



Salebin taklit ve tağşişinin belirlenmesinde kullanılabilir hızlı analiz yöntem(ler)inin geliştirilmesi

Program Kodu: 1003

Proje No: 115O058

Proje Yürütücüsü:

Doç. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ

Arastirmacilar:

Prof. Dr. Durmuş ÖZDEMİR

Dr. Öğr. Üyesi Barçın KARAKAŞ BUDAK

Dr. Öğr. Üyesi Cevdet GÜMÜŞ

Dr. Serpil KILIÇ

Danisman:

Prof. Dr. Ekrem SEZİK

Bursiyerler:

Ayşe Kevser BİLGİN

Onur BASANÇELEBİ

Gün Deniz AKKOÇ

AGUSTOS 2018

ANTALYA

ÖNSÖZ

Salep, ticari ölçekte yetiştiriciliği yapılamayan, doğadan toplanarak çeşitli işlemler sonrasında toz formda elde edilen ve yüksek fiyatlarla tüketiciye sunulan bir gıda katkı maddesidir. Toz salepte bileşimin büyük bir bölümü glikomannanlar ve nişasta gibi polisakkarit yapısındaki bileşiklerden oluşmaktadır. Bu sebeple de benzer kimyasal yapıya sahip ucuz ve kolay bulunabilir toz gıda maddeleriyle rahatlıkla taklit ve tağşiş edilebilmektedir. Diğer taraftan, salebin herhangi bir formda yurtdışına çıkarılması kanunen yasaklanmış olmasına rağmen, ülkemizden önemli düzeylerde salebin yurtdışına çıkarıldığına yönelik bulgular mevcuttur. Ayrıca, piyasada “salep” ibaresiyle satışa çıkarılan ürünün içeriğinde salep bulunması halinde miktarının da etikette beyanı gerekmekte iken, bir toz ürünün salep olup olmadığını ve/veya hangi oranda salep ihtiva ettiğini ölçebilen bir analiz yöntemi mevcut değildir. Bu belirtilen sebeplerle değişik ürünlerde salebin bulunup bulunmadığını ortaya koyabilecek analitik yöntemlere gıda endüstrisinde, gıda kontrolü ile yetkili kurum ve kuruluşlarda ve de ihracat birimlerinde ihtiyaç duyulmaktadır.

TÜBİTAK tarafından 115O058 numaralı proje numarası ile desteklenen bu proje kapsamında, toz salep ürününün taklit ve tağşiş durumlarının belirlenebilmesinde kullanılmak üzere yenilikçi, hızlı, güvenilir ve ekonomik analiz yöntemlerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Belirtilen amaca ulaşabilmek için, ülkemizin farklı bölgelerinden toplanarak hazırlanan salep örnekleri ile salebin taklit ve tağşiş edilmesinde kullanılması muhtemel maddeler tedarik edilerek enzimatik ve aletsel yöntemlerle analiz edilmişlerdir. Elde edilen sonuçlar, istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve önemli bulunan parametreler üzerinden salep ve taklit/tağşiş maddeleri arasındaki ayırmada belirleyici olan yöntemler tespit edilmiştir.

Proje çalışmalarımız sırasında engin bilgi ve tecrübesi ile bizleri yönlendiren ve orkideler konusunda ülkemizde ilk akla gelen isim olan sayın Prof. Dr. Ekrem SEZİK hocamıza, analizlerin gerçekleştirilmesi sürecinde özverili çalışmaları ve gayretleri nedenleri ile Akdeniz Üniversitesi Gıda Güvenliği ve Tarımsal Araştırmalar Merkezi teknik personellerinden Murat KILIÇ, Timur TONGUR, Taner ERKAYMAZ, Fatih PERİNÇEK ve İ. Burak ÇAM'a sonsuz şükran ve teşekkürlerimizi sunarız.

Projeden elde edilen sonuçlar bilim çevrelerinin yanı sıra salep ticareti ile uğraşan kuruluşların, salep içerikli ürünleri toplu olarak tedarik etmek durumunda olan işletmecilerin ve gıda analizleri yapan merkezlerin hizmetine sunulmaktadır. Bununla birlikte, yeterli mevzuat altyapısı oluşturulduktan sonra, geliştirilen yöntemlerin yasal yaptırımların uygulanmasını sağlayan kamu kuruluşlarının da (Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü. Gümrükler Muhafaza Genel Müdürlüğü gibi) faydalanabileceği yaygınlaştırılabilir analiz yöntem(ler)i olarak kullanılabilmesi ümit edilmektedir.



İÇİNDEKİLER

| | |
|--|----|
| ÖNSÖZ | ii |
| TABLolar LİSTESİ | 1 |
| ŞEKİLLER LİSTESİ | 3 |
| ÖZET..... | 6 |
| ABSTRACT | 8 |
| 1. GİRİŞ | 10 |
| 2. LİTERATÜR ÖZETİ | 11 |
| 2.1. Salep; genel bilgiler ve mevcut durum | 11 |
| 2.2. Gıda maddelerinde taklit ve tağşişin tespiti ve kullanılan teknikler | 23 |
| 2.3. Taklit ve tağşişin belirlenmesinde yöntem geliştirme çalışmaları | 28 |
| 3. GEREÇ ve YÖNTEM..... | 36 |
| 3.1. Analizlerde kullanılan kimyasal ve sarf malzemeleri | 36 |
| 3.2. Salep örneklerinin toplanması | 37 |
| 3.3. Yardımcı madde, katkı maddesi ve taklit / tağşiş materyallerinin toplanması | 39 |
| 3.4. Salep ve araştırma konusu diğer materyallerin ön hazırlık çalışmaları | 39 |
| 3.5. Homojen toz karışımların oluşturulması | 42 |
| 3.6. Piyasa izleme çalışmaları..... | 43 |
| 3.7. Taklit ve tağşişin belirlenmesinde kullanılan yöntemler | 46 |
| 3.7.1. Temel analizler | 47 |
| 3.7.1.1. Rutubet miktarı | 47 |
| 3.7.1.2. Kül miktarları | 47 |
| 3.7.1.3. %10 HCl'de çözünmeyen kül miktarları | 48 |
| 3.7.1.4. Protein miktarları | 48 |
| 3.7.1.5. İndirgen şeker düzeyleri | 48 |
| 3.7.2. Enzimatik analizler | 48 |
| 3.7.2.1. Glikomannan düzeylerinin belirlenmesi | 48 |
| 3.7.2.2. Nişasta miktarlarının belirlenmesi | 51 |
| 3.7.3. Aletsel analizler | 52 |
| 3.7.3.1. Elementel bileşim | 52 |
| 3.7.3.2. Kızılötesi (IR) spektrumu analizi | 53 |
| 3.7.3.3. İzotop oranları analizleri | 53 |



| | |
|--|-----|
| 3.7.3.4. Kalorimetrik ölçümler..... | 54 |
| 3.7.3.5. Karbonhidrat bileşikler analizleri | 54 |
| 3.7.3.6. Organik asit bileşikler analizleri..... | 54 |
| 3.7.3.7. Amino asit bileşikler analizleri | 55 |
| 3.7.4. Yöntemlerin doğrulanması..... | 56 |
| 3.7.5. İstatistiksel ve kemometrik değerlendirmeler | 57 |
| 4. BULGULAR ve TARTIŞMA..... | 59 |
| 4.1. Temel analizler | 59 |
| 4.2. Enzimatik analizler | 63 |
| 4.3. Elementel bileşim | 67 |
| 4.4. Kızılötesi (IR) spektrumu analizi | 76 |
| 4.5. İzotop oranları | 78 |
| 4.6. Kalorimetrik ölçümler..... | 85 |
| 4.7. Karbonhidrat bileşikler analizleri | 88 |
| 4.8. Organik asit bileşikler | 91 |
| 4.9. Amino asit bileşikler..... | 95 |
| 4.10. Taklit ve taşıyıcı tespitine yönelik en uygun kemometrik ve aletsel yöntem birleşimlerinin belirlenmesi..... | 102 |
| 4.10.1. Yönlendirmesiz Sınıflandırma Çalışmaları | 102 |
| 4.10.2. Yönlendirmeli Sınıflandırma Çalışmaları | 103 |
| 4.11. Homojen toz karışımlardaki salep miktarlarının belirlenebilmesine yönelik çalışmalar | 108 |
| 4.12. Salep miktarlarının belirlenebilmesinde yöntem birleşimleri..... | 119 |
| 4.13. Çok değişkenli ölçümleme ve modelleme çalışmaları | 122 |
| 4.13.1. PLS ile Modelleme Çalışması..... | 123 |
| 4.13.2. GILS Modelleme Çalışması..... | 125 |
| 4.14. Piyasa izleme çalışmaları | 129 |
| 5. SONUÇ..... | 132 |
| 6. KAYNAKLAR | 140 |
| 7. EKLER | 148 |
| Ek 1. FTIR spektrum kütüphanesi oluşturmak için kullanılan reçete bileşimleri | 148 |

TABLULAR LİSTESİ

| | |
|--|----|
| Tablo 1. Ticari saleplerde katkı maddesi olarak kullanılan, taklit ve tağşiş amaçlı katılan bazı materyaller ve yaklaşık fiyatları | 23 |
| Tablo 2. Proje çalışmalarında kullanılan alet ve ekipmanlar | 37 |
| Tablo 3. Proje kapsamında salep numuneleri toplanan bölgeler | 38 |
| Tablo 4. Proje kapsamında izlenen taklit, tağşiş ve katkı (TTK) maddeleri | 39 |
| Tablo 5. Farklı gözenek çapına sahip eleklerden geçirilen salep numuneleri oranları | 41 |
| Tablo 6. Farklı oranlarda (%0-%10) salep içeren homojen toz karışımları bileşimleri | 42 |
| Tablo 7. Farklı oranlarda (%0-%100) salep içeren homojen toz karışımları bileşimleri | 43 |
| Tablo 8. Piyasa izleme çalışmaları kapsamında tedarik edilen salep içecek tozu örnekleri .. | 43 |
| Tablo 9. Piyasa izleme çalışmaları kapsamında gerçek salep adı altında satışa sunulan ürün kodları | 45 |
| Tablo 10. Kullanılan analitik yöntemler | 46 |
| Tablo 11. Karl Fischer titrasyon cihazı çalışma koşulları | 47 |
| Tablo 12. ICP-MS çalışma şartları | 52 |
| Tablo 13. IR-MS çalışma şartları | 53 |
| Tablo 14. HPLC-RID çalışma koşulları | 54 |
| Tablo 15. ORBITRAP-MS çalışma koşulları | 55 |
| Tablo 16. Organik asitlerin kütle değerleri | 55 |
| Tablo 17. LC-MS/MS çalışma koşulları | 56 |
| Tablo 18. Temel analizler tekrarlanabilirlik sonuçları | 59 |
| Tablo 19. İndirgen şeker bileşikleri analizlerine ait bazı yöntem doğrulama sonuçları | 59 |
| Tablo 20. TTK maddeleri temel analizlere ait istatistiksel değerlendirme tablosu | 62 |
| Tablo 21. Enzimatik analizler tekrarlanabilirlik sonuçları | 63 |
| Tablo 22. Farklı partikül çapına sahip salep numunelerinin glikomannan düzeyleri | 64 |
| Tablo 23. TTK maddeleri enzimatik analizlere ait istatistiksel değerlendirme tablosu | 65 |
| Tablo 24. Elementel analizlere ait bazı yöntem doğrulama sonuçları | 67 |
| Tablo 25. Elementel analizlere ait geri kazanım verileri | 68 |
| Tablo 26. TTK maddeleri elementel analizlere ait istatistiksel değerlendirme tablosu | 75 |
| Tablo 27. İzotop oranları analizleri tekrarlanabilirlik sonuçları | 78 |
| Tablo 28. TTK maddeleri izotop analizlerine ait istatistiksel değerlendirme tablosu | 82 |
| Tablo 29. Kalorimetrik ölçümler tekrarlanabilirlik sonuçları | 85 |
| Tablo 30. TTK maddeleri kalorimetrik analizlere ait istatistiksel değerlendirme tablosu | 87 |
| Tablo 31. Karbonhidrat bileşikleri analizlerine ait bazı yöntem doğrulama sonuçları | 88 |

| | |
|---|-----|
| Tablo 32. TTK maddeleri karbonhidrat bileşikleri analizlerine ait istatistiksel değerlendirme tablosu | 90 |
| Tablo 33. Organik asit bileşikleri analizlerine ait bazı yöntem doğrulama sonuçları | 91 |
| Tablo 34. TTK maddeleri organik asit bileşikleri analizlerine ait istatistiksel değerlendirme tablosu | 94 |
| Tablo 35. Amino asit bileşikleri analizlerine ait bazı yöntem doğrulama sonuçları | 95 |
| Tablo 36. TTK maddeleri amino asit bileşikleri analizlerine ait istatistiksel değerlendirme .. | 100 |
| Tablo 37. Analiz grupları ile PLS-DA kullanılarak yapılan modelleme çalışmalarının başarı oranları | 106 |
| Tablo 38. Her bir analiz grubuna ait kimyasal analiz sonuçlarının sınıflandırmaya katkılarını gösterir katsayılar | 107 |
| Tablo 39. Ticari salep içecek tozu reçetelerine ilave edilen salep miktarları ile enzimatik bileşikler arasındaki korelasyon | 108 |
| Tablo 40. Ticari salep içecek tozu reçetelerine ilave edilen salep miktarları ile elementler arasındaki korelasyon | 110 |
| Tablo 41. Ticari salep içecek tozu reçetelerine ilave edilen salep miktarları ile izotop oranları arasındaki korelasyon | 112 |
| Tablo 42. Ticari salep içecek tozu reçetelerine ilave edilen salep miktarları ile organik asit bileşikleri arasındaki korelasyon | 114 |
| Tablo 43. Ticari salep içecek tozu reçetelerine ilave edilen salep miktarları ile amino asitler arasındaki korelasyon | 116 |
| Tablo 44. Salep ve TTK maddeleri ayırımına katkı sağlayan parametrelere ait mutlak korelasyon katsayıları | 120 |
| Tablo 45. PLS ve ILS modellerine ait tahmin ve mutlak hata düzeyleri | 121 |
| Tablo 46. PLS ve ILS modelleri başarı karėılařtırma tablosu | 121 |
| Tablo 47. GILS ve PLS modellerinin ölçümlene ve doğrulama seti tahmin başarıları | 128 |
| Tablo 48. Piyasa izleme çalışmaları kapsamında izlenen salep toz içecek numunelerinde glikomannan düzeylerine göre tespit edilen salep oranları | 129 |
| Tablo 49. Piyasa izleme çalışmaları kapsamında gerçek salep adı altında satışa sunulan ürünler ve tespit edilen salep oranları | 131 |

ŞEKİLLER LİSTESİ

| | |
|--|----|
| Şekil 1. <i>Orchis coriophora</i> türüne ait çiçekli bitki örnekleri ve ülkemizde coğrafi yayılışı | 12 |
| Şekil 2. <i>Orchis laxiflora</i> türüne ait çiçekli bitki örnekleri ve ülkemizde coğrafi yayılışı | 13 |
| Şekil 3. <i>Serapias vomeracea</i> ssp. <i>orientalis</i> türüne ait çiçekli bitki örnekleri ve ülkemizde coğrafi yayılışı | 14 |
| Şekil 4. <i>Dactylorhiza romana</i> türüne ait çiçekli bitki örnekleri ve ülkemizde coğrafi yayılışı .. | 15 |
| Şekil 5. <i>Anacamptis pyramidalis</i> türüne ait çiçekli bitki örnekleri ve ülkemizde coğrafi yayılışı | 16 |
| Şekil 6. <i>Orchis purpurea</i> türüne ait çiçekli bitki örnekleri ve ülkemizde coğrafi yayılışı | 17 |
| Şekil 7. <i>Orchis sancta</i> türüne ait çiçekli bitki örnekleri ve ülkemizde coğrafi yayılışı) | 18 |
| Şekil 8. <i>Orchis anatolica</i> türüne ait çiçekli bitki örnekleri ve ülkemizde coğrafi yayılışı | 19 |
| Şekil 9. Gıda analizlerinde kullanılabilir 'parmak izi yöntem' geliştirilmesinde izlenebilecek işlem basamakları | 28 |
| Şekil 10. PLS modellemelerinde LV sayısı seçiminde kullanılan LOOCV'nin akış şeması | 31 |
| Şekil 11. Basitleştirilmiş Genetik Algoritma akış şeması | 32 |
| Şekil 12. Yaş yumru olarak toplanan salep örnekleri | 38 |
| Şekil 13. Kaynatma öncesi temizlenmiş salep yumrusu örnekleri, kaynatma işlemi ve kaynatma sonrası güneşte bekletme işlemleri..... | 40 |
| Şekil 14. Kurutulmuş ve öğütülmüş salep örnekleri..... | 41 |
| Şekil 15. Kül analizi sıcaklık süre grafiği..... | 47 |
| Şekil 16. Veri sunumunda kullanılan grafik açıklamaları | 57 |
| Şekil 17. Salep numunelerinin temel analizlerine ait sonuçlar | 60 |
| Şekil 18. TTK maddeleri temel analizlerine ait sonuçlar | 61 |
| Şekil 19. Salep örneklerine ait enzimatik analiz sonuçları | 63 |
| Şekil 20. TTK maddelerine ait enzimatik analiz sonuçları | 65 |
| Şekil 21. Enzimatik analiz sonuçlarına uygulanan iki boyutlu saçılma grafiği | 66 |
| Şekil 22. Farklı bölgelerden temin edilen salep numunelerinde tespit edilen elementel bileşimler | 71 |
| Şekil 23. TTK maddelerinde tespit edilen elementel bileşimler..... | 74 |
| Şekil 24. Proje kapsamında toplanılan salep numunelerine ait FTIR spektrumları | 77 |
| Şekil 25. Salep taklit ve taşışında kullanılan maddelere ait FTIR spektrumları | 77 |
| Şekil 26. Salep örneklerine ait izotopik analiz sonuçları | 79 |
| Şekil 27. Salep numuneleri izotop oranları arası iki boyutlu saçılma grafikleri..... | 80 |
| Şekil 28. TTK maddelerine ait izotopik analiz sonuçları | 81 |
| Şekil 29. Tüm numunelerin izotopik oran değerlerine ait iki boyutlu saçılma grafikleri | 84 |
| Şekil 30. Kalorimetrik analiz bulguları | 86 |

| | |
|--|-----|
| Şekil 31. Salep numuneleri ve TTK maddelerinde tespit edilen karbonhidrat bileşikleri | 89 |
| Şekil 32. Salep numunelerinde tespit edilen organik asit bileşikleri..... | 92 |
| Şekil 33. TTK maddelerinde tespit edilen organik asitler | 93 |
| Şekil 34. Salep numunelerine ait esansiyel amino asit sonuçları | 96 |
| Şekil 35. Salep numunelerine ait esansiyel olmayan amino asit sonuçları..... | 97 |
| Şekil 36. TTK maddelerine ait esansiyel amino asit sonuçları | 98 |
| Şekil 37. TTK maddelerine ait esansiyel olmayan amino asit sonuçları | 99 |
| Şekil 38. PCA analizi sonuçları | 102 |
| Şekil 39. Çapraz doğrulama ile elde edilen yanlış sınıflandırma yüzdesine karşılık bileşen sayısı sonuçları | 103 |
| Şekil 40. Kurulan nihai PLS-DA modeli ile model setinin tahmin sonuçları | 104 |
| Şekil 41. Kurulan nihai PLS-DA modeli ile doğrulama setinin tahmin sonuçları..... | 104 |
| Şekil 42. Hatalı örnekler ayıklandıktan sonra elde edilen PLS-DA modeli ile doğrulama tahminleri grafiği..... | 105 |
| Şekil 43. PLS-DA modelinden elde edilen, analiz adlarına karşı sınıflandırmada kullanılan katsayılar grafiği | 106 |
| Şekil 44. Ticari salep içecek tozu reçetelerine ilave edilen salep miktarları ile karışımdaki glikomannan düzeyleri arasındaki doğrusallık..... | 109 |
| Şekil 45. Ticari salep içecek tozu reçetelerine ilave edilen salep miktarları ile karışımdaki nişasta düzeyleri arasındaki doğrusallık..... | 109 |
| Şekil 46. Ticari salep içecek tozu reçetelerine ilave edilen salep miktarları ile karışımdaki Mn ve Co düzeyleri arasındaki doğrusallık..... | 111 |
| Şekil 47. Ticari salep içecek tozu reçetelerine ilave edilen salep miktarları (%0-%100) ile karışımdaki Fe, Mn, Cu, Ba, Co ve Ga oranları arasındaki doğrusallık..... | 112 |
| Şekil 48. Ticari salep içecek tozu reçetelerine ilave edilen salep miktarları (%0-%10) ile karışımdaki $^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ve $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ oranları arasındaki doğrusallık | 113 |
| Şekil 49. Ticari salep içecek tozu reçetelerine ilave edilen salep miktarları (%0-%100) ile karışımdaki $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ve $^1\text{H}/^2\text{H}$ oranları arasındaki doğrusallık | 114 |
| Şekil 50. Ticari salep içecek tozu reçetelerine ilave edilen salep miktarları (%0-%10) ile karışımdaki malik asit düzeyleri arasındaki doğrusallık | 115 |
| Şekil 51. Ticari salep içecek tozu reçetelerine ilave edilen salep miktarları (%0-%100) ile karışımdaki malik asit ve fumarik asit düzeyleri arasındaki doğrusallık..... | 115 |
| Şekil 52. Ticari salep içecek tozu reçetelerine ilave edilen salep miktarları (%0-%10) ile karışımdaki lizin, histidin, arjinin, prolin, valin, tirozin, lösin + izölösin ve fenilalanin düzeyleri arasındaki doğrusallık | 117 |

| | |
|---|-----|
| Şekil 53. Ticari salep içecek tozu reçetelerine ilave edilen salep miktarları (%0-%100) ile karışımındaki lizin, histidin, arjinin, aspartik A., prolin, treonin, glutamik A., prolin, valin, metiyonin, tirozin, lösin + izolösin ve fenilalanin düzeyleri arasındaki doğrusallık..... | 119 |
| Şekil 54. LOOCV ile edilmiş LV sayısına karşı PRESS değerleri grafiği | 123 |
| Şekil 55. Gerçek salep konsantrasyonlarına karşı PLS tahminleri grafiği | 124 |
| Şekil 56. Ölçümlene ve doğrulama seti PLS tahmini artıkları grafiği | 125 |
| Şekil 57. Gerçek salep konsantrasyonlarına karşı GILS tahminleri grafiği | 126 |
| Şekil 58. Ölçümlene ve doğrulama seti GILS tahmini artıkları grafiği..... | 126 |
| Şekil 59. GILS modelinde dalga sayılarının seçilim frekansının tüm örneklerin ortalama spektrumu üzerinde gösterimi..... | 127 |
| Şekil 60. Glukomannan analizi iş akış şeması | 138 |
| Şekil 61. Amino asit analizi iş akış şeması | 139 |

ÖZET

Salebin taklit ve tağşişinin belirlenmesinde kullanılabilecek hızlı analiz yöntem(ler)inin geliştirilmesi

Bu projenin amacı, toz salep ürününün hakiki olup olmadığının ortaya konulmasında veya tağşişe uğratılıp uğratılmadığının belirlenmesinde kullanılabilecek yenilikçi, hızlı, güvenilir ve ekonomik analiz yöntem(ler)inin geliştirilmesidir.

Bu kapsamda, Türkiye'nin farklı bölgelerindeki (Kuzey Anadolu, Güneybatı Anadolu, Güney Anadolu, Güneydoğu Anadolu ve Doğu Anadolu) salep toplama alanlarından salep yumruları toplanılmış ve tekniğine uygun olarak hazırlanarak gerçek olduğundan emin olunan salep tozları elde edilmiştir. Taklit ve tağşiş materyalleri ise gamlar (guar gam, gum arabik, keçiboynuzu gamı, konyak gam), nişastalar (buğday nişastası, mısır nişastası, patates nişastası, pirinç nişastası), ticari katkılar (şeker, yağsız süt tozu, vanilya, tarçın) ve diğer taklit/tağşiş maddeleri (öğütülmüş makarna, öğütülmüş pirinç, öğütülmüş bulgur, buğday unu, sıvı ve katı salep aroması, karboksimetil selüloz) olmak üzere dört ana grupta sınıflandırılmış ve gruplardaki malzemelerin her biri üç farklı tedarikçiden temin edilmiştir. Hazırlanan gerçek salep tozları ve taklit/tağşiş maddeleri temel analizler (rutubet, kül, protein ve indirgen şeker), enzimatik analizler (glikomannan ve toplam nişasta) ve aletsel analizler (elementel bileşimler, kızılötesi spektrumlar, izotop oranları, karbonhidrat bileşikleri, organik asit bileşikleri ve amino asit bileşikleri) açısından analizlere tabi tutulmuş ve elde edilen sonuçlar kemometrik yöntemlerle değerlendirilerek incelenen parametrelerin salep ve taklit/tağşiş maddeleri arasındaki ayrımındaki doğru tahmin oranları belirlenmiştir.

Salep ile taklit ve tağşiş maddeleri arasındaki ayrımın belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen tüm yöntemler değerlendirildiğinde; doğru tahmin oranları açısından sırasıyla amino asit (%92,3), elementel (%89,7), enzimatik (%84,6), izotop (%79,5), karbonhidrat (%72,4), organik asit (%69,2) ve temel bileşenler (%69,2) analizlerinin önemli olduğu sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte, hızlı ve ekonomik bir yöntemin geliştirilmesi için FTIR cihazı kullanılarak çok değişkenli ölçümlenme ve modelleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Belirtilen cihazla yapılan çalışmalarda, Genetik Algoritma Tabanlı Ters En Küçük Kareler (GILS) yönteminin daha düşük kalibrasyon ve tahmin hatası (SEC ve SEP) değerleri sağladığı ve artıkların daha dar bir aralıkta dağıldığı görülmüş olup, bu modelle yapılan çalışmalarda bileşiminde salep oranı bilinmeyen toz numunelerdeki salep miktarlarının $\pm 5,76$ hata payı ile ölçülebileceği tespit edilmiştir.

Projenin sonraki aşamasında ayırım konusunda önemli bulunan yöntemler %0-%100 ve %0-%10 aralıklarında farklı oranlarda salep içerecek şekilde hazırlanmış karışımlarla denenerek yöntemlerdeki parametrelerin hangi düzeyde tespit sağlayabildiği ve tekrarlanabilirliği araştırılmıştır. Bu çalışmalarda, enzimatik analiz parametrelerinden glikomannan ve toplam nişastanın, elementel bileşenlerden demir, mangan, bakır, kobalt ve galyumun; izotop bileşenlerinden ¹³C/¹²C oranının, organik asit bileşenlerinden malik ve fumarik asitlerin ve aminoasit bileşiklerinden ise sistein hariç tüm aminoasit parametrelerinin %0-%100 oranlarındaki salep miktarı ile önemli düzeyde doğrusal sonuçlar ürettiği belirlenmiştir. Ayrıca, %0-%10 aralığında gerçek salep içeren reçetelerde ise enzimatik analiz parametrelerinden glikomannan ve toplam nişastanın, elementel bileşenlerden mangan ve kobaltın, organik asit bileşenlerinden malik asitin ve aminoasit bileşiklerinden ise lizin, histidin, arjinin, prolin, valin, tirozin, lösin + izölösün ve fenilalanin parametrelerine ait değerlerin karışımdaki gerçek salep oranı ile yüksek düzeyde ($r^2 > 0,90$) doğrusal olduğu belirlenmiştir. Salep ile taklit tağşiş maddeleri arası ayırmada öne çıkan en önemli parametre glikomannan olarak bulunmasına rağmen, gerçekleştirilen çok değişkenli regresyon analizi sonuçlarına göre; fenilalanin, lösin+izölösün, lizin, arjinin ve histidin birleşimin salep oranı bilinmeyen örneklerde kritik olduğu sonucuna varılmıştır. Belirtilen kombinasyonun regresyon formülünün kullanılması durumunda ise karışımdaki salep oranının $\pm\%1$ hassasiyetle belirlenebileceği mümkün görülmüştür.

Elde edilen bulgular; FTIR tekniği kullanılarak geliştirilen yöntemin toz formdaki saf salebin taklit tağşişin tanımlanmasında kullanılabileceğini göstermektedir. Diğer taraftan, toz gıdalara ilave edilen düşük miktardaki salebin belirlenmesinde karışımın glikomannan düzeyinin veya fenilalanin, lösin+izölösün, lizin, arjinin ve histidin birleşimlerinin incelenmesinin önem arz ettiğini göstermektedir.

Proje sonucunda, ülkemizin profilini yansıtan salep numunelerinin enzimatik ve kimyasal analizleri gerçekleştirilerek kapsamlı bileşimleri açığa çıkarıldığı gibi, salep ve diğer taklit tağşiş maddeleri arasında önemli bulunan parametreler belirlenmiştir. Bu çerçevede geliştirilen yöntemlerin ilgili birimler tarafından kullanılması ile salebin yurt dışına çıkışının önlenmesi ve böylelikle endemik olan veya olmayan Türkiye orkidelerinin korunmasına katkılar sağlanması ümit edilmektedir.

ANAHTAR KELİMELER: Gıda katkı maddesi, salep, taklit ve tağşiş, yöntem, kemometri.

ABSTRACT

Development of fast analytical method(s) for the determination of salep and its adulteration

The aim of this project is to develop innovative, fast, reliable and economical method(s) of analysis which can be used in determining salep authenticity or adulteration.

In this context, salep tubers were collected from different salep gathering regions of Turkey (North Anatolia, Southwest Anatolia, South Anatolia, Southeast Anatolia and East Anatolia) and authentic salep powder was obtained by applying traditional processing techniques. Adulteration materials were classified in four major groups as gums (guar gum, gum arabic, locust bean gum, konjac gum), starches (wheat starch, corn starch, potato starch, rice starch), commercial additives (sugar, skimmed milk powder, vanilla, cinnamon) and other adulteration materials (milled pasta, milled rice, milled bulgur, wheat flour, liquid and solid salep aroma, carboxymethyl cellulose) and samples of each of these materials were obtained from three different suppliers. Prepared salep powders and adulteration materials were subjected to proximate analysis (moisture, ash, protein and reducing sugar), enzymatic analyses (glucomannan and total starch) and instrumental analyses (elemental compositions, infrared spectrums, isotope ratios, carbohydrate compositions, organic acid compositions and amino acid compositions). Chemometric methods were applied to evaluate the results and indicative methods for discrimination between salep and adulteration materials were determined.

An overall assessment of the analysis methods showed that methods of analysis that were indicative of significant trueness were amino acid composition (92.3%), elemental composition, (89.7%), enzymatic (84.6%), isotope ratio (79.5%), carbohydrates (72.4%), organic acids composition (69.2%) and proximate composition (69.2%). Additionally, multivariate measurement and modelling studies were performed using the FTIR instrument for the development of a fast and economic assay method. In these studies, it was observed that the Genetic Inverse Least Squares (GILS) methodology resulted in lower Standard Error of calibration and prediction (SEC and SEP) values with residuals scattered in a narrower interval. The quantity of salep in blind powder samples analyzed using this method could be determined with an error margin of $\pm 5.76\%$.

In the next part of the study, the methods found significant for detection were evaluated using powder samples spiked with salep in the range 0-100% and 0-10% in order to investigate the detection limits and reproducibility. In this study, glucomannan and starch analyses with enzymatic assays, iron, manganese, copper, cobalt and gallium composition as determined with the elemental analysis, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio determined by isotopic analysis, malic and fumaric acid contents determined in the organic acids assay and all amino acids other than cysteine as determined with the amino acids assay were significantly effective in producing linear correlation with salep concentrations in the range 0-100%. On the other hand, it was determined that glucomannan and starch contents as determined with the enzymatic assays, manganese and cobalt determined by elemental analysis, malic acids among organic acids, and lysine, histidine, arginine, proline, valine, tyrosine, leucine + isoleucine and phenylalanine among the amino acids were determined as parameters which resulted in high linear correlation ($r^2 > 0.90$) with true salep levels at inclusion levels 0-10%. Although, the parameter that was most prominent in salep detection was glucomannan content, the multivariate regression analysis showed that the combinatory determination of phenylalanine, leucine+isoleucine, lysine, arginine and histidine were found to be of critical importance for the determination of salep in blind samples. Using the regression equation of the combinatory method, salep concentration could be determined with sensitivity in the range of 1%.

Results obtained show that the method developed using the FTIR technology could be applied in determination of authenticity of pure salep in powder form. On the other hand, determination of glucomannan content or the combinatory method of phenylalanine, leucine+isoleucine, lysine, arginine and histidine contents of the mixture is important for the quantification of low amounts of salep addition to powder foods may be detected and quantified based on the

As a result of this project, not only was a detailed compositional evaluation of salep samples representative of Turkish salep were performed, but also parameters applicable in discrimination of salep from other possible contaminant substances were determined. In this context, it is hoped that the methods developed as an outcome of this project can be utilized by concerned parties for the detection of salep, which may in turn contribute to prevention of the export of salep and the protection of endemic and non-endemic orchids of Turkey.

KEYWORDS: Food additive, salep, adulteration, method, chemometry.

1. GİRİŞ

Salep, doğal koşullarda yetişen bazı karasal orkidelerin yumrularından elde edilen, ihracatı tamamen yasak olan ve gördüğü taleple ilişkili olarak da değerine göre hiçte yüksek sayılmaması gereken fiyatlardan alıcı bulabilen bir üründür. İnternet üzerinden ve farklı illerdeki aktarlardan elde edilen saf toz salep fiyatlarının kilogram başına 350-450 TL arasında değiştiği belirlenmiştir. Salep doğal yapısı itibarı ile büyük oranda glikomannan ve bir miktarda nişastadan oluşmakta olup, kolaylıkla taklit ve tağşiş edilebilmektedir. Bu amaç için en yaygın kullanılan yöntemler, öğütülmüş salebe nişasta, öğütülmüş makarna, bulgur veya pirinç gibi maddelerin karıştırılmasıdır. Ayrıca, salep içeceği olarak satılan ticari toz karışımlarda etiket içeriğinde salep ibaresi yer almakla birlikte, bileşimlerinde yağsız süttozu, şeker, çözünebilir nişasta ve gamlar (guar, konyak, keçiyoynuzu vb.) gibi pek çok katıştırma maddesi de bulunmaktadır. Bu gibi ürünlerin gerçekten salep içerip içermediğini ortaya koyabilecek valide edilmiş analiz yöntemlerinin geliştirilmesi gerekmektedir.

Hakiki salebin elde edilmesinde kullanılan orkide türlerinin ticari yetiştiriciliğinin henüz istenilen düzeye ulaşmamasından dolayı fiyatının yüksek olması, taklit ve tağşiş edilebilmesinin kolay olması, tüketici tarafından taklit ve tağşişin fark edilmesinin zor olması ve en önemlisi de hâlihazırda taklit ve tağşişi tespit edebilecek geçerli ve hızlı bir yöntemin bulunmaması, bu değerli üründe tağşiş yapılmasını cazip kılabilen ve neticede tüketici mağdur edilmektedir. Aynı zamanda, ülkemiz gıda mevzuatında salebin kimyasal bileşimine yönelik sadece "Türk Gıda Kodeksi Baharat Tebliği"nde birkaç kriter mevcut olup, bu kriterler yabancı madde bulunmaması, rutubet (%), toplam kül (%) ve %10 HCl'de çözünmeyen kül (%) parametrelerini içermektedir. Belirtilen parametreler haricinde mevzuatımızda hâlihazırda başka bir düzenleme mevcut değildir. Aynı tebliğde salebin "Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği (Resmî Gazete 10.04.2003 28614)"ne tabii olduğu da belirtilmektedir. Diğer taraftan, ülkemizde yumru, toz ve diğer formlarda salep ihracatı doğal kaynakların korunması amacıyla kanunen yasaklanmasına rağmen, artan miktarlarda toplanılmaktadır. Gerekli olduğu durumlarda bir örneğin bileşiminde salep bulunduğunu ortaya koyabilecek tekrarlanabilir, yaygınlaştırılabilir ve hızlı çalışan analiz yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çerçevede yapılan değerlendirmelerde herhangi bir toz ürünün salep olup olmadığını veya hangi oranda salep içerdiğini ortaya koyabilecek bir yöntem bulunmadığı belirlenmiştir.

Bu proje kapsamında, salep taklit ve tağşişinin belirlenmesi konusundaki temel yaklaşım; araştırılan gıda maddesinin ve taklit ve tağşişe konu olan maddelerin kimyasal bileşimlerinin açığa çıkarılması, farklılığa neden olan etkili maddelerin belirlenmesi, etkili maddeler üzerinden tağşişin ayrıntısını verebilen yöntemin geliştirilmesi ve geliştirilen yöntemin valide edilmesi olarak planlanmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Salep; genel bilgiler ve mevcut durum

Salep, Orchidaceae familyasına ait birçok türün toprak altı yumrularının belirli işlemlerden geçirilmesi ile elde edilen toz bir üründür. Salep sadece yumrulu orkidelerden elde edilebiliyor olsa da tüm yumrulu cinsler bu amaç için uygun değildir. Dünyada yaklaşık 800 orkide cinsi ve bu cinslerin altında da 20 bin türün olduğu bildirilmesine rağmen, ülkemizde 24 cins ve 90 kadar tür saptanmıştır ve bunlardan 8 cinse ait en az 30 orkide türü salep eldesi için değerlendirilmektedir (Sezik, 1984; Kasperek ve Grimm, 1999). Ülkemizde salep orkidelerinin yetişme ortamları genel hatları ile ormanlık, makilik, çayırılık, zeytinlik ve tarım alanları olmakla birlikte en yaygın yetiştiği bölgeler Kuzey Anadolu (Kastamonu, Sinop), Güney Anadolu (Muğla, Antalya, Silifke), Güneydoğu Anadolu, (Kahramanmaraş, Gaziantep, Hatay) ve Doğu Anadolu (Elazığ, Van, Muş, Bitlis) olarak belirtilmektedir. Pek çok araştırmacı tarafından yayınlanan ülkemizde orkidelerin doğal yayılışları ile ilgili çok sayıda araştırmaya ulaşmak mümkündür (Sezik, 1967; Sezik ve Özer, 1983; Sezik ve Özer, 1988; Sezik ve Baykal, 1991; Altan vd., 2007; Sezik vd., 2007; Aybeke vd., 2010). Bu konuda Türk salepleri ile ilgili ilk çalışma Ekrem Sezik tarafından “Türkiye’nin salepgilleri: Ticari salep çeşitleri ve özellikle Muğla salebi üzerine araştırmalar” isimli doktora tezi çalışması ile yapılan çalışmadır (Sezik, 1967). Farklı bölgelerde (Muğla, Kastamonu, Kahramanmaraş ve Antalya) salep elde edilmesinde bilhassa *Orchis* türlerinin (*Orchis anatolica*, *Orchis coriophora*, *Orchis italica*, *Orchis laxiflora*, *Orchis morio* vb), bunun yanında *Ophrys* ve *Serapias* türleri ile *Anacamptis pyramidalis*, *Dactylorhiza romana*, *Barlia robertiana* ve *Himantoglossum* türlerinin kullanıldığını belirtilmektedir (Sezik, 1984).

Ülkemizde salep elde edilmesinde kullanılan bazı orkide türlerinin morfolojik özellikleri, fotoğrafları ve ülkemizdeki coğrafi yayılışını gösterir bilgiler aşağıda sunulmuştur.

***Orchis coriophora* L.**

Bitki : 15-45 cm yükseklikte.

Yapraklar : Taban yapraklar 5-6 adeta kanallı, lanseolat; üst yapraklar sapı sarar.

Brakteler : Ovaryum kadar uzunlukta.

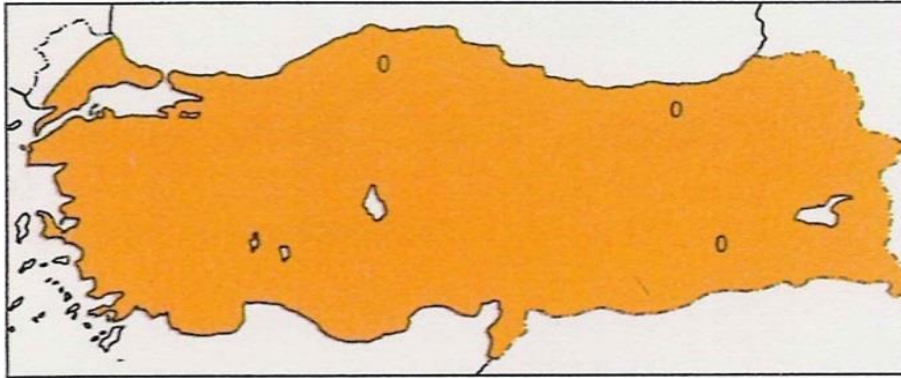
Çiçek durumu : Azçok sık silindirik spika. Çiçekler mat ya morumsu kırmızı renkli yeşil çizgili veya beyaz veya yeşilimsi beyaz renkli, kırmızı benekli.

Sepaller : Petallerle miğfer teşkil etmiş.

Labellum : 3 loplu, biraz içe bükük orta lop yan loplardan biraz daha uzun, yan loplarda düz dişli değil. Mahmuz ovaryumdan biraz kısa, aşağı doğru.

Yetiştirildiği yer : Taban suyu olan çayırarda ve biraz asidik topraklarda.

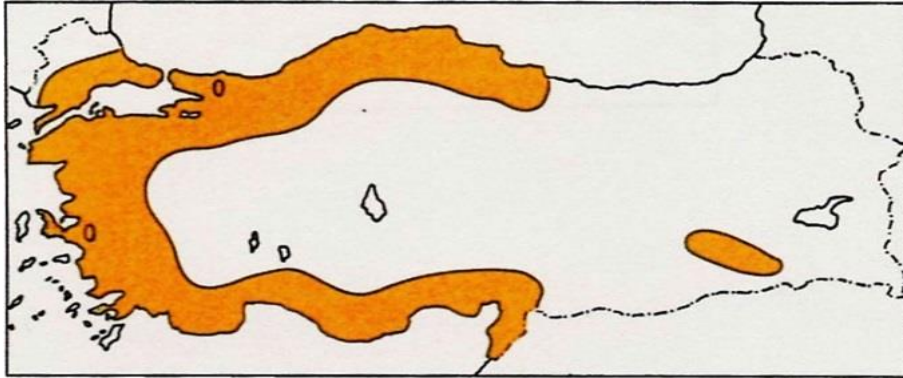
Çiçeklenme : Nisan sonu-Haziran.



Şekil 1. *Orchis coriophora* türüne ait çiçekli bitki örnekleri ve ülkemizde coğrafi yayılımı (Sezik, 1984; Gümüş, 2009)

***Orchis laxiflora* Lam.**

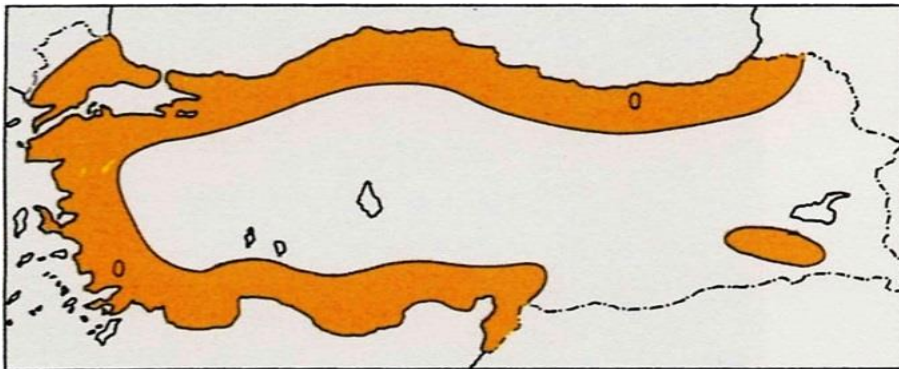
- Bitki** : 30-60 cm yükseklikte.
- Yapraklar** : 7-10, lanseolat, beneksiz.
- Brakteler** : Morumsu, ovaryumdan biraz kısa.
- Çiçek durumu** : Gevşek, 6-20 çiçekli. Çiçekler mor, kırmızı, nadiren pembe.
- Sepaller** : Lateral olanlar geriye doğru yayık.
- Petaller** : İçe doğru bükük, dorsal sepalle miğfer meydana getirmiş.
- Labelleum** : Hafif 3 loplu, orta kısmı beyazımsı ve beneksiz. Orta lop yok veya çok küçük, yan loplar geriye doğru bükülmüş, bu yüzden labellum katlanmış gibi görünür. Mahmuz ufki, bazen biraz aşağı doğru açta genişlemiş, ovaryumun yarısı kadar boyda.
- Yetiştği yer** : Nemli çayırlar, bataklıklar.
- Çiçeklenme** : Mayıs- Haziran



Şekil 2. *Orchis laxiflora* türüne ait çiçekli bitki örnekleri ve ülkemizde coğrafi yayılışı (Sezik, 1984; Gümüş, 2009)

Serapias vomeracea (Burm.fil.) Briq. ssp. ***orientalis*** Greuter.

- Bitki** :10-30 cm yükseklikte, gövde yeşil, üst kısımlara doğru kırmızımsı mor.
- Yapraklar** : 4-6, mavimsiden sarımsı yeşile kadar olan renklerde geniş lanseolat dışa doğru bükük.
- Brakteler** : Geniş lanseolat, çiçekleri geçen boyda mavimsi mordan gümüşü yeşile kadar değişik renklerde.
- Çiçek durumu** : Kısa, ovat, 3-6 çiçekli sık. Çiçekler büyük.
- Sepaller** : Petallerle beraber 20-30mm boda bir miğfer meydana getirmiş, uçta sivrilmiş, kurşuniden morumsuya kadar olan renklerde.
- Labellum** : Epikil geniş lanseolattan kordata kadar olan şekillerde, tabana yakın kısımda sık tüylü; sarımsı yeşil, kırmızımsı kahverengi veya koyu mor. Hipokilin 2 yan lopu yukarı kalkık, miğferin altında.
- Yetiştği yer** : Kuru veya nemli çayırlar, makilikler yol kenarları.
- Çiçeklenme** : Mart sonu- Mayıs (Sezik 1984).



Şekil 3. *Serapias vomeracea* ssp. *orientalis* türüne ait çiçekli bitki örnekleri ve ülkemizde coğrafi yayılışı (Sezik, 1984; Gümüş, 2009)

***Dactylorhiza romana* (seb.) Soo**

Bitki : 15-40 cm yükseklikte.

Yapraklar : Çok sayıda, genellikle tabanda rozet yapmış, linear'dan linear-lanseolat'a kadar olan şekillerde.

Brakteler : Otsu, lanseolat çiçeklerden aşağıda çok, üst kısımlarda az uzun.

Çiçek durumu : Kısa silindirik; çiçekler küçük, kırmızımsı mor, kırmızı, sarı nadiren beyaz renklerde.

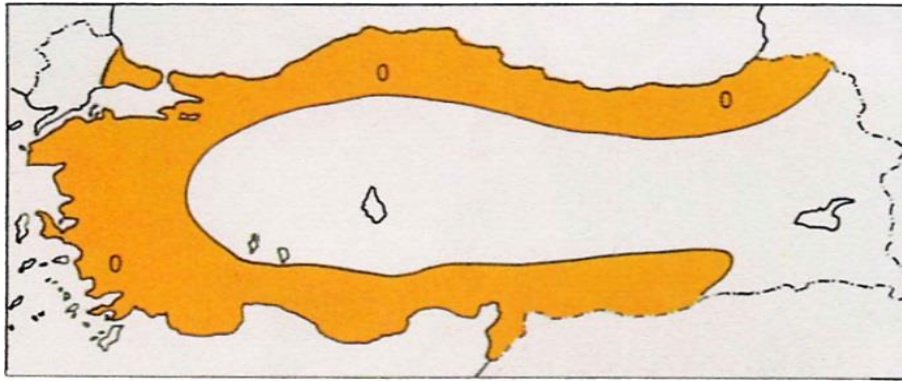
Sepaller : Lanseolat'tan uzun ovat'a kadar olan şekillerde; lateral kadar hemen hemen geriye kıvrılmış, 13 mm kadar boyda.

Petaller : Geniş ovat, 10 mm kadar boyda.

Labellum : Öne doğru, küçük 3 lopluk bazen tam, geniş ovat'tan ovat'a, hatta yuvarlağa kadar olabilen şekillerde. Yüzeyinde leke, benek veya çizgiler taşımaz. Mahmuz, silindirik yukarı doğru, genellikle 10-23 mm

Yetiştği yer : Çalılık veya orman altı.

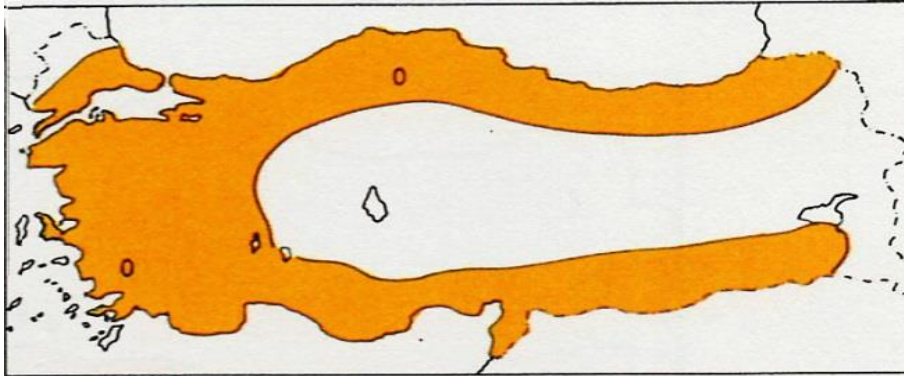
Çiçeklenme : Mart-Temmuz.



Şekil 4. *Dactylorhiza romana* türüne ait çiçekli bitki örnekleri ve ülkemizde coğrafi yayılışı (Sezik, 1984; Gümüş, 2009)

***Anacamptis pyramidalis* (L.) L.C. Rich**

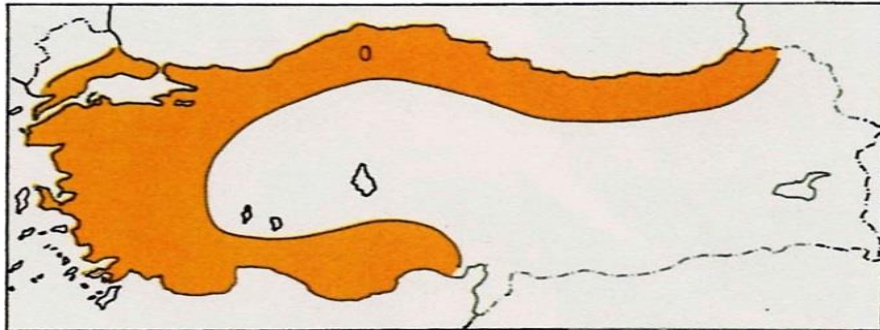
- Bitki** : 20-50 cm yükseklikte.
- Yapraklar** : 5-9 linear'dan lanseolat'a kadar olan şekillerde ve beneksiz.
- Brakteler** : Hemen hemen ovaryum kadar uzunlukta.
- Çiçek durumu** : Çok sık konik bir baş şeklinde olup çiçekler açınca oblong bir şekil alır. Çiçekler açık pembeden koyu pembeye kadar olan renklerde.
- Sepaller** : Lateral sepaller geniş yayık; dorsal sepal, petallerle miğfer meydana getirmiş.
- Labellum** : Üç loplulu; tabanlı 2 küçük dik çıkıntı var. Mahmuz ince uzun, silindirik, hemen hemen ovaryumun 1,5 katı; aşağı doğru.
- Yetiştigi yer** : Kuru çayırılık yamaçlar, kalkerli topraklar.
- Çiçeklenme** : Mart- Haziran
- Mahalli adı** : Peynir çiçeği, peynircik, yoğurtcuk (Sezik 1984).



Şekil 5. *Anacamptis pyramidalis* türüne ait çiçekli bitki örnekleri ve ülkemizde coğrafi yayılışı (Sezik, 1984; Gümüş, 2009)

***Orchis purpurea* Hudson**

- Bitki** : 25-80 cm yükseklikte, gürbüz.
- Yapraklar** : 6-10, geniş lanseolattan ovata kadar olan şekillerde, parlak yeşil, beneksiz.
- Brakteler** : Ovaryumun yarısı kadar uzunlukta.
- Çiçek durumu** : Çok çiçekli, bitkiye nazaran büyük 5-20cm boyda.
- Sepaller** : Petallerle oldukça yuvarlak miğfer meydana getirmiş; miğfer kırmızımsıdan siyahımsı kahverengiye kadar olan renklerde.
- Labellum** : 3 loplu; lateral loplar silindirik, orta lop çok geniş ve yuvarlaklaşmış, ortada küçük bir apendis ile dişlenmiş; beyazımsıdan pembeye kadar olan renklerde morumsu kırmızı noktalı.
- Yetiştirildiği yer** : Çalılıklarda, orman altında.
- Çiçeklenme** : Nisan- Haziran (Sezik 1984).



Şekil 6. *Orchis purpurea* türüne ait çiçekli bitki örnekleri ve ülkemizde coğrafi yayılımı (Sezik, 1984; Gümüş, 2009)

***Orchis sancta* L.**

Bitki : 15-45 cm yükseklikte.

Yapraklar :5-7, lineardan lanseolata kadar olan şekillerde.

Brakteler : Ovaryumdan daha uzun.

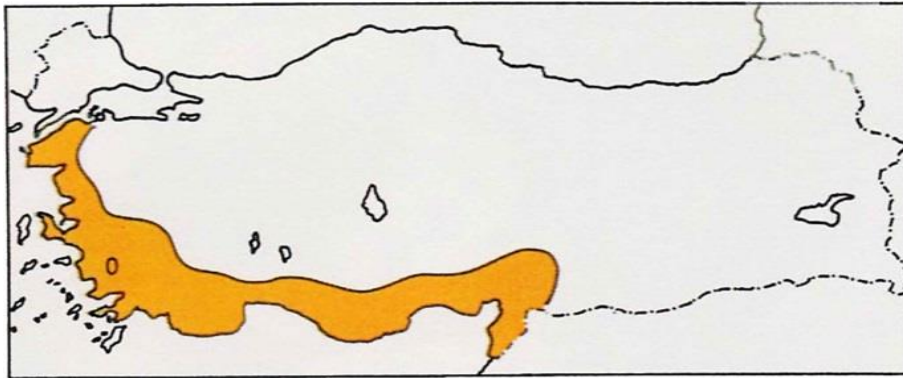
Çiçek durumu : Gevşek, çiçekler açık pembeden parlak kırmızıya kadar olan renklerde

Sepaller : Petallerle beraber ucu sivrilmiş bir miğfer yapmış.

Labellum : 3 loplu; yan loplar bariz şekilde dişli.

Yetiştığı yer : Kuru çayırlar, maki arasında.

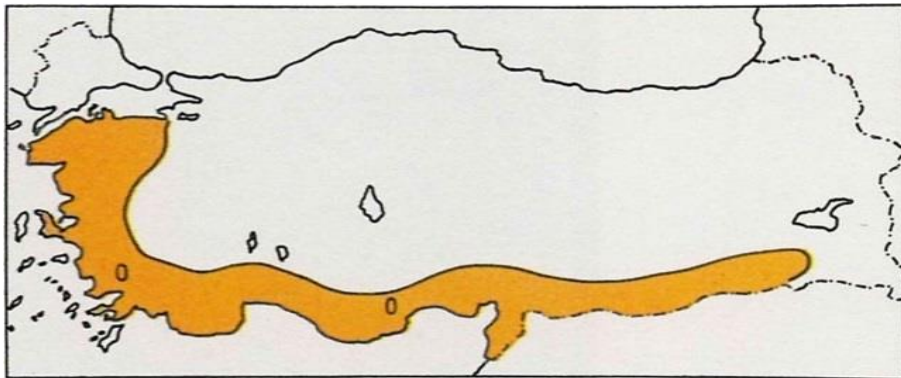
Çiçeklenme : Nisan (Sezik 1984).



Şekil 7. *Orchis sancta* türüne ait çiçekli bitki örnekleri ve ülkemizde coğrafi yayılımı (Sezik, 1984; Gümüş, 2009)

***Orchis anatolica* Boiss.**

- Bitki** : 10-25 cm yükseklikte.
- Yapraklar** : 5-7, lanseolat; benekli yapraklı
- Brakteler** : Ovaryumun yarısından daha kısa.
- Çiçek durumu** : 5-9 çiçekli gevşek, çiçekler gül pembesi-mor renkli.
- Sepaller** : Lateral olanlar yayık, dorsal sepaller petaller ile gevşek bir miğfer yapmış.
- Labellum** : 3 loplu, loplalar gül pembesi- mor renkli, tabanı seyrek kırmızı benekli, mahmuz çok uzun silindirik yukarı veya aşağı doğru.
- Yetiştği yer** : Çayırılık taşlı yamaçlar, çalılıkların kenarı.
- Çiçeklenme** : Mart-Nisan (Sezik 1984).



Şekil 8. *Orchis anatolica* türüne ait çiçekli bitki örnekleri ve ülkemizde coğrafi yayılışı (Sezik, 1984; Gümüş, 2009)

Ülkemizde doğal ortamlardan yapılan salep toplayıcılığı bilinçsiz ve aşırı toplama sonucunda orkide türlerinin yok olması tehlikesini de beraberinde getirmektedir (Sezik, 1984; Erzurumlu ve Doran, 2011). Salep için 1 kg kuru yumru elde edilmesinde doğadan sökülmesi gereken yumru sayısının 1,000-4,350 adet arasında değiştiği belirlenmiştir. İç tüketime konu edilen salep miktarının 20 ila 45 ton civarında olduğu, bunun içinde 40 ile 180 milyon adet bitkinin toplandığı tahmin edilmektedir (Anonim, 2014b). Hâlihazırda, ülkemizde salep toplama sadece doğal yetiştirme alanlarından yapılmakta olup, böylesi büyük bir talebi karşılamak amacıyla kültüre alınabilmesine yönelik çalışmalar da devam etmektedir (Gönülşen vd., 1996; Çağlayan vd., 1998; Gümüş ve Ellialtıoğlu, 2012). Bu çalışmalarda in-vitro koşullarda, olumlu ve umut verici sonuçlar alınmasına rağmen (Bektaş vd, 2013), büyük miktarda ticari üretimin gerçekleştirilebileceği bir yöntem henüz geliştirilememiştir.

In-vitro yöntemler dışında in-vivo (yaşayan doğal ortamında) koşullarda da salep üretim olanakları araştırılmıştır. Bu denemelerde salep için sökülen orkidelerin yumruları alındıktan sonra toprak üstü gövdelerinin tekrar dikilmeleri durumunda, çoğu kez bitkinin hayatta kalabileceğini, hatta tohum üretebileceğini gösterilmiştir. Bu konudaki ümit verici bir çalışma Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından yürütülen ve son aşamasına geldiği bildirilen bir araştırmadır. Salep orkidelerini, yumrularından tarla koşullarında üretmeyi amaçlayan çalışmada önemli bulgulara ulaşıldığı ve uygulamanın başarılı olduğu belirtilmektedir (Anonim, 2014b).

Salebin temel bileşiminde bulunan başlıca maddeler, glikomannanlar (gam/müsilaj) ve daha az oranda da nişasta gibi poliholozit (polioz veya polisakkarit) yapısında olan bileşiklerdir (Sezik, 2002). Farklı bölgelerden elde edilen saleplerin %12-44 oranında müsilaj, %8-19 oranında nişasta içerdiği bildirilmektedir (Sezik, 1967; Sezik, 1984; Tamer vd., 2006; Sezik vd., 2007). Farklı türlerden elde edilen saleplerin bileşimi arasında da önemli farklılıklar olduğu çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda analiz edilen farklı türden örneklerin glikomannan içeriği %18-55; nişasta içeriği %5-38; protein içeriği ise %3-5 protein; %1-2 kül; %9-11 su olduğu bildirilmiştir (Sezik, 1967; Tekinşen ve Güner, 2010). Salep içeriğinin ayrıca toplama dönemine göre de farklılık gösterdiği bilinmektedir (Kaya ve Tekin, 2001). Salebin etkili maddesi veya salebin kullanım gerekçesi olan madde glikomannanlardır. Bu madde süt veya su ile karıştırıldığında şişmektedir ve akıcı bir çözelti haline gelmektedir. Kaliteli bir salebin %40 civarında glikomannan içerdiği bildirilmektedir (Sezik vd., 2007). Mannan ailesinin bir polisakkaridi olan glikomannan kimyasal yapı itibarı ile D-glikoz ve D-mannoz moleküllerinin β -1,4 bağları ile bağlanması sonucu oluşan bir poliholozittir. Poliholozit yapısının yaklaşık olarak %60'ı D-mannoz ve %40'ı ise D-glikozdan meydana gelmektedir. Bazı glikomannanlarda yapıdaki –oz'ların bazıları asetillenmiştir.

Hafifçe dallanma gösteren bu poliholozitin molekül ağırlığı 200-2.000 kilodalton arasındadır (Alonso-Sande vd., 2009). Mevcut durumda salebin kimyasal yapısı ile yukarıda belirtilen çerçevede birtakım veriler bulunsa da bir ürünün saf salep (Orchidaceae) olup olmadığını ortaya koyabilecek ve taşıdığı durumlarını ortaya koyabilecek hızlı yöntemler bulunmamaktadır.

Salep orkidelerine ait toprak altı organları (yumrular) toplanılmasından sonra yıkama, ipe dizme, su veya sütle kaynatma, kurutma gibi işlemlerden geçirilerek yumru salep, bunların öğütülmesi ile de toz salep olarak tüketiciye sunulmaktadır. Elde edilen ürün hem sıcak içecek, dondurma gibi ürünlerde gıda katkı maddesi olarak, hem de sağlığı korumaya yardımcı etkilerinden ötürü bir drog olarak kullanılmaktadır (Sezik, 1967; Sezik, 1984; Sezik vd., 2007; Tanker vd., 2007; Arslan, 2011). Bunlara ilave olarak son zamanlarda, tıbbi aromatik, kozmetik ve eczacılık alanlarında da çeşitli kullanım alanları bulunduğu bildirilmektedir (Anonim, 2014b).

Ülkemizde salebin mevcut ekonomik durumu konusunda yapılan araştırmaların salep ticaretinin yoğunlukla yapıldığı yerlerdeki gözlem ve mülakata dayalı olduğu ve bu nedenle resmi istatistiksel veri toplanamadığı bildirilmektedir. Aynı kaynakta salep üretiminin yoğunlukla yapıldığı bölgelerin Ege Bölgesi (%50), Akdeniz Bölgesi (%15), Karadeniz Bölgesi (%15), İç Anadolu Bölgesi (%10), Doğu Anadolu Bölgesi (%5) ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi (%5) olduğu belirtilmektedir (Anonim, 2014b). Bununla birlikte, üretilen salebin kendisinin veya herhangi bir formunun ihrac edilmesi yönetmeliklerle yasaklanmıştır. Ancak, ülkemizden önemli miktarlarda salebin yurtdışına çıkarıldığına yönelik bulgular mevcuttur. 18.09.2009 tarihli ve 27353 sayılı Resmî Gazete’de yayımlanan İhracı Yasak ve Ön İzne Bağlı Mallara İlişkin Tebliğde (İhracat 96/31) Değişiklik Yapılmasına Dair Tebliğ (Tebliğ No: İhracat 2009/11) gereğince Orchidaceae (salep) türlerinin yumru ve droglarının (toz, tablet ve her türlü formda) ihracatının yasak olduğu belirtilmektedir (Anonim, 2011b). Bununla birlikte 20.09.1988 tarihli Resmi Gazete’de yayınlanan tebliğ ile Orchidaceae (salep), ihracat amacıyla doğadan sökümü yasak olan yabancı çiçek soğanları arasında belirtilir (Anonim, 1989). Ayrıca güncel bir veri olarak, Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından yayınlanan “Doğal Çiçek Soğanlarının 2015 Yılı İhracat Listesi Hakkında Tebliğ”e göre Orchidaceae (salep) türlerinin hepsi “Doğadan Toplanmak Suretiyle İhraç Edilmesi Yasak Olan Çiçek Soğanları” listesinde yer almaktadır (Anonim, 2014a). Ancak, ülkemizden yılda yaklaşık 45 ton salep ihrac edildiğinin bildirildiği araştırmalara kolaylıkla ulaşılabilmektedir (Kreutz ve Çolak, 2011). Kasperek ve Grimm (1999) 1991 yılında Almanya’ya ihrac edilen 2.113 kg salebin kabaca 3-4 milyon orkide yumrusuna tekabül ettiğini belirtmişlerdir.

Aynı yayında 1993 yılında Türkiye'nin toplam 75.119 kg salep ihraç ettiği bilgisine yer verilmiş ve kesin olarak yasaklanmış olsa da Türkiye'de bu hususta hukuki yaptırımların uygulanmadığı belirtilmiştir (Kasperek ve Grimm, 1999). Ayrıca, Türkiye'nin en önde gelen ve en iyi kalitede salep ihraç eden ülke olduğuna vurgu yapan bazı bilimsel çalışmalara da rastlamak mümkündür (Hossain, 2011). Tespit edilen bu bulgular ülkemizden ciddi rakamlarda salebin yurtdışına çıkarıldığını ve bu ürünün ihracatının farklı isimler adı altında vuku bulmuş olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle herhangi bir ürünün salep olup olmadığının belirlenmesi ihracat birimlerinde büyük önem arz etmektedir.

Salep konusunda ülkemizde yaşanan bir diğer sorun da salep içerdiği bildirilen bir ürünün etiketlenmesi ile ilgilidir. 29.12.2011 tarihli ve 28257 sayılı Resmî Gazete'de yayımlanan Türk Gıda Kodeksi Etiketleme Yönetmeliği gereğince gıda maddelerinin etiketlenmesinde uyulması gereken kurallar belirtilmiştir (Anonim, 2011a).

Buna göre; toz formda "salep" olarak satılacak bir üründe veya etiketi üzerinde kelime, resim veya grafik olarak "salep" vurgulandığı takdirde gıdanın "salep benzeri ürünle" karışmasına engel olan maddenin (yani gerçek salebin) net miktarının etiket üzerinde belirtilmesi zorunludur (bkz. Madde 22). Ancak yapılan piyasa incelemesinde bu türden ürünlerin bazılarında etiketlerinde katılan salep miktarını gösteren bir ibareye rastlanılamamış olup, salep miktarı belirtilen ürünlerde ise mevcut bir analiz yöntemi olmaması nedeni ile sadece üreticinin beyanını esas alan bir yaklaşım söz konusudur.

Türkiye'de salebin önemli bir kısmı Bucak (Burdur) ve Siirt olmak üzere iki bölgede toplanmaktadır (Sezik vd., 2007). Bu merkezlerde salep, kalitesine de bağlı olarak, değişken fiyatlarla satışa sunulmaktadır. Bir kg toz salebi üretebilmek için her birinin ağırlığı 0,25 ile 1,00 gram arasında değişen 1,000-4,000 adet arasında kurutulmuş yumruya ihtiyaç duyulmaktadır. Üretim sürecinde ihtiyaç duyulan bu düzeylerdeki yumru ihtiyacı salebin ne kadar değerli bir ürün olduğunu ortaya çıkarmaktadır. Bunun karşılığında internet üzerinden ve farklı illerdeki aktarlardan elde edilen saf toz salep fiyatlarının ise kg başına sadece 350-450 TL civarında olduğu belirlenmiştir. Salep üreticileri ile yapılan birebir görüşmelerde salebin taklit ve tağşiş edilmesi amacı ile buğday ununun, öğütülmüş makarna, bulgur ve pirincin katıldığı bildirilmektedir. Ayrıca son dönemlerde aroma teknolojisinin gelişmesi ile bazı aroma üreticileri tarafından salep aroması adı altında esans karışımlarının piyasaya sürüldüğü ve salep içermeyen bir ürüne iz miktarda (çoğunlukla binde bir oranında) ilave edilmesi önerilmekte ve böylelikle yapılan taklit ve tağşiş duyusal olarak algılanamayacak şekilde gizlenebilmektedir. Bunlarla birlikte, etiketinde salep ihtiva ettiği bildirilen ticari ürünlerin imalatında farklı gıda katkıları da kullanılabilir. Salep taklit ve tağşişinde ayrıca salebin ticari kullanım alanlarındaki diğer alternatiflerden olan gamlar kullanılabildiği gibi, bazı nişasta türleri de salebe katıştırılarak haksız kazançlar elde edilebilmektedir.

Salep taklit ve tağşişinde kullanılan bu materyallerin ekonomik değerleri gerçek saleple karşılaştırıldığında arada büyük farklılıkların olduğu göze çarpmaktadır. Yapılan piyasa araştırmasına göre, salep tağşişinde yaygın olarak kullanılan bazı materyallerin yaklaşık fiyatları aşağıdaki tabloda (Tablo 1) sunulmaktadır (<http://magaza.hammaddeler.com/> Son erişim tarihi: 27.02.2018).

İlgili tablodan da anlaşılacağı üzere saf salebin bir takım ucuz materyallerle taklit ve tağşişi veya taklidi bu konuda haksız kazanç sağlamayı amaç edinen kişiler tarafından oldukça cazip görülmektedir. Nitekim (Tamer vd., 2006) salepte tağşiş probleminin olduğuna dair vurgu yapmışlardır.

Tablo 1. Ticari saleplerde katkı maddesi olarak kullanılan, taklit ve tağşiş amaçlı katılan bazı materyaller ve yaklaşık fiyatları

| Materyal | Fiyat (TL/kg) | Materyal | Fiyat (TL/kg) |
|-------------------|---------------|------------------|---------------|
| Şeker | 5 | Yağsız süt tozu | 20 |
| Makarna unu | 6 | Pirinç nişastası | 20 |
| Pirinç (unu) | 7 | Guar gam | 22 |
| Buğday unu | 7 | Gam arabik | 34 |
| Bulgur unu | 8 | Konjac gam | 50 |
| Buğday nişastası | 8 | Tarçın | 50 |
| Patates nişastası | 11 | Keçiboynuzu gamı | 80 |
| Mısır nişastası | 14 | Vanilin | 90 |

2.2. Gıda maddelerinde taklit ve tağşişin tespiti ve kullanılan teknikler

Gıdalarda taklit ve tağşişin tespiti zorlu bir iştir, ancak tüketicinin korunması ve yasal yaptırımların uygulanması açısından büyük önem taşımaktadır (Primrose vd., 2010). Gıda taklit ve tağşişi en bilinen şekli ile tüketici tarafından fark edilmesi mümkün olmayan ve gıdaya ilave edilmesi ile ekonomik açıdan üreticiye büyük avantajlar sağlayan birtakım maddeler ile yapılmaktadır. Bu nedenlerle taklit ve tağşiş materyalleri piyasada kolaylıkla bulunabilen maddelerden seçilmektedir. Belirli bir oranda orijinal gıdaya katılan bu maddeler çoğu zaman tüketiciler tarafından duysal olarak algılanamamaktadır. Taklit ve tağşiş maddeleri genellikle kimyasal açıdan orijinal ürünle benzerlikler içermekte olup, orijinal ürünle arasındaki farkın belirlenmesi oldukça karmaşık süreçleri ve analitik teknikleri gerektirmektedir. Bu teknikler yardımıyla orijinal ürünün parmak izi sayılabilecek bir takım kritik unsurlar belirlenmekte ve elde edilen verilere bir takım istatistiksel teknikler uygulanarak gıda maddesine uygulanan tağşiş durumu nitel ve/veya nicel olarak ortaya konulabilmektedir.

Resmi kontrollerde gıda tağışışının belirlenmesi amacı ile parmak izi tekniklerinin uygulama stratejileri Esslinger vd tarafından Şekil 9'da verilen akış şeması çerçevesinde önerilmektedir (Esslinger vd., 2014). Gıda maddelerine yapılan taklit ve tağışışın kesin olarak ortaya konulabilmesindeki en önemli nokta, gıda maddesi ile taklit ve tağışış materyali arasında farklılığı oluşturabilecek düzeyde ve parmak izi olarak nitelendirilen bir takım kritik bileşiklerinin tespitidir.

Taklit ve tağışış durumlarının belirlenmesi amacıyla günümüzde geliştirilen teknikler ileri düzeyde uzmanlık gerektirmekte, zaman ve kimyasal malzeme sarfiyatı yönünden olumsuzluklar içermekte ve de kullanılan kimyasallar nedeni ile önemli düzeylerde çevresel kirlilik etmenini açığa çıkarmaktadır. Sözü edilen bu olumsuzluklar, bu alanda araştırma yapanları daha kolay, hızlı ve ekonomik yöntemleri geliştirme konusunda çalışma yapmaya yöneltmektedir.

Fourier Dönüşüm Kızılötesi (FTIR) spektroskopisi tekniği de bu amaç için kullanılacak yöntemlerden bir tanesidir. Genel olarak organik bileşiklerin tanımlanmasında kullanılan bu teknoloji hızlı, basit, hassas, ekonomik ve gıdaya zarar vermeden test edebilme imkânlarından dolayı son zamanlarda gıda endüstrisinde yaygın olarak müracaat edilen bir teknik olarak karşımıza çıkmaktadır. FTIR tekniği optik izomerler dışında bütün bileşiklerin farklı IR absorpsiyon özelliklerine sahip olması esasına dayanmaktadır ve bu nedenle tarama sonucu elde edilen IR spektrumu organik maddelerin yapısal durumları hakkında doğrudan bilgiler sunmaktadır. Gıda tağışışı ile ilgili olarak FTIR tekniği; lotus kök tozlarının nişasta kullanılarak yapılan tağışış durumlarının belirlenmesinde (Liu vd., 2013), sütlerde melamin tağışışının belirlenmesinde (Jawaid vd., 2013), nişasta ile yapılan soğan tozu tağışışının belirlenmesinde (Lohumi vd., 2014), diyet takviyelerinde hammadde düzeylerinin belirlenmesinde (Champagne ve Emmel, 2011), ekstra virjin zeytinyağlarının diğer yemeklik yağlar ile yapılan tağışış durumlarının belirlenmesinde (Gurdeniz ve Ozen, 2009; Maggio vd., 2010), ballara ilave şekerler ile yapılan tağışışın belirlenmesinde (Gallardo-Velázquez vd., 2009), özel bir nişasta türünün (kudzu starch) diğer bazı türdeki nişastalardan ayırımının ve miktarsal olarak hangi düzeyde tağışış yapıldığının belirlenmesinde (Xu vd., 2015), kavrulmuş ve öğütülmüş kahvede bazı tağışış materyallerinin tespit edilmesinde (Reis vd., 2013), farklı kaynaklardan elde edilen sütlerin türleri ve karışım oranlarının belirlenmesinde (Nicolaou vd., 2010), safran kalite düzeylerinin belirlenmesinde (Ordoudi vd., 2014) ve Avrupa salebi olarak bilinen konyak glikomannanın karakterizasyonu (Wang vd., 2015) gibi pek çok gıda ürünündeki taklit ve tağışış durumlarının belirlenmesinde kullanıldığı bildirilmektedir. Ayrıca bu teknik buğday, bal, zeytinyağı gibi pek çok gıda maddesinin coğrafi kökenlerinin belirlenmesinde de adından söz ettirmektedir (Benincasa vd., 2007; Zhao vd., 2013; González-Martín vd., 2014; Gok vd., 2015).

Diğer taraftan, çoklu element parmak izi yöntemi ise gıdaların coğrafi kökenlerinin belirlenmesinde ve bir takım özel elementler sayesinde tağşiş belirleme çalışmalarında önemli bir analitik teknik olarak değerlendirilmektedir. Gıda maddelerinde tağşişin ortaya konulmasında tağşişe konu olan üründe tespit edilen özel bir element referans alınabildiği gibi, üründe belirlenen tüm elementlerin kemometrik yöntemlerle değerlendirilmesi ile elde edilen veriler de kullanılabilir. İ

Bu amaçla sıklıkla izlenen elementler majör elementler grubunda Ca, Mg, Na, K, P, Zn, Mn, Fe ve Cu; iz elementler grubunda ise Li, B, Ga, Co, Zr, Sr, Mo, Cd, Cs, Ba, Pb, As, Se, Cu, Rb, Al, Cr ve Ni'dir. Belirtilen elementlerin gıda maddelerinde tespit edilen düzeyleri daha çok bitkinin yetiştirildiği toprak yapısı ile ilişkili olsa da botanik ve kültivar çeşitlilik de önemli parametrelerdendir. Ayrıca tağşiş için kullanılan bazı materyallerin sentetik olarak üretilmeleri elementel açıdan bu maddelerin kolaylıkla teşhis edilebilmesine imkan tanımaktadır. İ

İndüktif Eşlenmiş Plazma – Kütle Spektrometri (ICP-MS) tekniği periyodik tablodaki pek çok elementi oldukça geniş bir aralıkta (ng/kg'dan mg/kg'a) hızlı, kesin ve doğru olarak tanımlayabilmesi nedeni ile çoklu element parmak izi tekniğinin en güçlü enstrümanıdır (Husted vd., 2011). ICP-MS kullanılarak pirinçlerin coğrafi kökenlerinin belirlenmesi (Cheajesadagul vd., 2013), safranın sınıflandırılması (D'Archivio vd., 2014) zeytinyağlarının karakterizasyonu (Benincasa vd., 2007), şeker kamışı ve pancardan üretilen şekerlerin sınıflandırılması (Rodushkin vd., 2011) ve çayların bölgesel ayrımlarının belirlenmesi (Pilgrim vd., 2010) gibi çalışmalar literatürde bildirilmektedir.

İzotop Oran – Kütle Spektrometri (IR-MS) tekniği ise gıda tağşişinin belirlenmesi çalışmalarında son yıllarda popüler bir yaklaşım olarak ortaya çıkmaktadır. Bu teknik yardımıyla spektroskopik veya kromatografik tekniklerle ayrılması mümkün olmayan bileşiklerin izotop oranları belirlenerek ayrımları gerçekleştirilebilmektedir. IR-MS tekniği kullanılarak biyo-elementler olarak adlandırılan hidrojen, karbon, azot ve oksijenin izotop oranları hassas bir şekilde tespit edilmektedir. Biyo-elementlerin izotop oranları ($^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ve $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) bazı faktörlere bağlı olarak değişiklikler göstermekte olup gıdanın orijini hakkında önemli ipuçları vermektedir, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ oranı temel olarak gıda maddesinin üretildiği materyalin karbondioksit döngüsünü yansıtmaktadır. Bu sayede farklı fotosentez mekanizmasına sahip olan bitkilerden üretilen gıdalar birbirinden ayrılabilir. Örneğin C3 bitkileri olarak adlandırılan tüm açık tohumlu bitkiler ile kapalı tohumlu bitkiler grubundaki çift çenekli bitkiler Calvin-Benson fotosentetik döngüyü kullanırlar. Bu bitkiler Hatch–Slack fotosentez döngüsünü kullanan C4 bitkilerinden (şeker pancarı gibi bazı çift çenekliler ile buğdaygiller familyası üyeleri çoğu tek çenekli bitkiler) daha düşük $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ oranına sahiptir. Yapılan araştırmalarda C3 bitkilerinin -23‰ ile -28‰ arasında C4 bitkilerinin ise -9‰ ile -15‰ $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ oranı arasında değiştikleri bildirilmektedir (Ruiz-Matute vd., 2010).

Karbon izotop oranlarına ilave olarak azot izotop oranları da IR-MS analizlerinde yaygın olarak izlenen parametrelerdendir. Bitkinin $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ imzası su stresi, iklimsel şartlar, toprağın yapısı, denitrifikasyon ve mineralizasyon süreçleri gibi pek çok faktörden etkilenmektedir (Yousfi vd., 2010). Bunlarla birlikte $^2\text{H}/^1\text{H}$ ve $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ oranları ise bitkinin yetiştiği ortamın meteorolojik döngüsüne ve bitkideki suyun bazı fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak farklılıklar arz etmektedir. Sonuç olarak, biyo-elementlere ait izotop oranlarının farklı bitkiler için parmak izi mahiyetinde tanımlayıcı unsurlar olduğu ve bu bitkilerden üretilen gıda maddelerinin ayırımı için iyi birer parametre oldukları söylenebilmektedir (Gonzalvez vd., 2009). IR-MS tekniğinin ballarda ve pekmezlerde farklı şeker kaynakları ile yapılan tağşişin belirlenmesinde (Cengiz vd., 2014; Tosun, 2014), bazı tahıl ürünlerinin coğrafi kökenlerinin belirlenmesinde (Luo vd., 2015; Wu vd., 2015) ve şarapların coğrafi kökenlerine göre karakterize edilmesinde (Dutra vd., 2013) kullanıldıkları bildirilmektedir.

Bitkisel ürünlerin organik asit profilinin tanımlanması yöntemi ise, özellikle farklı genotiplerin karakterize edilmesi çalışmalarında ve kalite üzerine agronomik faktörlerin ve olgunluğun araştırıldığı çalışmalarda ön plana çıkmaktadır (Flores vd., 2012). Bitkisel ürünlerde organik asit profili ve düzeyleri bitkinin yetiştiği toprak ve maruz kaldığı stres durumlarına göre değişebilmektedir (Jones, 1998). Bu kapsamda izlenen organik asitler tartarik, malik, sitrik, laktik ve askorbik asit olarak literatürde belirtilmesine rağmen, bitki köklerinin bazı özel organik asitlerce zengin olduğu bilinmektedir. Farklı zincir uzunluklarına sahip laktat, asetat, oksalat, süksinat, fumarat, malat, sitrat, izositrat ve asonitat gibi organik asitler kök kısımlarında tanımlanmaktadır. Bu organik asitlerin bazıları trikarboksilik asit döngüsünde ara ürün olarak enerji döngüsüne katılırken, diğerleri katyon yükünün dengelenmesi için veya ozmotik potansiyeli sağlamak için hücrelerde bulunurlar. Tipik olarak köklerdeki organik asit miktarı kökün kuru ağırlığının yaklaşık %1-4 arasında değişmektedir (Jones, 1998). Araştırma konusu materyalin köklerden elde edilen yumrular olması nedeni ile bu yumrulardaki organik asit profilinin izlenmesi karakterizasyonu ve özel bir organik asidin tespit edilmesi ile tağşişin nitel ve/veya nicel olarak belirlenebilmesi ihtimal dairesindedir.

Gıda ürünlerinde karbonhidrat düzeyleri kullanılarak taklit/tağşişin belirlendiği çalışmalar da mevcuttur. Örnek olarak, kahvede kavrulmuş soya ve buğday ile yapılan tağşişin belirlenmesinin amaçlandığı bir çalışmada, örneklerin karbonhidrat kompozisyonu belirlenmiş ve saf kavrulmuş kahvenin galaktoz ve mannoz açısından zengin olduğu, kavrulmuş buğday ile yapılan tağşişin belirlenmesinde belirleyici unsurun glikoz ve kavrulmuş soya ile yapılan tağşişin belirtecini ise fruktoz olduğu bildirilmektedir (Pauli vd., 2014).

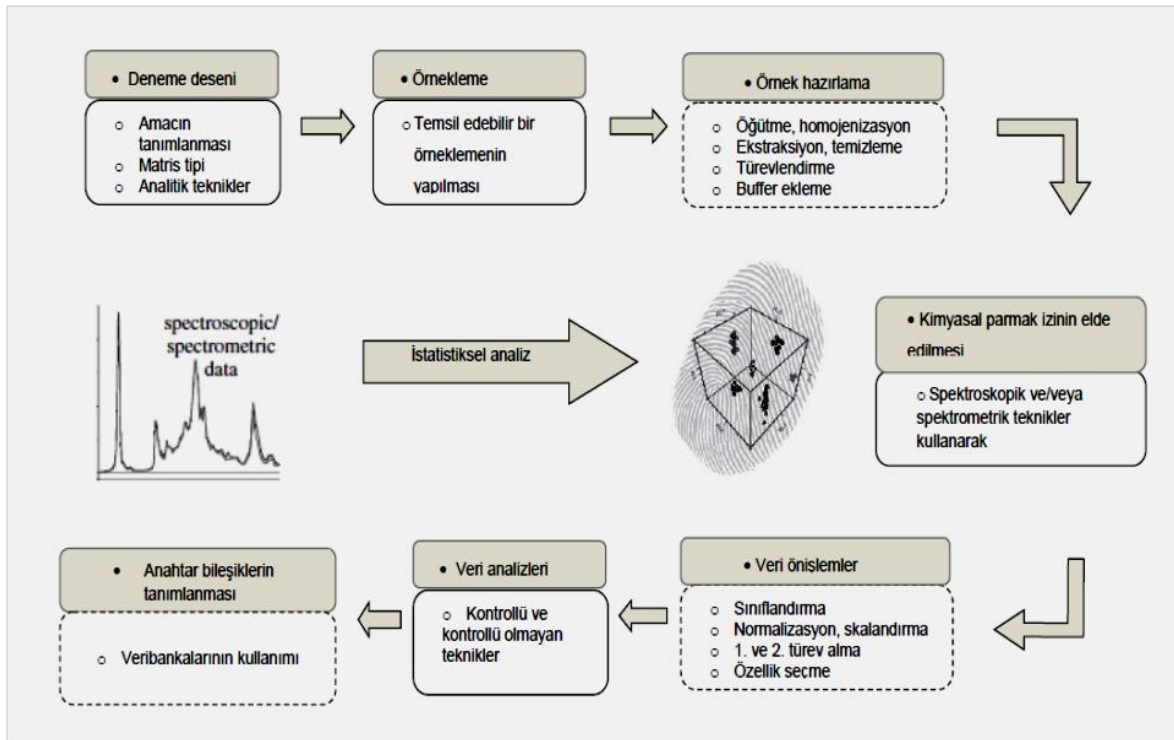
Benzer bir çalışmada, kahvelerde buğday ve bölgesel bir tohum (acai seed) ile yapılan tağşişin belirlenmesinde arabinoz, galaktoz, glikoz, ksiloz ve mannoz bileşimleri araştırılarak galaktozun kahve tağşişinin belirlenmesi için karakteristik bir bileşik olduğu sonucuna varılmıştır (Domingues vd., 2014). Karbonhidrat profilinin aynı zamanda pekmezde ticari glikoz ve fruktoz ile yapılan tağşişin belirlenmesi (Şimşek vd., 2004), ballarda sakaroz, fruktoz, maltoz, maltotrioz ve oligosakkaritleri içeren farklı arı besleme şurupları ile yapılan tağşişin belirlenmesi (Cordella vd., 2005), ballarda fruktoz ve sakaroz şurupları ile yapılan tağşişin belirlenmesi (Yılmaz vd., 2014), maltodekstrin ile yapılan süt tozu tağşişinin belirlenmesi (Sanvido vd., 2010) gibi çalışmalarda izlendiği bildirilmektedir. Kimyasal bileşim açısından değerlendirildiğinde salebin de yüksek oranda bir karbonhidrat kaynağı olduğu söylenebilmektedir. Bu kapsamda Avrupa salebi (konyak) üzerine yapılan çalışmalarda yapıda bulunan glikomannanın mannoz ve glikoza oranlarının bitkinin orijini hakkında özgünlük ifade ettiği bildirilmektedir. Yapılan çalışmada konyakta bu oranın 1,6:1 olduğu, bunun karşılığında İskoç çamında ve orkide yumrularında sırasıyla 2,1:1 ve 3,6:1 oranlarında oldukları belirtilmektedir (Alonso-Sande vd., 2009).

Termoanalitik tekniklerden biri olan Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) yöntemi ise FTIR sistemlerinde olduğu gibi hızlı olması, örnek hazırlama işlemleri gerektirmemesi ve analizler sırasında çözücü kullanılmaması gibi avantajları nedenleri ile geleneksel tanımlama yöntemlerine göre avantajlar sunmaktadır. DSC tekniği temel olarak örneğin ısıtma soğutma sırasında meydana gelen fiziksel değişimlerini izlemektedir. DSC analizleri ile elde edilen kalorimetrik veri gıda maddelerinin işlenmesi ve depolanması süreçlerinde termal geçişlerin anlaşılması noktasında önem arz etmektedir. Bununla birlikte, gıda maddesini meydana getiren birtakım öğeler termal davranışlar açısından farklı davranışlar sergileyebilmekte ve bu davranışların incelenmesi ile gıda maddesinin saflığı ve coğrafi kökenleri hakkında birtakım verilere ulaşılabilmektedir. DSC tekniği kullanılarak un ve nişastalarda retrogradasyon, jelatinizasyon ve camsı geçiş; katı ve sıvı yağlarda erime noktası, kristalizasyon, polimorfik davranışlar ve oksidasyon stabilitesi; sebzelerden elde edilen tozlarda camsı geçiş; proteinlerde denatürasyon ve aggregasyon belirlenmesi ile ilgili uygulamalar yapılabilmektedir. Nişasta, salebin ana bileşenini oluşturmakta olup salep tağşişi konusunda da farklı türden nişastalar yaygın olarak kullanılmaktadır. Gıda maddelerinde bulunan doğal veya modifiye türden nişastalar DSC termogramında farklı endotermik piklere neden olmaktadır. Nişastanın türüne bağlı olarak 50 ve 80°C arasında jelatinizasyon, 100°C üzerinde amiloz-lipit kompleksi ve 140°C'nin üzerinde ise yeniden kristallenmiş amiloz ve yeniden kristallenmiş amilopektinde retrogradasyon görülmekte olup bu değerler nişasta türleri arasında farklılıklar arz etmektedir (Heussen, 2011).

Literatürde; DSC sistemi kullanılarak zeytinyağlarında farklı türden yağlar ile yapılan taşışın tespit edilmesi (Chiavaro vd., 2008; van Wetten vd., 2015), farklı bölgelerden temin edilen nişastaların fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi (Li vd., 2014), tereyağlarına farklı düzeylerde katılan hayvansal yağlar ve margarin miktarlarının belirlenmesi (Aktaş ve Kaya, 2001), ekmeğ hamurunun soğuk şartlarda depolanması sırasında amilopektinde meydana gelen jelatinizasyon ve retrogradasyonun belirlenmesi (Ribotta vd., 2003) gibi çalışmalar yer almaktadır. Bu tekniğin ayrıca un, nişasta ve zeytinyağı gibi gıda maddelerinin coğrafi kökenlerinin belirlenmesinde de kullanıldığı bildirilmektedir (Andrade-Mahecha vd., 2012; Chatziantoniou vd., 2014).

2.3. Taklit ve taşışın belirlenmesinde yöntem geliştirme çalışmaları

Gıda taşışının belirlenmesinde pek çok analitik yöntem önerilmiş olmasına rağmen, hangi analitik tekniğin bu konuda daha fazla öne çıktığının belirlenmesi elde edilen verilere bir takım istatistiksel çalışmaların uygulanmasını zorunlu kılmaktadır. Bu kapsamda, Esslinger vd (2014) tarafından önerilen ve resmi kontrollerde gıda taşışının belirlenmesi için parmak izi tekniklerinin uygulama stratejilerini konu alan çalışmada belirtilen akış şeması Şekil 9'da sunulmaktadır.



Şekil 9. Gıda analizlerinde kullanılabilir 'parmak izi yöntem' geliştirilmesinde izlenebilecek işlem basamakları

Kemometrik sınıf model tekniklerinin uygun analitik tekniklerle kombine edildiklerinde gıdaların taşıdığı belirlenmesinin belirli bir etken maddeyi hedef almayan analizleri için kullanışlı ve güçlü bir araç oldukları bildirilmektedir (Xu vd., 2015). Bu teknikler arasında temel bileşen analizleri (Principal Component Analysis, PCA) veri yapısı hakkında bilginin temin edilmesinde, dışarıda kalan verilerin belirlenmesinde ve test ve standart örnekler arasındaki farkın belirlenmesinde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Ortiz vd., 2013). Çoklu değişken analitik tekniklerin FTIR yöntemi ile kombine edildiği pek çok araştırma literatürde mevcuttur (Gok vd., 2015). Ayrıca bu tekniklerle HPLC (Kuş ve van Ruth, 2015), ICP-MS (Chudzinska ve Baralkiewicz, 2010) ve UV-Vis spektrofotometre (Di Anibal vd., 2009) gibi cihazlardan elde edilen verilerin işlenmesiyle taşıdığı konusunda önemli ipuçlarına ulaşılabildiği bildirilmektedir.

Bu kapsamda, çok değişkenli ölçümlene teknikleri, tek bir dalga boyundaki bilgiyi kullanmak yerine tüm spektrum ile konsantrasyon değerlerini ilişkilendirmeyi amaçlamaktadır. Bu sayede çoğu zaman kompleks spektrumlarla bile tek bir maddenin modellenmesi mümkün hale gelmektedir. Ayrıca basit senaryolarda dahi pik maksimaları yerine tüm pik(ler)in kullanılmasıyla detektörden elde edilen tüm bilginin değerlendirilmesi ve bu sayede daha başarılı ölçümlene modellerinin oluşturulması sağlanabilir. Literatürde bu çerçevede kullanılan 15 civarı model bildirilmesine rağmen, en yaygın kullanılan model Kısmi En Küçük Kareler 1 (Partial Least Squares 1, PLS 1) tekniğidir.

PLS tekniği, ilk olarak ekonometri için geliştirilmiş ve kimya alanında S, Wold ve arkadaşları tarafından popülerleştirilmiştir. Bu teknik, yayınlandığından bu yana kemometri alanında oldukça geniş bir kullanım alanları bulmuş ve özellikle spektral verilerin işlenmesinde standart bir araç haline gelmiştir. Spektral verilerde karşılaşılan değişkenler (spektral durumda dalga boylarındaki absorpsiyon değerleri) arasındaki yüksek korelasyon ve örnek sayısının değişken sayısından çoğu zaman çokça küçük olması standart çok değişkenli regresyon yöntemlerinin başarısız olmasına sebebiyet vermektedir. Bu bağlamda PLS, orijinal değişkenlerin elde edilen doğrultulara yansıtılması (T matrisinin eldesi) üzerinden yapılan regresyonla, geleneksel regresyon üzerinde pek çok avantaja sahiptir. Bunlardan ilki, yansıtılan bu değişkenlerin orijinal değişkenlerden çok daha az sayıda ve bağımsız değişkenlere dönüşmesi sayesinde gerçekleşir; öyle ki bu bağımsız değişkenler matematiksel olarak "sağlıklı" şekilde konsantrasyonlar ile ilişkilendirilebilir. Bir diğer avantaj ise spektral gürültü ve konsantrasyon bilgilerindeki hataların bir kısmının. PLS ile elde edilen modelde küçük doğrultulara tekabül etmesinden ileri gelir. PLS algoritmasından elde edilen ilk doğrultular X ve Y arasındaki ilişkiyi en iyi açıklayan doğrultular iken, son doğrultular ise spektrumdaki gürültüye, kolineariteye ya da spektrumda konsantrasyonla ilişkisiz bilgilere tekabül edebilir.

Temel Bileşen (Principle Component, PC) ya da Gizli Değişken (Latent Variable, LV) olarak adlandırılan bu doğrultuların tamamı modellemeye dahil edildiğinde. PLS yöntemi Ters En Küçük Kareler (Inverse Least Squares, ILS) isimli klasik çok değişkenli ölçümleme yöntemine eşdeğer hale gelmektedir (Geladi ve Kowalski, 1986; de Jong, 1993).

PLS yöntemini kullanılmasında aşağıda belirtilen eşitliklerden faydalanılır.

$$A_{m \times n} = T_{m \times h} \cdot P'_{n \times h} + E_{m \times n} \quad \text{Eşitlik 1}$$

$$c_{m \times 1} = T_{m \times h} \cdot q_{h \times 1} + f_{m \times 1} \quad \text{Eşitlik 2}$$

$$T_{m \times h} = A_{m \times n} \cdot W_{n \times h} \quad \text{Eşitlik 3}$$

Yukarıda verilen eşitliklerde; m örnek sayısını, n spektral nokta sayısını, h temel bileşen sayısını (PC sayısı), A spektral veri matrisini (her bir satır bir spektrum olmak üzere), T spektral skor matrisini, P spektral yük matrisini, E spektral matrisin artıklarını, c modellemesi gerçekleştirilen örnek bileşenine ait konsantrasyon vektörünü, q konsantrasyon yük vektörünü, f konsantrasyon artıklarını, W ise spektral ağırlık matrisine işaret etmektedir. Spektrumdan konsantrasyon tahmini ise aşağıda verilen Eşitlik 4 ile hesaplanmaktadır.

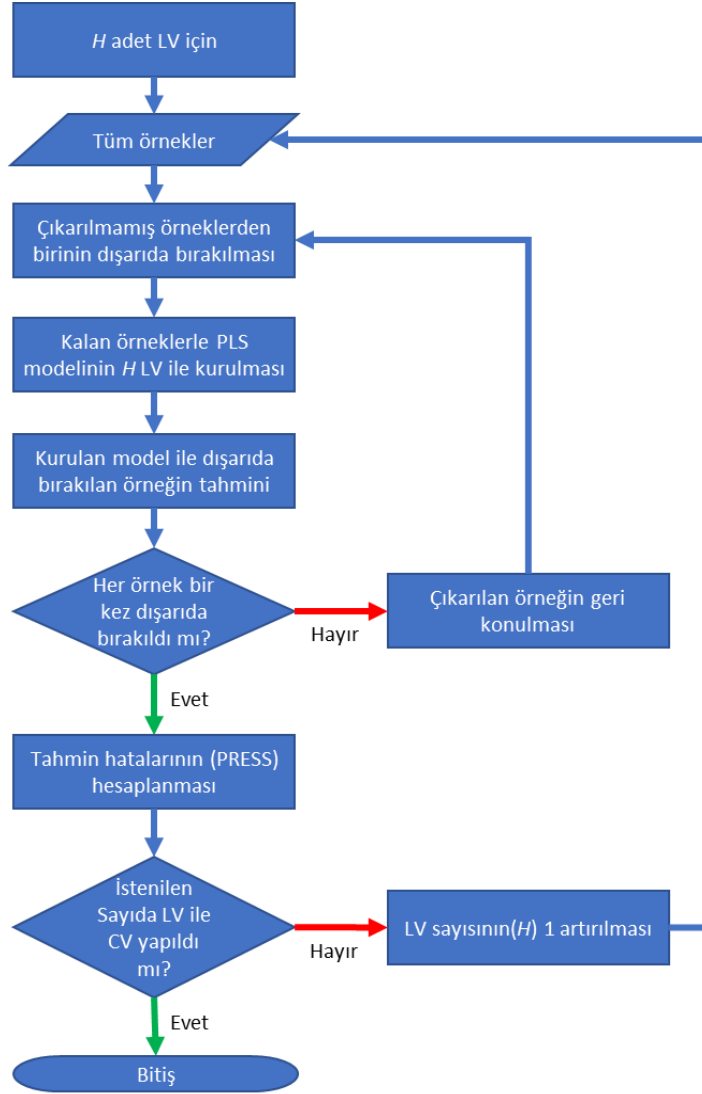
$$\hat{c}_{m \times 1} = A_{m \times n} \cdot W_{n \times h} \cdot q'_{1 \times h} \quad \text{Eşitlik 4}$$

Eşitlikte A spektral veri matrisini, c konsantrasyon vektörünü, W ve q ise A ve \hat{c} arasındaki kovaryansı maksimize eden doğrultuları göstermektedir.

Tahmin hatası ölçütü olarak kullanılan Tahmin Artıklarının Kareleri Toplamı (Predicted Residuals Sum of Squares. PRESS) değeri aşağıda verilen Eşitlik 5'teki gibi hesaplanmaktadır.

$$\text{PRESS} = \sum_{m=1}^M (\hat{c}_m - c_m)^2 \quad \text{Eşitlik 5}$$

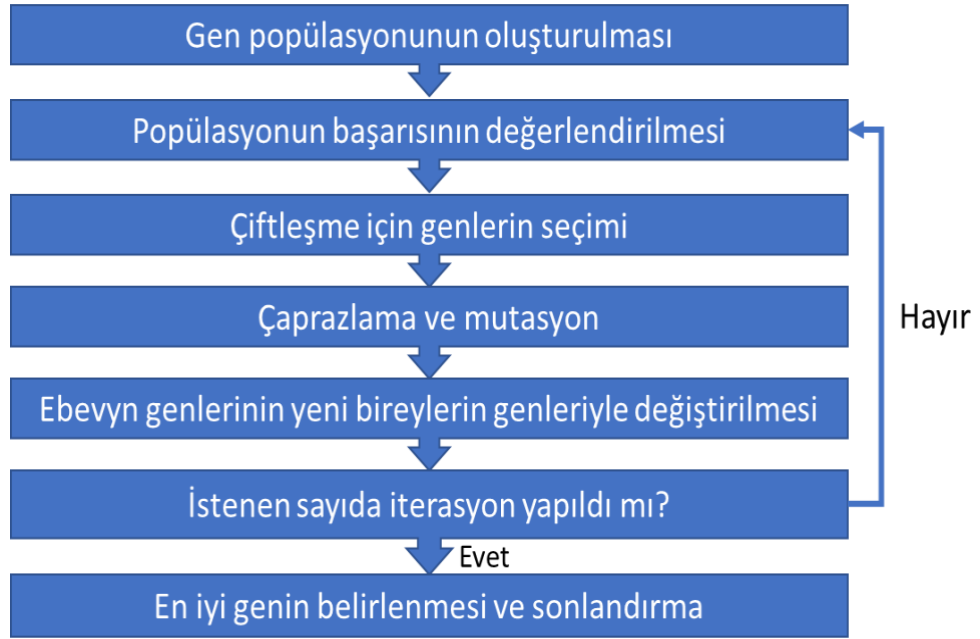
Optimal LV sayısının belirlenmesinde Bir Örneği Dışarıda Bırakan Çapraz Doğrulama (Leave One Out Cross Validation, LOOCV) en sık kullanılan yöntemlerden biridir (Brereton, 2003). Şekil 10'da LOOCV'ye ait ayrıntılı akış şeması sunulmaktadır.



Şekil 10. PLS modellemelerde LV sayısı seçiminde kullanılan LOOCV'nin akış şeması

PRESS değerleri her bir LV için elde edilmiş ve ardından PRESS değerindeki düşüşün istatistiksel olarak sonlandığı nokta optimal LV sayısı olarak seçilerek nihai PLS modeli tüm veri üzerinden oluşturulmaktadır.

Son zamanlarda gerçekleştirilen çalışmalarda Genetik Algoritma Tabanlı Ters En Küçük Kareler (Genetic Inverse Least Squares, GILS) yönteminin ölçümlene başarısında çoğu zaman PLS 1 tekniğine göre daha üstün geldiği gözlemlenmektedir (Özdemir, 2005). GILS tekniği spektrumdaki her bir noktayı kullanan standart çok değişkenli ölçümlene yöntemlerine alternatif olarak genetik tabanlı ölçümlene algoritmaları en iyi değişkenler setini bulmayı hedeflemektedir. Bunu yaparken ise doğal seçimden ilham alan genetik algoritmalar, terminoloji olarak biyolojiyi baz almaktadır. Bu bağlamda değişkenler seti bir gen olarak isimlendirilirken, o setin potansiyel tahmin başarısı ise fitness olarak adlandırılır. Genetik algoritmanın basitleştirilmiş akış şeması Şekil 11'de sunulmuştur.



Şekil 11. Basitleştirilmiş Genetik Algoritma akış şeması

Genetik algoritma (GA) herhangi birçok değişkenli ölçümlene yöntemiyle birleştirilebilir. GA tüm değişkenlerden ziyade daha az sayıda değişken içeren genler ile çalıştığı için PLS, PCR gibi yöntemlerin avantajları azalmakta ve bu algoritmaların kullanılması gerekli işlemci gücünü önemli ölçüde artırmaktadır. Bu nedenle daha basit ve çok daha az işlem gücü gerektiren Ters En Küçük Kareler (Inverse Least Squares, ILS) yöntemi GA ile yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Özdemir, 2005).

GILS yöntemi için kullanılan Eşitlik 6, 7 ve 8'de ILS ile ilgili formüller verilmiştir.

$$\mathbf{c}_{m \times 1} = \mathbf{A}_{m \times n} \cdot \mathbf{p}_{n \times 1} + \mathbf{e}_{c_{m \times 1}} \quad \text{Eşitlik 6}$$

$$\hat{\mathbf{p}} = (\mathbf{A}^t \cdot \mathbf{A})^{-1} \cdot \mathbf{A}^t \cdot \mathbf{c} \quad \text{Eşitlik 7}$$

$$\hat{\mathbf{c}} = \mathbf{a}^t \cdot \hat{\mathbf{p}} \quad \text{Eşitlik 8}$$

Yukarıda Eşitlik 6, 7 ve 8'de m örnek sayısını, n spektral nokta sayısını, \mathbf{A} spektral matrisi, \mathbf{c} konsantrasyon vektörünü, \mathbf{p} regresyon katsayılarını, \mathbf{e} konsantrasyon tahmini hatasını (konsantrasyon artıkları) ve $\hat{\mathbf{c}}$ konsantrasyon tahminini ifade etmektedir. ILS'de Eşitlik 7 ile elde edilen regresyon katsayılarının spektrum ile iç çarpımından konsantrasyon tahminleri Eşitlik 8'de gösterildiği gibi elde edilmiştir.

Çok değişkenli sınıflandırma yöntemlerini yönlendirmeli ve yönlendirmesiz yöntemler başlıkları altında incelemek mümkündür. Bu yöntemler aynı çok değişkenli ölçümleme teknikleri gibi birden çok değişkenin kullanılması ile örneklerin daha sağlıklı sınıflandırılması, muhtemel gruplaşmaların gözlemlenmesi ve sorunlu örneklerin belirlenmesinde kullanılır. Bu bağlamda kemometrik sınıflandırma yöntemler yönlendirmeli ve yönlendirmesiz başlıkları altında incelenebilir.

PCA yönlendirmesiz sınıflandırma ve veri analizi yöntemlerinden en popüleridir. PCA verinin kovaryans matrisinin özvektörleri üzerinden, hiçbir sınıf bilgisi sağlanmadan, veriyi varyansı maksimize eden doğrultulara yansıtır. Bu işlem spektral ve çoklu kimyasal analiz gibi değişkenler arası korelasyonun yüksek olduğu durumlarda bilginin “sıkıştırılarak” çok daha az boyutta incelenmesine olanak tanır. Bu yansıtma işlemi üzerinden, örneğin 2 boyuta indirgenmiş grafik vasıtasıyla, muhtemel gruplanmalar ve dışarıda kalmış ya da sorunlu örnekler gözlemlenebilir. Aşağıda PCA yönteminden elde edilen değişkenler Eşitlik 9’da verilmiştir.

$$A_{m \times n} = T_{m \times h} \cdot P_{n \times h} + E_{m \times n} \quad \text{Eşitlik 9}$$

Verilen Eşitlik 9’da h tercih edilen temel bileşen sayısına (en fazla spektral matrisin rankı kadar olabilir). P isimli yük matrisi (PCA loadings) ise ortogonal olup orijinal veri matrisinden elde edilen kovaryansın özdeğer vektörlerine tekabül etmektedir. T isimli skor matrisi (PCA scores) P matrisi ile veri matrisinin çarpımından elde edilmekte ve verinin bu yeni düzleme yansıtılmış halini temsil etmektedir.

Öte yandan E matrisi ise PCA modelinden elde edilen yük matrisinin tamamı ya da bir kısmı kullanıldığında açıklanamayan artıklara tekabül etmektedir. Yapılacak olan PCA analizinde kaç adet düzleme yansıtılma yapılacağı P matrisinin ilk kaç sütununun kullanılacağı ile belirlenir. Bu sütunların her biri Temel Bileşen (Principle Component, PC) olarak adlandırılır ve kullanım amacına göre farklı sayıda PC’ler seçilebilir. Her bir PC’nin verideki varyansı ne kadar açıkladığı o PC’ye tekabül eden özdeğerin büyüklüğü ile doğru orantılıdır. Bu bağlamda verideki sorunlu örneklerin ve muhtemel sınıflandırmaların gözle incelenmesinde 2 boyutun kullanılması daha uygun olacağından 2 adet PC ile PCA modeli oluşturulurken. PCA tabanlı sınıflandırma çalışmalarında ise bu sayı belirli bir varyans yüzdesinin açıklanmasını sağlama kriteri ya da çapraz doğrulama gibi yöntemlerle seçilebilir (Brereton, 2009).

Çok değişkenli sınıflandırma tekniklerinden yine oldukça yaygın olan Kısmi En Küçük Kareler, Diskriminant Analiz (Partial Least Squares, Discriminant Analysis) ise ölçümleme yöntemi olan PLS2'nin sınıflandırma amacıyla kullanılan halidir. PLS2 ise PLS1 yönteminin çoklu bileşen tahmini yapılmasında ve özellikle bileşenler arasında korelasyonun yüksek olduğu durumlarda etkili bir regresyon tekniğidir. PLS-DA yönteminde bağımlı değişkenler ikilik sistemde grup bilgisini içerir şekilde oluşturulur. Optimal LV seçiminde ise PRESS değeri yerine sınıflandırmadaki hata kriteri olan yanlış sınıflandırma oranı kullanılır. Tahminleme basamağında da PLS ile aynı yolun izlendiği PLS-DA yönteminde örneğin hangi sınıfla ait olduğu maksimum değeri alan sınıf tahmini belirlenerek gerçekleştirilebilir (Brereton, 2009).

Geliştirilen bir analiz yönteminin güvenilir sonuçlar üretebildiğini doğrulamak ve geçerliliğini güvence altına almak için çeşitli çalışmaların yapılması gerekmektedir. Genellikle mevcut yöntemler yetersiz kaldığında, mevcut yöntemleri yeni yaklaşımlar ışığında modifiye etmek gerektiğinde, yeni analitik cihazlar veya teknikler ile daha iyi sonuçlar alınacaksa yöntem geliştirme çalışmalarının yapılması önerilmektedir (Dong, 2006). Yöntem geliştirme çalışmaları Dong (2006) tarafından beş aşamaya ayrılmıştır.

Bu aşamalar;

- a. Yöntemin hedeflerinin belirlenmesi
- b. Analizi yapılacak örnekler ve analitler hakkında bilgi toplanması
- c. Ön denemelerin yapılması
- d. Yöntemin en uygun çalışma koşullarının belirlenmesi
- e. Yöntem doğrulama çalışmasının yapılması şeklinde belirtilmiştir.

Yöntemin geçerli kılınmasında uygulanması gereken temel işlemler "Yöntem Doğrulama" başlığı altında bahsedilmektedir. Doğrulama bir yöntemin veya ölçüm işleminin belirlenen amaçlara uygunluğunun nesnel olarak test edilerek yazılı delillerle kanıtlanması olarak ifade edilmektedir (Araujo, 2009). Yöntem doğrulama bir analiz yönteminin doğru olarak uygulanabilmesini sağlamak, doğru olarak kullanıldığını belgelemek ve ölçüm sonuçlarının doğruluk ve kesinlik değerlerini ortaya koymak amacıyla yapılmaktadır. Yöntem doğrulamasında analiz yönteminin performansını veya güvenilirliğini ortaya çıkarmak amacıyla çeşitli deneyler yapılmakta ve bu deneylerden elde edilen sonuçlar istatistiksel yöntemlerle değerlendirilmektedir. Bu kapsamda uygulanması gereken temel parametreler, aşağıda doğruluk, kesinlik, seçicilik, doğrusallık, tespit sınırı ve ölçüm sınırı olarak bildirilmektedir (Taverniers vd., 2004).

Doğruluk bir test sonucunda elde edilen değer ile gerçek değer arasındaki yakınlık derecesi olarak tanımlanmaktadır (Hauck vd. 2008). Bu değer, bilinen konsantrasyondaki bir örneğin analiz edilmesi ve ölçülen değer ile gerçek değer karşılaştırılması ile, önceden kullanılan alternatif yöntemin sonuçlarıyla yeni bir yöntemden elde edilen analiz sonuçlarının karşılaştırılmasıyla veya örnek matrisine bilinen miktarda analitin eklenerek geri kazanım değerinin hesaplanmasıyla belirlenebilmektedir (Green 1996). Kesinlik değeri ise, aynı koşullarda yapılan bağımsız ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının ölçüsüdür ve ölçüm sonuçlarının ortalama değer etrafındaki dağılımını göstermektedir. Seçicilik değeri, cihazın ölçüm yaptığı sırada ortamda girişime neden olacak maddeler bulunması durumunda ölçüm güvenilirliğini gösteren parametrelerdir. Doğrusallık ölçümleme grafiğinin oluşturulması ve bu grafiğin korelasyon katsayısının (R^2) 1'e yakınlık derecesi olarak ölçülmektedir. Tespit sınırı ve ölçüm sınırı bir analitik yöntem kullanılarak güvenilir bir şekilde belirlenebilen en düşük analit konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır (Taverniers vd., 2004).

Bu bilgiler ışığında, proje kapsamında salep taklit ve taşımasının belirlenmesi konusundaki temel yaklaşım; ülkemizin farklı bölgelerinden temin edilen salep gerçek salep numunelerinin ve taklit ve taşıma konu olan maddelerin kimyasal bileşimlerinin açığa çıkarılması, elde edilen verilerin kemometrik yöntemlerle değerlendirilerek farklılığa neden olan etkili maddelerin belirlenmesi, etkili maddeler üzerinden taşımanın ayrıntısını verebilen yöntemin geliştirilmesi ve geliştirilen yöntemin valide edilmesi olarak planlanmıştır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Analizlerde kullanılan kimyasal ve sarf malzemeleri

Elementel analizlerde kullanılan ^{57}Fe , ^{66}Zn , ^{55}Mn , ^{63}Cu , ^{52}Cr , ^{88}Sr , ^{60}Ni , ^{47}Ti , ^{85}Rb , ^{138}Ba , ^{98}Mo , ^{51}V , ^{59}Co , ^7Li , ^{69}Ga , ^{82}Se , ^{133}Cs , ^{121}Sb , ^9Be , ^{205}Tl ve ^{209}Bi analitik standartları VHG lab (Manchester, NH, ABD) firmasından, Suprapure® grade, %65'lik nitrik asit Merck (Darmstadt, Germany) firmasından ve numunelerin elementel analizi öncesi filtrasyon işlemlerinde kullanılan 0,45 µm gözenek çapına sahip filtre Sartorius (Göttingen, Almanya) firmasından temin edilmiştir.

Numunelerin izotop oranları analizlerinde kullanılan standart maddeler (sakaroz (IAEA CH6) $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} \text{‰} -10,45 \pm 0,04$, selüloz (IAEA CH3) $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} \text{‰} -24,72 \pm 0,05$, potasyum nitrat (USGS 34) $\delta^{15}\text{N}_{\text{air}} \text{‰} -1,8 \pm 0,2$ ve su $\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}} \text{‰} -27,9 \pm 0,6$) Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MS, ABD) firmasından temin edilmiştir.

Enzimatik analizler kapsamında gerçekleştirilen glikomannan ve nişasta analizleri için kullanılan enzimatik kitler Megazyme (Wicklow, İrlanda) firmasından alınmıştır.

Amino asit analizlerinde kullanılan L-arjinin, L-aspartik asit, L-sistein, L-glutamik asit, L-histidin, L-izolösin, L-lösin, L-lizin, L-metiyonin, L-fenilalanin, L-prolin, L-serin, L-treonin, L-tirozin ve L-valin analitik standartları; karbondirat analizlerinde kullanılan sakaroz, glikoz, fruktoz, maltoz, mannoz, galaktoz ve arabinoz analitik standartları ve organik asit analizlerinde kullanılan tartarik asit, sitrik asit, fumarik asit, malik asit, propiyonik asit, bütirik asit ve laktik asit analitik standartları Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, ABD) firmasından. HPLC grade formik asit (%99,9), amonyum format (%99), etanol (%98) ve metanol (%99,8) Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir. Örneklerin filtre edilmesi işlemlerinde kullanılan şırınga ucu filtreler Millipore (Burlington, Massachusetts, ABD) firmalarından temin edilmiştir.

Kromatografik sistemde hareketli fazın hazırlanması, belirli konsantrasyonlarda standart maddelerin elde edilmesi ve numunelerin istenilen düzeylerde seyreltilmesi işlemlerinde kullanılan 18,2MΩ cm (25°C'de) kalitesinde ultra saf su Millipore saflaştırma sisteminde (Bedford, MA, ABD) üretilmiştir. Cihazlarda kullanılan yüksek (>%99,999) saflıktaki helyum, argon, azot, oksijen, hidrojen, karbondioksit ve karbon monoksit gazları Habaş (İstanbul, Türkiye) firmasından temin edilmiştir. Proje çalışmalarında kullanılan alet ve ekipmanlara ait ayrıntılı liste Tablo 2'de sunulmaktadır.

Tablo 2. Proje çalışmalarında kullanılan alet ve ekipmanlar

| Alet / Ekipman | Marka | Model | Menşei |
|------------------------|---------------------|-----------------|---------------------|
| Çekiçli değirmen | IKA | MF10 Basic | Staufen, Almanya |
| Sarsak elek | RETSCH | AS200 | Haan, Almanya |
| Manyetik karıştırıcı | Heidolph | MR Hei Standard | Schwabach, Almanya |
| Etüv | Nüve | NC500 | Ankara, Türkiye |
| Analitik terazi | Sartorius | ED224S | Göttingen, Almanya |
| Vortex | IKA | TTS3 Basic | Wilmington, NC, ABD |
| Ultra saf su cihazı | Millipore | Milli-Q | Bedford, MA, ABD |
| Mikrodalga Yakma | Berghof Speedwave | Four Microwave | Eningen, Almanya |
| pH metre | Mettler Toledo | AG8603 | Zaventem, Belçika |
| Santrifüj | Eppendorf Cenrifuge | 5810 R | Hamburg, Almanya |
| Protein analiz cihazı | Velp Scientifica | UDK 129 | Usmate, İtalya |
| Kül fırını | Elektra Rezistans | 14060 | Ankara, Türkiye |
| Spektrofotometre | Perkin Elmer | Lambda-35 | Waltham, MA, ABD |
| Karl Fischer titrasyon | Mettler Toledo | Easy KFV | Zaventem, Belçika |
| ICP-MS sistemi | Perkin Elmer | Elan DRC-e | Norwalk, CT, ABD |
| IR-MS sistemi | Thermo Finnigan | Delta V | Waltham, MA, ABD |
| FTIR cihazı | Perkin Elmer | Frontier | Waltham, MA, ABD |
| DSC cihazı | Perkin-Elmer | DSC 6000 | Norwalk, CT, ABD |
| HPLC sistemi | Shimadzu | LC 10 A | Kyoto, Japonya |
| LC-MS/MS sistemi | Thermo Scientific | TSQ Access Max | Waltham, MA, ABD |
| Orbitrap MS | Thermo Scientific | Exactive | Waltham, MA, ABD |

3.2. Salep örneklerinin toplanması

Türkiye saleplerini temsil edebilecek şekilde farklı illerden salep numunelerinin toplanmasında, projemizde danışman olarak görev alan Prof Dr. Ekrem Sezik'in 2007 yılında yapmış olduğu TÜBİTAK projesinde (TBAG-Ç, SEK/23, 103T008) belirttiği noktalar esas alınmıştır. Bu kapsamda Tablo 3'te belirtilen illerde faaliyet gösteren tüccarlardan ve/veya toplayıcılardan salebin iki farklı yoğun toplama dönemi olan nisan ve mayıs aylarında olmak üzere yaklaşık birer kilogram yaş salep yumrusu temin edilmiştir.

Tablo 3. Proje kapsamında salep numuneleri toplanan bölgeler

| Bölge sınıfı | Bölge | İller |
|--------------|-------------------|--|
| A | Kuzey Anadolu | Kastamonu-Tokat-Yozgat (Akdağ Madeni)-Bartın |
| B | Güneybatı Anadolu | Muğla |
| C | Güney Anadolu | Antalya-Mersin |
| D | Güneydoğu Anadolu | Kahramanmaraş-Adıyaman-Malatya |
| E | Doğu Anadolu | Van-Muş-Siirt-Hakkari-Bitlis |

Belirtilen illerden Kahramanmaraş ve Bitlis illerinden salep temin edilememesi nedeni ile İstanbul'da faaliyet gösteren bir tüccardan Güneydoğu Anadolu salebi adı altında kurutulmuş ve ipe dizilmiş olarak tüketime sunulan 1. 2. ve 3. kalite olmak üzere üç farklı kalitedeki salep örnekleri tedarik edilmiş ve bu illeri temsilen denemelere dahil edilmiştir. Temin edilen salep yumrusu örnekleri Şekil 12'de görüldüğü şekliyle laboratuvara ulaştırılarak ön hazırlık çalışmalarına başlanılmıştır.



Şekil 12. Yaş yumru olarak toplanan salep örnekleri

Ülkemiz salep profilini temsilen toplanan salep örneklerine ilişkin bir kodlama sistemi oluşturulmuştur. Bu sisteme göre ilk 2 karakter salep numunesinin toplandığı ilin il trafik plaka kodunu, sonrası iki karakter tüccar sıra numarasını ve son iki karakter ise toplama dönemine işaret etmektedir. Örnek olarak 07.T3.MAY. Antalya ilinden 3. tüccardan Mayıs döneminde alınan numuneyi göstermektedir.

3.3. Yardımcı madde, katkı maddesi ve taklit / tağşiş materyallerinin toplanması

Salebin taklit ve tağşiş edilmesinde kullanılan taklit, tağşiş ve katkı (TTK) maddeleri gamlar, nişastalar, ticari katkıları ve diğeri taklit/tağşiş maddeleri olmak üzere 4 grupta sınıflandırılmış (Tablo 4) ve gruplarda yer alan her bir malzeme ülkemizde satışa sunulan üç farklı markadan olmak üzere üretici veya tedarikçilerden temin edilmiştir.

Tablo 4. Proje kapsamında izlenen taklit, tağşiş ve katkı (TTK) maddeleri

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

3.4. Salep ve araştırma konusu diğeri materyallerin ön hazırlık çalışmaları

Ülkemiz saleplerini temsil edebilecek şekilde toplanan yaş salep yumrusu örnekleri laboratuvara getirildikten sonra geleneksel uygulamalarda olduğu şekliyle kurutma işlemine tabii tutulmuştur. Bu amaçla, öncelikle yaş yumrular yıkanarak toprak ve kirlilik unsurları uzaklaştırılmıştır. Temizlenen yumrular kaynar su içinde 15 dakika kaynatılmış (Şekil 13a) ve boyut küçültme işlemine tabii tutularak (Şekil 13b) güneş altında elle kırılmayacak düzeye ulaşıncaya kadar kurutulmuştur (Şekil 13c). Geleneksel usullerle gerçekleştirilen bu işlemler sonucunda kurutulan salep numunelerinin nem düzeyi $7,67 \pm 1,15$ olarak belirlenmiştir.

Kurutulan örnekler polietilen torbalara konulmuş ve uygun şekilde etiketlenerek oda koşullarında muhafazası gerçekleştirilmiştir.



Şekil 13. Kaynatma öncesi temizlenmiş salep yumrusu örnekleri, kaynatma işlemi ve kaynatma sonrası güneşte bekletme işlemleri

Araştırmalarda kullanılacak olan tüm salep örnekleri ve TTK maddeleri temel analizler, enzimatik analizler ve aletsel analizler öncesinde homojen bir toz haline getirilmiştir. Bu amaçla öncelikle yumru ve partikül haldeki örnekler bir çekiçli değirmen kullanılarak öğütülmüş ve ardından homojen yapıda numuneler elde edilmesi amacıyla farklı gözenek çaplarına sahip eleklerden geçirilmiştir. Gerçekleştirilen elek analizine ait sonuçlar Tablo 5'te sunulmaktadır.

Tablo 5. Farklı gözenek çapına sahip eleklerden geçirilen salep numuneleri oranları

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

Tablo 5'te belirtildiği şekliyle partikül büyüklüğüne bağlı olarak fraksiyonlarına ayrılan salep numunelerinde gerekli olan homojenizasyonun sağlanabilmesi amacıyla 150 μm (100 mesh) ölçülere sahip eleğin altında kalan fraksiyon toplanılmıştır. Benzer işlem taklit, tağşiş ve katkı maddeleri için de gerçekleştirilmiş olup salep numuneleri ile bu maddelerin karışmasındaki homojenizasyon probleminin önüne geçilmiştir. Elde edilen tüm preparatlar kodlanarak 50 mL'lik polietilen santrifüj tüpler içinde analiz süresine kadar buzdolabı şartlarında (+4°C) muhafaza edilmiştir. Şekil 14'te güneşte bekletme sonucu kurutulan (Şekil 14a) ve sonrasında öğütülerek (Şekil 14b) analizler için uygun hale getirilen (Şekil 14c) salep örnekleri görülmektedir.



Şekil 14. Kurutulmuş ve öğütülmüş salep örnekleri

3.5. Homojen toz karışımların oluşturulması

Karışım haldeki toz örneklerin içerisinde mevcut salep miktarının belirlenebilmesi amacıyla homojen toz karışımları oluşturulmuştur. Bu karışımların oluşturulmasında projemizde danışman olarak görev alan Prof. Dr. Ekrem SEZİK tarafından bildirilen oranlar referans alınmıştır. Buna göre ülkemizde satışa sunulan ticari salep içecek tozu içeren karışımlarının bileşimlerinde %59,50 şeker, %30,80 yağsız süt tozu, %4,40 buğday nişastası, %3,90 guar gam, %0,50 salep aroması, %0,40 tuz, %0,30 salep ve %0,20 tarçın olduğu bildirilmektedir. Bildirilen bu reçete üzerinden oluşturulan ve farklı oranlarda salep içeren salep reçeteleri Tablo 6 ve 7'de verilen bileşimlere göre oluşturulmuştur. Homojen toz karışımlarının oluşturulmasında bileşenler bir beher içerisinde toplanmış, öncelikle bir baget yardımıyla karıştırılmış ve daha sonra manyetik karıştırıcıda 1000 devir/dakika hızda 5 dakika homojen bir karışım haline getirilmesi sağlanmıştır. Sonraki aşamada ise bir ultraturaks yardımıyla 3200 devir/dakika hızda 5 dakika karıştırılarak karışımın homojenizasyon derecesi artırılmıştır.

Tablo 6. Farklı oranlarda (%0-%10) salep içeren homojen toz karışımları bileşimleri

| No | SLP | SKR | YST | BNT | GUM | SKA | TUZ | TRC |
|----|-------|-------|-------|------|------|------|------|------|
| 01 | 0,00 | 59,69 | 30,89 | 4,41 | 3,91 | 0,50 | 0,40 | 0,20 |
| 02 | 0,11 | 59,62 | 30,86 | 4,41 | 3,91 | 0,50 | 0,40 | 0,20 |
| 03 | 0,21 | 59,56 | 30,83 | 4,40 | 3,90 | 0,50 | 0,40 | 0,20 |
| 04 | 0,31 | 59,50 | 30,80 | 4,40 | 3,90 | 0,50 | 0,40 | 0,20 |
| 05 | 0,41 | 59,44 | 30,77 | 4,39 | 3,89 | 0,50 | 0,40 | 0,20 |
| 06 | 0,61 | 59,32 | 30,71 | 4,38 | 3,89 | 0,50 | 0,40 | 0,20 |
| 07 | 0,80 | 59,21 | 30,65 | 4,38 | 3,88 | 0,50 | 0,40 | 0,20 |
| 08 | 1,00 | 59,09 | 30,58 | 4,37 | 3,87 | 0,50 | 0,40 | 0,20 |
| 09 | 1,29 | 58,91 | 30,49 | 4,35 | 3,86 | 0,49 | 0,40 | 0,20 |
| 10 | 1,58 | 58,74 | 30,40 | 4,34 | 3,85 | 0,49 | 0,39 | 0,20 |
| 11 | 1,87 | 58,57 | 30,31 | 4,33 | 3,84 | 0,49 | 0,39 | 0,20 |
| 12 | 2,26 | 58,34 | 30,20 | 4,31 | 3,82 | 0,49 | 0,39 | 0,20 |
| 13 | 2,64 | 58,11 | 30,08 | 4,29 | 3,81 | 0,49 | 0,39 | 0,20 |
| 14 | 3,02 | 57,89 | 29,96 | 4,28 | 3,79 | 0,49 | 0,39 | 0,19 |
| 15 | 3,48 | 57,61 | 29,82 | 4,26 | 3,77 | 0,48 | 0,39 | 0,19 |
| 16 | 3,95 | 57,33 | 29,67 | 4,24 | 3,76 | 0,48 | 0,38 | 0,19 |
| 17 | 4,41 | 57,06 | 29,53 | 4,22 | 3,74 | 0,48 | 0,38 | 0,19 |
| 18 | 5,04 | 56,68 | 29,34 | 4,19 | 3,71 | 0,48 | 0,38 | 0,19 |
| 19 | 5,67 | 56,30 | 29,14 | 4,16 | 3,69 | 0,47 | 0,38 | 0,19 |
| 20 | 6,29 | 55,93 | 28,95 | 4,13 | 3,66 | 0,47 | 0,38 | 0,19 |
| 21 | 7,84 | 55,00 | 28,47 | 4,06 | 3,60 | 0,46 | 0,37 | 0,18 |
| 22 | 8,52 | 54,60 | 28,26 | 4,04 | 3,58 | 0,46 | 0,37 | 0,18 |
| 23 | 9,18 | 54,21 | 28,06 | 4,01 | 3,55 | 0,45 | 0,36 | 0,18 |
| 24 | 10,00 | 53,72 | 27,80 | 3,97 | 3,52 | 0,45 | 0,36 | 0,18 |

Tablo 7. Farklı oranlarda (%0-%100) salep içeren homojen toz karışımları bileşimleri

| No | SLP | SKR | YST | BNT | GUM | SKA | TUZ | TRC |
|----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 01 | 0,00 | 59,69 | 30,89 | 4,41 | 3,91 | 0,50 | 0,40 | 0,20 |
| 02 | 10,00 | 53,72 | 27,80 | 3,97 | 3,52 | 0,45 | 0,36 | 0,18 |
| 03 | 20,02 | 47,74 | 24,71 | 3,53 | 3,13 | 0,40 | 0,32 | 0,16 |
| 04 | 30,04 | 41,75 | 21,61 | 3,09 | 2,74 | 0,35 | 0,28 | 0,14 |
| 05 | 40,07 | 35,77 | 18,51 | 2,64 | 2,34 | 0,30 | 0,24 | 0,12 |
| 06 | 50,10 | 29,78 | 15,42 | 2,20 | 1,95 | 0,25 | 0,20 | 0,10 |
| 07 | 60,15 | 23,79 | 12,31 | 1,76 | 1,56 | 0,20 | 0,16 | 0,08 |
| 08 | 70,17 | 17,80 | 9,22 | 1,32 | 1,17 | 0,15 | 0,12 | 0,06 |
| 09 | 80,16 | 11,84 | 6,13 | 0,87 | 0,78 | 0,10 | 0,08 | 0,04 |
| 10 | 90,12 | 5,90 | 3,05 | 0,44 | 0,39 | 0,05 | 0,04 | 0,02 |
| 11 | 100,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 12 | 0,00 | 100,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 13 | 0,00 | 0,00 | 100,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 14 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 100,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 15 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 100,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 16 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 100,00 | 0,00 | 0,00 |
| 17 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 100,00 | 0,00 |
| 18 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 100,00 |

3.6. Piyasa izleme çalışmaları

Gerçek salep ile taklit ve taşıyıcı maddeleri arasında belirleyici olan yöntemlerin geliştirilmesinden sonra ülkemizde satışa sunulan toplam 40 adet salep içecek tozu örnekleri (Tablo 8) ve orijinal salep olduğu ifade edilen 20 adet toz numune (Tablo 9) ve belirlenen analitik parametreler açısından incelenmiştir. İnceleme kapsamındaki numuneler salep tozu ticari işletmelerden ve yerel marketlerden temin edilmiştir.

Tablo 8. Piyasa izleme çalışmaları kapsamında tedarik edilen salep içecek tozu örnekleri

| KOD | Etiket açıklaması |
|------|---|
| TS01 | Şeker, yağsız süt tozu, kıvam artırıcı, doğal salep , aroma vericiler, tuz, tatlandırıcılar |
| TS02 | Şeker, nişasta, süt tozu, salep aroması, vanilya, ksantan gam, tarçın |
| TS03 | Şeker, yağsız süt tozu, mısır nişastası, kıvam artırıcı, salep aroması, tarçın, salep tozu, vanilin aroması, tuz |
| TS04 | Şeker, yağsız süt tozu, kıvam artırıcılar, salep aroma verici, salep tozu (%0,3) , tarçın aroma verici |
| TS05 | Nişasta, yağsız süt tozu, şeker, kahve beyazlatıcısı, süt proteini, emülgatör, aroma vericiler, topaklanma önleyici, tuz, tarçın, tatlandırıcı, salep tozu (%0,01) |
| TS06 | Şeker, patates nişastası, yağsız süt tozu, salep tozu (%1) , aroma verici, toz tarçın, topaklanma önleyici, tuz, kıvam artırıcı |

-
- TS07** Şeker, yağsız süt tozu, patates nişastası, aroma vericiler, tarçın, topaklanma önleyici, **salep tozu (%0,3)**
- TS08** Şeker, modifiye patates nişastası, yağsız süt tozu, laktöz, aroma vericiler, kıvam artırıcılar, tarçın, **salep tozu (%0,1)**, tatlandırıcı
- TS09** Şeker, yağsız süt tozu, kıvam artırıcı, **doğal salep**, zencefil, topaklanma önleyici, salep aroması, süt aroması, vanilya aroması, tarçın, tuz,
- TS10** Şeker, mısır nişastası, süt tozu, **salep**, tarçın, trisodyum sitrat, vanilin
- TS11** Şeker, yağsız süt tozu, mısır nişastası, aroma vericiler, glikoz şurubu, emülgatör, sodyum kazeinat, tarçın, **salep (%0,1)**, renklendirici
- TS12** Şeker, süt tozu, mısır nişastası, kıvam artırıcı, aroma vericiler, topaklanma önleyiciler
- TS13** Şeker, mısır nişastası, süt tozu, kıvam artırıcı, tarçın, aroma vericiler, tatlandırıcı karışım,
- TS14** Şeker, süt tozu, , topaklanma önleyiciler, kıvam artırıcı, vanilin, toz tarçın, aroma vericiler, renklendiriciler
- TS15** Şeker, süt tozu, kıvam artırıcı, emülgatör, aromalar, topaklanma önleyici, tarçın
- TS16** Şeker, patates nişastası, yağsız süt tozu, modifiye tapyoka nişastası, maltodekstrin, **salep tozu (%0,3)**, kıvam artırıcı, tuz, aroma verici, toz tarçın, topaklanma önleyici,
- TS17** Şeker, süt tozu, **doğal salep (%6,5)**, dekstroz, peynir altı suyu, topaklanma önleyici, stabilizör, aroma vericiler
- TS18** Şeker, nişasta, yağsız süt tozu, süt aroması, toz tarçın, salep aroması, topaklanma önleyici
- TS19** Bileşim beyan edilmemiş
- TS20** Şeker, mısır nişastası, süt tozu, **doğal salep**, kıvam artırıcı, vanilin, salep aroma, vanilin aroması
- TS21** Şeker, modifiye mısır nişastası, yağsız süt tozu, **salep tozu (%0,4)**, inceltici, aroma verici, topaklanma önleyici
- TS22** Şeker, süt tozu, mısır nişastası, kıvam artırıcı, toz tarçın, aroma vericiler, topaklanma önleyici
- TS23** Şeker, yağsız süt tozu, guar gam, mısır nişastası, salep aroması, tarçın aroması, silikon 225
- TS24** Bileşim beyan edilmemiş
- TS25** Bileşim beyan edilmemiş
- TS26** **Doğal dağ salebi (%6)**, şeker, topaklanma önleyici, mısır nişastası, kıvam artırıcı, guar
- TS27** Şeker, nişasta, yağsız süt tozu, süt aroması, guar gum, tarçın, vanilin, salep aroması, topaklanma önleyici
- TS28** Şeker, kahve beyazlatıcı, kazeinat, emülgatör, topaklanma önleyici, renklendirici, yağsız süt tozu, modifiye nişasta, kıvam artırıcı, tarçın, aroma, **salep (%0,4)**, vanilin
-

| | |
|-------------|---|
| TS29 | Şeker, mısır nişastası, süt tozu, kıvam artırıcı, damla sakızı, maltodekstrin, tarçın, salep , aroma vericiler |
| TS30 | Bileşim beyan edilmemiş |
| TS31 | Şeker, süt tozu, mısır nişastası, doğal salep , kahve beyazlatıcısı, emülgatör, renklendirici, vanilya, karbonat, admül, xantan gum, guar gum, aroma, tarçın, trikalsiyum fosfat |
| TS32 | Bileşim beyan edilmemiş |
| TS33 | Öğütülmüş saf salep |
| TS34 | Şeker, modifiye mısır nişastası, yağsız süt tozu, laktoz, kıvam artırıcı, salep tozu (%2) , aroma verici |
| TS35 | Şeker, yağsız süt tozu, mısır nişastası, maltodekstrin, peynir altı suyu tozu, aroma vericiler, kıvam vericiler, sodyum kazeinat, tarçın, renklendiriciler |
| TS36 | Şeker, süt tozu, mısır nişastası, salep (%1) , kıvam artırıcı, aroma vericiler |
| TS37 | Şeker, yağsız süt tozu, modifiye mısır nişastası, salep (%1) , kıvam artırıcı, tarçın, aroma verici |
| TS38 | Saf salep |
| TS39 | %100 doğal salep |
| TS40 | Şeker, yağsız süt tozu, buğday nişastası, kıvam artırıcı, salep aroması, tuz, salep (%0,3) , tarçın aroması, vanilya, tarçın |

Tablo 9. Piyasa izleme çalışmaları kapsamında gerçek salep adı altında satışa sunulan ürün kodları

| KOD | KOD |
|------------|------------|
| PS01 | PS11 |
| PS02 | PS12 |
| PS03 | PS13 |
| PS04 | PS14 |
| PS05 | PS15 |
| PS06 | PS16 |
| PS07 | PS17 |
| PS08 | PS18 |
| PS09 | PS19 |
| PS10 | PS20 |

3.7. Taklit ve tağışın belirlenmesinde kullanılan yöntemler

Proje kapsamında kullanılan tüm analitik yöntemler, yöntemlere ait parametreler ve kullanılan cihaz ve kit bilgileri Tablo 10'da sunulmaktadır.

Tablo 10. Kullanılan analitik yöntemler

| Analiz grubu | Parametreler | Yöntem | Kullanılan cihaz / kit |
|-------------------------------------|--|---------------------|--------------------------------|
| Temel Analizler | Rutubet | Titrimetrik | Karl Fischer Titrasyon |
| | Kül | Gravimetrik | Kül Fırını |
| | %10 HCl'de çözünmeyen kül | Gravimetrik | Kül Fırını |
| | Protein miktarları | Kjeldahl | Kjeldahl Protein Analiz Cihazı |
| | İndirgen şekerler | Kromatografik | HPLC |
| Enzimatik Analizler | Glikomannan, Nişasta | Enzimatik | Enzimatik Kitler |
| Elementel Bileşim | ⁵⁷ Fe, ⁶⁶ Zn, ⁵⁵ Mn, ⁶³ Cu, ⁵² Cr, ⁶⁰ Ni, ⁸⁸ Sr, ⁴⁷ Ti, ⁸⁵ Rb, ¹³⁸ Ba, ⁹⁸ Mo, ⁵¹ V, ⁵⁹ Co, ⁷ Li, ⁶⁹ Ga, ⁸² Se, ¹³³ Cs, ¹²¹ Sb, ⁹ Be, ²⁰⁵ Tl, ²⁰⁹ Bi | Kütle spektrometrik | ICP-MS |
| Kızılötesi (IR) Spektrumu Analizi | IR Spektrum | Spektrometrik | FTIR |
| İzotop Oranları Analizleri | ¹³ C/ ¹² C, ¹⁵ N/ ¹⁴ N, ² H/ ¹ H, ¹⁸ O/ ¹⁶ O | Kütle spektrometrik | IR-MS |
| Kalorimetrik Ölçümleri | Erime sıcaklığı, Erime ısısı, Tg/Step | Kalorimetrik | DSC |
| Karbonhidrat Bileşikleri Analizleri | Sakaroz, Glikoz, Fruktoz, Maltoz, Mannoz, Galaktoz, Arabinoz | Kromatografik | HPLC |
| Organik Bileşikleri Analizleri | Asit Tartarik A., Sitrik A., Fumarik A., Malik A., Propiyonik A., Bütirik A., Laktik Asit | Kütle spektrometrik | ORBITRAP-MS |
| Amino Bileşikleri Analizleri | Asit Arjinin, Aspartik A., Sistein, Glutamik A., Histidin, İzolösin, Lösin, Lizin, Metiyonin, Fenilalanin, Prolin, Serin, Treonin, Tirozin, Valin | Kütle spektrometrik | LC-MS/MS |

3.7.1. Temel analizler

3.7.1.1. Rutubet miktarı

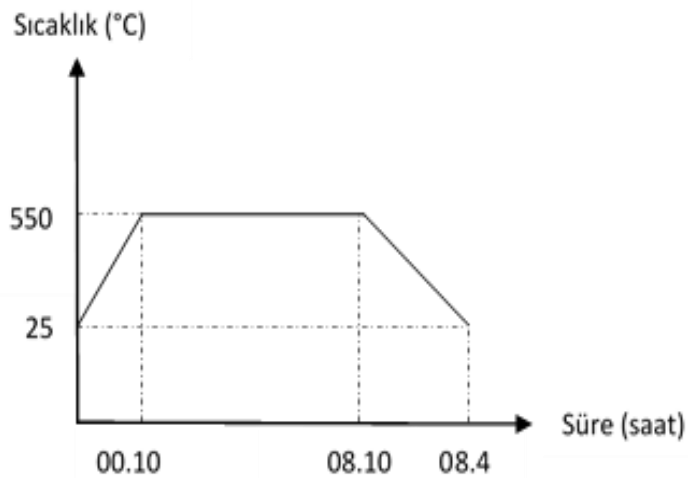
Numunelerdeki rutubet miktarı Karl Fischer titrasyon cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizlerde, öğütülerek 100 mesh elekten geçirilerek hazırlanan örneklerden 0,20-0,25 gram tartılmış ve Tablo 11'de belirtilen şartlar altında ölçümler yapılmıştır.

Tablo 11. Karl Fischer titrasyon cihazı çalışma koşulları

| | |
|--------------------------|-------------------------|
| Cihaz | Mettler Toledo Easy KFV |
| Formamid hacmi | 30 mL |
| Combi Metanol hacmi | 30 mL |
| Combi Titrant 5 hacmi | Otomatik |
| Maksimum başlangıç hacmi | 50 µL/dak |
| Karıştırma ön süresi | 60 sn |
| Voltaj | 100 mV |

3.7.1.2. Kül miktarları

Numunelerdeki kül miktarı kül fırını (GEMO PC 107, Türkiye) kullanılarak tayin edilmiştir. Bu amaçla cihazın porselen krozesine hazırlanan örnekten 3 gram tartılmış ve üzerine 100 µL %3'lük H₂O₂ ilave edilerek aşağıdaki şekilde belirtilen sıcaklık programındaki kül fırınında yakılmıştır. Süre sonunda krezeler kül fırınından alınarak desikatöre yerleştirilmiş ve tartımları gerçekleştirilerek başlangıç ağırlık oranına göre % kül miktarı belirlenmiştir.



Şekil 15. Kül analizi sıcaklık süre grafiği

3.7.1.3. %10 HCl'de çözünmeyen kül miktarları

Numunelerin %10 HCl'de çözünmeyen kül analizleri için öncelikle numunelerde toplam kül tayini gerçekleştirilmiş ve krozedeki kül üzerine %10 HCl çözeltisi ilave edilerek bir behere alınmıştır. Hazırlanan çözelti 5 dakika kaynatılmış ve soğumasının ardından filtre edilmiştir. Filtre kağıdı üzerindeki süzüntü ile birlikte krozeye yerleştirilerek 105°C'de 1 saat kurutulmuş ve sonra 550°C'de 1 saat kül fırınında bekletilmiştir. Süre sonunda kroze kül fırınından alınarak desikatöre yerleştirilmiş ve tartımları gerçekleştirilerek başlangıç ağırlık oranına göre %10 HCl'de çözünmeyen kül miktarı belirlenmiştir.

3.7.1.4. Protein miktarları

Numunelerdeki protein düzeyleri Velp Scientifica (Usmate, İtalya) marka Kjeldahl protein analiz cihazı kullanılarak tespit edilmiştir. Hazırlanan numunelerden 1 gram alınarak Kjeldahl tüpüne yerleştirilmiş ve üzerlerine 2'şer adet katalizör ve antifoam tablet ve ayrıca 12 mL derişik H₂SO₄ (%96-98) ilave edilmiştir. Daha sonra digestion ünitesine yerleştirilen tüpler 40 dakika 300°C ve 90 dakika 420°C'de tamamen çözünür hale getirilmiştir. Süre sonunda tüpe 50 mL saf su eklenerek distilasyon ünitesine alınmıştır. Distilasyon işlemi cihazda otomatik olarak gerçekleşmektedir. Bu amaçla 50 mL NaOH, 30 mL borik asit ve 3-4 damla indikatör çözeltisi kullanılmaktadır. Yaklaşık 5 dakika süren distilasyon işlemi sonucunda çözelti bir erlene alınarak 0,2 N HCl kullanılarak titrasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Numunelerdeki % protein düzeyleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Protein} = N \times f \times (V_1 - V_0) \times (0,014 / m) \times 100 \times \text{ÇF} \quad \text{Eşitlik 10}$$

N : Titrasyonda kullanılan HCl'nin normalitesi, f : Titrasyonda kullanılan HCl'nin faktörü, V₁ : Titrasyonda kullanılan HCl'nin hacmi (mL), V₀ : Kör için harcanan HCl'nin hacmi (mL), m : numune kütlesi (gram), ÇF : Çevirme Faktörü (6,25).

3.7.1.5. İndirgen şeker düzeyleri

Numunelerdeki indirgen şeker düzeyleri karbonhidrat bileşikleri analizleri kısmında belirtilen yöntem kullanılarak tespit edilen glikoz ve fruktoz değerlerinin toplamı olarak ifade edilmiştir.

3.7.2. Enzimatik analizler

3.7.2.1. Glikomannan düzeylerinin belirlenmesi

Numunelerdeki glikomannan miktarı "Megazyme® Glikomannan Analiz Prosedürü (K-GLUM 03/14)" referans alınarak tespit edilmiştir. Yöntem aşağıda belirtilen aşamaları içermektedir:

a) Cam bir test tüpüne mg duyarlılıkta 0,1 gram numune tartılmış ve üzerine 5 mL etanol (%80 v/v) çözeltisi ilave edilerek vorteks yardımıyla homojenize edilmiştir.

b) Hazırlanan tüp 90°C sıcaklıkta 5 dakika termoreaktörde inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda 5 mL etanol (%80 v/v) ilave edilerek 1,500 g dönüş hızında 10 dakika boyunca santrifüjlenmiştir.

c) Santrifüjleme sonucu oluşan üst faz atılmış ve alt pellet fazı 5 mL etanol (%80 v/v) ile yeniden süspansiyon edilerek vorteks ile homojenize edilmiş ve üzerine tekrar 5 mL etanol (%80 v/v) ilave edilmiştir.

d) Hazırlanan tüpler tekrar 1,500 g dönüş hızında 10 dakika boyunca santrifüjlenmiştir.

e) Santrifüjleme sonucu oluşan üst faz atılmış ve alt pellet fazı "Solution 1" çözeltisinden 8 mL kullanılarak süspansiyon edilmiştir, (Solution 1 Hazırlanması: Kite bulunan Bottle 1 450 mL distile suda çözündürülmüş ve çözelti pH 1M HCl veya 1 M NaOH kullanılarak 4,5'e ayarlanmış ve son olarak hacim 500 ml'ye tamamlanmıştır).

f) Hazırlanan tüpler 30 saniye vortekslenerek homojenize edilmiş ve termoreaktör içersine yerleştirilerek 90°C'de 30 saniye inkübe edilmiştir.

g) İnkübe edilen tüpler tekrar vortekste kuvvetlice karıştırılmış ve aynı sıcaklıktaki termoreaktör içersine yerleştirilerek 30 saniye inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonucunda tüpler yeniden vortekslenmiştir.

h) Homojenize edilmiş pelet fazını içeren test tüpü termoreaktör içersinde 90°C'de 4 dakika boyunca bekletilmiştir. Süre sonunda inkübe edilen tüp vortekslenmiştir.

Test tüpü 40°C'lik bir su banyosu içersinde yerleştirilerek 5 dakika boyunca bekletilmiştir.

i) Su banyosundan alınan test tüpü içersine analiz kiti içeriğinde yer alan "Suspension 4 (β -mannanase)" solüsyonundan 20 μ L ilave edilmiş ve tüp 30 saniye boyunca vortekslenmiştir.

j) Test tüpü 40°C sıcaklığındaki su banyosuna tekrar yerleştirilerek 60 dakika boyunca inkübasyona bırakılmış, inkübasyon süresince aralıklı olarak (3 kez) vortekslenmiştir.

k) Test tüpü içeriği bir beher içersine ultra saf su ile iyice yıkama yoluyla aktarılmış ve son hacim 70 mL olana kadar saf su ilave edilmiştir.

l) 1 M NaOH çözeltisi kullanılarak beher içersindeki çözeltinin pH değeri 12,5 olarak ayarlanmış ve çözelti 10 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir.

m) Beherin içersine taze olarak hazırlanan 200 mM sodyum fosfat tampon çözeltisinden (pH 6,5) 20 mL ilave edilmiştir.

n) 1 M HCl çözeltisi kullanılarak beher içersindeki çözeltinin pH değeri 6,5 olarak ayarlanmış ve 250 mL'lik balon jöjeye ultra saf su ile iyice yıkama yoluyla aktarılmış ve çözeltinin hacmi ultra saf su ile 250 mL'ye tamamlanmıştır.

o) 0,5 mL örnek çözeltisinden spektrofotometre küvetine alınmış ve üzerine analiz kiti içeriğinde yer alan “*Suspension 5 (β-Glucosidase + β-mannosidase)*” çözeltisinden 0,02 mL ilave edilmiştir. Kör okuma için hazırlanan küvete ise 0,5 mL örnek çözeltisi ve 0,02 mL saf su (~35°C) konulmuştur.

p) Hazırlanan kör ve örnek küvetleri hafifçe çalkalanmış ve ağızları kapatılarak 35°C sıcaklıktaki bir etüvde 20 dakika boyunca inkübe edilmiştir.

q) Hazırlanan her iki küvete 2 mL saf su (~35°C), 0,2 mL *Solution 2* ve 0,1 mL *Solution 3* ilave edilmiştir. (*Solution 3* Hazırlanması: Kit paketinde yer alan *Bottle 3* 12 mL distile su içinde çözündürülerek hazırlanmıştır).

r) Kör ve örnek küvetleri hafifçe çalkalanarak 30°C sıcaklıktaki bir etüvde 3 dakika inkübe edilmiştir. Süre sonunda küvetler 340 nm dalga boyundaki spektrofotometre cihazında okutularak elde edilen absorbands değeri not edilmiştir (=A₁)

s) A₁ değerinin belirlenmesinden sonra spektrofotometre küvetleri (örnek ve kör küvetleri) içine kit içeriğinde yer alan *Suspension 6* çözeltisinden 0,02 mL ilave edilmiş, küvetler hafifçe çalkalanmış ve 10 dakika bekletildikten sonra spektrofotometre cihazında okutulmuştur (=A₂).

t) Küvetlerin her birine analiz kiti içeriğinde yer alan *Suspension 7* çözeltisinden 0,02 mL ilave edilmiş, küvetler hafifçe çalkalanmış ve 20 dakika bekletildikten sonra spektrofotometre cihazında okutulmuştur (=A₃).

u) Absorbans değeri 2 dakika aralıklarla tekrar okutularak kontrol edilir ve sabit bir değer elde edilene kadar bu okumalara devam edilir. Absorbans değerinin artış eğiliminde olması reaksiyonun devam ettiğine işaret etmektedir. Bu süre örneğin glikomannan içeriğine bağlı olarak 20 dakikadan sonra 30 dakikaya kadar sürebilmektedir.

v) Glikomannan miktarının (% m/m) belirlenebilmesi amacıyla aşağıda yer alan formülden yararlanılmıştır.

$$\Delta A_{\text{glikomannan}} = (A_3 - A_1)_{\text{Numune}} - (A_3 - A_1)_{\text{Kör}} \quad \text{Eşitlik 11}$$

$$\text{Glikomannan (g/100 g)} = \Delta A_{\text{glikomannan}} \times 36,8 \text{ (g/100 g)}$$

Yukarıdaki formülde hesaplanan glikomannan düzeyi aşağıda belirtilen formülde de ilgili değerler yerlerine konularak hesaplanabilmektedir.

$$\text{Glikomannan (g/100 g)} = \frac{\Delta A_{\text{glikomannan}}}{6300} \times \frac{V}{1000} \times MW \times \frac{FEV}{0,5} \times \frac{100}{W} \times F \quad \text{Eşitlik 12}$$

6300 = 340 nm dalga boyunda NADPH sönüm katsayısı, V = Spektrofotometre küvetindeki son hacim (2,86 mL), V/1000 = NADPH molaritesini mole çevirmek için kullanılan faktör, MW = anhidro-D-glikoz/D-mannoz molekül ağırlığı (162,14), FEV = Balon josedeki son hacim (250 mL), v = Spektrofotometre küvetine eklenen örnek hacmi (0,5 mL), w = Numune miktarı (0,100 g), 100/w = Glikomannan içeriğini numunenin bir yüzdesi şeklinde ifade eden faktör değeri, F = Dilüsyon faktörü (1)

3.7.2.2. Nişasta miktarlarının belirlenmesi

Numunelerdeki nişasta miktarı “Megazyme® Toplam Nişasta HK Analiz Prosedürü (AMG / α -amylase / HK Method)” referans alınarak tespit edilmiştir. Yöntem aşağıda belirtilen aşamaları içermektedir:

a) Cam bir test tüpüne mg duyarlılıkta 0,1 gram numune tartılmış ve dispersiyona yardımcı olması açısından test tüpüne 0,2 mL seyreltik etanol (%80 v/v) çözeltisi ilave edilmiştir.

b) Test tüpüne analiz kitinde belirtilen şekilde hazırlanmış olan 3 mL “termostabil α -amilaz solüsyonu”ndan eklenmiş ve 6 dakika boyunca test tüpü kaynar su banyosunda bekletilmiştir.

c) Test tüpüne analiz kiti içeriğindeki “amiloglikozidaz (20U) çözeltisi”nden 0,1 mL eklenmiş ve vorteks yardımıyla tüp içeriği homojenize edilmiştir.

d) Test tüpü 50°C sıcaklığındaki su banyosunda yerleştirilerek 30 dakika boyunca bekletilmiş ve süre sonunda balon jöje içinde 100 mL’ye saf su ile tamamlanmıştır.

e) Balon jöjeden 35 mL çözelti santrifüj tüpüne alınarak 3000 devir/dak, dönüş hızında 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.

f) Santrifüj tüpünün üst kısmındaki berrak çözülden 0,05 mL numune spektrofotometre küvetine alınmış ve üzerine 2 mL saf su, analiz kiti içeriğinde yer alan “buffer çözeltisi”nden 0,1 mL ve analiz kitinde belirtilen şekilde hazırlanmış olan “NADP+/ATP çözeltisi”nden 0,1 mL eklenmiştir.

g) Numune için hazırlanan bu küvet, 3 dakika sonunda spektrofotometre cihazında 340 nm dalga boyunda kör okuma ile karşılaştırılarak okutulmuştur. Elde edilen değer “A1_{numune}” şeklinde tanımlanmıştır.

h) Kör okuma içi boş bir spektrofotometre küvetine 2,05 mL saf su lave edilmiştir. Üzerine “buffer çözeltisi”nden 0,1 mL ve “NADP+/ATP çözeltisi”nden 0,1 mL eklenerek 3 dakika bekleme sonucunda küvet, numune için hazırlanan küvet ile birlikte spektrofotometre cihazında 340 nm dalga boyunda okutulmuştur. Elde edilen değer “A1_{kör}” şeklinde tanımlanmıştır.

i) Küvetlerin her birinin üzerine analiz kiti içeriğinde yer alan “HK/G-6-PDH çözeltisi”nden 0,02 mL eklenmiştir, 5 dakika sonunda küvetler spektrofotometre cihazında yine aynı dalga boyunda okutulmuştur. Elde edilen değerler “A2_{kör}” ve “A2_{numune}” şeklinde tanımlanmıştır.

j) Toplam nişasta miktarının belirlenebilmesi amacıyla aşağıda yer alan formülden yararlanılmıştır.

$$1,1685 \times \Delta A_{D\text{-Glikoz}} \text{ (g/L)}$$

Eşitlik 13

$$\Delta A_{D\text{-Glikoz}} = (A_2 - A_1)_{\text{Numune}} - (A_2 - A_1)_{\text{Kör}}$$

$$C \text{ (g/L)} = \frac{V \times MW}{\epsilon \times d \times v} \times \frac{162}{180} \times \Delta A_{D\text{-Glikoz}}$$

C = Numunedeki toplam nişasta konsantrasyonu, V = Spektrofotometre küvetindeki son hacim (2,27 mL), MW = D-glikoz molekül ağırlığı (180,16 g/mol), ϵ = 340 nm dalga boyunda NADPH sönüm katsayısı (6300), d = ışık yolu (1 cm), v = Spektrofotometre küvetine eklenen örnek hacmi (0,05 mL), 162/180 = Serbest D-glikoz'dan anhidro D-glikoz oluşum katsayısı

3.7.3. Aletsel analizler

3.7.3.1. Elementel bileşim

Numunelerin elementel bileşimi ICP-MS yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Analizlerde homojen hale getirilmiş olan toz örneklerden 0,10±0,01 g tartılarak mikrodalga ünitesinin (Berghof Speedwave® Four Microwave System, Eningen, Almanya) teflon kapları içine konulmuş ve üzerine 5 mL HNO₃ ve 2 mL H₂O₂ eklenmiştir. Mikrodalga ünitesinin sıcaklık koşulları oda sıcaklığından 170°C'ye 5 dakika ve ardından 190°C'ye 15 dakikada artış şeklinde programlanarak numunelerin tamamen çözünür hale getirilmesi sağlanmıştır. Yakma işlemi sonucunda örnekler oda sıcaklığına soğutulularak hacimleri 25 mL'ye ultra saf su kullanılarak tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti Tablo 12'de çalışma şartları verilen ICP-MS cihazında analiz edilmiştir.

Tablo 12. ICP-MS çalışma şartları

| | |
|--------------------------------|--|
| Cihaz | Elan DRC-e (Perkin Elmer SCIEX, Norwalk, CT, ABD) |
| Örnek girişi | Quartz CYCLONIC DRC Spray Chamber |
| RF Gücü | 1100 |
| Skimmer Cone | Nikel |
| Sampler Cone | Nikel |
| Nebulizer | Micromist Nebulizer 0,4 mL/dak |
| Gaz akış oranı (L/dak) | Nebulizer: 0,81. Auxillary: 1,20. Plazma: 19,00 |
| Tarama modu | Peak hopping |
| Analitik kütleler (amu) | Standart mod: ⁵⁷ Fe, ⁶⁶ Zn, ⁵⁵ Mn, ⁶³ Cu, ⁸⁸ Sr, ⁵² Cr, ⁶⁰ Ni, ⁴⁷ Ti, ⁸⁵ Rb, ¹³⁸ Ba, ⁹⁸ Mo, ⁵¹ V, ⁵⁹ Co, ⁷ Li, ⁶⁹ Ga, ⁸² Se, ¹³³ Cs, ¹²¹ Sb, ⁹ Be, ²⁰⁵ Tl ve ²⁰⁹ Bi |
| Tekrar sayısı | 3 |
| Oto örnekleyici | CETAX ASX-520 |
| Analitik kütle Dwell time (ms) | 50 |
| Internal standart | Tb |

3.7.3.2. Kızılötesi (IR) spektrumu analizi

Kızılötesi (IR) spektrumu analizi FTIR spektrometresi (Frontier, Perkin Elmer, Waltham, MA, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Araştırma konusu maddelerin homojen haldeki toz preparatları bir bağıet yardımıyla alınarak FTIR cihazının Attenuated Total Reflectance (ATR) kristali üzerine bırakılmış ve baskılama kolu yardımı ile tüm örnekler için aynı oranda ve spektrumu en iyi şekilde açığa çıkaran bir basınç uygulanmıştır. Her numune taraması öncesinde havaya karşı background spektrumu alınarak temel durum belirlenmiştir. Spektrum oda sıcaklığında numune başına 4 ölçüm olacak şekilde yapılmış ve tarama işlemleri 4000-600 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında, 8 cm⁻¹ çözünürlükte ve 1 cm⁻¹ aralıklarla gerçekleştirilmiştir.

3.7.3.3. İzotop oranları analizleri

Numunelerin izotop kütle oranları (¹³C/¹²C, ¹⁵N/¹⁴N, ²H/¹H ve ¹⁸O/¹⁶O) elementel tabanlı IR-MS cihazı kullanarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, 150±50 µg ağırlığındaki numune mikro kalay kapsül içine ultra hassas terazi kullanılarak tartılmış ve cihazın oto örnekleyici kısmına yerleştirilerek Tablo 13'te verilen koşullar altında analiz edilmişlerdir. Her bir numune ve referans ölçümü üç tekrarlı olarak analiz edilmiştir.

Tablo 13. IR-MS çalışma şartları

| | ¹³ C/ ¹² C ve ¹⁵ N/ ¹⁴ N | ² H/ ¹ H ve ¹⁸ O/ ¹⁶ O |
|--|--|--|
| Cihaz | Thermo Finnigan Isotope Ratio Mass Spectrometer, Delta V, (Waltham, MA, ABD) | |
| Elementel analizör | Thermo-Electron Flash EA 2000 | |
| Arayüz | Thermo Finnigan ConFlo IV | |
| Yazılım | Thermo Electron Isodat V 2.38 | |
| Oksidasyon reaktörü sıcaklığı | 1,020°C | Off |
| Redüksiyon reaktörü sıcaklığı | 450°C | 1450°C |
| Fırın sıcaklığı | 60°C | 100°C |
| Taşıyıcı gaz (He) akış hızı | 110 mL/dak | 120 mL/dak |
| Flaş yanma gazı (O ₂) akış hızı | 250 mL/dak | Off |
| ConFlo IV Interface He basıncı | 1,40 bar | 1,40 bar |
| ConFlo IV Interface CO ₂ H ₂ basıncı | 1,40 bar | 2,60 bar |
| ConFlo IV Interface N ₂ CO basıncı | 1,60 bar | 2,00 bar |

3.7.3.4. Kalorimetrik ölçümler

Numunelerin kalorimetrik ölçümleri Perkin Elmer marka DSC 6000 model diferansiyel tarama kalorimetresi (Norwalk, CT, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 10-20 mg ağırlığında hassas olarak alüminyum kaplara tartılan örnek referans olarak boş kaplara karşı analiz edilmiştir. DSC analizleri 0'dan 350°C'ye $\beta=10^{\circ}\text{C}/\text{dak}$ ısıtma oranında ve 30 mL/dak N_2 koşullarında gerçekleştirilmiştir. DSC cihazının ölçümleme tablosu standart indiyum kullanılarak yapılmıştır.

3.7.3.5. Karbonhidrat bileşikleri analizleri

Homojen haldeki numuneler analiz öncesinde ultrasaf su kullanılarak çözünebilir hale getirilmiş ve 0,45 μm membran filtreden geçirildikten sonra Tablo 14'te belirtilen şartlar altında analize alınmışlardır. Numunelerin seyreltme oranı HPLC cihazında karbonhidrat bileşiklerinin en iyi ayırımının ve pik büyüklüğünün elde edildiği düzeye göre belirlenmiştir.

Tablo 14. HPLC-RID çalışma koşulları

| | |
|-----------------------|---|
| Cihaz | Shimadzu - 10A (Shimadzu, Kyoto, Japonya) |
| Dedektör | Refractive Index Detector (RID) |
| Kolon | (CARBOsep Coregel 87P, 7,8x300 mm. Transgenomic, NE, ABD) |
| Yazılım | Lab solution |
| Kolon fırın sıcaklığı | 65°C |
| Enjeksiyon hacmi | 20 μL |
| Akış hızı | 0,6 mL/dak |
| Mobil faz | 0,125 mM H_2SO_4 |

3.7.3.6. Organik asit bileşikleri analizleri

Numunelerdeki organik asit düzeyleri ORBITRAP-MS yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Bu kapsamda öğütülmüş olarak hazırlanan salep numuneleri ve taşıyıcı materyallerindeki organik asit (tartarik asit, sitrik asit, fumarik asit, malik asit, propiyonik asit, bütirik asit ve laktik asit) miktarları analizi (Kivrak, 2015) ve (Regueiro vd., 2013)'in belirttiği yöntemlerin modifikasyonu ile ekstrakte edilmişlerdir. Bu yöntemle göre, homojenize edilmiş 1 g numune içerisinde %0,5 (v/v) formik asit bulunan 50 mL su ile ekstrakte edilmiştir. Karışım 5 dakika vorteks ile karıştırıldıktan sonra 4°C de 4000 devir/dak hızda 15 dakika santrifüj edilmiş ve ardından santrifüj işlemi sonrası elde edilen üst faz 0,2 μm PTFE membran filtreden geçirilerek Tablo 15'te belirtilen koşullar altındaki ORBITRAP-MS cihazına enjekte edilmiş ve Tablo 16'da verilen kütle değerleri kullanılarak organik asitlerin tespiti yapılmıştır.

Tablo 15. ORBITRAP-MS çalışma koşulları

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

Tablo 16. Organik asitlerin kütle değerleri

| Organik asit | Monoisotropik kütle m/z | Gerçek kütle m/z | İyonlaşma m/z |
|-----------------|-------------------------|------------------|---------------|
| Tartarik Asit | 150,0164 | 149,0088 | [M-H] |
| Sitrik Asit | 192,0270 | 191,0194 | [M-H] |
| Fumarik Asit | 116,0109 | 115,0032 | [M-H] |
| Malik Asit | 134,0215 | 133,0138 | [M-H] |
| Propiyonik Asit | 74,0368 | 73,0308 | [M-H] |
| Bütirik Asit | 88,0524 | 87,0427 | [M-H] |
| Laktik Asit | 90,0317 | 89,0251 | [M-H] |

3.7.3.7. Amino asit bileşikleri analizleri

Numunelerdeki serbest amino asit (arjinin, aspartik asit, sistein, glutamik asit, histidin, izolösin, lösin, lizin, metiyonin, fenilalanin, prolin, serin, treonin, tirozin ve valin) miktarları analizi (Kivrak, 2015)'in belirttiği yöntemle göre ultra performans sıvı kromatografisi kütle spektrometrisi / kütle spektrometrisi (UPLC-MS/MS) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Bu yöntemle göre, homojenize edilmiş 0,5 g numune içerisinde %0,1 (v/v) formik asit bulunan 10 mL su:metanol (80:20, v/v) çözeltisi ile ekstrakte edilmiştir. Karışım 5 dakika vorteks ile karıştırıldıktan sonra 4°C de 4000 devir/dak hızda 15 dakika santrifüj edilmiş ve ardından santrifüj işlemi sonrası elde edilen üst faz 0,2 µm PTFE membran filtreden geçirilerek Tablo 17'de belirtilen koşullar altındaki LC-MS/MS cihazına enjekte edilmiştir.

Tablo 17. LC-MS/MS çalışma koşulları

| | |
|-------------------------|--|
| Cihaz | Thermo Scientific- TSQ Quantum Access Max (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, ABD) |
| Kolon | Hypersil GOLD RP C18 (1,9µm), 50x2,1 mm |
| Yazılım | Xcalibur |
| Kolon fırın sıcaklığı | 40°C |
| Enjeksiyon hacmi | 10 µL |
| Kapiler sıcaklığı | 270°C |
| Buharlaştırma sıcaklığı | 50°C |
| Auxiliary gaz basıncı | 20 bar |
| Sheath gaz basıncı | 50 bar |
| Sprey Voltaj | ±3500 V |
| Mobil faz A | Su:MeOH 95:5, %0,1 formik A., 4 mM amonyum asetat |
| Mobil faz B | Metanol |

3.7.4. Yöntemlerin doğrulanması

Bu kapsamında salep ve tağşiş maddelerinin analizlerinde kullanılacak analitik yöntemlere ait parametrelerin en uygun hale getirilmesi ve yöntem doğrulama çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca çalışma materyalleri ile denemeler yapılarak belirtilen yöntemlerin amaca uygunluğu değerlendirilmiştir. Bu kapsamda elementel, karbonhidrat, organik asit ve amino asit bileşikler için yöntemlerin doğrusal aralıkları, ölçümleme denklemleri, ölçümleme katsayıları, tespit sınırları, tayin sınırları, tekrarlanabilirlik değerleri ve geri kazanım değerleri hesaplanırken; temel analizler, enzimatik analizler, izotop oranları analizleri ve kalorimetrik ölçümler için ise salep örnekleri ile yapılan analizler sonucu elde edilen sonuçların tekrarlanabilirlik değerleri hesaplanmıştır. Yöntem doğrulama çalışmalarında kullanılan parametreler ve hesaplama teknikleri aşağıda özet olarak sunulmaktadır:

Doğrusal aralık: Bu çalışma için en az 6 farklı konsantrasyon noktasında ve üç tekrarlı olmak üzere analitlerin standart çözeltileri ilgili cihazlara enjekte edilmiş ve elde edilen sonuçlar cihazların yazılımları ile değerlendirilerek ölçümleme grafikleri oluşturulmuştur.

Ölçümleme denklemi: Doğrusal aralık çalışmasına elde edilen verilerin lineer regresyon analizi ile oluşturulan denklemini ifade etmektedir.

Ölçümleme katsayısı: Ölçümleme denkleminin R² değerini ifade etmektedir.

Tekrarlanabilirlik: Geri kazanım çalışmasından elde edilen sonuçların bağıl standart sapma değeri (%RSD) tekrarlanabilirlik değeri olarak ifade edilmiştir.

Tespit ve tayin sınırı (LOD ve LOQ): Ölçümleme doğrusunda kullanılan en düşük konsantrasyondaki analiz çözeltisinin veya standart örneğin ilgili analitik teknik kullanılarak en az 6 kez analizi gerçekleştirilmiş ve cihazın ürettiği sinyale karşılık gelen konsantrasyon değerinin standart sapma değerinin 3 katı tespit sınırı ve 10 katı ise ölçüm sınırı olarak ifade edilmiştir.

Geri kazanım: Bu kapsamda analitleri içeren standart çözelti geri kazanım çalışma örneklerine eklenerek en az 6 paralel örnek hazırlanmıştır. Hazırlanan örnekler ilgili cihaza üç kez enjekte eklenmiş ve elde edilen sonuçlardan geri kazanım değerleri belirlenmiştir. Geri kazanım değeri aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır:

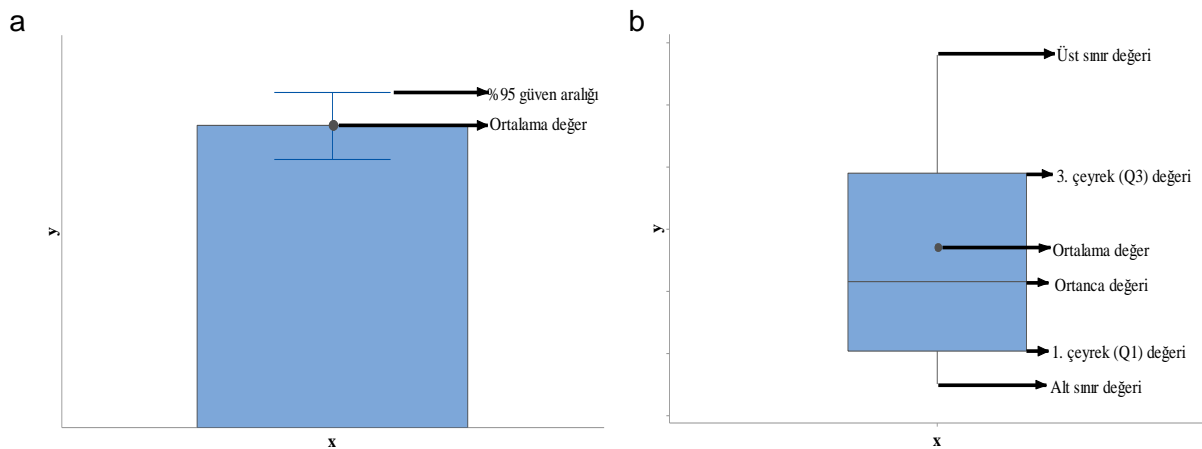
$$\% \text{ geri kazanım} = (C_1 - C_2) / C_3 \times 100$$

Eşitlik 14

C1 = Analit eklenmiş örnek, C2 = Analit eklenmemiş örnek, C3 = Eklene miktar

3.7.5. İstatistiksel ve kemometrik değerlendirmeler

Analizler sonucu elde edilen verilerin sunumunda farklı bölgelerden temin edilen salep numuneleri için interval plot, TTK maddeleri için boxplot ve numuneler arası grupları gösterebilmek için ise iki boyutlu saçılma grafik türleri kullanılmıştır. Grafiklerin oluşturulmasında Minitab istatistik programından yararlanılmış olup, interval ve box plot grafik türlerinde yer alan parametreler Şekil 16'da sunulmaktadır. İnterval plot grafiğinde %95 güven aralığı değeri numune ortalamalarının standart sapma değerleri olarak ifade edilmiştir. Box plot grafiği ise, üst sınır, 3. çeyrek (Q3), ortalama, ortanca, 1. çeyrek (Q1) ve alt sınır değerlerinin tümünü birlikte gösterebilme imkanı tanımaktadır. İlgili grafikte üst sınır değeri $Q3 + 1,5 (Q3 - Q1)$, alt sınır değeri ise $Q1 - 1,5 (Q3 - Q1)$ formülleri ile hesaplanırken, Q3 değeri verilerin %75'ini ve Q1 değeri ise verilerin %25'ini kapsayan değeri göstermektedir.



Şekil 16. Veri sunumunda kullanılan grafik açıklamaları (a: İnterval plot, b:Box plot grafiği)

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

ANOVA testi sonucunda farklılıkların hangi gruplardan kaynaklandığını belirlemek için Post Hoc testleri uygulanmıştır. Bu kapsamda, varyansların homojen olması durumunda Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi, varyansların homojen olmaması durumunda ise Tamhane's T2 Çoklu Karşılaştırma Testi seçilmiştir. Testler sonucunda istatistiksel olarak önemli farklılıklar arz eden özellikler ilgili çizelgelerde farklı harflerle gösterilmiştir.

Normal dağılım göstermeyen salep bileşenlerinin gerek bölgeler arasında gerekse salep ile TTK arasındaki bileşenler açısından farklılığını belirlemek amacıyla Mann-Whitney U testi uygulanmıştır. Testler sonucunda istatistiksel olarak önemli farklılıklar gösteren özellikler ilgili çizelgelerde harflendirme veya "*" işareti kullanılarak gösterilmiştir.

Proje kapsamındaki numunelerin salep ya da taklit malzemesi olduğunun belirlenmesi amacıyla ise MATLAB platformunda geliştirilen yazılım paketleri kullanılarak yönlendirmesiz ve yönlendirmeli sınıflandırma çalışmaları yapılmıştır. Yönlendirmesiz sınıflandırma çalışmalarında Temel Bileşen Analizi (PCA) yöntemiyle veriler incelenirken, yönlendirmeli sınıflandırma yöntemlerinden Kısmi En Küçük Kareler-Diskriminant Analiz (PLS-DA) kullanılarak modeller oluşturulmuştur. Elde edilen kemometrik modelin başarısı bağımsız test seti kullanılarak ölçülmüştür. Tüm analiz yöntemlerinin birleştirilmesi ile oluşturulan ilk model ile aynı zamanda hangi analiz yönteminin sınıflandırmaya en çok katkısı olduğu da belirlenmiştir. En yüksek başarıya sahip analiz yöntemleri ile ayrı ayrı PLS-DA modelleri kurularak bu modellerin de doğru tahmin oranı testlerinin tamamlanması ile en az efor, zaman ve maliyet kriterlerini sağlayan ve aynı zamanda yüksek sınıflandırma başarısına sahip analitik yöntem belirlenmiştir. Projenin bir diğer amacı olan kantitatif olarak örneklerdeki salep miktarının tayini için ise çok değişkenli ölçümleme yöntemlerinden PLS ve Genetik Ters En Küçük Kareler (GILS) yöntemleri kullanılmıştır. Kemometrik çalışmalar sırasında, analiz verilerini sınıflandırmaya uygun hale getirmek amacıyla tayin sınırının altında kalındığını bildiren analiz sonuçlarına ait değerler sıfır olarak düzenlenmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Temel analizler

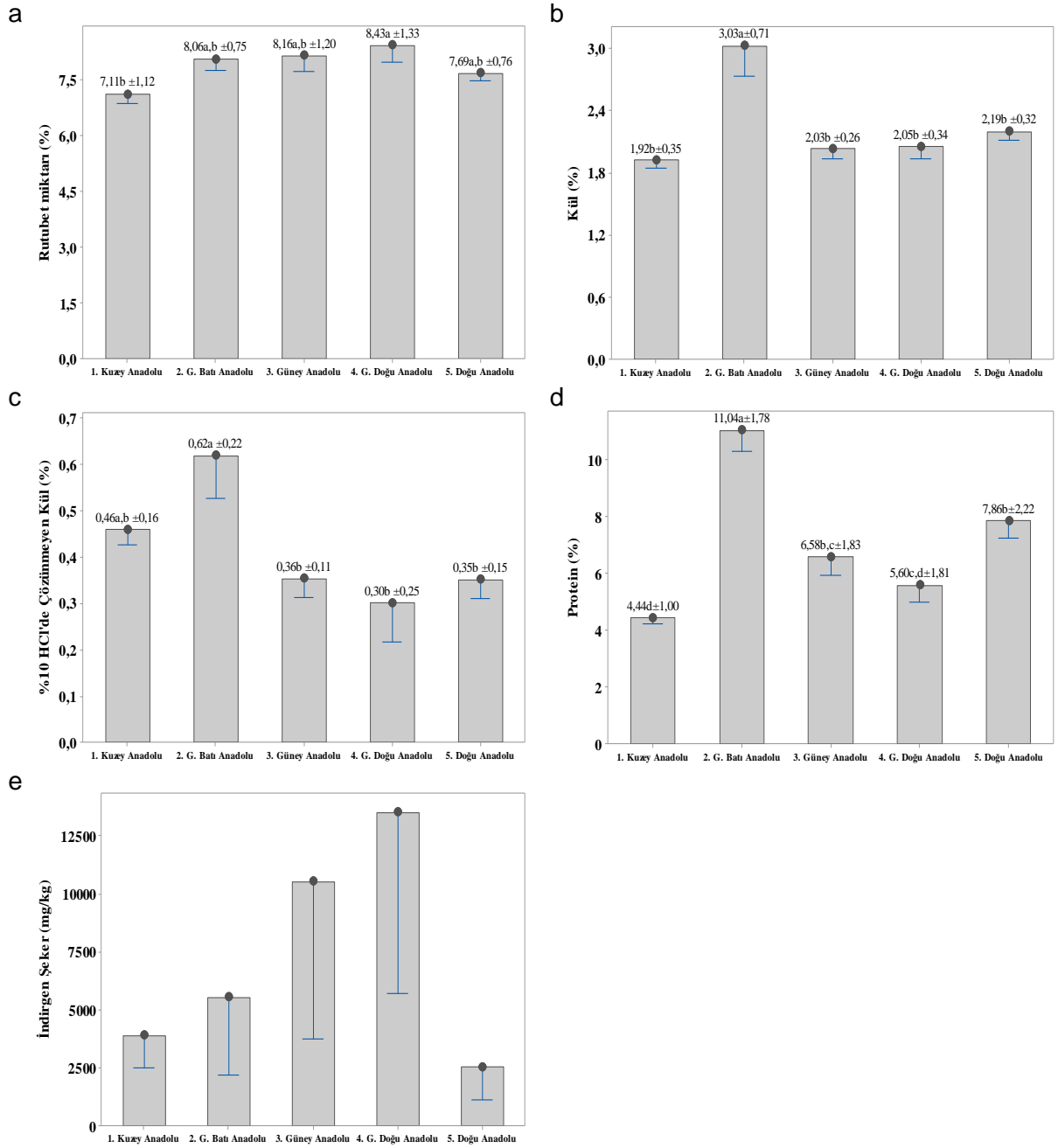
Numunelerin rutubet miktarı, kül miktarı, %10 HCl'de çözünmeyen kül miktarı ve protein düzeylerinin belirlenmesine yönelik analizlerde kullanılan yöntemin en uygun hale getirilebilmesi amacıyla gerçek salep numunesi kullanılarak tekrarlı analizleri gerçekleştirilmiş ve ortalama, standart sapma ve bağıl standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca numunelerdeki indirgen şeker düzeylerinin belirlenmesi amacıyla kullanılan kromatografik yöntem ise bazı yöntem doğrulama parametreleri açısından değerlendirilmiştir. Yöntem doğrulama çalışmalarından elde edilen bulgular Tablo 18 ve 19'da ve salep numunelerinde doğrulanmış yöntemler kullanılarak elde edilen sonuçlar Şekil 17'de sunulmaktadır.

Tablo 18. Temel analizler tekrarlanabilirlik sonuçları

| Analiz No | Rutubet miktarı (%) | Kül miktarı (%) | %10 HCl'de çözünmeyen kül (%) | Protein (%) |
|------------------|---------------------|-----------------|-------------------------------|-------------|
| 1 | 6,680 | 1,540 | 0,489 | 4,450 |
| 2 | 7,510 | 1,550 | 0,380 | 4,640 |
| 3 | 7,360 | 1,550 | 0,480 | 4,810 |
| 4 | 7,430 | 1,570 | 0,383 | 4,630 |
| 5 | 8,020 | 1,560 | 0,443 | 4,450 |
| 6 | 6,830 | 1,570 | 0,333 | 4,450 |
| Ortalama | 7,305 | 1,557 | 0,418 | 4,572 |
| Standart sapma | 0,445 | 0,011 | 0,057 | 0,135 |
| Bağıl std. sapma | 6,092 | 0,710 | 13,605 | 2,952 |

Tablo 19. İndirgen şeker bileşikleri analizlerine ait bazı yöntem doğrulama sonuçları

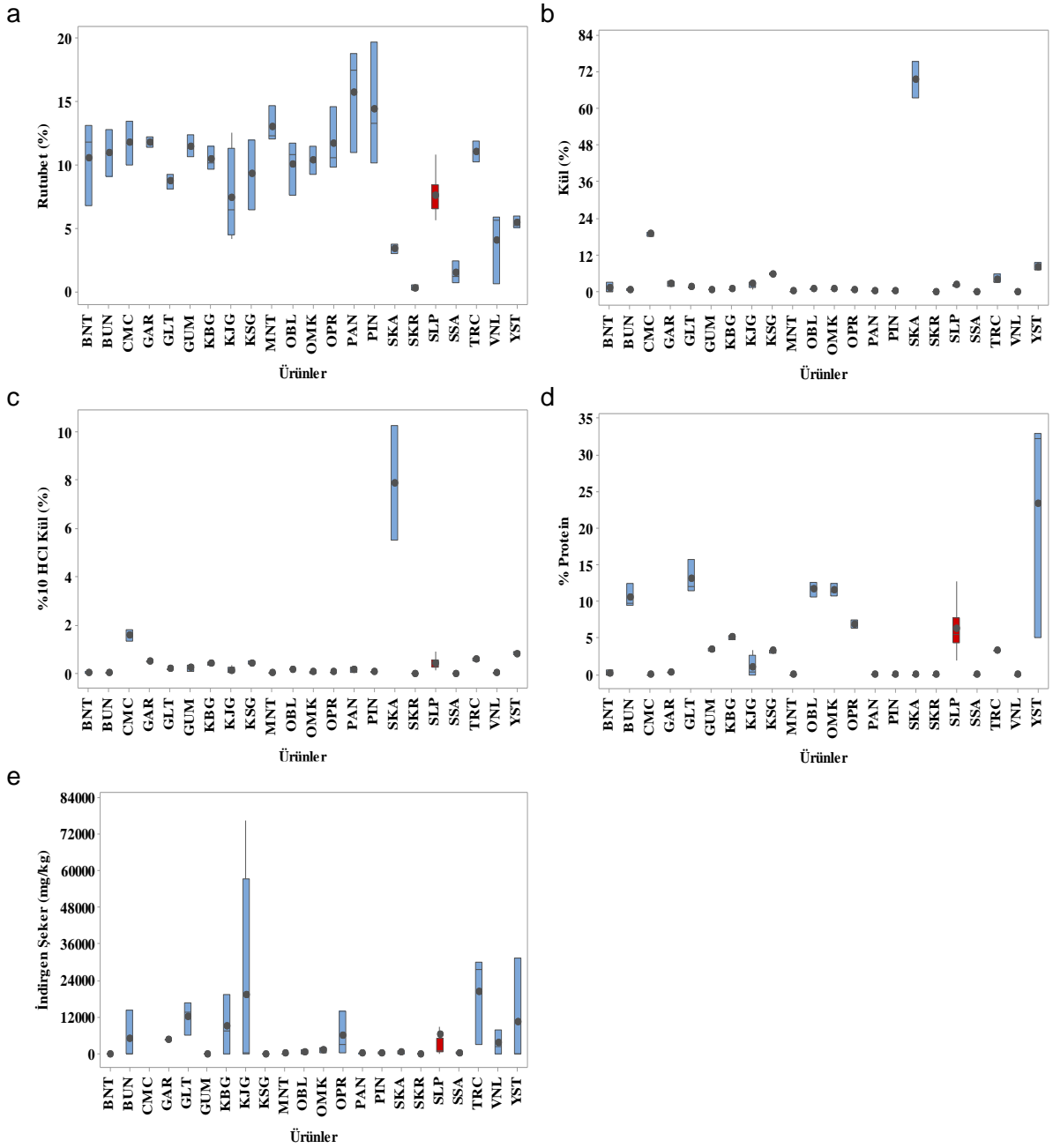
| Parametreler | Glikoz | Fruktoz |
|---------------------------|--------------------|----------------------|
| Doğrusal Aralık (mg/L) | 25 - 1000 | 25 - 1000 |
| Ölçümleme Denklemi | $Y = 3558 \cdot X$ | $Y = 3193,2 \cdot X$ |
| R ² | 0,9999 | 0,9998 |
| Seyreltme katsayısı | 50 | 50 |
| Tespit Sınırı (mg/L) | 84,01 | 60,85 |
| Tayin Sınırı (mg/L) | 279,88 | 202,62 |
| Tekrarlanabilirlik (%RSD) | 3,04 | 2,35 |
| % Geri Kazanım | 99,55 | 98,53 |



Şekil 17. Salep numunelerinin temel analizlerine ait sonuçlar

Elde edilen sonuçlara göre, salep örneklerindeki rutubet düzeylerinin %5,63 ile %9,38 arasında değiştiği tespit edilmiştir (Şekil 17a). Ortalama en yüksek düzeydeki kül, %10 HCl'de çözünmeyen kül ve protein düzeyleri Güneybatı Anadolu Bölgesi'nden temin edilen örneklerde belirlenmiştir (Şekil 17b,c ve d). Numunelerdeki indirgen şeker düzeylerinin ise geniş bir aralıkta seyrettiği göze çarparken bu açıdan en yüksek düzeyin Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nden toplanan örneklerde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 17e). Numunelerde tespit edilen rutubet, kül, protein düzeylerinin salep konusunda literatürde belirtilen çalışmalarla uyum içerisinde olduğu sonucuna varılmıştır (Farhoosh ve Riazi, 2007; Tekinşen ve Güner, 2010; Lalika vd., 2013; Bulut-Solak vd., 2017).

Taklit, taşıyıcı ve katkı maddeleri (TTK)'ne ait temel analiz sonuçları Şekil 18'de, bu sonuçlara ait istatistiksel değerlendirmeler Tablo 20'de sunulmaktadır.



Şekil 18. TTK maddeleri temel analizlerine ait sonuçlar

Tablo 20. TTK maddeleri temel analizlere ait istatistiksel değerlendirme tablosu

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

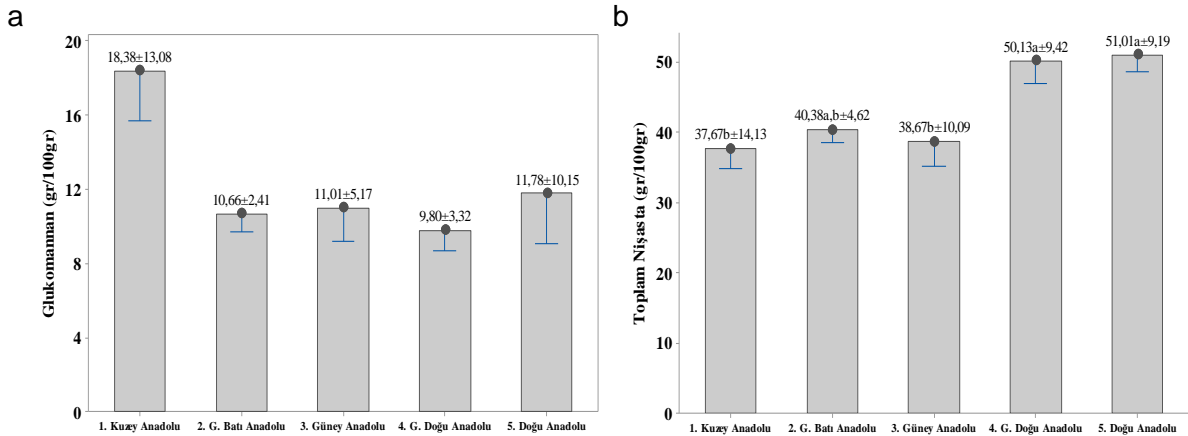
Tablo 20'de sunulan verilere göre; TTK maddelerindeki rutubet düzeylerinin %0,14 ile %19,74 arasında değiştiği belirlenmiştir. Kül ve %10 HCl'de çözünmeyen kül miktarları açısından en yüksek değerler katı salep aromasında tespit edilirken, protein açısından en yüksek değer yağsız süt tozu örneğinde belirlenmiştir (Şekil 18b ve c). Elde edilen bulgular, izlenen taklit, taşıyıcı ve unsurlarından nişasta örneklerinin (buğday, mısır, patates ve pirinç) tamamında, şekerde, vanilyada, karboksimetil selülozda, salep sıvı ve katı aroma vericilerinde protein tespit edilmediğini göstermektedir. Salepte belirlenen ortalama protein miktarı (6,32±2,61), öğütülmüş pirinç ve keçiyoynuzu gamında belirlenen değerlerle istatistiksel olarak farklılık arz etmezken, diğer TTK maddelerinde belirlenen düzeylerle farklılıklar içerdiği sonucuna varılmıştır (p<0,05). Benzer şekilde, salep numunelerindeki kül miktarlarının (2,13±0,49) guar gamda tespit edilen değerle benzerlikler içerdiği, ancak diğer TTK maddelerindeki kül miktarları ile farklılıklar arz ettiği tespit edilmiştir (p<0,05).

4.2. Enzimatik analizler

Salep örneklerinde enzimatik analizler kapsamında gerçekleştirilen glikomannan ve toplam nişasta analizlerine ait tekrarlanabilirlik verileri Tablo 21’de ve farklı bölgelerden temin edilen salep numunelerine ait enzimatik analiz bulguları Şekil 19’da sunulmaktadır.

Tablo 21. Enzimatik analizler tekrarlanabilirlik sonuçları

| Analiz No | Nişasta miktarı (g/100g) | Glikomannan miktarı (g/100g) |
|----------------------|--------------------------|------------------------------|
| 1 | 60,291 | 0,970 |
| 2 | 58,640 | 0,898 |
| 3 | 55,899 | 0,934 |
| 4 | 58,593 | 0,861 |
| 5 | 53,592 | 0,865 |
| 6 | 57,597 | 0,898 |
| Ortalama | 57,435 | 0,904 |
| Standart sapma | 2,164 | 0,042 |
| Bağıl standart sapma | 3,768 | 4,635 |



Şekil 19. Salep örneklerine ait enzimatik analiz sonuçları

Enzimatik analiz sonuçlarına göre, numunelerdeki glikomannan ve nişasta düzeyleri sırasıyla 2,04 - 47,03 g/100g ve 15,42 - 74,34 g/100g aralıklarında değişmektedir. Elde edilen sonuçlara göre. Kuzey Anadolu Bölgesi'nin en yüksek glikomannan düzeyine sahip olduğu belirlenirken (Şekil 19a), bu bölgenin aynı zamanda en düşük nişasta düzeyine sahip numuneleri ihtiva ettiği sonucuna varılmıştır. Nişasta düzeyleri açısından en yüksek ortalama düzey Doğu Anadolu Bölgesi'ne ait salep örnekleri olduğu belirlenmiştir (Şekil 19b).

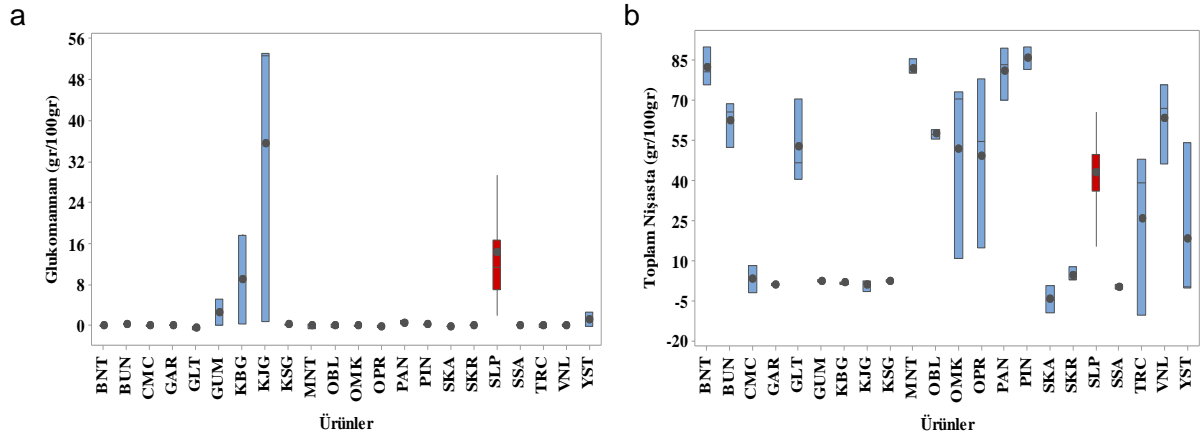
Salep numunelerinde tespit edilen glikomannan ve nişasta düzeylerinin *Orchis anatolica* türlerinde yapılan ve ortalama glikomannan düzeyinin %18,5 ve nişasta düzeyinin %41,6 olarak bildirildiği çalışma ile bölgesel bir takım farklılıklar olmakla birlikte uyum içinde olduğu sonucuna varılmıştır (Bulut-Solak vd., 2017). Bununla birlikte ülkemizde yetişen on farklı salep türünde yapılan bir çalışmada glikomannan düzeylerinin %17,7 ile %54,6 arasında değiştiği bildirilmektedir (Tekinşen ve Güner, 2010). Proje kapsamında incelenen salep numunelerinde belirlenen glikomannan düzeylerinin literatürde belirtilen bu çalışmadan düşük olarak tespit edilmiş olması, salep numunelerinin partikül büyüklükleri arası farklılıklarına bağlanmıştır. Adı geçen çalışmada kurutulan salep örneklerinin tamamı değirmende öğütülerek hazırlanırken, proje çalışmalarında kullanılan salep örnekleri öğütmenin ardından TTK maddeleri ile olan karıştırma işlemlerinde meydana gelebilecek olası homojenizasyon probleminin önlenmesi amacıyla 150 µm gözenek çapına sahip elekten geçirilerek hazırlanmışlardır. Bununla birlikte, numunelerin elekten geçmeyen üst kısımdaki fraksiyonunda da (>150 µm) glikomannan analizleri gerçekleştirilmiş ve sonuç olarak bu fraksiyonda daha yüksek düzeyde bir glikomannan miktarları tespit edilmiştir. Farklı bölgelerden temin edilen salep numunelerinin 150 µm'lik eleğin alt ve üst kısımlarında toplanan fraksiyonları için tespit edilen glikomannan düzeyleri Tablo 22'de sunulmaktadır.

Tablo 22. Farklı partikül çapına sahip salep numunelerinin glikomannan düzeyleri

| Salep numunesinin temin edildiği il | Partikül büyüklüğü | |
|-------------------------------------|--------------------|---------|
| | >150 µm | <150 µm |
| Kastamonu | 23,988 | 14,030 |
| Yozgat | 32,964 | 26,150 |
| Muğla | 23,800 | 6,360 |
| Van | 30,073 | 23,300 |
| Muş | 12,120 | 5,940 |
| Karışım* | 31,483 | 13,054 |

*:Proje kapsamında temin edilen tüm salep numunelerinden 5'er gram alınıp homojenize edilerek hazırlanmıştır.

Tablo 22'de sunulan veriler, glikomannanın salebin öğütülmesi daha zor olan dış kısımlarında yoğunlaştığını açığa çıkarmaktadır. Proje kapsamında izlenen TTK maddelerine ait glikomannan ve nişasta düzeyleri Şekil 20'de, bu düzeylere uygulanan istatistiksel değerlendirmeler ise Tablo 23'te sunulmaktadır.



Şekil 20. TTK maddelerine ait enzimatik analiz sonuçları

Tablo 23. TTK maddeleri enzimatik analizlere ait istatistiksel değerlendirme tablosu

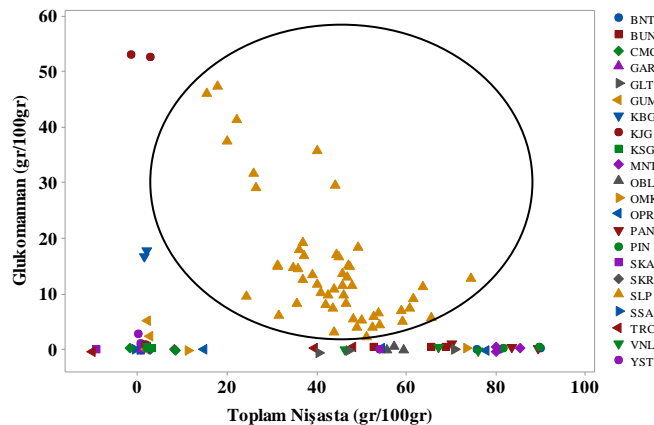
| TTK Maddesi | Glikomannan (gr/100gr) | Toplam nişasta (gr/100gr) |
|--------------|------------------------|---------------------------|
| GUM | 2,50*±2,56 | 2,33*±0,45 |
| GAR | 0,06*±0,02 | 1,06*±0,49 |
| KBG | 8,90±9,66 | 1,75*±0,43 |
| KJG | 29,83±26,88 | 1,21*±1,15 |
| KSG | 0,26*±0,16 | 2,33*±0,49 |
| BNT | 0,09*±0,12 | 82,16*±7,13 |
| MNT | 0,13*±0,17 | 81,88*±3,11 |
| PAN | 0,53*±0,45 | 80,95*±9,94 |
| PIN | 0,29*±0,20 | 85,70*±5,72 |
| SKR | 0,00*±0,00 | 4,51*±2,97 |
| YST | 1,21*±1,34 | 18,18±31,09 |
| VNL | 0,13*±0,23 | 63,07*±15,19 |
| TRC | 0,22*±0,20 | 29,16±25,64 |
| GLT | 0,00*±0,00 | 52,57±15,91 |
| OMK | 0,06*±0,06 | 50,40±34,26 |
| OPR | 0,02*±0,04 | 48,99±31,95 |
| OBL | 0,12*±0,21 | 71,38*±12,47 |
| BUN | 0,32*±0,02 | 62,25*±8,50 |
| SSA | 0,00*±0,00 | 0,47*±0,53 |
| SKA | 0,00*±0,00 | 0,30*±0,42 |
| CMC | 0,11*±0,16 | 4,16*±5,88 |
| Salep | 14,28±10,24 | 42,62±12,48 |

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

TTK maddelerine uygulanan enzimatik analiz sonuçları numunelerdeki glikomannan ve nişasta düzeylerinin oldukça geniş bir aralıkta seyrettiğini göstermektedir. Numunelerdeki ortalama glikomannan düzeyleri 0 ile 29,83 g/100g arasında değişirken, nişasta düzeyleri 0 ile 85,70 g/100g arasında değişmektedir. Elde edilen sonuçlar, proje kapsamında izlenen salep numunelerindeki glikomannan düzeylerinin ($14,28 \pm 10,24$) konyak gamdaki ($29,83 \pm 26,88$) ve keçiyoynuzu gamındaki ($8,90 \pm 9,66$) glikomannan düzeyleri ile benzer olduğunu gösterirken, diğer tüm TTK maddeleri ile istatistiksel olarak farklılıklar arzettiğini ortaya çıkarmaktadır ($p < 0,05$). Bu nedenle salep ve TTK maddeleri ayrımı açısından glikomannan düzeylerinin konyak gam ve keçiyoynuzu gamı harici önemli bir belirteç olabileceği sonucuna varılmıştır.

TTK maddelerinin toplam nişasta düzeyleri incelendiğinde ise, salep nişasta düzeyleri ($42,62 \pm 12,48$ g/100g) ile tarçın, galeta, öğütülmüş makarna ve öğütülmüş pirinçteki nişasta düzeyleri arasındaki fark önemli bulunmamış ($p > 0,05$), ancak diğer tüm TTK maddeleri ile istatistiksel açıdan önemli düzeylerde farklılıklar bulunduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$). Bununla birlikte glikomannan analizleri yönünden salep ile benzerlikler içeren konyak gam ve keçiyoynuzu gamındaki nişasta düzeyleri sırasıyla $1,21 \pm 1,15$ ve $1,75 \pm 0,43$ olarak tespit edilmiştir.

Yukarıda sunulan bilgiler ışığında; salep ile TTK maddeleri arasındaki ayrımın belirlenmesinde glikomannan düzeyleri ile birlikte nişasta analizlerinin de gerçekleştirilmesi gerektiği düşünülmektedir. Bu analizlerde, anlamlı düzeylerde glikomannan belirlenmesi durumunda numunenin salep, konyak gam veya keçiyoynuzu gamı olabileceği ve nişasta düzeyinin $1,48 \pm 0,86$ g/100g olarak belirlenmesi durumunda numunenin konyak gam veya keçiyoynuzu gamı; $42,62 \pm 12,48$ g/100g olarak tespit edilmesi durumunda ise numunenin salep olarak değerlendirilebileceği sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte salep numuneleri ile TTK maddeleri arasındaki farklılıkların tespit edilebilmesi amacıyla düzenlenen iki boyutlu saçılma grafiği Şekil 21’de sunulmuştur.



Şekil 21. Enzimatik analiz sonuçlarına uygulanan iki boyutlu saçılma grafiği

Şekil 21’de sunulan iki boyutlu saçılma grafiği glikomannan ve nişasta yönünden salep numunelerinin kendi aralarında sınıflanmakta olduklarını göstermektedir. Bu nedenle numunelerin glikomannan ve nişasta içeriklerinin belirlenmesi salep ve TTK maddeleri arasındaki ayırımın gerek nitel gerekse nicel belirlenmesinde büyük önem taşıdığı sonucuna varılmıştır.

4.3. Elementel bileşim

Numunelerin elementel bileşimlerinin belirlenmesinden önce kullanılan yöntem bazı yöntem doğrulama çalışmaları parametreleri açısından değerlendirilmiş ve elde edilen sonuçlar Tablo 24 ve Tablo 25’te sunulmuştur.

Tablo 24. Elementel analizlere ait bazı yöntem doğrulama sonuçları

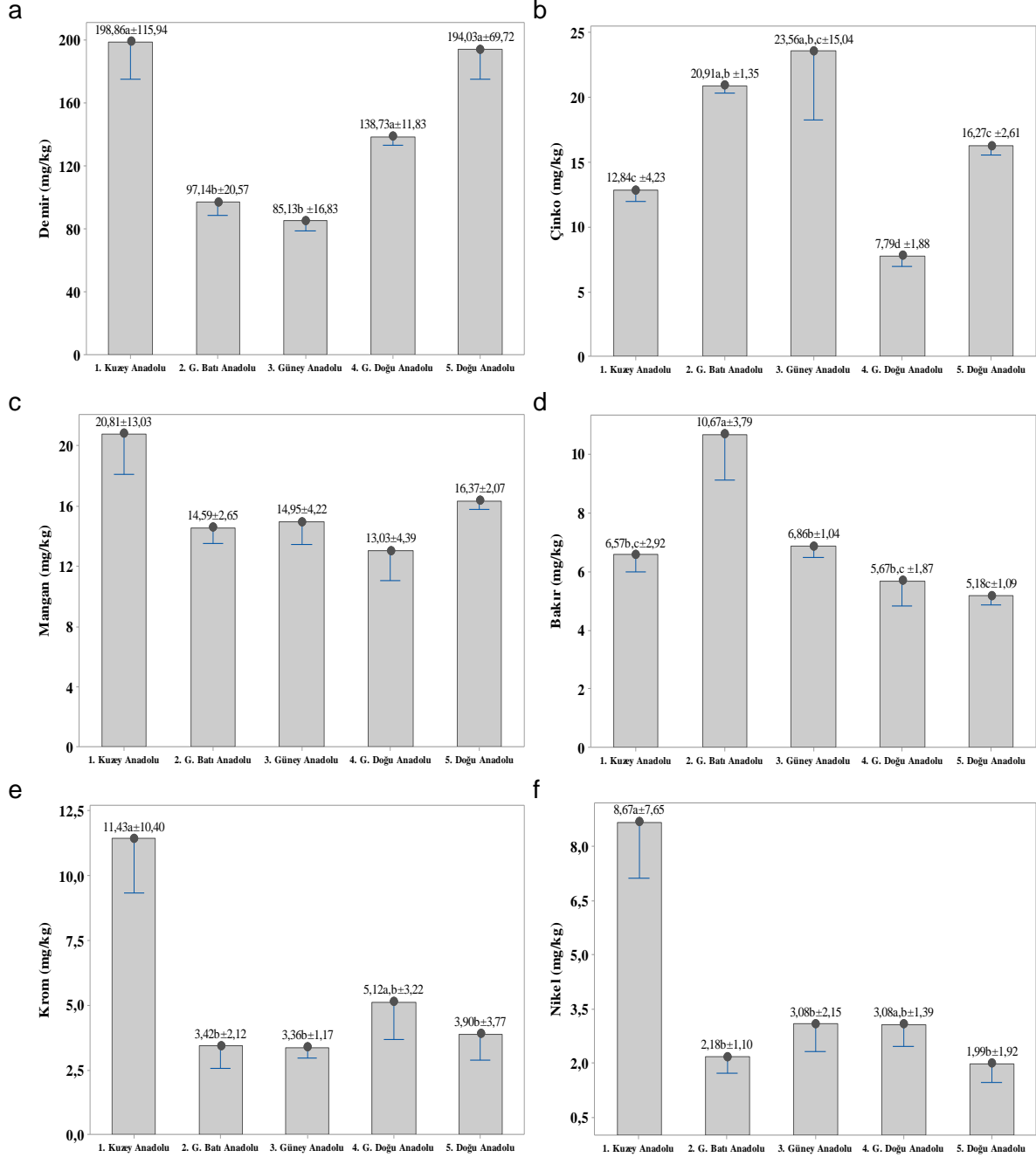
| | Doğrusal Aralık (µg/L) | Ölçümleme Denklemi | R² | Tespit Sınırı (µg/L) | Tayin Sınırı (µg/L) | Tekrar edilebilirlik (%RSD) |
|-----------|-------------------------------|---------------------------|----------------------|-----------------------------|----------------------------|------------------------------------|
| Fe | 0,5-200 | $y = 7285,2x + 4524$ | 0,9968 | 0,42 | 1,39 | 2,43 |
| Zn | 2-200 | $y = 1340,1x - 1473,8$ | 0,9987 | 0,77 | 2,59 | 12,87 |
| Mn | 2-50 | $y = 18733x - 17295$ | 0,9921 | 1,52 | 5,06 | 3,73 |
| Cu | 2-50 | $y = 6920,6x - 1509,3$ | 0,9983 | 0,14 | 0,47 | 2,52 |
| Cr | 2-50 | $y = 5799,3x + 16481$ | 0,9947 | 1,32 | 3,96 | 4,42 |
| Ni | 2-100 | $y = 3107,8x - 2498,8$ | 0,9987 | 1,11 | 3,70 | 3,62 |
| Sr | 0,5-50 | $y = 27059x + 8254,2$ | 0,9974 | 1,24 | 4,09 | 3,44 |
| Ti | 2-100 | $y = 950,93x + 1645,7$ | 0,9993 | 0,82 | 2,73 | 3,34 |
| Rb | 2-100 | $y = 16844x + 11729$ | 0,9999 | 1,73 | 5,77 | 8,84 |
| Ba | 0,5-50 | $y = 27564x + 22783$ | 0,9993 | 0,44 | 1,47 | 2,45 |
| Mo | 0,5-100 | $y = 6369,2x + 7349,5$ | 0,9987 | 0,75 | 2,50 | 2,54 |
| V | 2-100 | $y = 13258x + 29800$ | 0,9987 | 0,23 | 0,77 | 1,94 |
| Co | 0,5-100 | $y = 14908x + 21485$ | 0,9984 | 0,25 | 0,83 | 1,74 |
| Li | 2-50 | $y = 1473,6x + 784,09$ | 0,9996 | 0,01 | 0,03 | 8,42 |
| Ga | 2-50 | $y = 10164x + 6411,1$ | 0,9996 | 0,02 | 0,07 | 10,64 |
| Se | 0,5-100 | $y = 102,67x + 138,02$ | 0,9989 | 0,51 | 1,70 | 2,44 |
| Cs | 2-50 | $y = 32901x + 18497$ | 0,9998 | 0,01 | 0,03 | 10,30 |
| Sb | 2-50 | $y = 3578,7x - 3986,5$ | 0,9991 | 0,02 | 0,06 | 5,62 |
| Be | 2-200 | $y = 279,11x - 126,07$ | 0,9993 | 0,07 | 0,24 | 3,47 |
| Tl | 2-200 | $y = 20014x + 4465,7$ | 0,9992 | 0,10 | 0,36 | 5,79 |
| Bi | 2-50 | $y = 26142x + 5537,6$ | 0,9999 | 0,02 | 0,06 | 6,82 |

Tablo 25. Elementel analizlere ait geri kazanım verileri

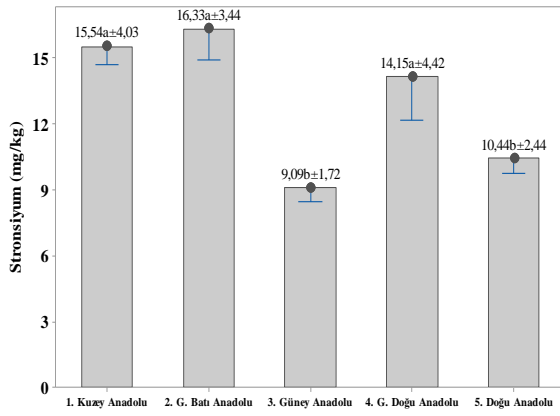
| Parametreler | Sertifikalı referans materyal (CRM:GBW 10011) | | | | | Salep materyali | | |
|--------------|---|-------------|------------|-------------|--------------|-----------------|---------|-------------|
| | Düşük düzey | Geri | Orta düzey | Geri | Yüksek düzey | Geri | Düzyey | Geri |
| | (µg/kg) | kazanım (%) | (µg/kg) | kazanım (%) | (µg/kg) | kazanım | (µg/kg) | kazanım (%) |
| Fe | 188,89 | 61,52±0,23 | 224,44 | 93,24±1,21 | 374,22 | 86,56±1,87 | 20,00 | 103,01±1,63 |
| Zn | 118,44 | 87,69±1,17 | 234,97 | 84,07±0,73 | 234,64 | 80,89±0,79 | 20,00 | 92,65±1,52 |
| Mn | 54,81 | 79,52±1,65 | 65,58 | 91,54±5,90 | 109,23 | 86,05±1,52 | 20,00 | 99,05±6,35 |
| Cu | 27,41 | 91,46±1,55 | 32,79 | 104,47±2,08 | 54,62 | 94,29±1,44 | 20,00 | 101,79±3,04 |
| Cr | * | | | | | | 20,00 | 95,52±3,86 |
| Ni | | | | | | | 20,00 | 101,45±3,78 |
| Sr | 25,38 | 85,01±2,00 | 30,36 | 94,34±2,75 | 50,57 | 90,64±1,50 | 20,00 | 110,55±2,63 |
| Ti | 20,42 | 86,65±4,12 | 24,29 | 112,13±1,67 | 40,46 | 117,62±1,26 | 20,00 | 113,99±2,95 |
| Rb | | | | | | | 20,00 | 96,74±3,52 |
| Ba | 24,36 | 75,21±1,38 | 29,15 | 95,59±2,03 | 48,55 | 82,52±1,48 | 20,00 | 108,90±1,12 |
| Mo | 4,87 | 90,09±2,32 | 5,83 | 102,59±1,74 | 9,71 | 101,67±1,39 | 20,00 | 118,75±1,17 |
| V | 0,35 | 86,64±1,22 | | | | | 20,00 | 114,58±1,29 |
| Co | 0,08 | 66,11±10,39 | | | 0,16 | 87,01±1,78 | 20,00 | 115,38±1,17 |
| Se | | | | | 1,07 | 78,07±16,99 | 20,00 | 122,36±2,05 |
| Sb | 0,06 | 114,27±8,16 | | | 0,12 | 80,75±3,32 | | |

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

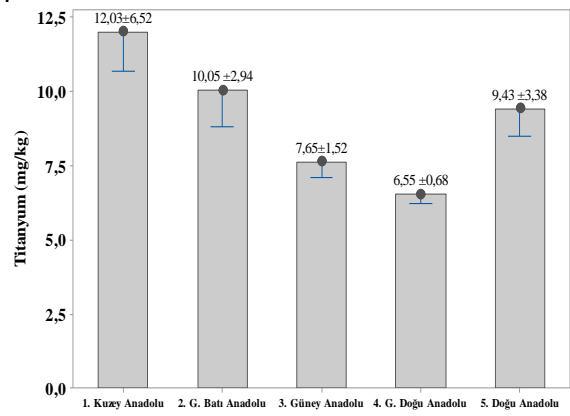
Tablo 24 ve 25'te sunulan verilere göre kullanılan yöntemin doğrusal, tekrarlanabilir, kesin ve numunelerdeki elementel düzeyler açısından yeterli düzeyde LOD ve LOQ düzeylerine sahip olduğunu göstermektedir. Proje kapsamında izlenen salep numunelerine elementel bileşim analizlerine ait sonuçlar Şekil 22'de gösterilmektedir.



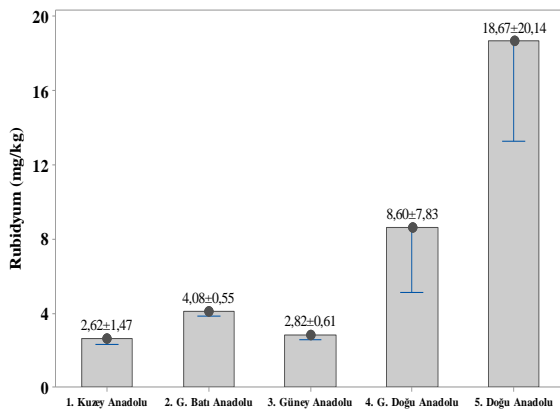
g



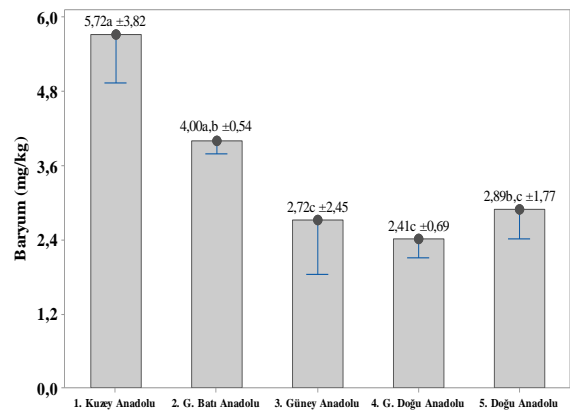
h



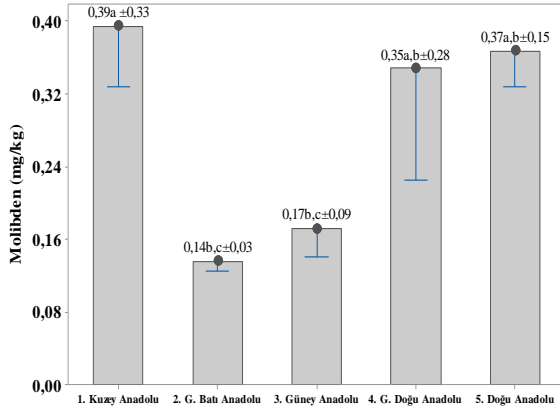
i



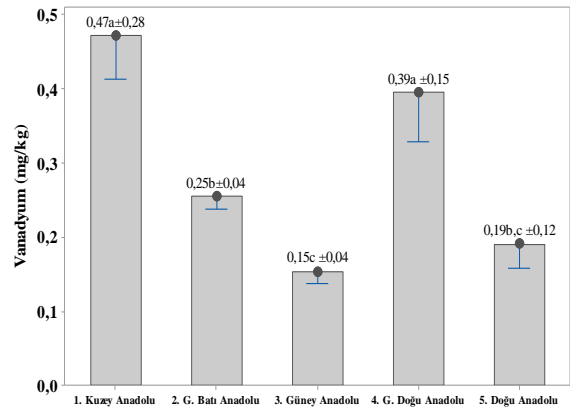
j

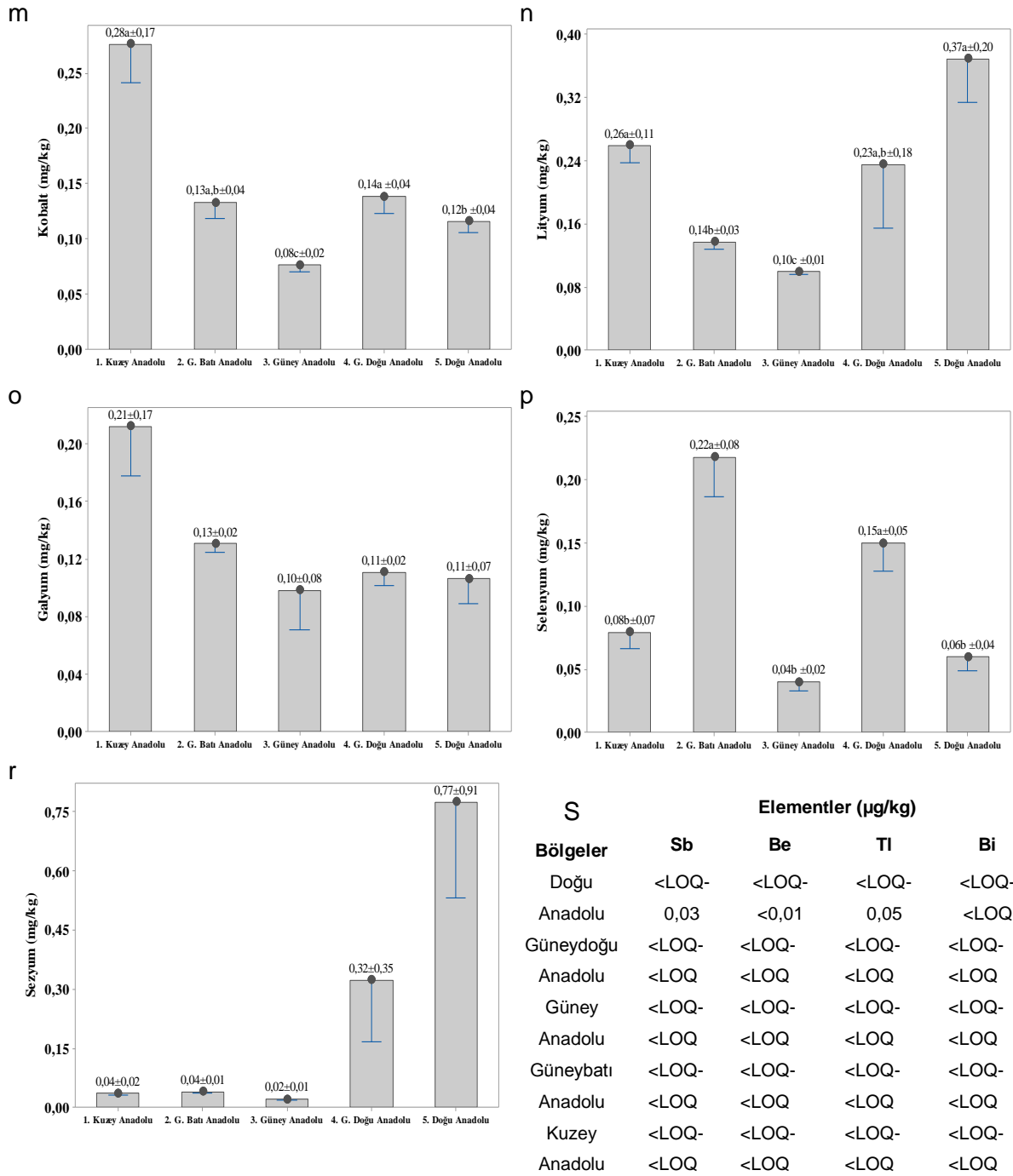


k



l

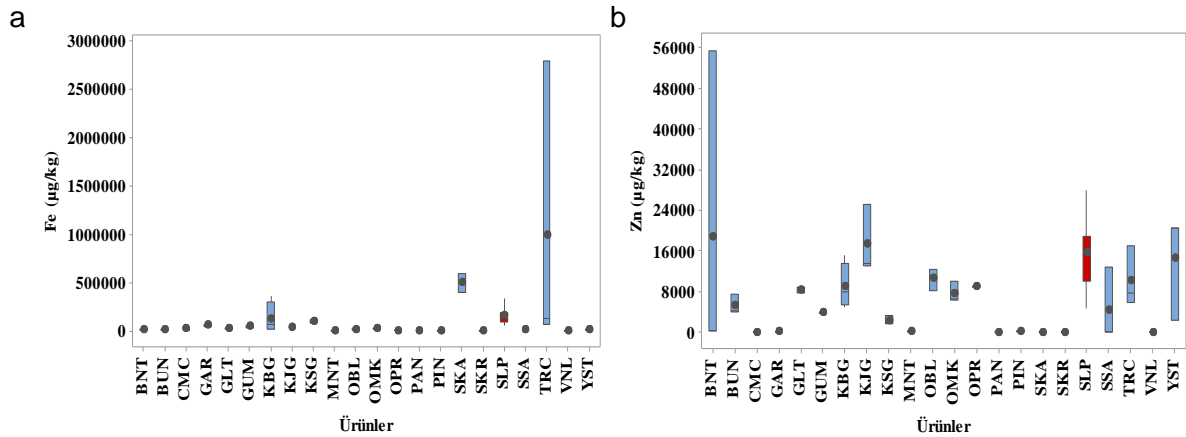


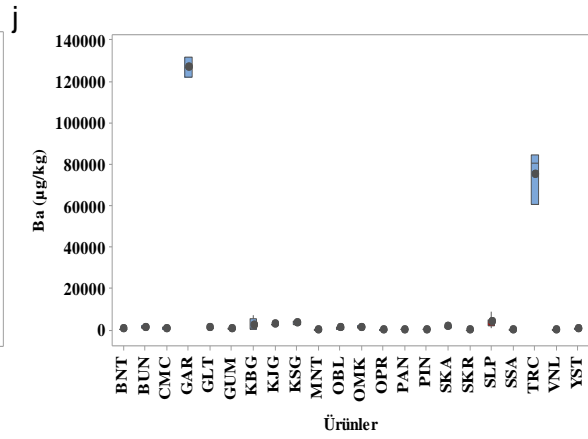
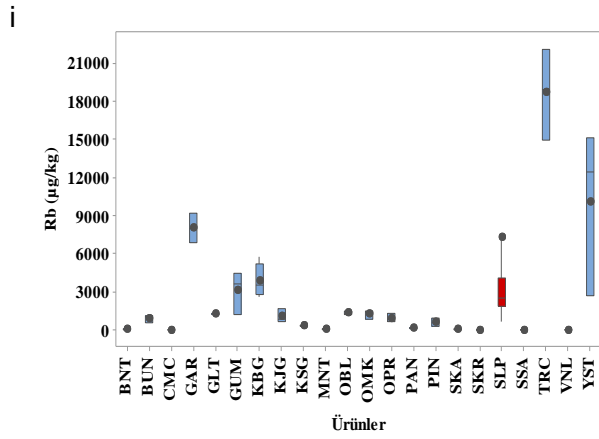
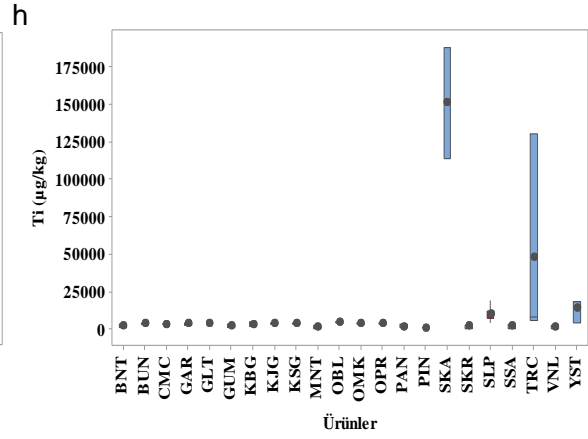
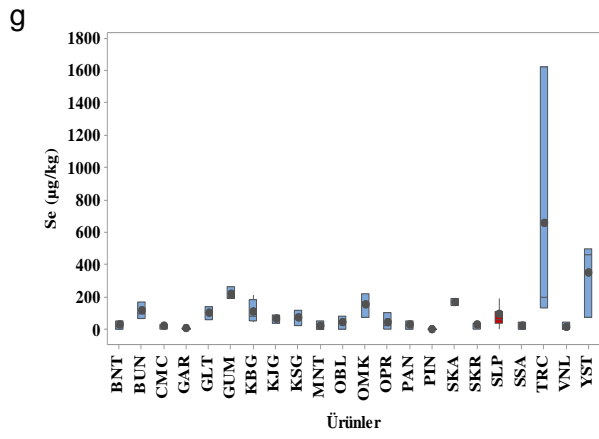
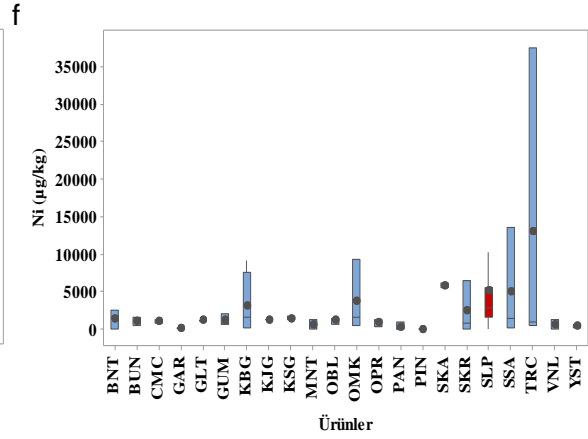
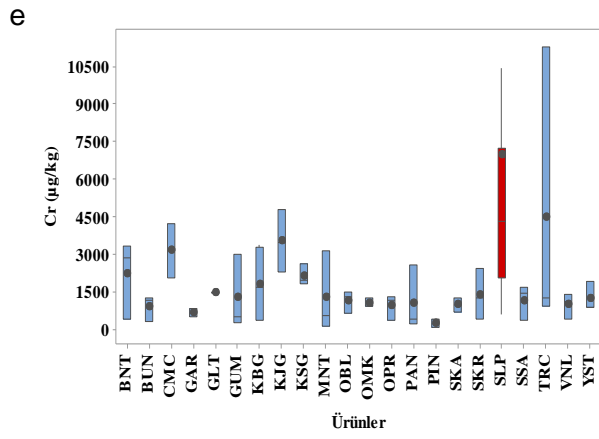
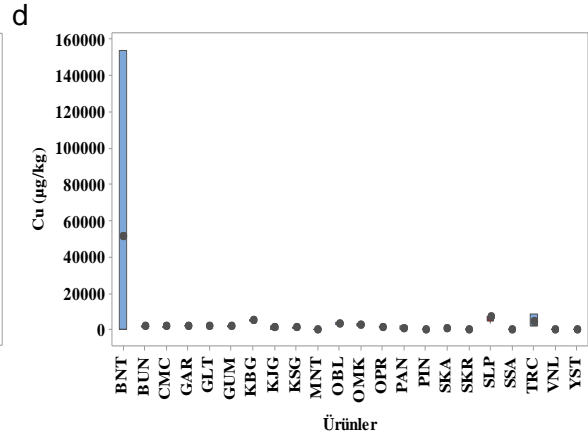
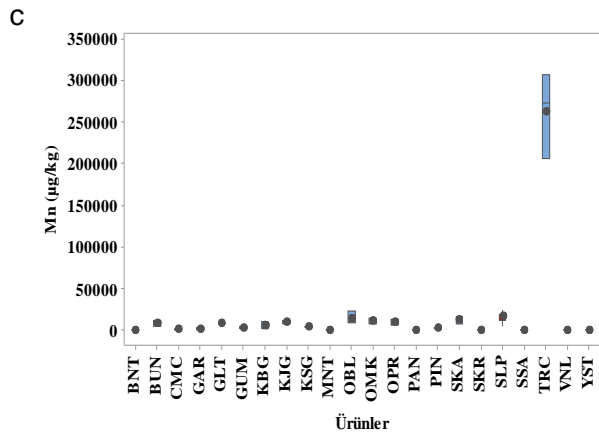


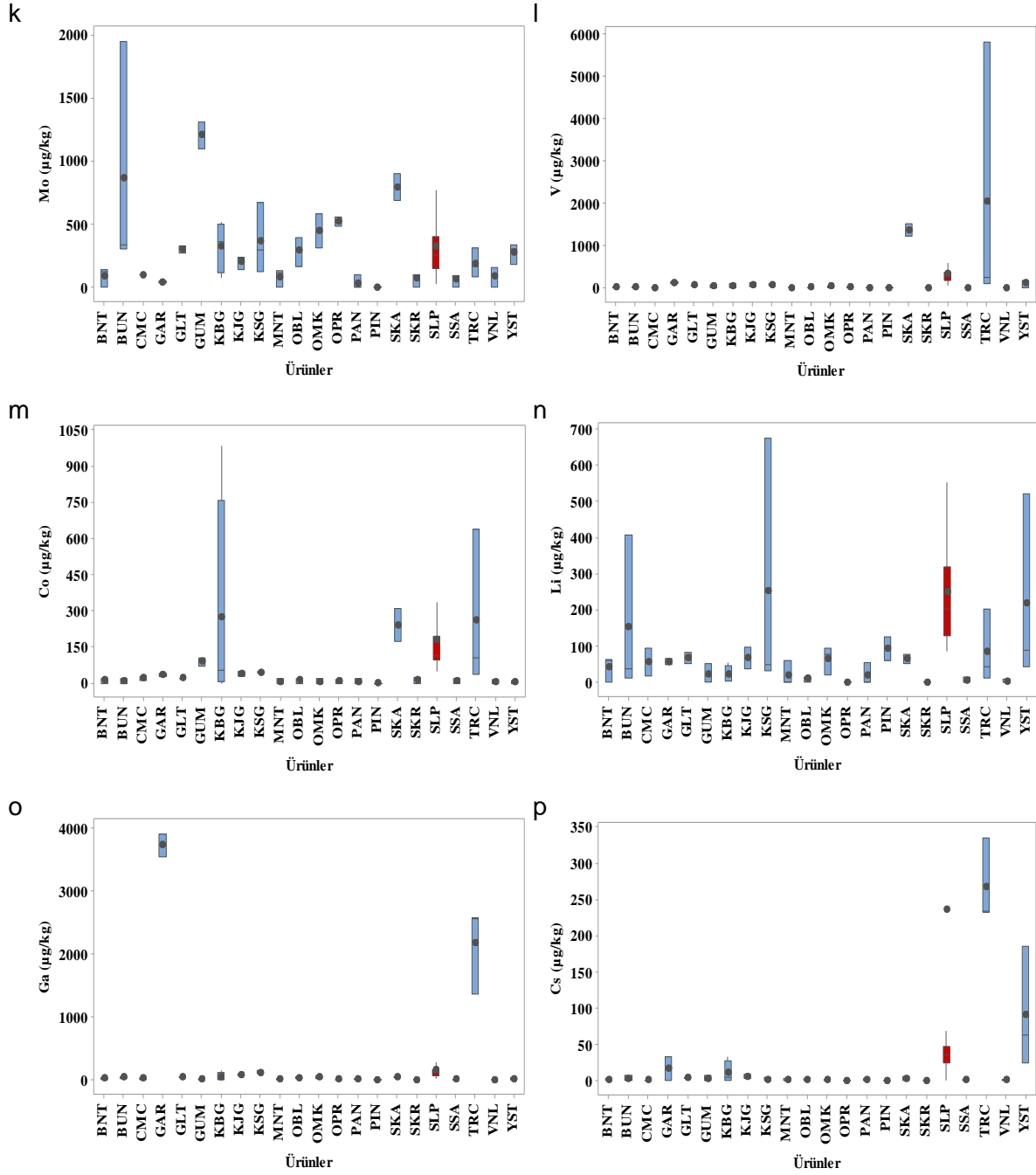
Şekil 22. Farklı bölgelerden temin edilen salep numunelerinde tespit edilen elementel bileşimler

Elementel analiz sonuçlarına göre, en yüksek elementel değerin Kuzey Anadolu Bölgesi'ne (296,82 mg/kg) ve en düşük elementel değerinin ise Güney Anadolu Bölgesi'ne (159,90 mg/kg) ait numunelerde olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte. Kuzey Anadolu Bölgesi'nde temin edilen numunelerin demir, mangan, krom, nikel, titanyum, baryum, molibden, vanadyum, kobalt ve galyum elementleri açısından diğer bölgelerden temin edilen salep örneklerine göre daha yüksek düzeyde olduğunu göstermektedir (Şekil 22a, c, e, f, h, j, k, l, m, ve o). Ayrıca, ortalama en yüksek düzeyde rubidyum, lityum ve sezyum elementleri Doğu Anadolu Bölgesi saleplerinde (Şekil 22i, n ve r); çinko, bakır, stronsiyum ve selenyum elementleri Güneybatı Anadolu Bölgesi'nden temin edilen salep numunelerinde tespit edilmiştir (Şekil 22b, d, g ve p). Proje çalışmaları kapsamında elementel düzeyleri araştırılan antimuan, berilyum, talyum ve bizmut elementleri Güney, Güneybatı ve Kuzey Anadolu bölgelerinden toplanan salep örneklerinin hiçbirinde belirlenemezken, Doğu ve Güneydoğu bölgesinden temin edilen saleplerden sadece 2-3 örnekte iz düzeyde antimuan, berilyum ve talyum elementleri tespit edilmiştir (Şekil 22s). Numunelerde tespit edilen elementlerin salebin yetiştiği toprağın yapısı ile ilişkili olabileceği gibi çevresel faktörlerin de etki gösterebileceği sonucuna varılmıştır. Bu açıdan, Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleri'nden temin edilen salep numunelerindeki sezyum düzeyleri diğer bölgelerden temin edilen numunelere kıyasla yüksek düzeylerde tespit edilmiş olması ilgi çeken bir ayrıntıdır. Sezyum elementi Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde sırasıyla ortalama 0,77 ve 0,32 mg/kg olarak belirlenirken, numunelerin toplandığı diğer bölgelerde oldukça düşük düzeylerde tespit edilmiştir (Şekil 22r).

TTK maddelerinde belirlenen elementel düzeyler Şekil 23'te ve ayrıca tespit edilen elementel düzeylere ait istatistiksel değerlendirme sonuçları Tablo 26'da sunulmaktadır.







Şekil 23. TTK maddelerinde tespit edilen elementel bileşimler

Tablo 26. TTK maddeleri elementel analizlere ait istatistiksel değerlendirme tablosu

| TTK | Fe | Zn | Mn | Cu | Cr | Ni | Se | Ti |
|--------------|------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| GUM | 49,41 \pm 13,55 | 3,90 \pm 0,09 | 3,38 \pm 1,34 | 1,92 \pm 0,23 | 1,28 \pm 1,51 | 1,17 \pm 0,82 | 0,22 \pm 0,04 | 2,34 \pm 1,03 |
| GAR | 60,09 \pm 9,96 | 0,07 \pm 0,10 | 1,98 \pm 1,21 | 2,14 \pm 0,27 | 0,67 \pm 0,22 | 0,12 \pm 0,17 | 0,01 \pm 0,01 | 3,49 \pm 1,12 |
| KBG | 130,70 \pm 164,53 | 8,99 \pm 4,45 | 5,25 \pm 4,99 | 4,96 \pm 0,43 | 1,78 \pm 1,61 | 3,12 \pm 4,17 | 0,11 \pm 0,07 | 3,21 \pm 1,55 |
| KJG | 36,17 \pm 6,72 | 17,32 \pm 6,79 | 10,09 \pm 2,25 | 1,13 \pm 0,91 | 3,53 \pm 1,24 | 1,29 \pm 0,01 | 0,07 \pm 0,03 | 3,81 \pm 0,24 |
| KSG | 100,12 \pm 17,24 | 2,26 \pm 0,88 | 4,50 \pm 0,80 | 0,99 \pm 0,35 | 2,13 \pm 0,42 | 1,44 \pm 0,33 | 0,07 \pm 0,05 | 4,00 \pm 0,48 |
| BNT | 13,92 \pm 6,07 | 18,70 \pm 31,83 | 0,52 \pm 0,07 | 51,34 \pm 88,93 | 2,21 \pm 1,56 | 1,39 \pm 1,30 | 0,03 \pm 0,03 | 2,50 \pm 1,18 |
| MNT | 63,31 \pm 91,14 | 0,01 \pm 0,17 | 0,23 \pm 0,08 | <LOQ* | 2,19 \pm 1,43 | 2,15 \pm 2,42 | 0,02 \pm 0,03 | 2,09 \pm 1,26 |
| PAN | 4,52 \pm 3,83 | <LOQ* | 0,31 \pm 0,13 | 0,64 \pm 1,10 | 1,06 \pm 1,33 | 0,34 \pm 0,59 | 0,03 \pm 0,03 | 1,79 \pm 1,28 |
| PIN | 6,02 \pm 2,45 | <LOQ* | 2,72 \pm 0,25 | 0,05 \pm 0,07 | 0,25 \pm 0,25 | <LOQ* | <LOQ* | 0,89 \pm 0,13 |
| SKR | 10,00 \pm 6,13 | 14,47 \pm 10,49 | 0,12 \pm 0,08 | <LOQ* | 1,38 \pm 1,01 | 2,40 \pm 3,52 | 0,02 \pm 0,02 | 1,98 \pm 1,63 |
| YST | 20,90 \pm 11,70 | 7,62 \pm 11,22 | 0,25 \pm 0,08 | 0,02 \pm 0,03 | 1,28 \pm 0,60 | 0,46 \pm 0,26 | 0,35 \pm 0,23 | 13,76 \pm 8,26 |
| VNL | 6,59 \pm 4,51 | <LOQ* | 0,09 \pm 0,08 | <LOQ* | 0,99 \pm 0,51 | 0,60 \pm 0,61 | 0,02 \pm 0,02 | 1,68 \pm 1,33 |
| TRC | 999,03 \pm 1557,1 | 10,26 \pm 6,00 | 262,14 \pm 51,62 | 4,37 \pm 3,90 | 4,49 \pm 5,89 | 13,03 \pm 21,23 | 0,65 \pm 0,84 | 48,15 \pm 71,10 |
| GLT | 27,10 \pm 13,39 | 8,58 \pm 0,68 | 8,46 \pm 0,49 | 2,14 \pm 0,19 | 1,51 \pm 0,57 | 1,08 \pm 0,11 | 0,09 \pm 0,04 | 4,03 \pm 0,24 |
| OMK | 30,39 \pm 4,86 | 7,67 \pm 2,06 | 12,00 \pm 3,48 | 2,79 \pm 0,59 | 1,04 \pm 0,20 | 3,77 \pm 4,79 | 0,15 \pm 0,07 | 3,69 \pm 0,18 |
| OPR | 8,49 \pm 4,01 | 8,94 \pm 0,14 | 9,39 \pm 3,47 | 1,34 \pm 0,16 | 1,04 \pm 0,39 | 0,89 \pm 0,44 | 0,04 \pm 0,05 | 3,82 \pm 0,58 |
| OBL | 21,14 \pm 13,44 | 10,65 \pm 2,11 | 14,40 \pm 7,25 | 3,45 \pm 0,40 | 1,16 \pm 0,44 | 1,13 \pm 0,45 | 0,04 \pm 0,04 | 4,41 \pm 0,50 |
| BUN | 20,57 \pm 9,67 | 5,18 \pm 1,94 | 9,15 \pm 3,87 | 1,82 \pm 0,46 | 0,92 \pm 0,53 | 1,01 \pm 0,57 | 0,11 \pm 0,05 | 3,46 \pm 0,46 |
| SSA | 12,22 \pm 12,74 | 4,25 \pm 7,36 | 0,17 \pm 0,24 | 0,01 \pm 0,02 | 1,16 \pm 0,69 | 5,06 \pm 7,46 | 0,02 \pm 0,03 | 2,06 \pm 1,61 |
| SKA | 501,82 \pm 139,42 | <LOQ* | 12,55 \pm 5,89 | 0,36 \pm 0,02 | 0,99 \pm 0,40 | 5,82 \pm 0,40 | 0,17 \pm 0,03 | 151,04 \pm 52,42 |
| CMC | 33,67 \pm 27,54 | <LOQ* | 1,15 \pm 1,10 | 1,56 \pm 0,00 | 3,15 \pm 1,54 | 1,06 \pm 0,38 | 0,02 \pm 0,02 | 3,21 \pm 0,12 |
| Salep | 165,73\pm94,34 | 15,60\pm7,65 | 17,56\pm9,14 | 6,62\pm2,80 | 7,05\pm7,96 | 5,07\pm5,96 | 0,09\pm0,08 | 10,09\pm4,99 |
| TTK | Rb | Ba | Mo | V | Co | Li | Ga | Cs |
| GUM | 3,14 \pm 1,66 | 0,53 \pm 0,15 | 1,21 \pm 0,11 | 0,04 \pm 0,04 | 0,09 \pm 0,02 | 0,02 \pm 0,03 | 0,01 \pm 0,01 | 0,00 \pm 0,01 |
| GAR | 8,05 \pm 1,67 | 126,69 \pm 7,04 | 0,04 \pm 0,01 | 0,13 \pm 0,02 | 0,04 \pm 0,01 | 0,06 \pm 0,01 | 3,73 \pm 0,25 | 0,02 \pm 0,02 |
| KBG | 3,90 \pm 1,36 | 2,22 \pm 3,16 | 0,33 \pm 0,21 | 0,05 \pm 0,04 | 0,27 \pm 0,47 | 0,02 \pm 0,03 | 0,05 \pm 0,07 | 0,01 \pm 0,01 |
| KJG | 1,08 \pm 0,54 | 2,68 \pm 0,06 | 0,20 \pm 0,06 | 0,08 \pm 0,05 | 0,04 \pm 0,01 | 0,07 \pm 0,03 | 0,08 \pm 0,02 | 0,00 \pm 0,01 |
| KSG | 0,30 \pm 0,04 | 3,51 \pm 0,82 | 0,36 \pm 0,28 | 0,07 \pm 0,03 | 0,04 \pm 0,01 | 0,25 \pm 0,04 | 0,12 \pm 0,03 | <LOQ* |
| BNT | 0,06 \pm 0,07 | 0,36 \pm 0,10 | 0,09 \pm 0,08 | 0,01 \pm 0,01 | 0,01 \pm 0,01 | 0,04 \pm 0,03 | 0,02 \pm 0,02 | <LOQ* |
| MNT | 0,06 \pm 0,06 | 0,14 \pm 0,13 | 0,07 \pm 0,06 | 0,00 \pm 0,01 | 0,14 \pm 0,23 | 0,04 \pm 0,03 | 0,02 \pm 0,02 | <LOQ* |
| PAN | 0,18 \pm 0,08 | 0,13 \pm 0,03 | 0,03 \pm 0,06 | <LOQ* | 0,01 \pm 0,01 | 0,02 \pm 0,03 | 0,01 \pm 0,01 | <LOQ* |
| PIN | 0,60 \pm 0,45 | 0,11 \pm 0,01 | <LOQ* | <LOQ* | <LOQ* | 0,09 \pm 0,04 | <LOQ* | <LOQ* |
| SKR | 0,00 \pm 0,01 | 0,01 \pm 0,02 | 0,07 \pm 0,06 | <LOQ* | 0,02 \pm 0,02 | <LOQ* | <LOQ* | <LOQ* |
| YST | 10,13 \pm 6,53 | 0,80 \pm 0,61 | 0,27 \pm 0,08 | 0,10 \pm 0,09 | 0,00 \pm 0,01 | 0,22 \pm 0,26 | 0,01 \pm 0,02 | 0,09 \pm 0,08 |
| VNL | 0,01 \pm 0,01 | 0,02 \pm 0,03 | 0,09 \pm 0,08 | <LOQ* | 0,01 \pm 0,01 | 0,00 \pm 0,01 | <LOQ* | <LOQ* |
| TRC | 18,76 \pm 3,63 | 75,09 \pm 12,57 | 0,19 \pm 0,11 | 2,05 \pm 3,26 | 0,26 \pm 0,33 | 0,08 \pm 0,10 | 2,17 \pm 0,69 | 0,26 \pm 0,05 |
| GLT | 1,12 \pm 0,31 | 0,99 \pm 0,24 | 0,34 \pm 0,70 | 0,04 \pm 0,04 | 0,02 \pm 0,00 | 0,05 \pm 0,04 | 0,04 \pm 0,02 | 0,00 \pm 0,01 |
| OMK | 1,27 \pm 0,39 | 1,34 \pm 0,63 | 0,44 \pm 0,14 | 0,03 \pm 0,02 | 0,01 \pm 0,01 | 0,07 \pm 0,04 | 0,04 \pm 0,03 | <LOQ* |
| OPR | 0,94 \pm 0,34 | 0,03 \pm 0,05 | 0,52 \pm 0,04 | 0,02 \pm 0,02 | 0,01 \pm 0,01 | <LOQ* | 0,01 \pm 0,01 | <LOQ* |
| OBL | 1,35 \pm 0,15 | 1,01 \pm 0,51 | 0,29 \pm 0,12 | 0,01 \pm 0,01 | 0,01 \pm 0,01 | 0,01 \pm 0,01 | 0,03 \pm 0,02 | <LOQ* |
| BUN | 0,92 \pm 0,29 | 1,27 \pm 0,58 | 0,87 \pm 0,94 | 0,01 \pm 0,02 | 0,01 \pm 0,01 | 0,15 \pm 0,22 | 0,04 \pm 0,02 | 0,00 \pm 0,01 |
| SSA | 0,01 \pm 0,01 | 0,08 \pm 0,14 | 0,06 \pm 0,52 | 0,00 \pm 0,01 | 0,01 \pm 0,01 | 0,00 \pm 0,01 | <LOQ* | <LOQ* |
| SKA | 0,05 \pm 0,06 | 1,53 \pm 0,88 | 0,80 \pm 0,15 | 1,37 \pm 0,21 | 0,24 \pm 0,10 | 0,07 \pm 0,02 | 0,05 \pm 0,01 | 0,01 \pm 0,01 |
| CMC | <LOQ* | 0,87 \pm 0,83 | 0,10 \pm 0,00 | <LOQ* | 0,02 \pm 0,01 | 0,06 \pm 0,06 | 0,03 \pm 0,02 | <LOQ* |
| Salep | 7,27\pm12,06 | 4,13\pm3,09 | 0,33\pm0,26 | 0,33\pm0,24 | 0,18\pm0,14 | 0,25\pm0,16 | 0,15\pm0,13 | 0,24\pm0,55 |

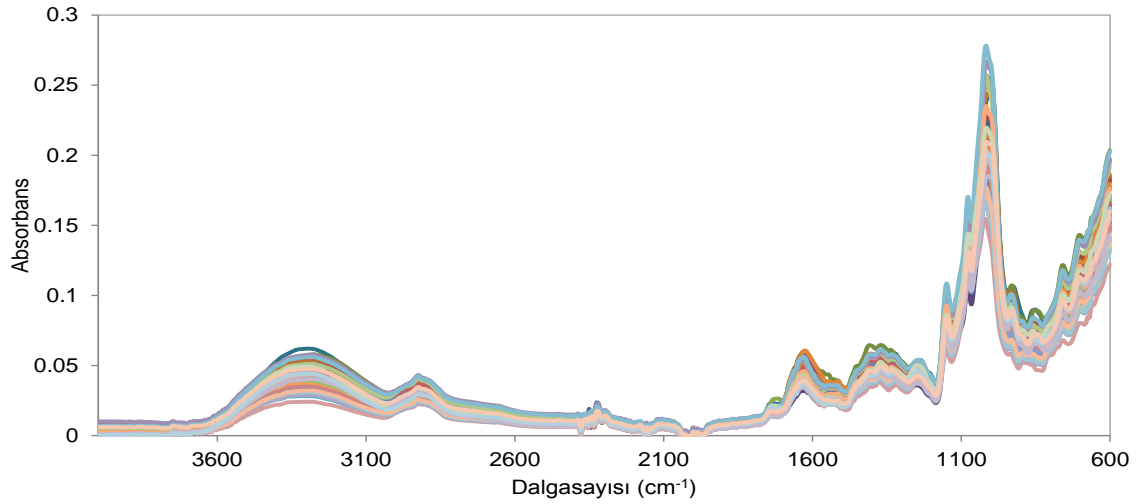
Elde edilen bulgulara göre; demir tarçında (999,03±1557,11) (Şekil 23a), çinko buğday nişastasında (18,70±31,83) (Şekil 23b), mangan tarçında (262,14±51,62) (Şekil 23c), bakır buğday nişastasında (51,34±88,93) (Şekil 23d), stronsiyum katı salep aromasında (123,07±54,75) (Şekil 23g), nikel tarçında (13,03±21,23) (Şekil 23f), titanyum katı salep aromasında (151,04±52,42) (Şekil 23h), rubidyum tarçında (18,76±3,63) (Şekil 23i), molibden buğday ununda (0,87±0,94) (Şekil 23k), vanadyum tarçında (2,05±3,26) (Şekil 23l), kobalt tarçında (0,26±0,33) (Şekil 23m), galyum gam arabikte (3,73±0,25) (Şekil 23o), selenyum tarçında (0,65±0,84), krom salepte (7,05±7,96) (Şekil 23e), lityum salepte (0,25±0,04) (Şekil 23n) ve baryum ise gam arabikte (126,69±7,04) (Şekil 23j) mg/kg cinsinden en yüksek düzeylerde tespit edilmişlerdir.

Ayrıca Tablo 26'da salep ile %95 önem seviyesinde farklı bulunan TTK maddeleri listelenmiştir. İlgili tabloya göre; salebin titanyum, vanadyum ve sezyum yönlerinden 19; demir, mangan, bakır, stronsiyum ve galyum yönlerinden 18; rubidyum ve baryum yönlerinden 17; çinko, kobalt ve lityum yönlerinden 16; krom yönünden 14; selenyum ve molibden yönlerinden 12 ve nikel yönünden ise 8 adet TTK maddesi ile istatistiksel olarak farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir ($p<0,05$).

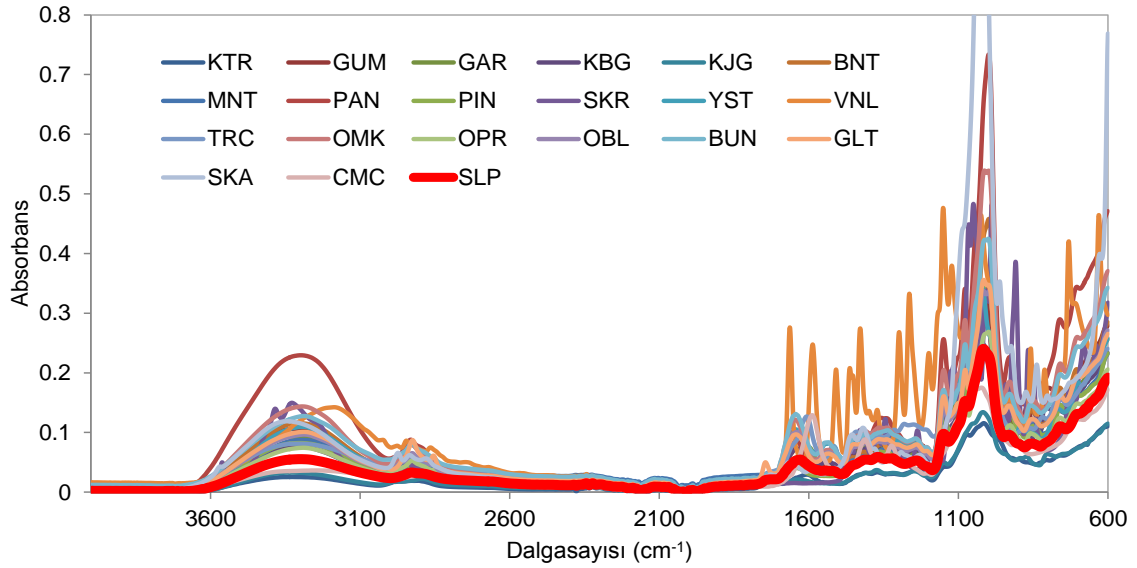
Salep numunelerinde tespit edilen ortalama krom (7,05±7,96 mg/kg) ve lityum (0,25±0,16 mg/kg) elementleri incelenen tüm TTK maddelerinde tespit edilen ortalama lityum düzeylerinden daha yüksek olarak bulunmuştur. Bu açıdan krom ve lityum elementlerinin taklit ve tağşişi belirlemede bir belirteç olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Buna ilave olarak, proje çalışmaları kapsamında salep örneklerinde tespit edilemeyen talyum ve bizmut elementleri incelenen tüm konyak gam örneklerinde farklı düzeylerde belirlenmiştir. Bu açıdan değerlendirildiğinde bu elementlerin Avrupa salebi olarak adlandırılan ve yapısal olarak ülkemiz salepleri ile büyük benzerlikle gösteren konyak gam ile ayırmda önemli parametreler olabileceği sonucuna varılmıştır.

4.4. Kızılötesi (IR) spektrumu analizi

Proje kapsamında temin edilen tüm salep numunelerinin ve TTK maddelerinin FTIR spektrumları taranarak kaydedilmiş ve bir veri bankası oluşturulmuştur. Bununla birlikte farklı oranlarda salep içeren 270 farklı reçete bileşimi hazırlanarak spektrumları alınmış ve ilgili veri bankasına eklenilmiştir. Hazırlanan reçete bileşimleri proje sonuç raporu eklerinde yer alan "Ek 1. FTIR spektrum kütüphanesi oluşturmak için kullanılan reçete bileşimleri" dosyasında sunulmaktadır. Bu çerçevede incelenen tüm salep numunelerine ait spektrum Şekil 24'te TTK maddelerine ait spektrum ise Şekil 25'te çakıştırılarak gösterilmektedir.



Şekil 24. Proje kapsamında toplanılan salep numunelerine ait FTIR spektrumları



Şekil 25. Salep taklit ve taşışinde kullanılan maddelere ait FTIR spektrumları

İlgili spektrumlar incelendiğinde salep numuneleri arasında neredeyse aynı spektrumlar tespit edilmesine rağmen (Şekil 24), salep numuneleri ile TTK maddeleri arasında bir takım spektrum farklılıklarının bulunduğu belirlenmiştir (Şekil 25). İlgili farklılıklar “Kemometrik çok değişkenli sınıflama ve kümeleme analizi” bölümünde tartışılmıştır.

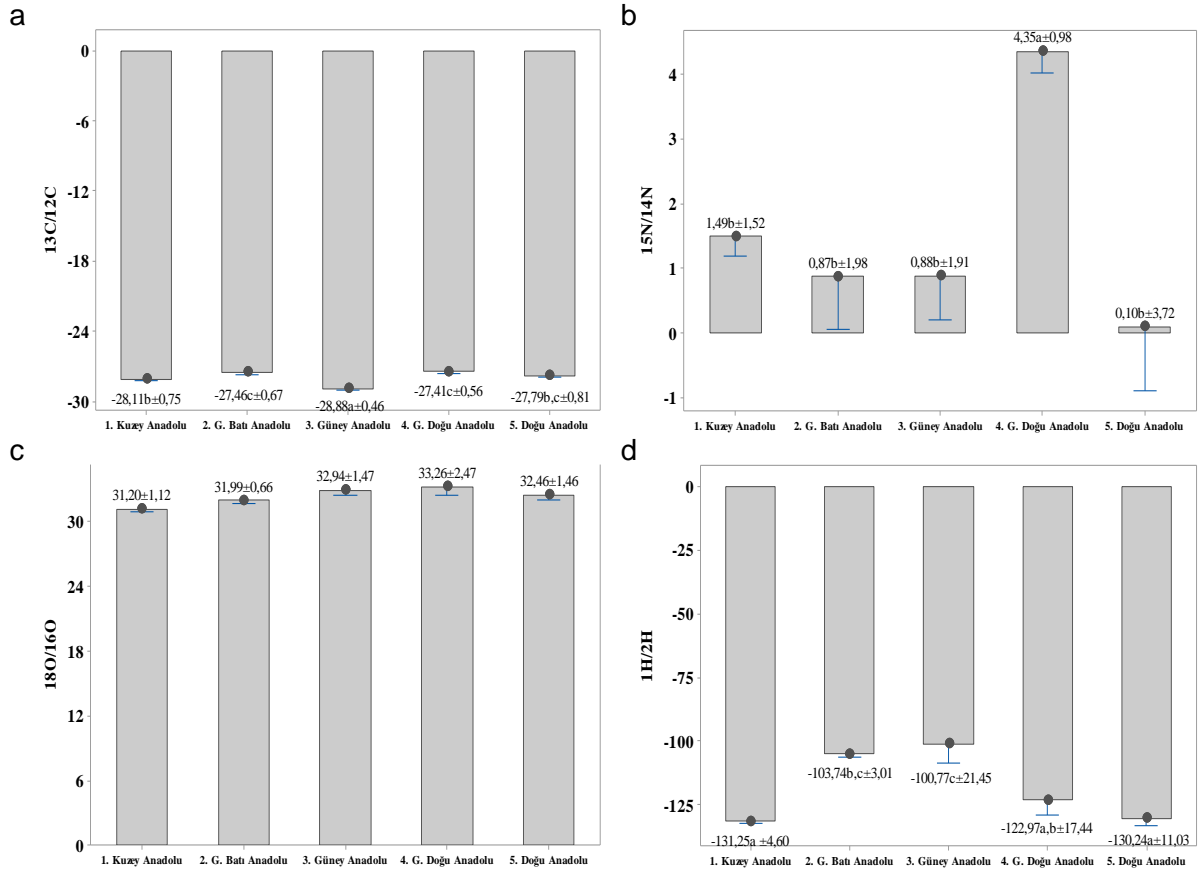
4.5. İzotop oranları

Salep ve TTK numunelerinde kullanılacak olan izotop oranı kütle spektrometrisi yöntemi numune analizleri öncesinde gerek analitik standart maddelerle gerekse salep numunesi ile tekrarlı analizlere tabi tutularak yöntem parametrelerinde (gaz akış oranları, seyreltme oranları vb,) bazı düzenlemelere gidilmiştir. Ayrıca numune çalışılması öncesinde ilgili cihaz sertifikalı referans madde ile kalibre edilmiş referans gaz ile çalıştırılarak sonuçların güvenilirliği test edilmiştir. Bu kapsamda elde edilen bulgular Tablo 27'de sunulmaktadır.

Tablo 27. İzotop oranları analizleri tekrarlanabilirlik sonuçları

| Analiz No | ¹³ C/ ¹² C | ¹⁵ N/ ¹⁴ N | ² H/ ¹ H | ¹⁸ O/ ¹⁶ O |
|------------------|----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| 1 | -27,328 | 9,156 | -103,869 | 30,929 |
| 2 | -27,184 | 7,117 | -107,243 | 31,770 |
| 3 | -27,236 | 5,375 | -105,210 | 32,218 |
| 4 | -27,618 | 9,109 | -111,010 | 32,568 |
| 5 | -27,488 | 9,372 | -107,072 | 32,057 |
| 6 | -27,276 | 10,174 | -104,998 | 34,466 |
| 7 | -27,368 | 8,415 | -101,871 | 33,277 |
| 8 | -27,405 | 7,286 | -102,222 | 32,300 |
| 9 | -27,342 | 9,041 | -108,553 | 33,058 |
| 10 | -27,411 | 10,122 | -108,719 | 33,608 |
| Ortalama | -27,366 | 8,517 | -106,077 | 32,625 |
| Standart sapma | 0,126 | 1,507 | 2,965 | 1,010 |
| Bağıl std, sapma | -0,459 | 17,697 | -2,795 | 3,094 |

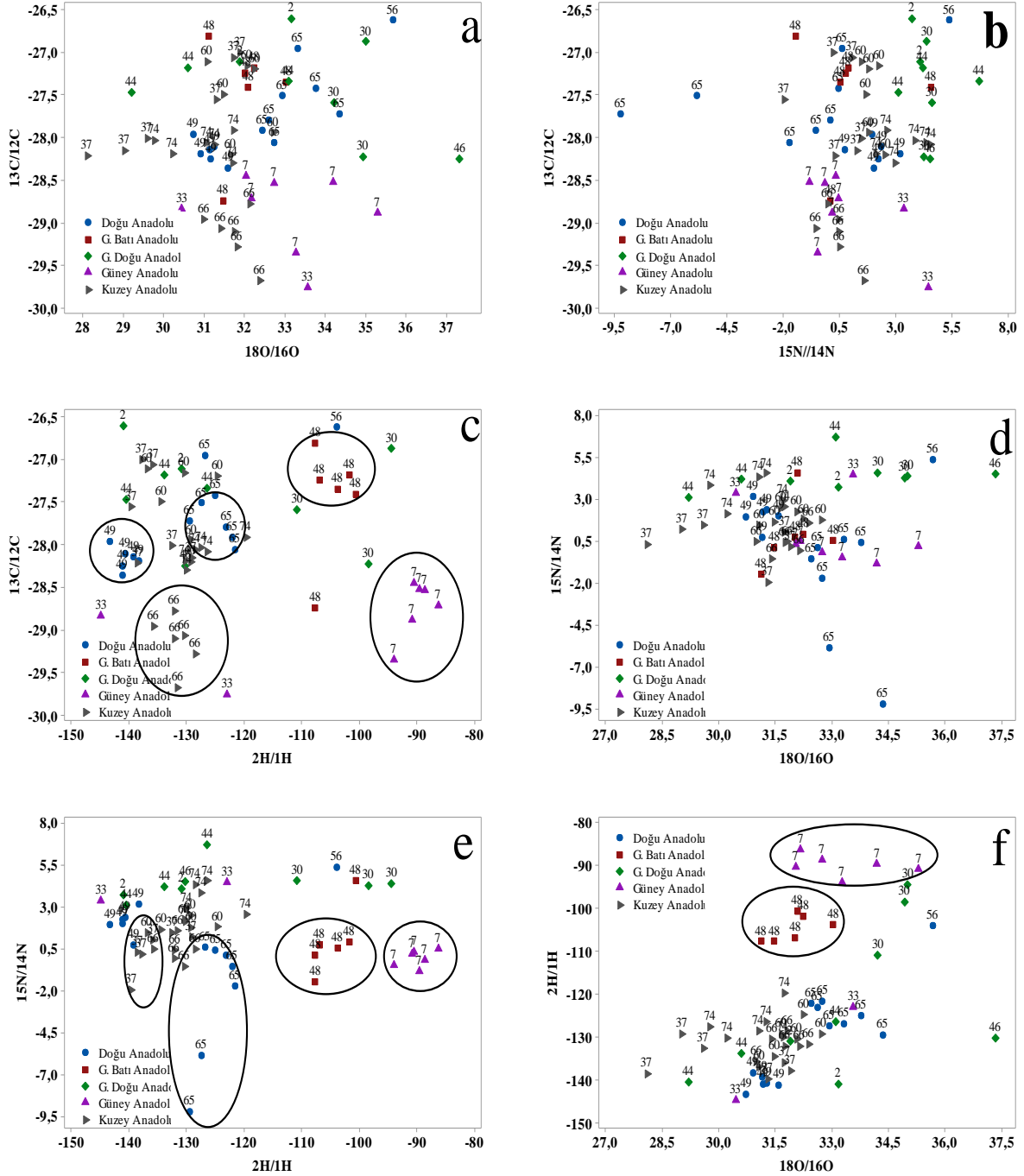
Tablo 27'de sunulan veriler, numunelerin izotop oranlarını belirlemek için kullanılacak yöntemin doğru ve tekrarlanabilir sonuçlar üretebildiğine işaret etmektedir. Salep örneklerinde belirlenen izotop oranlarına ait değerler Şekil 26'da gösterilmektedir,



Şekil 26. Salep örneklerine ait izotopik analiz sonuçları

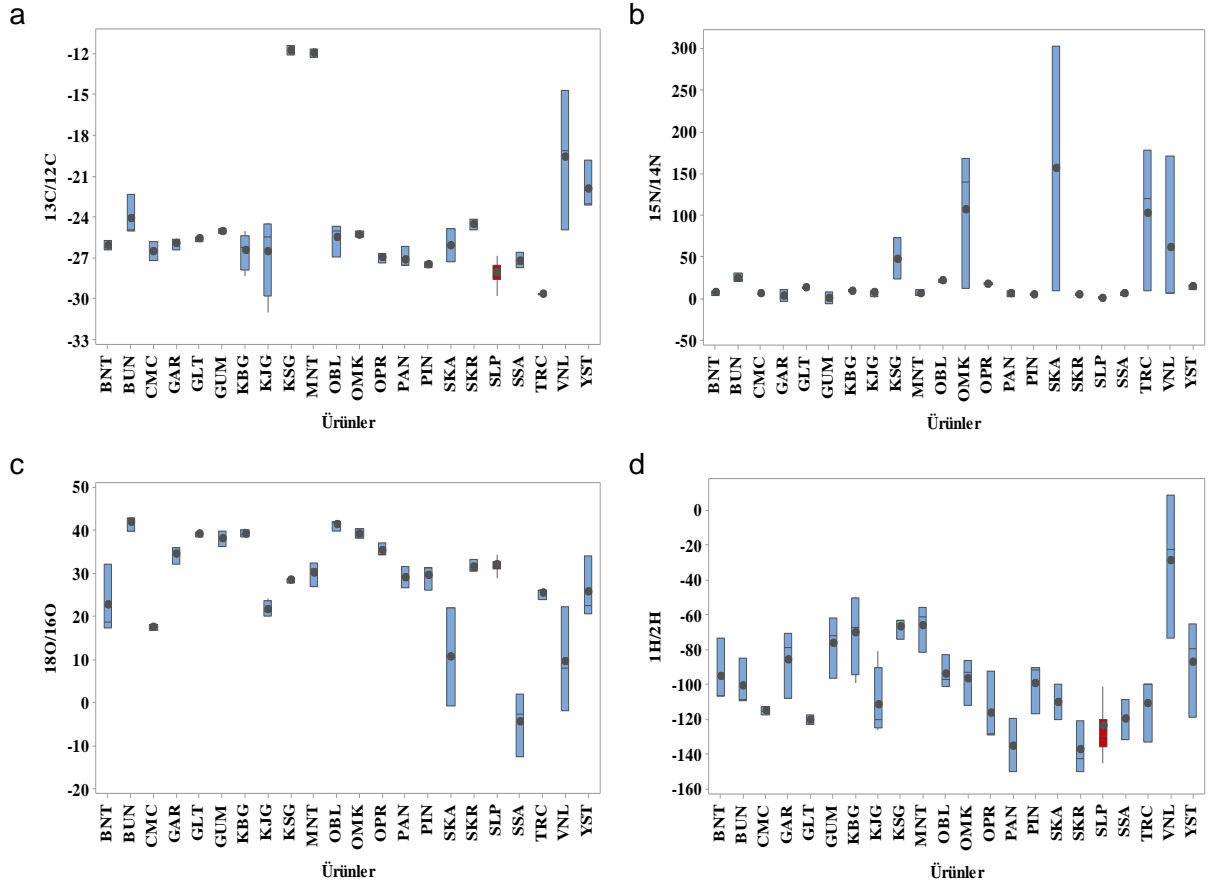
Şekil 26'da sunulan izotopik analiz bulgularına göre, salep numunelerine ait karbon, azot, oksijen ve hidrojen izotop oranlarının sırasıyla -26,61 ile -29,68; -9,25 ile 6,66; 28,09 ile 37,31 ve -84,20 ile -144,86 arasında değiştikleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar; azot, hidrojen ve karbon izotop oranları açısından bölgeler arasında farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) olduğu, oksijen izotop oranlarının ise istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunmadığını ($p > 0,05$) göstermektedir. Karbon izotop oranları açısından en yüksek değerler Güneydoğu ve Güneybatı Anadolu Bölgeleri'nden temin edilen salep numunelerinde belirlenirken (Şekil 26a), en yüksek azot ve hidrojen izotop oranlarının ise sırasıyla Güneydoğu Anadolu Bölgesi ve Güney Anadolu saleplerinde bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 26b ve d). Bununla birlikte, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ oranının bölgeler arası bir farklılık göstermemesi nedeni ile ülkemiz salep profiline yönelik standart değerleri yansıtmakta olduğu düşünülmektedir (Şekil 26c). Numunelerdeki karbon izotop oranındaki farklılık bitkilerin fotosentez mekanizması ile ilişkili olması nedeni ile güneşlenme oranına ve fizyolojik faktörlere, azot izotop oranları arasındaki farklılıklar bitkinin yetiştiği doğal çevresel faktörlere (gübre kullanımı veya çevresel kirlilikten gelen azot içeriği) ve salebin yetiştiği ortamlardaki mikrofloraların farklı olması ile ilişkilidir.

Hidrojen izotop oranlarındaki farklılıklar ise su döngüsü, meteorolojik koşulların farklı olmasına bağlıdır (Sun, 2008; Cengiz vd., 2014). Bitkisel numunelerde tespit edilen izotopik oranlar aynı zamanda bitkinin yetiştiği bölge hakkında da önemli veriler sunmakta ve bu veriler kullanılarak bitkinin yetiştiği bölgeler de tahmin edilebilmektedir. Bu kapsamda toplanan salep örnekleri arasında muhtemel bölgesel sınıflamaların belirlenebilmesi amacıyla uygulanan iki boyutlu saçılma grafikleri Şekil 27’de sunulmaktadır.



Şekil 27. Salep numuneleri izotop oranları arası iki boyutlu saçılma grafikleri

Sekil 27’de sunulan grafiklere göre farklı bölgelerden toplanan salep örneklerinin bölgesel ayrımında en etkili izotop oran birleşiminin $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ile $^2\text{H}/^1\text{H}$ (Şekil 27c), $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ile $^2\text{H}/^1\text{H}$ (Şekil 27e) $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ile $^2\text{H}/^1\text{H}$ (Şekil 27f) oranlarının olduğu gözle çarpmaktadır. Bu birleşim kullanılarak numunelerin toplandığı bölgeler ve hatta iller arasında birtakım ayrımların yapılmasının mümkün olabileceği sonucuna varılmıştır. Proje kapsamında incelenen TTK maddelerinde tespit edilen karbon, azot, oksijen ve hidrojen izotoplarına ait oransal dağılımlar Şekil 28’de, istatistiksel değerlendirmeler ise Tablo 28’de sunulmaktadır.



Şekil 28. TTK maddelerine ait izotopik analiz sonuçları

Tablo 28. TTK maddeleri izotop analizlerine ait istatistiksel değerlendirme tablosu

| TTK | $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ | $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ | $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ | $^1\text{H}/^2\text{H}$ |
|--------------|-----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|
| GUM | -25,03 \pm 0,16 | 0,86 \pm 6,67 | 38,08 \pm 1,77 | -76,61 \pm 17,76 |
| GAR | -26,09 \pm 0,42 | -1,32 \pm 3,00 | 35,56 \pm 0,45 | -74,37 \pm 5,79 |
| KBG | -26,49 \pm 1,37 | 9,55 \pm 1,88 | 39,12 \pm 0,95 | -70,53 \pm 23,37 |
| KJG | -26,57 \pm 3,04 | 7,66 \pm 4,31 | 21,63 \pm 1,89 | -111,82 \pm 21,13 |
| KSG | -11,75 \pm 0,36 | 47,93 \pm 24,66 | 28,39 \pm 0,53 | -66,76 \pm 6,04 |
| BNT | -26,09 \pm 0,38 | 7,14 \pm 2,76 | 22,72 \pm 8,11 | -95,37 \pm 19,08 |
| MNT | -11,86 \pm 0,22 | 6,82 \pm 3,36 | 30,01 \pm 2,86 | -66,10 \pm 13,42 |
| PAN | -27,10 \pm 0,81 | 6,02 \pm 3,64 | 29,06 \pm 2,48 | -135,06 \pm 15,19 |
| PIN | -27,51 \pm 0,28 | 4,06 \pm 1,04 | 31,31 \pm 0,04 | -90,87 \pm 0,72 |
| SKR | -24,54 \pm 0,39 | 5,44 \pm 1,37 | 31,41 \pm 1,45 | -137,70 \pm 15,24 |
| YST | -21,97 \pm 1,89 | 14,65 \pm 3,26 | 24,66 \pm 7,20 | -87,46 \pm 27,82 |
| VNL | -19,58 \pm 5,10 | 61,89 \pm 95,16 | 9,57 \pm 12,10 | -28,97 \pm 41,19 |
| TRC | -29,66 \pm 0,03 | 102,87 \pm 85,26 | 25,39 \pm 1,19 | -110,87 \pm 18,96 |
| GLT | -25,62 \pm 0,18 | 13,17 \pm 0,66 | 39,04 \pm 0,61 | -120,10 \pm 2,65 |
| OMK | -25,28 \pm 0,26 | 107,01 \pm 83,62 | 39,00 \pm 1,21 | -96,99 \pm 13,68 |
| OPR | -26,94 \pm 0,37 | 17,87 \pm 1,43 | 35,19 \pm 1,70 | -116,53 \pm 20,90 |
| OBL | -25,53 \pm 1,24 | 21,35 \pm 2,74 | 41,16 \pm 1,19 | -93,64 \pm 9,63 |
| BUN | -24,11 \pm 1,52 | 24,95 \pm 4,85 | 41,79 \pm 1,70 | -100,84 \pm 14,04 |
| SSA | -27,25 \pm 0,60 | 6,48 \pm 2,67 | -4,37 \pm 7,48 | -119,72 \pm 11,43 |
| SKA | -26,08 \pm 1,72 | 156,27 \pm 208,22 | 10,59 \pm 16,04 | -110,15 \pm 14,28 |
| CMC | -26,51 \pm 0,95 | 5,70 \pm 0,37 | 17,53 \pm 0,88 | -115,10 \pm 3,27 |
| Salep | -27,97\pm0,76 | 1,46\pm2,56 | 32,10\pm1,64 | -123,10\pm16,49 |

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

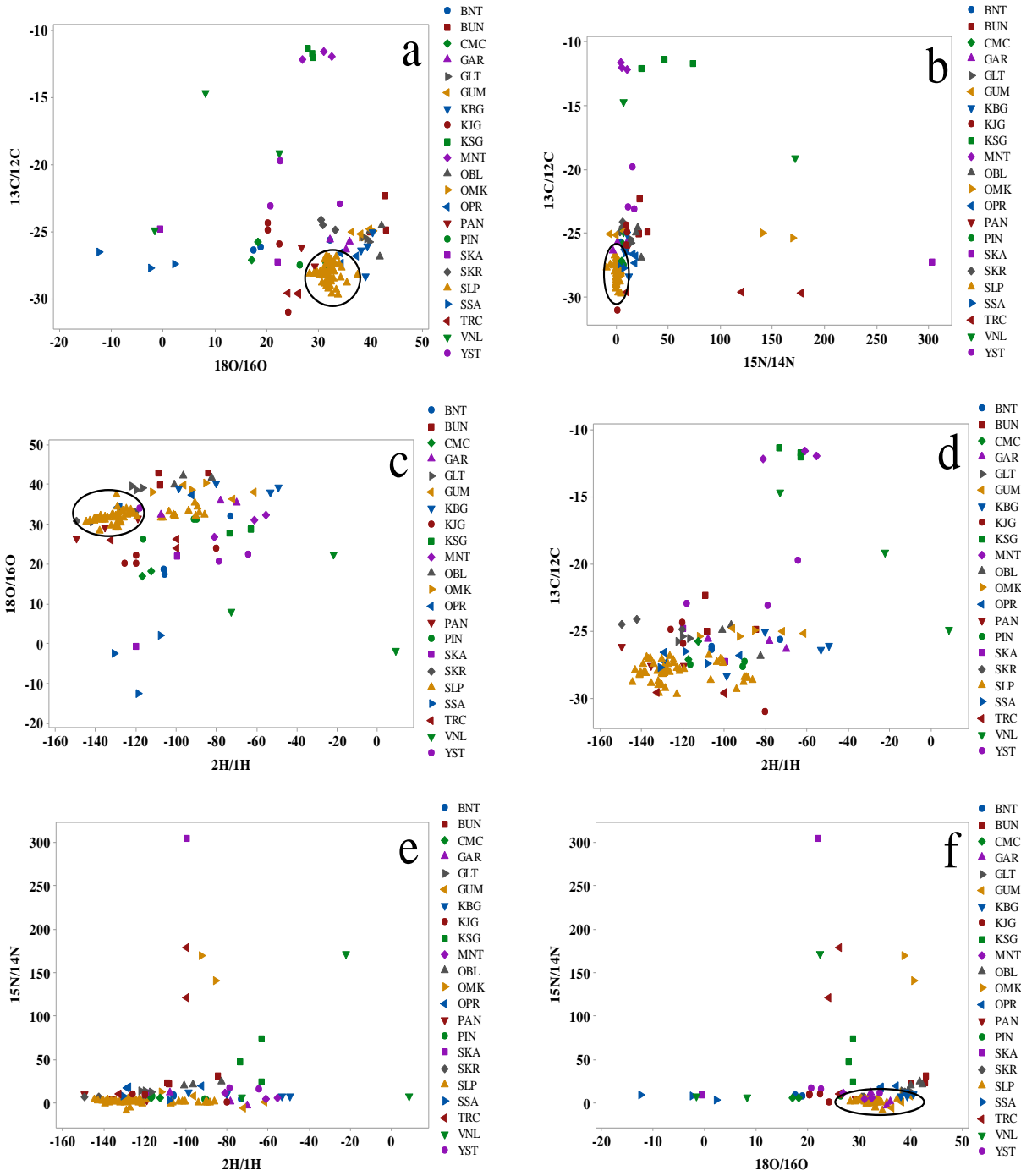
TTK maddelerine ait izotop analiz sonuçlarına göre; numunelerde belirlenen $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ve $^2\text{H}/^1\text{H}$ izotop oranlarının sırasıyla ‰-31,04 ile ‰-11,39, ‰-5,54 ile ‰303,50, ‰-12,58 ile ‰42,81 ve ‰-149,85 ile ‰8,52 aralıklarında değiştikleri tespit edilmiştir. Ayrıca Tablo 28’de sunulan istatistiksel değerlendirme tablosunda izotop oranları açısından salep ile %95 önem seviyesinde farklı bulunan TTK maddeleri listelenmiştir. İlgili listede belirtilen TTK maddelerine ait değerler salep örneklerinde tespit edilen değerler ile karşılaştırıldığında $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ oranı açısından salebin konyak gam, patates nişastası, pirinç nişastası, katı ve sıvı salep aroması hariç olmak üzere diğer TTK maddelerinden istatistiksel anlamda farklılıklar arz ettiği tespit edilmiştir ($p < 0,05$).

Benzer şekilde salep örneklerinde -9,25 ile 6,66 arasında değişen $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ oranının pirinç nişastası, guar gam ve gam arabik dışındaki tüm TTK maddelerinden istatistiksel olarak farklı olduğu görülmektedir ($p<0,05$). Azot izotop oranlarının TTK maddelerinin çoğunda salep ile farklılıklar göstermesi belirtilen maddeler ile yapılabilecek taklit ve tağşişin belirlenmesinde $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ oranının önemli olabileceğini düşündürmektedir.

Salep numunelerinde belirlenen $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ oranlarının ise pirinç nişastası, buğday nişastası, mısır nişastası, yağsız süt tozu ve şeker dışındaki tüm TTK maddelerinden belirgin şekilde farklı olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca elde edilen sonuçlara göre; her ne kadar ülkemizde yetişen salep örneklerinin $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ oranları arasında istatistiksel olarak farklılıklar bulunmasa da, tespit edilen değerlerin ülkemizde yetiştirilen salep numuneleri ile Avrupa salebi olarak bilinen konyak gam arasında farklılıklar içerdiğini göstermektedir. Bu açıdan kimyasal açıdan büyük ölçüde benzeşen bu iki ürün arasındaki farklılığın belirlenmesinde bu oranlarının kullanılabilmesi ihtimal dairesindedir.

TTK maddelerindeki $^2\text{H}/^1\text{H}$ izotop oranları oldukça geniş bir aralıkta seyretmekte olup, konyak gam, patates nişastası, şeker, tarçın, galeta unu, öğütülmüş pirinç, buğday unu, karboksimetil selüloz, katı ve sıvı salep aroması hariç tüm TTK maddelerinde tespit edilen değerlerin salep numuneleri ile istatistiksel olarak farklılıklar içerdiği belirlenmiştir ($p<0,05$).

Proje kapsamında incelenen salep numuneleri ve TTK maddelerinde tespit edilen izotopik değerlere ait ikili birleşimlerinin salep ve TTK maddeleri arası ayırmada kullanılabilirliğini belirlemek amacı ile hazırlanan iki boyutlu saçılma grafikleri Şekil 29'da gösterilmektedir.



Şekil 29. Tüm numunelerin izotopik oran değerlerine ait iki boyutlu saçılma grafikleri

Şekil 29'da sunulan grafiklere göre salep numunelerinin TTK maddeleri içinde gruplanması değerlendirildiğinde en iyi izotopik birleşimin $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ile $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ (Şekil 29a) ve $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ile $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ (Şekil 29b) ve $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ile $^2\text{H}/^1\text{H}$ (Şekil 29c) arasında bulunduğu sonucuna varılmıştır.

4.6. Kalorimetrik ölçümler

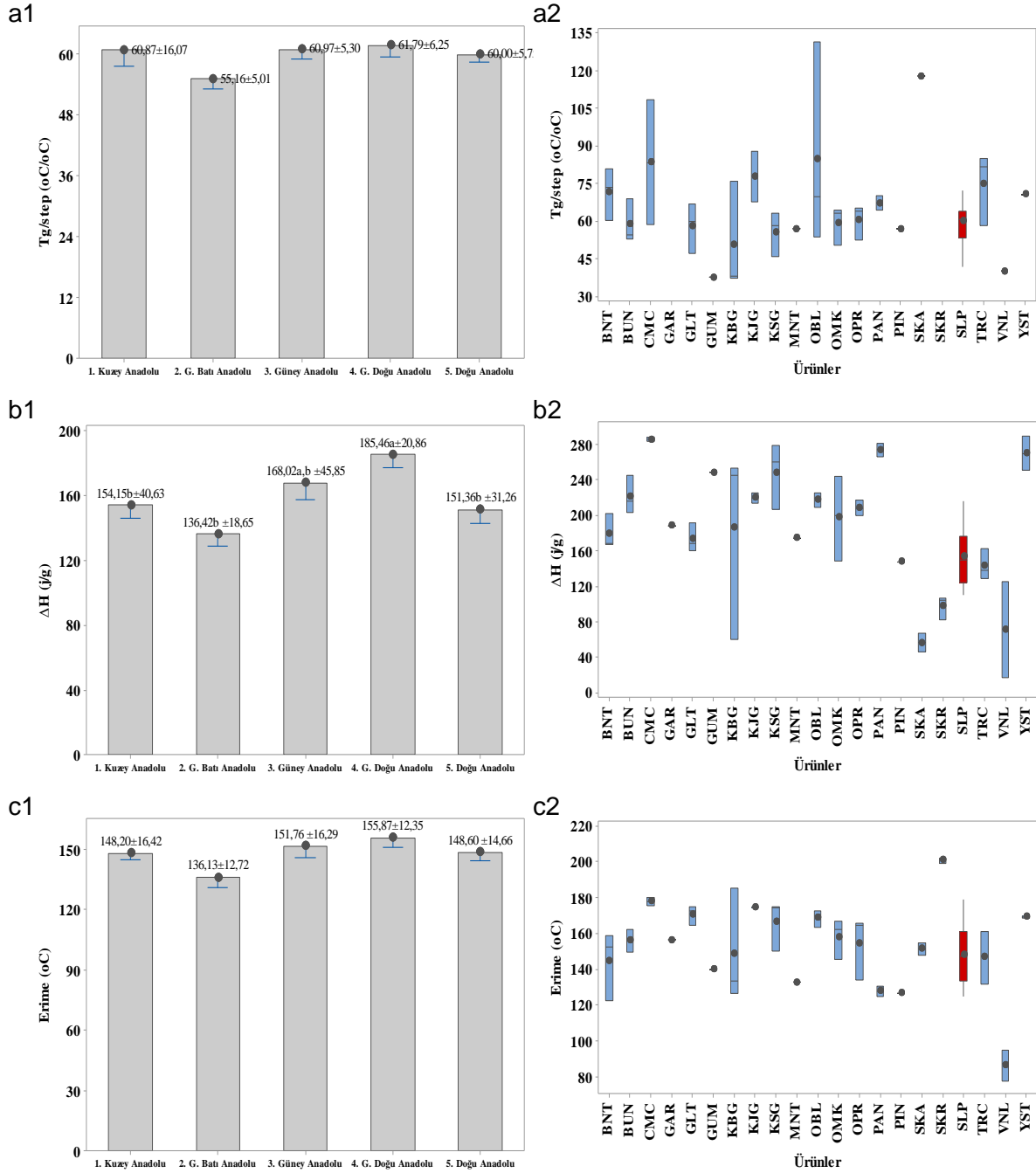
Salep örneklerinde kalorimetrik ölçümler kapsamında gerçekleştirilen erime sıcaklığı (°C), erime Isısı (J/g) ve Tg/Step değerlerine ait tekrarlanabilirlik verileri Tablo 29'da sunulmaktadır.

Tablo 29. Kalorimetrik ölçümler tekrarlanabilirlik sonuçları

| Analiz No | Erime Sıcaklığı (°C) | Erime Isısı (J/g) | Tg/Step |
|----------------------|----------------------|-------------------|---------|
| 1 | 165,220 | 222,260 | 138,680 |
| 2 | 162,960 | 211,560 | 133,700 |
| 3 | 167,110 | 223,260 | 143,240 |
| 4 | 166,750 | 211,600 | 134,030 |
| 5 | 168,770 | 218,280 | 145,330 |
| 6 | 169,180 | 209,940 | 137,330 |
| Ortalama | 166,665 | 216,150 | 138,718 |
| Standart sapma | 2,314 | 5,878 | 4,759 |
| Bağıl standart sapma | 1,389 | 2,719 | 3,431 |

Salep örneklerine ve TTK maddelerine uygulanan kalorimetrik analizler sonucu elde edilen bulgular Şekil 30'da, verilere uygulanan istatistiksel değerlendirmeler ise Tablo 30'da gösterilmektedir.

İlgili şekil ve tablolara göre; ülkemizin farklı bölgelerinden temin edilen salep örneklerinin kalorimetrik analiz sonuçlarından elde edilen verilere göre; numunelerde belirlenen erime sıcaklığı, entalpi ve termogravimetrik değerlerin geniş bir aralıkta seyrettiği meydana çıkmaktadır. Kalorimetrik analizler bilindiği üzere, gıda maddesini meydana getiren birtakım öğelerin termal açıdan farklı davranışlar sergilemesinden kaynaklanmaktadır. Bu yönüyle salebin bileşiminde büyük bir orana sahip nişastanın retrogradasyon ve jelatinizasyonu kalorimetrik ölçüm sonuçlarını etkileyebilmektedir. Ülkemizin farklı bölgelerinden temin edilen salep numunelerindeki nişasta oranlarının geniş bir aralıkta (15,42 – 74,34 g/100g) seyretmesi nedeni ile kalorimetrik değerlerin de standart sapmasının büyük olmasına yol açmış olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 30. Kalorimetrik analiz bulguları

Şekil 30'da sunulan verilere göre, salep numunelerinde tespit edilen ortalama, en az ve en çok kalorimetrik değerler dikkate alındığında sonuçların TTK maddelerinde tespit edilen değerler ile büyük oranda örtüştüğü sonucuna varılmıştır. Ancak bazı TTK maddelerinde belirlenen entalpi değişimi (ΔH) değerlerinin salep numunelerinde belirlenen değerlerden büyük oranda farklılıklar içerdiği dikkati çekmektedir (Şekil 30b1 ve b2). Buna örnek olarak nişasta grubunda yer alan TTK maddeleri, karboksimetil selüloz, yağsız süt tozu, vanilya öğütülmüş pirinç ve bulgur verilebilir.

Tablo 30. TTK maddeleri kalorimetrik analizlere ait istatistiksel değerlendirme tablosu

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

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

Tablo 30'da sunulan kalorimetrik ölçümlere ait istatistiksel değerlendirme tablosuna göre, camsı geçiş sıcaklığı bakımından salep örnekleri ile TTK maddeleri arasında bir farklılık tespit edilememiştir. Ancak, erime sıcaklığı açısından salep ile konyak gam, patates nişastası, şeker, yağsız süt tozu, vanilya, galeta ve öğütülmüş bulgur arasında ve entalpi değerleri açısından ise konyak gam, ksantan gam, şeker, yağsız süt tozu, vanilya, öğütülmüş pirinç ve buğday unu arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklar bulunduğu belirlenmiştir ($p<0,05$).

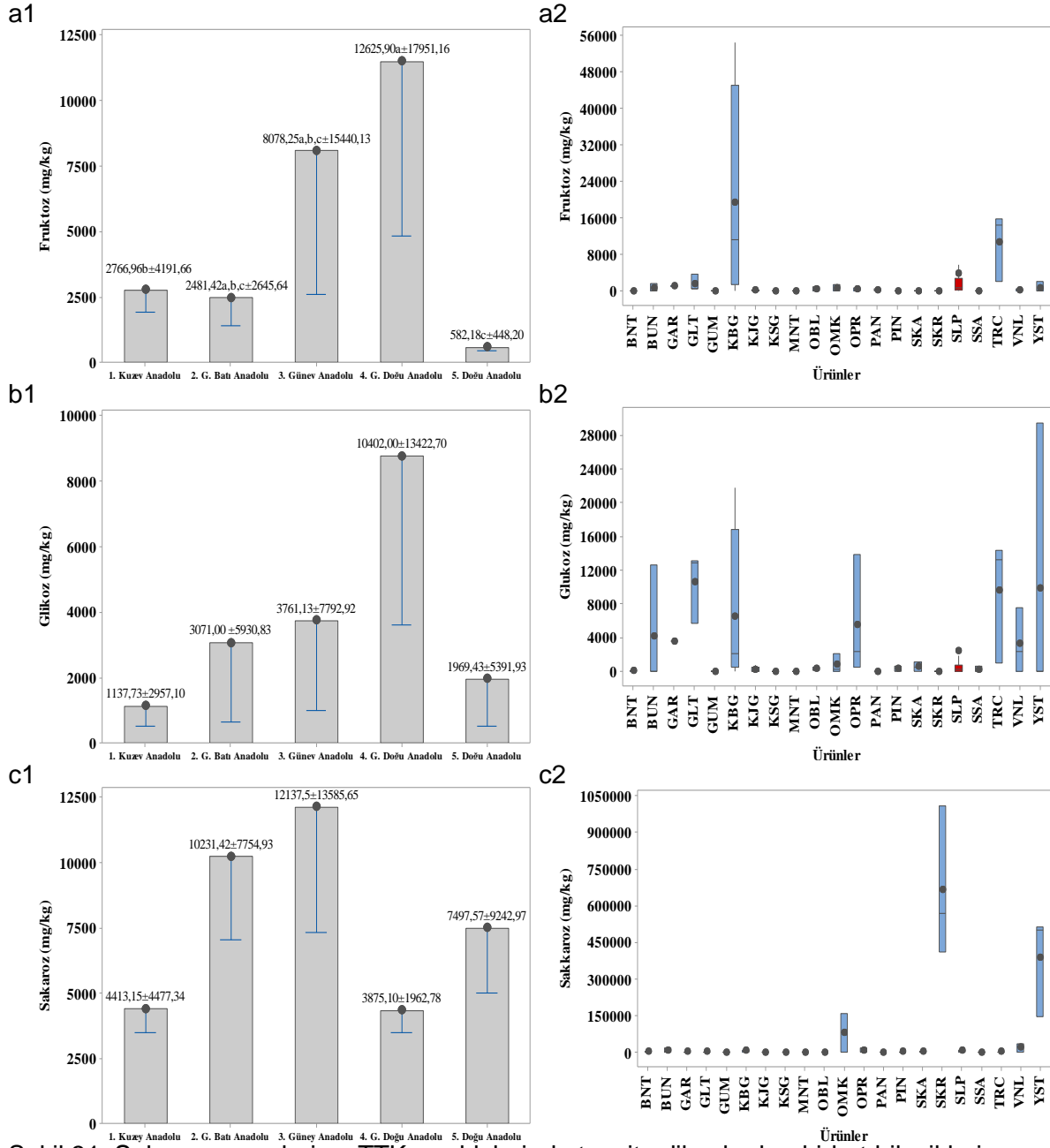
4.7. Karbonhidrat bileşikleri analizleri

Numunelerin karbonhidrat analizleri öncesinde kullanılacak olan yöntem bazı yöntem doğrulama parametreleri açısından değerlendirilmiş ve elde edilen bulgular Tablo 31’de sunulmuştur.

Tablo 31. Karbonhidrat bileşikleri analizlerine ait bazı yöntem doğrulama sonuçları

| Parametreler | Doğrusal Aralık (mg/L) | Ölçümleme Denklemi | R ² | Seyreltme katsayısı | Tespit S, (mg/L) | Tayin S, (mg/L) | Tekrarlanabilirlik (%RSD) | % Geri Kazanım |
|--------------|------------------------|--------------------|----------------|---------------------|------------------|-----------------|---------------------------|----------------|
| Sakaroz | 25 - 1000 | Y = 3209,1X | 0,9999 | 50 | 90,62 | 302,15 | 2,39 | 99,52 |
| Glikoz | 25 - 1000 | Y = 3558X | 0,9999 | 50 | 84,01 | 279,88 | 3,04 | 99,55 |
| Fruktoz | 25 - 1000 | Y = 3193,2X | 0,9998 | 50 | 60,85 | 202,62 | 2,35 | 98,53 |
| Maltoz | 25 - 1000 | Y = 3312X | 0,9989 | 50 | 58,93 | 196,33 | 2,69 | 98,61 |
| Mannoz | 25 - 1000 | Y = 2835,4X | 0,9999 | 50 | 94,26 | 313,91 | 3,20 | 97,44 |
| Galaktoz | 25 - 1000 | Y = 3957,1X | 0,9999 | 50 | 91,42 | 304,74 | 2,65 | 98,12 |
| Arabinoz | 25 - 1000 | Y = 3524X | 0,9997 | 50 | 66,14 | 220,22 | 3,36 | 98,15 |

Yöntem doğrulama çalışmalarından elde edilen sonuçlar karbonhidrat bileşiklerini belirlemek üzere kullanılacak yöntemin kabul edilebilir düzeylerde olduğunu göstermektedir. Doğrulama çalışmaları ile en uygun hale getirilen yöntem kullanılarak gerçekleştirilen analizler sonucu salep numuneleri ve TTK maddeleri için elde edilen sonuçlar grafikler halinde Şekil 31’de ve istatistiksel değerlendirmeler ise Tablo 32’de sunulmaktadır.



Şekil 31. Salep numuneleri ve TTK maddelerinde tespit edilen karbonhidrat bileşikleri

Salep numunelerinin karbonhidrat bileşikleri analiz sonuçları numunelerdeki sakaroz, glukoz ve fruktoz miktarlarının geniş bir aralıkta seyrettiğini ortaya koymaktadır. Tespit edilen bu değerlerdeki standart sapma değişiminin yüksek olması salep numunelerinin sıvı ortamda jelleşmesine ve böylelikle analitik çalışmalarda kullanılan ayırma kolonundaki çözünürlük kaybına neden olmasına bağlanmıştır. Ayrıca çalışma kapsamında yer alan karbonhidrat bileşenlerinden maltoz, mannoz, galaktoz, arabinoz salep örneklerinin hiçbirinde tespit edilememiştir. Bu kapsamda karbonhidrat bileşiklerinin uygun çözünürlükte ayırmasını gerçekleştirebilmek amacıyla en uygun seyreltme oranları belirlenerek çalışmalar tamamlanmıştır.

Tablo 32. TTK maddeleri karbonhidrat bileşikleri analizlerine ait istatistiksel değerlendirme tablosu

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

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

Şekil 31'de sunulan grafiklere göre; ülkemizin farklı bölgelerinden temin edilen salep örneklerinde sakaroz ve glikoz bileşenleri açılarından istatistiksel anlamda bölgelerarası farklılıklar tespit edilememiştir (p<0.05). Bununla birlikte fruktoz değerleri açısından en yüksek fruktoz oranı Güneydoğu Anadolu bölgesinden temin edilen salep numunelerinde belirlenmiştir (Şekil 31a1). TTK maddeleri için sunulan grafikler değerlendirildiğinde ise, pek çok TTK maddesinin proje kapsamında izlenen karbonhidrat bileşiklerinden birini veya birkaçını ihtiva etmediği belirlenmiş olup, bu bileşiklerin salebin taklit ve taşışın belirlenebilmesinde kullanılabileceğini düşündürmektedir. Bunlara örnek olarak; guar gam, ksantan gam, mısır nişastası, sıvı salep aroması, katı salep aroması ve karboksimetil selüloz verilebilir. Ayrıca yine düzeyler dikkate alındığında salep numunelerinin yağsız süt tozu, öğütülmüş makarna ve şeker numunelerinden farklılıklar arz ettiği belirlenmiş olup, diğer TTK maddeleri ile ayırım konusunda kemometrik yöntemlerden faydalanılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

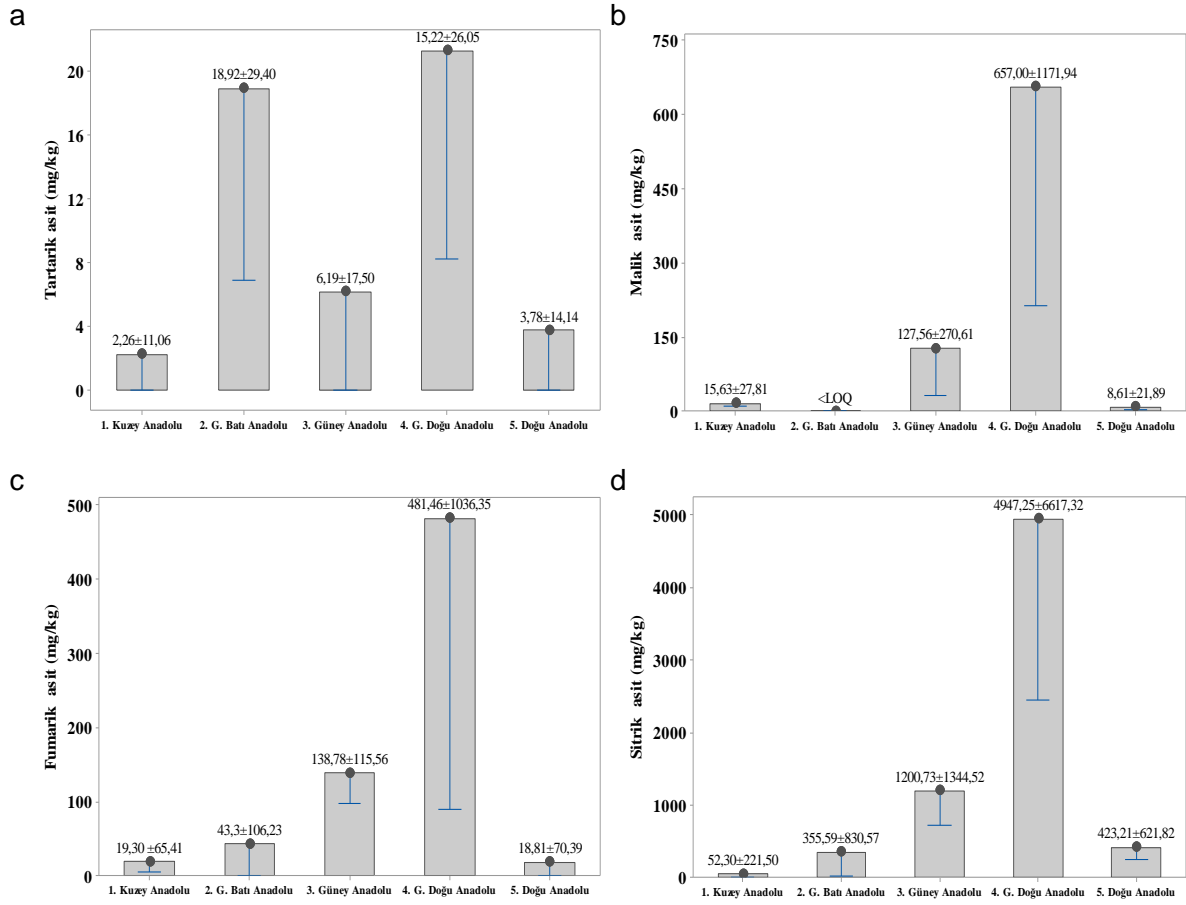
4.8. Organik asit bileşikleri

Numunelerdeki organik asit düzeylerinin doğru, kesin ve tekrarlanabilir bir şekilde belirlenebilmesi amacıyla ilgili cihazda yöntem doğrulama çalışmaları gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlara göre yöntem en uygun hale getirilmiştir. Bu kapsamda elde edilen bulgular Tablo 33'te sunulmaktadır.

Tablo 33. Organik asit bileşikleri analizlerine ait bazı yöntem doğrulama sonuçları

| Parametreler | Doğrusal | | R ² | Seyreltme katsayısı | Tespit Sınırı (µg/L) | Tayin Sınırı (µg/L) | Tekrar edilebilirlik (%RSD) | % Geri Kazanım |
|-----------------|---------------|------------------------|----------------|---------------------|----------------------|---------------------|-----------------------------|----------------|
| | Aralık (µg/L) | Ölçümlene Denklemi | | | | | | |
| Tartarik Asit | 25 - 1000 | $y = 0,0013x + 1,2955$ | 0,9981 | 5000 | 9,02 | 29,97 | 6,51 | 88,62 |
| Sitrik Asit | 25 - 1000 | $y = 0,0041x - 1,8507$ | 0,9960 | 5000 | 8,13 | 26,97 | 8,23 | 92,40 |
| Fumarik Asit | 25 - 1000 | $y = 0,0027x - 1,7388$ | 0,9979 | 5000 | 10,24 | 33,97 | 10,25 | 81,36 |
| Malik Asit | 25 - 1000 | $y = 0,0016x + 0,7925$ | 0,9986 | 5000 | 8,50 | 28,31 | 9,96 | 85,48 |
| Propiyonik Asit | 25 - 1000 | $y = 0,0034x + 0,8821$ | 0,9978 | 5000 | 10,42 | 34,63 | 9,24 | 77,92 |
| Bütirik Asit | 25 - 1000 | $y = 0,0044x + 1,6302$ | 0,9936 | 5000 | 9,84 | 32,63 | 8,75 | 82,20 |
| Laktik Asit | 25 - 1000 | $y = 0,0022x - 1,4424$ | 0,9971 | 5000 | 11,81 | 39,29 | 10,55 | 79,68 |

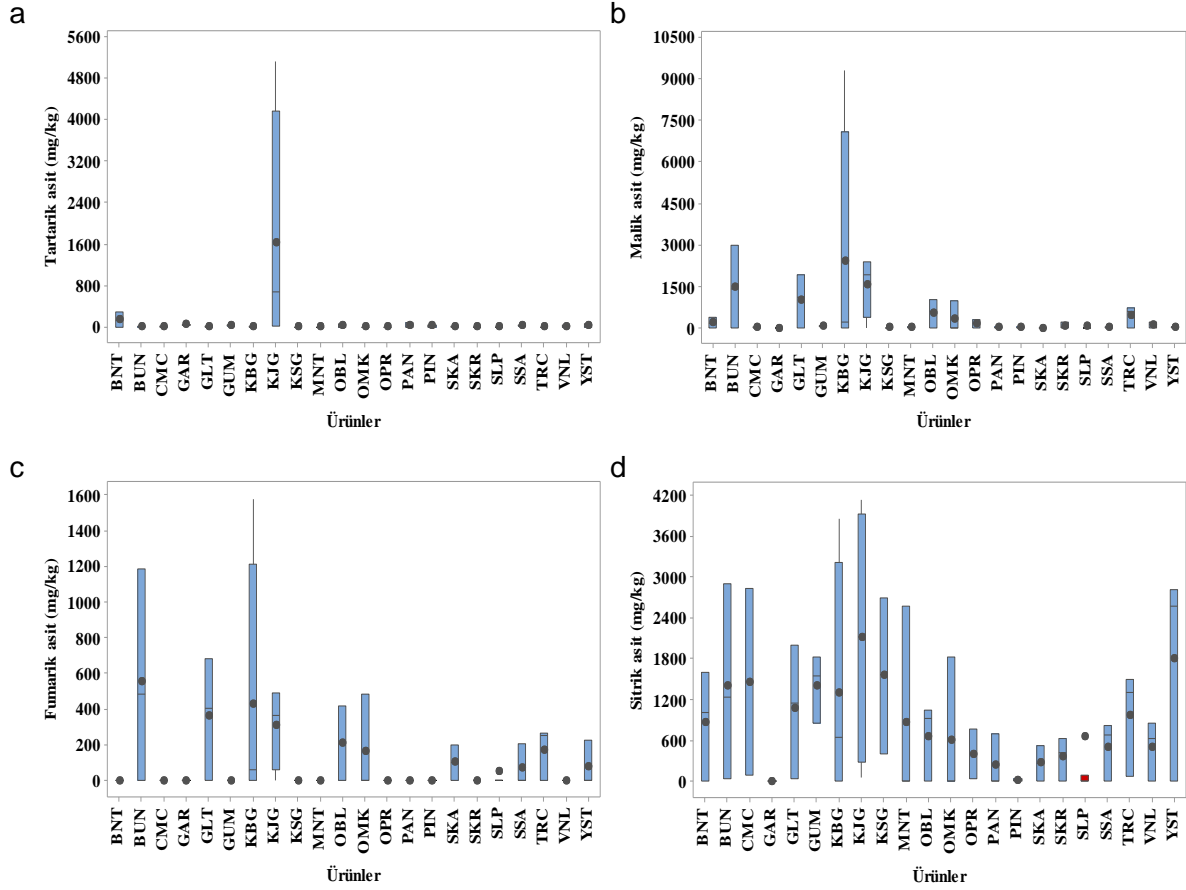
Tablo 33'te sunulan verilere göre, numunelerde organik asit düzeylerini tespit etmek amacıyla kullanılacak yöntemin numunelerde beklenen düzeyler dikkate alındığında kabul edilebilir niteliklerde olduğunu göstermektedir. Doğrulama çalışmaları ile en uygun hale getirilen yöntem kullanılarak gerçekleştirilen analizler sonucu salep numuneleri için elde edilen sonuçlar grafikler halinde Şekil 32'de istatistiksel değerlendirmeler ise Tablo 34'te sunulmaktadır.



Şekil 32. Salep numunelerinde tespit edilen organik asit bileşikleri

Şekil 32'de sunulan grafiklere göre; ülkemizin farklı bölgelerinden temin edilen salep numunelerinde farklı konsantrasyonlarda tartarik (<LOD-60,28 mg/kg), malik (<LOD-1713,46 mg/kg) fumarik (<LOD-592,53 mg/kg) ve sitrik asit (<LOD-17361,35 mg/kg) bileşikleri belirlenmiştir. Bu açıdan değerlendirildiğinde salep numunelerindeki hakim organik asidin sitrik asit olduğu söylenebilmektedir. Numunelerdeki sitrik asidin toplam organik aside oranı Kuzey Anadolu, Güneybatı Anadolu, Güney Anadolu, Güneydoğu Anadolu ve Doğu Anadolu Bölgeleri için sırasıyla %58,44; %85,09; %81,50; %81,09 ve %93,13 olarak tespit edilmiştir. Salep örnekleri toplam organik asit içeriği açısından değerlendirildiğinde ise en yüksek ortalama organik asit içeriğinin (6100,93mg/kg) Güneydoğu Anadolu Bölgesi'ndeki örneklerde olduğu belirlenmiştir. Bölgelerden toplanan salep örneklerinde yapılan organik asit çalışmaları sonucunda tartarik asit bakımından 52, fumarik asit bakımından 48, malik asit bakımından 46 ve sitrik asit bakımından 32 örnekteki düzeyler tanımlama limitinin altında (<LOQ) belirlenmiştir. Proje kapsamında incelenen organik asitlerden bütirik, propionik ve laktik asitlerden hiçbiri numunelerde tespit edilemezken, salep örneklerinin tamamında da belirlenebilen spesifik bir organik asit bulunamamıştır.

Proje kapsamında incelenen TTK maddelerinde belirlenen organik asitler Şekil 33'te sunulmaktadır.



Şekil 33. TTK maddelerinde tespit edilen organik asitler

Tablo 34. TTK maddeleri organik asit bileşikleri analizlerine ait istatistiksel değerlendirme

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

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

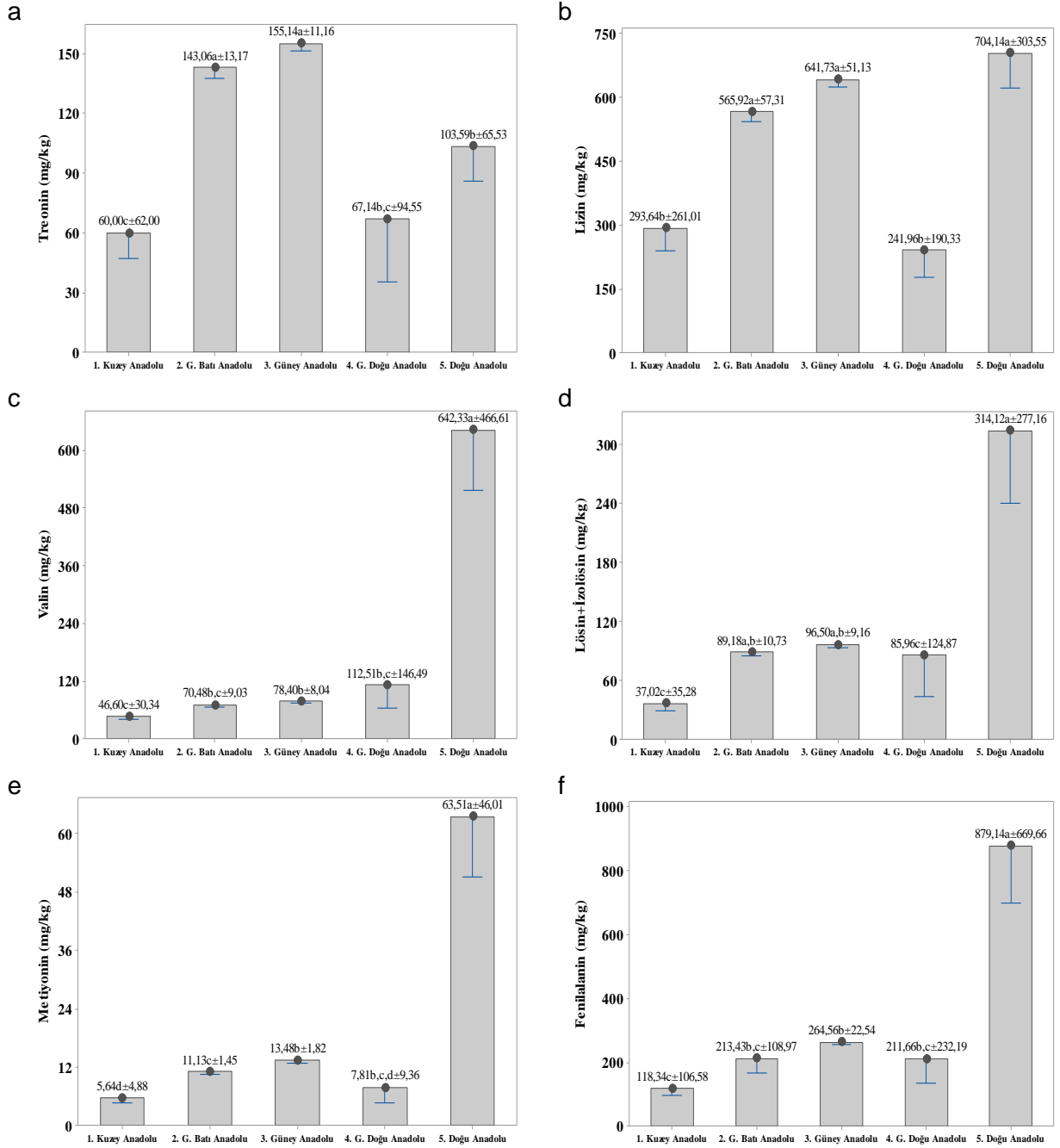
Şekil 33'te sunulan grafiklere göre, TTK maddelerinde incelenen organik asit bileşiklerinden bütirik, propiyonik ve laktik asitlerden hiçbiri tespit edilmezken, farklı konsantrasyonlarda tartarik (<LOD-5126,77 mg/kg), malik (<LOD-9314,81 mg/kg) fumarik (<LOD-1578,18 mg/kg) ve sitrik asit (<LOD-4138,59 mg/kg) bileşikleri belirlenmiştir. Numunelerdeki en yüksek ortalama tartarik, malik, fumarik ve sitrik asit bileşikleri sırasıyla konyak gam, keçiboynuzu gamı, buğday unu ve konyak gam numunelerinde belirlenmiştir. Tartarik asit bileşimi açısından konyak gamın diğer TTK maddeleri dikkate alındığında farklılıklar arz ettiği dikkati çekmektedir (Şekil 33a). Bu ürün salep taklit ve tağşişi konusunda salebe kimyasal açıdan en çok benzeyen bir ürün olup. Avrupa Salebi olarak yurtdışından ucuz bir şekilde getirilmekte ve gerçek salep yerine satılabilmektedir. TTK maddelerindeki ve salep numunelerindeki organik asit bileşikleri incelendiğinde konyak gamın yüksek düzeyde (1619,47±2412,03 mg/kg) tartarik asit içermesi ve bunun karşılığında proje kapsamında incelenen salep numunelerinde en fazla 60,28 mg/kg düzeyinde tartarik asit bulunması Avrupa salebi ile ülkemiz salepleri arasında belirleyici bir unsur olarak karşımıza çıkmaktadır.

4.9. Amino asit bileşikleri

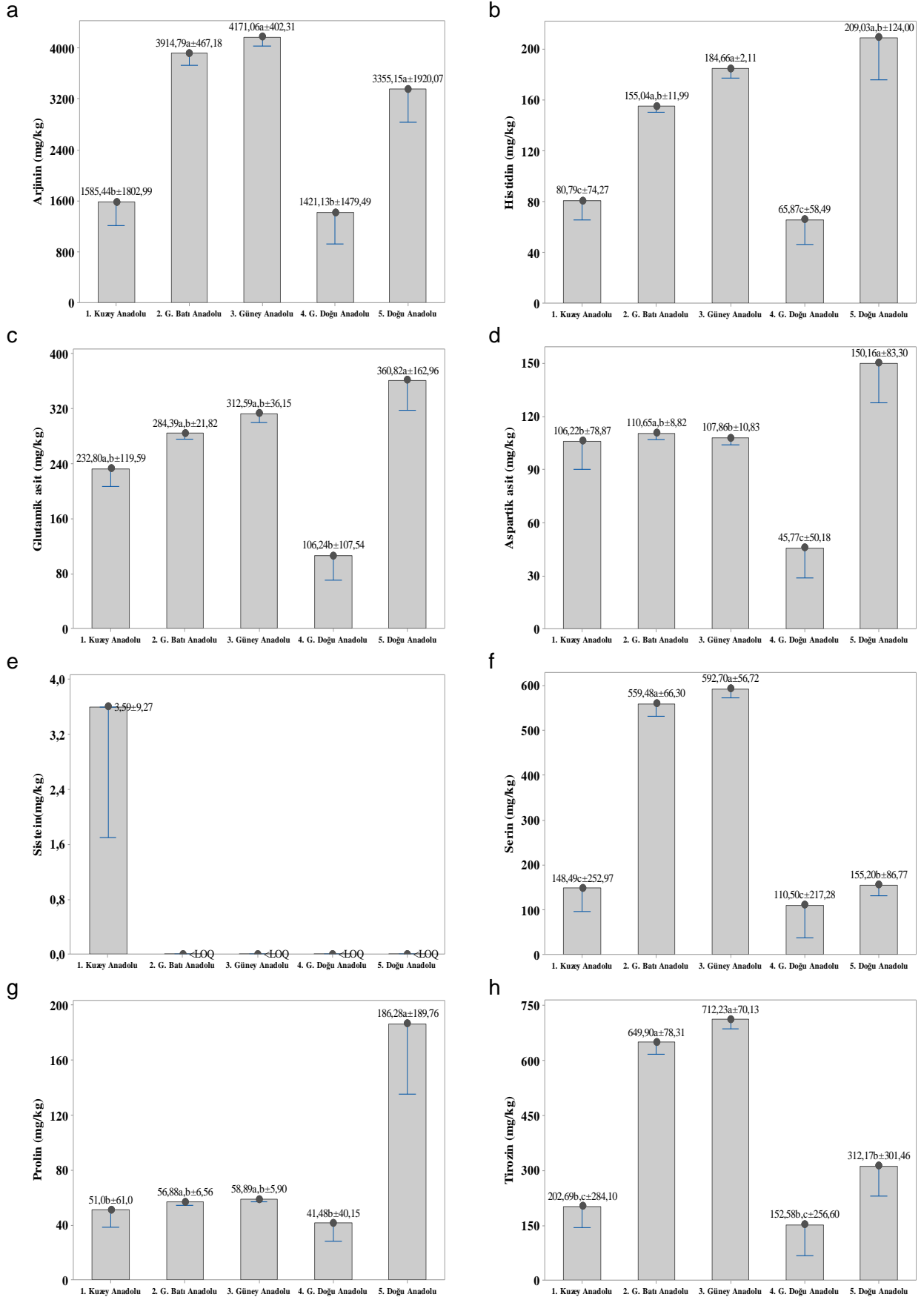
Numunelerde izlenen amino asit bileşiklerine ait yöntem doğrulama çalışmalarından elde edilen sonuçlar Tablo 35'te, bu çalışmalarla en uygun hale getirilen yöntem kullanılarak analiz edilen salep numunelerine ait esansiyel amino asit sonuçları Şekil 34'te ve esansiyel olmayan amino asit sonuçları ise Şekil 35'te sunulmaktadır.

Tablo 35. Amino asit bileşikleri analizlerine ait bazı yöntem doğrulama sonuçları

| Parametreler | Doğrusal Aralık (mg/L) | Ölçümleme Denklemi | R ² | Tespit S. (mg/L) | Tayin S. (mg/L) | Tekrar edilebilirlik | Geri Kazanım (%) |
|---------------|------------------------|--------------------------|----------------|------------------|-----------------|----------------------|------------------|
| Arjinin | 0,87 - 10,89 | $y = 145089x + 107014$ | 0,9938 | 5,02 | 16,70 | 2,39 | 95,32 |
| Aspartik asit | 0,67 - 8,32 | $y = 206889x - 8097,11$ | 0,9978 | 4,41 | 14,62 | 3,04 | 96,33 |
| Sistein | 1,20 - 15,02 | $y = 54947,9x + 5658,85$ | 0,9982 | 7,62 | 25,53 | 2,35 | 94,46 |
| Glutamik asit | 0,74 - 9,19 | $y = 303008x + 53121,6$ | 0,9976 | 5,93 | 19,76 | 2,69 | 94,78 |
| Histidin | 0,78 - 9,67 | $y = 0,06x + 2,77715$ | 0,9929 | 5,35 | 17,55 | 3,20 | 87,24 |
| İzolösin | 0,66 - 8,19 | $y = 0,06x + 4,64957$ | 0,9987 | 5,22 | 17,42 | 2,65 | 94,72 |
| Lösin | 0,66 - 8,19 | $y = 0,06x + 4,68665$ | 0,9993 | 4,41 | 14,61 | 3,36 | 94,33 |
| Lizin | 0,73 - 9,14 | $y = 902508x$ | 0,9939 | 5,12 | 17,04 | 3,27 | 93,82 |
| Metiyonin | 0,75 - 9,32 | $y = 0,06x + 1,3114$ | 0,9999 | 6,05 | 19,95 | 3,82 | 91,73 |
| Fenilalanin | 0,83 - 10,32 | $y = 0,06x + 5,63665$ | 0,9996 | 5,82 | 19,52 | 2,33 | 95,02 |
| Prolin | 0,57 - 7,20 | $y = 0,06x + 3,46862$ | 0,9946 | 5,61 | 18,65 | 3,54 | 94,05 |
| Serin | 0,52 - 6,57 | $y = 25456,2x$ | 0,9969 | 5,82 | 19,22 | 4,10 | 93,24 |
| Treonin | 0,59 - 7,445 | $y = 258625x + 50477,8$ | 0,9943 | 5,63 | 18,73 | 3,64 | 95,62 |
| Tirozin | 0,91 - 11,32 | $y = 977602x + 30008,4$ | 0,9965 | 7,45 | 24,76 | 2,93 | 95,03 |
| Valin | 0,58 - 7,31 | $y = 177346x + 74307,5$ | 0,9947 | 4,42 | 14,65 | 3,00 | 93,62 |

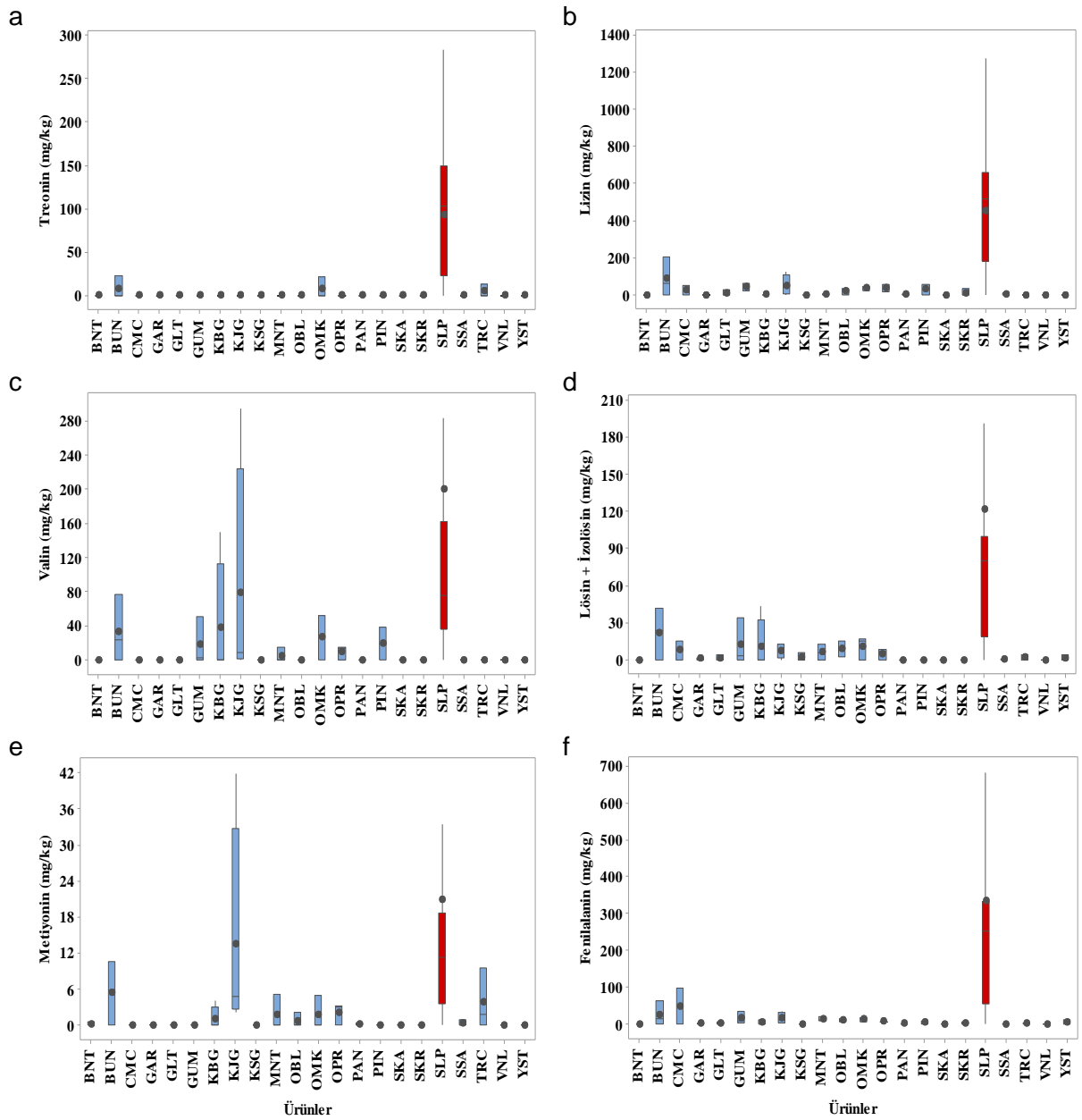


Şekil 34. Salep numunelerine ait esansiyel amino asit sonuçları

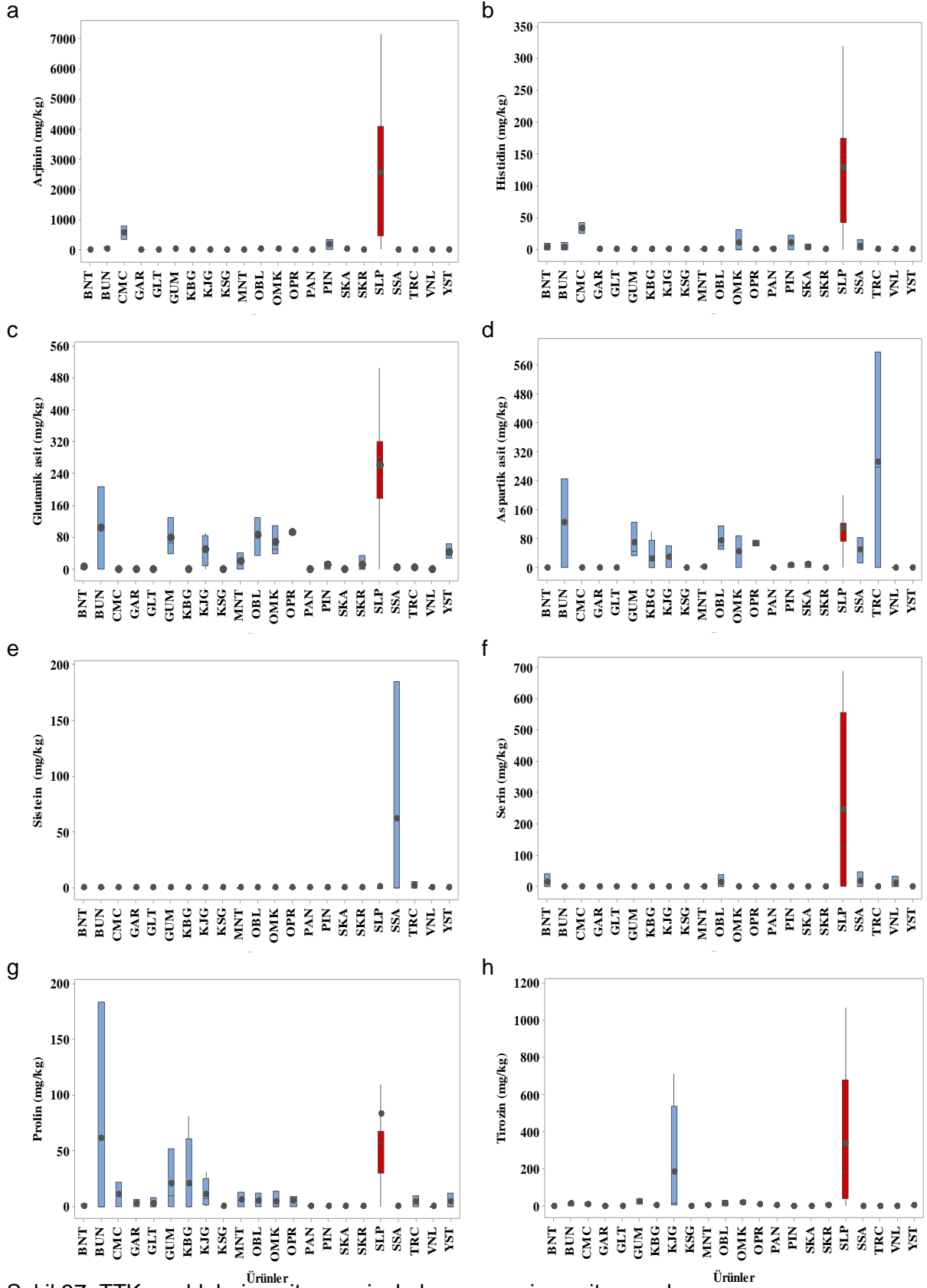


Şekil 35. Salep numunelerine ait esansiyel olmayan amino asit sonuçları

Amino asit bileşikleri analizleri sonuçlarına göre; proje kapsamında izlenen salep numunelerinde sistein aminoasidi oldukça düşük düzeylerde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 35e). İncelenen numunelerin tamamında farklı düzeylerde treonin, lizin, arjinin, histidin, aspartik asit, glutamik asit, prolin, tirozin, lösin+izolösin ve fenilalanin tespit edilmiş olup, belirlenen bu amino asitlerin salep numunelerinin TTK maddeleri ile ayırımında önemli belirleyici analitler olabileceği sonucuna varılmıştır. Ülkemizin farklı bölgelerinde toplanan salep numunelerinde istatistiksel olarak en yüksek oranda treonin, lizin, arjinin, serin ve tirozin Güney ve Güneybatı Anadolu Bölgeleri'nde (Şekil 34a, b; 35a, f ve h), histidin Güney Anadolu Bölgesi'nde (Şekil 35b), valin, lösin+izolösin, metiyonin, fenilalanin, glutamik asit, aspartik asit ve prolin Doğu Anadolu Bölgesi'nde tespit edilmiştir (Şekil 34c, d, e, f; 35c, d ve g). TTK maddelerinde belirlenen amino asitler Şekil 36 ve 37'de sunulmaktadır.



Şekil 36. TTK maddelerine ait esansiyel amino asit sonuçları



Şekil 37. TTK maddelerine ait esansiyel olmayan amino asit sonuçları

Proje kapsamında izlenen TTK maddelerine uygulanan istatistiksel değerlendirme sonuçları Tablo 36'da sunulmaktadır.

Tablo 36. TTK maddeleri amino asit bileşikleri analizlerine ait istatistiksel değerlendirme

| TTK | Treonin | Lizin | Arjinin | Histidin | AspartikA. | Sistein | Glutamika. |
|--------------|----------------------|----------------------|-----------------------|--------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| GUM | <LOQ | 42,13'±21,64 | 27,73'±2,86 | <LOQ | 68,32±50,53 | <LOQ | 78,62'±46,38 |
| GAR | <LOQ | <LOQ | <LOQ | <LOQ | <LOQ | <LOQ | <LOQ |
| KBG | <LOQ | 0,63'±1,26 | 3,47'±6,95 | <LOQ | 24,92'±49,84 | <LOQ | <LOQ |
| KJG | <LOQ | 51,39'±53,07 | 5,27'±10,62 | 1,02'±2,03 | 28,75'±33,41 | <LOQ | 48,64'±38,77 |
| KSG | <LOQ | <LOQ | <LOQ | <LOQ | <LOQ | <LOQ | <LOQ |
| BNT | <LOQ | <LOQ | <LOQ | 3,31'±5,73 | <LOQ | <LOQ | 5,84'±5,36 |
| MNT | <LOQ | 2,10'±3,64 | 0,13'±0,22 | 0,53'±0,91 | 2,12'±3,67 | <LOQ | 18,97'±20,91 |
| PAN | <LOQ | 1,88'±3,26 | 5,61'±6,77 | 1,21'±2,10 | 462,33'±800, | <LOQ | 630,33'±1091,77 |
| PIN | <LOQ | 29,08'±41,13 | 164,83'±233,10 | 11,04'±15,61 | 6,94±9,81 | <LOQ | 9,46±13,37 |
| SKR | <LOQ | 11,31'±19,59 | 2,92'±5,06 | <LOQ | <LOQ | <LOQ | 11,23'±19,45 |
| YST | <LOQ | <LOQ | 4,85'±8,39 | <LOQ | <LOQ | <LOQ | 43,32'±19,20 |
| VNL | <LOQ | 0,09'±0,15 | 4,83'±8,36 | <LOQ | <LOQ | <LOQ | <LOQ |
| TRC | 4,40'±7,62 | <LOQ | <LOQ | <LOQ | 292,05'±298, | 1,75±3,03 | 3,27'±5,66 |
| GLT | <LOQ | 9,09'±15,74 | <LOQ | <LOQ | <LOQ | <LOQ | <LOQ |
| OMK | 6,99'±12,11 | 37,60'±11,63 | 9,48'±8,22 | 10,38'±17,97 | 43,72±43,46 | <LOQ | 66,90'±37,70 |
| OPR | <LOQ | 37,68'±18,92 | 0,82'±1,41 | <LOQ | 65,84'±9,28 | <LOQ | 92,39'±6,58 |
| OBL | <LOQ | 19,88'±17,51 | 17,96'±10,45 | <LOQ | 75,44±34,58 | <LOQ | 84,52'±47,99 |
| BUN | 7,53'±13,04 | 88,90'±105,75 | 34,39'±59,57 | 3,76'±6,52 | 125,15±122,8 | <LOQ | 103,36'±103,63 |
| SSA | <LOQ | 3,44'±5,96 | 2,75'±1,41 | 5,24'±9,08 | 50,46±34,35 | 61,79±107,33 | 2,64'±4,57 |
| SKA | <LOQ | <LOQ | 6,76'±9,55 | 4,15'±5,86 | 8,12'±11,48 | <LOQ | <LOQ |
| CMC | <LOQ | 24,48'±34,62 | 567,31±315,57 | 34,09±11,66 | <LOQ | <LOQ | <LOQ |
| Salep | 91,71±70,36 | 452,66±298,44 | 2535,57±1903,9 | 128,95±97,3 | 108,04±72,39 | 1,41±6,01 | 259,05±142,54 |
| TTK | Serin | Prolin | Valin | Metiyonin | Tirozin | Lösin+İzolösin | Fenilalanin |
| GUM | <LOQ | 20,54±27,55 | 18,24'±28,90 | <LOQ | 24,32±16,01 | 12,74'±18,95 | 16,35'±16,53 |
| GAR | <LOQ | 3,05'±4,31 | <LOQ | <LOQ | <LOQ | 0,97'±1,36 | 1,12'±1,58 |
| KBG | <LOQ | 20,30±40,61 | 37,44±74,87 | 1,03'±2,05 | 3,73'±7,45 | 11,00'±21,66 | 3,81'±7,06 |
| KJG | <LOQ | 11,19'±13,44 | 78,24±144,61 | 13,47±19,04 | 186,32±351,0 | 7,29'±5,86 | 16,01'±14,15 |
| KSG | <LOQ | <LOQ | <LOQ | <LOQ | <LOQ | 2,14±3,71 | <LOQ |
| BNT | 13,62±23,59 | 0,71'±1,24 | <LOQ | 0,19'±0,33 | <LOQ | <LOQ | 0,45'±0,77 |
| MNT | <LOQ | 6,03'±6,31 | 4,95'±8,57 | 1,69'±2,93 | 5,77'±7,58 | 6,02'±6,25 | 14,25'±5,66 |
| PAN | <LOQ | 0,57'±0,98 | 1271,00'±2201, | 0,15'±0,25 | 2,20'±3,82 | <LOQ | 0,66'±1,14 |
| PIN | <LOQ | <LOQ | 19,07±26,96 | <LOQ | <LOQ | <LOQ | 4,79'±6,77 |
| SKR | <LOQ | <LOQ | <LOQ | <LOQ | 4,65'±8,06 | <LOQ | 2,15'±3,72 |
| YST | <LOQ | 4,03'±6,98 | <LOQ | <LOQ | 2,92'±5,06 | 1,32'±2,29 | 4,36'±7,56 |
| VNL | 10,68'±18,50 | <LOQ | <LOQ | <LOQ | <LOQ | <LOQ | <LOQ |
| TRC | <LOQ | 4,21'±5,14 | <LOQ | 3,81'±5,07 | 1,70'±2,94 | 2,01'±2,30 | 1,29'±1,17 |
| GLT | <LOQ | 2,58'±4,47 | <LOQ | <LOQ | <LOQ | 1,38'±2,39 | 2,15'±3,72 |
| OMK | <LOQ | 4,55'±7,88 | 27,17'±26,22 | 1,66±2,88 | 20,72'±9,45 | 10,77'±9,34 | 12,76'±4,78 |
| OPR | <LOQ | 5,60'±4,86 | 9,84±8,53 | 2,07'±1,80 | 9,06±1,41 | 5,12'±4,54 | 6,45'±0,13 |
| OBL | 13,14'±22,75 | 5,10'±6,37 | <LOQ | 0,69±1,19 | 14,52'±15,72 | 8,76'±6,44 | 10,79'±5,56 |
| BUN | <LOQ | 61,24'±106,07 | 33,61'±39,74 | 5,49'±5,31 | 13,55'±11,73 | 22,10'±21,15 | 26,30'±33,81 |
| SSA | 15,17±26,28 | <LOQ | <LOQ | 0,30'±0,53 | 0,78'±1,35 | 0,22'±0,39 | 0,25'±0,43 |
| SKA | <LOQ | <LOQ | <LOQ | <LOQ | <LOQ | <LOQ | <LOQ |
| CMC | <LOQ | 11,10±15,69 | <LOQ | <LOQ | 9,90'±14,00 | 7,86±11,12 | 48,66±68,81 |
| Salep | 243,11±259,86 | 82,26±112,94 | 199,57±332,06 | 20,81±32,24 | 331,24±318,5 | 120,77±176,38 | 335,25±449,49 |

Şekil 36 ve 37'de sunulan grafiklere göre TTK maddelerinin pek çoğunda amino asit düzeyleri LOQ düzeyinin altındaki değerlerde tespit edilmiştir. Çalışmaya konu olan TTK'lerin toplam protein içeriğinin iz düzeyde (%0 – 0,5) olması amino asitlerin pek çoğu için LOQ düzeyinin altında değer tespit edilmesini açıklamaktadır.

İlgili grafiklerde treonin amino asidi tarçın, buğday unu ve öğütülmüş makarna hariç tüm TTK maddelerinde LOQ değerinin altında belirlenmiştir (Şekil 36a). Salep numunelerinde ise treonin miktarı 1,02 ile 282,60 mg/kg aralığında değişmekte olup, ortalama $91,71 \pm 70,36$ düzeyindedir. Bu nedenle ilgili amino asidin salep ile guar gam, gum arabik, keçiyoynuzu gamı, konyak gam, ksantan gam, buğday nişastası, mısır nişastası, patates nişastası, pirinç nişastası, şeker, yağsız süt tozu, vanilya, galeta unu, öğütülmüş pirinç, öğütülmüş bulgur, salep sıvı aroma verici, salep katı aroma verici ve karboksimetil selüloz arasındaki taklit ve tağşişin belirlenmesinde önemli olduğu düşünülmektedir.

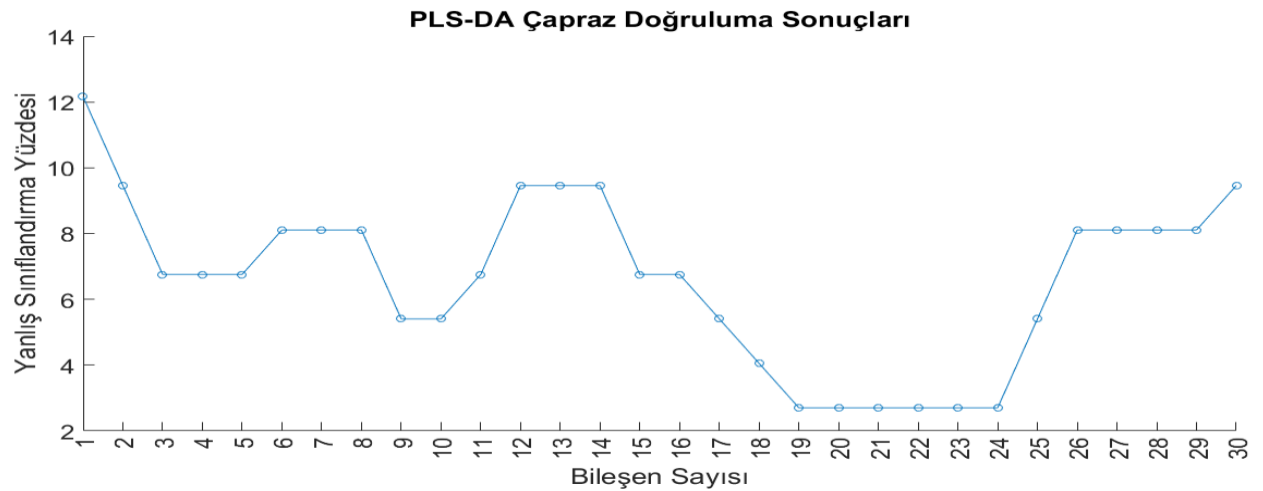
Bununla birlikte Tablo 36'da sunulan istatistiksel değerlendirme tablosuna göre; salebin lizin ve glutamik asit amino asidi açısından tüm TTK maddeleri ile, arjinin ve histidin açılarından karboksimetil selüloz harici tüm TTK maddeleri ile, serin açısından buğday nişastası ve sıvı salep aroması harici tüm TTK maddeleri ile, prolin açısından keçiyoynuzu gamı ve karboksi metil selüloz harici tüm TTK maddeleri ile, valin açısından keçiyoynuzu gamı, konyak gam, pirinç nişastası ve öğütülmüş pirinç harici tüm TTK maddeleri ile, metiyonin açısından konyak gam, öğütülmüş makarna ve öğütülmüş bulgur harici tüm TTK maddeleri ile, tirozin açısından guar gam ve konyak gam harici tüm TTK maddeleri ile, lösin+izolösin açısından ksantan gam ve karboksimetil selüloz harici tüm TTK maddeleri ile ve fenilalanin açısından ise karboksimetil selüloz harici tüm TTK maddeleri ile istatistiksel anlamda farklılıklar içerdiği sonucuna varılmıştır ($p < 0,05$).

Şekil 38'de sunulan verilere göre, sırasıyla PC1 (X eksen) toplam varyansın %19,7'sini ve PC2 (Y eksen) %9,7'sini olmak üzere bu PCA projeksiyonu toplamda varyansın %29,4'ünü açıklamaktadır. Örneklerin dağılımı incelendiğinde 2 boyutta verideki varyansın ancak %29,4'ünün açıklanabilmesine karşın taklit malzemeleri ile saf salep örnekleri arasında bir ayrışmanın olduğu özellikle PC1 ekseninde çoğu örnek için gözlemlenebilmektedir. Ayrıca şehirlerarasında da görülen kümelenme, bilinmeyen örneklerin analizleri bu düzleme yansıtıldığında -eğer saf salep ise- hangi şehirden olduğu hakkında bilgi sağlayabileceği öngörülmektedir.

Taklit malzemeleri kendi içlerinde bir kümelenme göstermese de çoğu saf salep örneğinin, özellikle Van, Muş, Kastamonu ve Tokat'tan alınan salep örneklerinin kendi içlerinde kümelendiği görülmüştür.

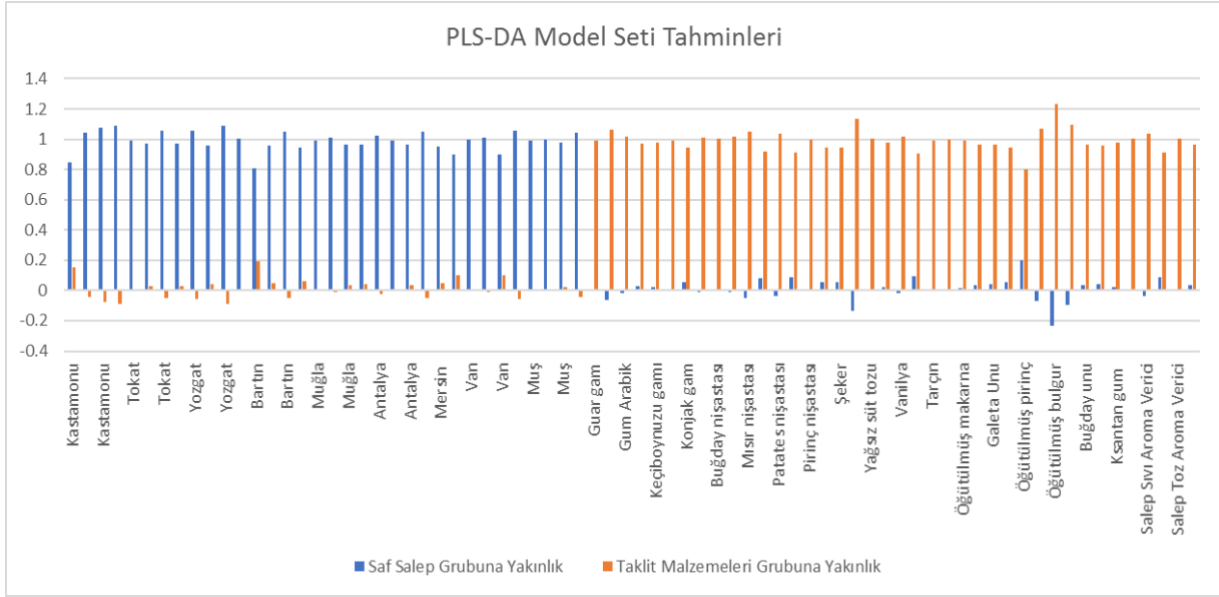
4.10.2. Yönlendirmeli Sınıflandırma Çalışmaları

Örneklerin kimyasal analizleri kullanılarak taklit malzemeleri ile tağşiş malzemelerinin ayırt edilmesini sağlayacak yönlendirmeli sınıflandırma çalışmalarında Kısmi En Küçük Kareler Ayırıcı Analizi (PLS-DA) kullanılmıştır. Bu yöntem hem gruplarıyla örnekler arasındaki ilişkiyi maksimize etmeye çalışan hem de PCA'deki gibi görselleştirme sınırlarından (en fazla 3 boyut görselleştirilebilir) bağımsız fakat prensip olarak benzer bir sınıflandırma yöntemidir. Çalışmalar kapsamında 113 örnek öncelikle 74'ü model seti kalan 39'u ise doğrulama seti olacak şekilde gelişine dağıtılmıştır. Tüm PLS tabanlı algoritmalarda olduğu gibi PLS-DA'de de bileşen sayısının seçilmesi modelleme için gerekmektedir ve bu amaçla en tutarlı bileşen sayısı seçme yöntemlerinden biri olan tek örneği dışarıda bırakan çapraz doğrulama model setine uygulanmış, sonuçlar Şekil 39'da sunulmuştur.

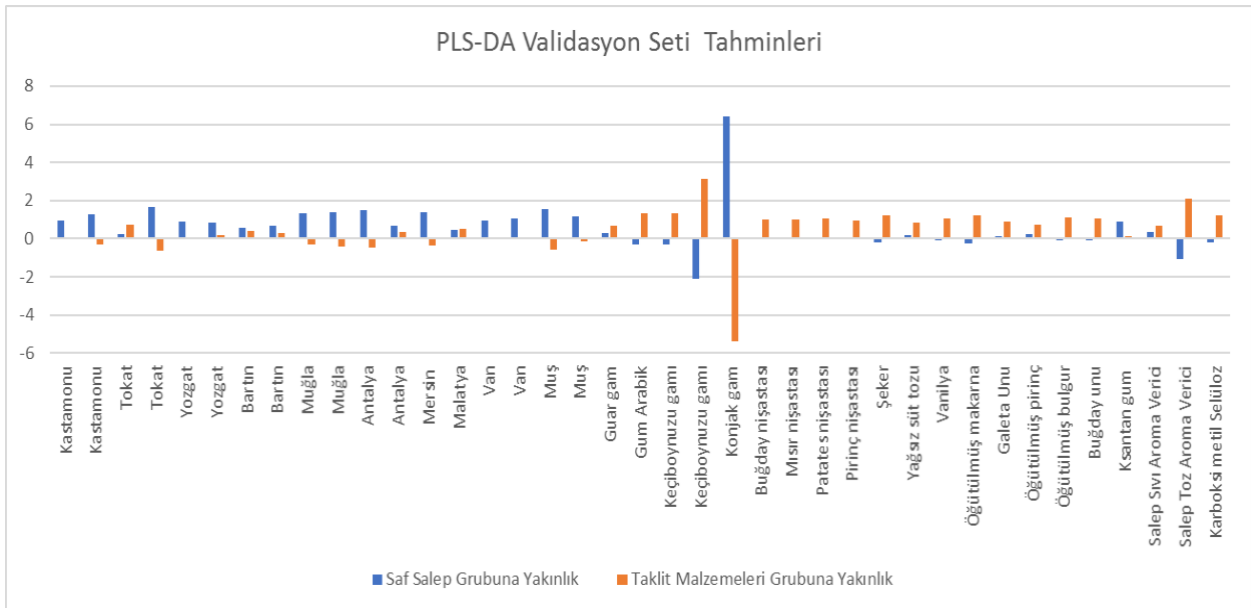


Şekil 39. Çapraz doğrulama ile elde edilen yanlış sınıflandırma yüzdesine karşılık bileşen sayısı sonuçları

Bileşen sayısı Şekil 39'a bakarak en düşük sınıflandırma hatasına tekabül eden en küçük bileşen sayısı olan 19 olarak seçilmiştir. Ardından 19 bileşen ile kurulan nihai PLS-DA modeli ile model setinin kendisi ve doğrulama seti tahmin ettirilmiş, sonuçlar model seti için Şekil 40'ta doğrulama seti için Şekil 41'de sunulmuştur.

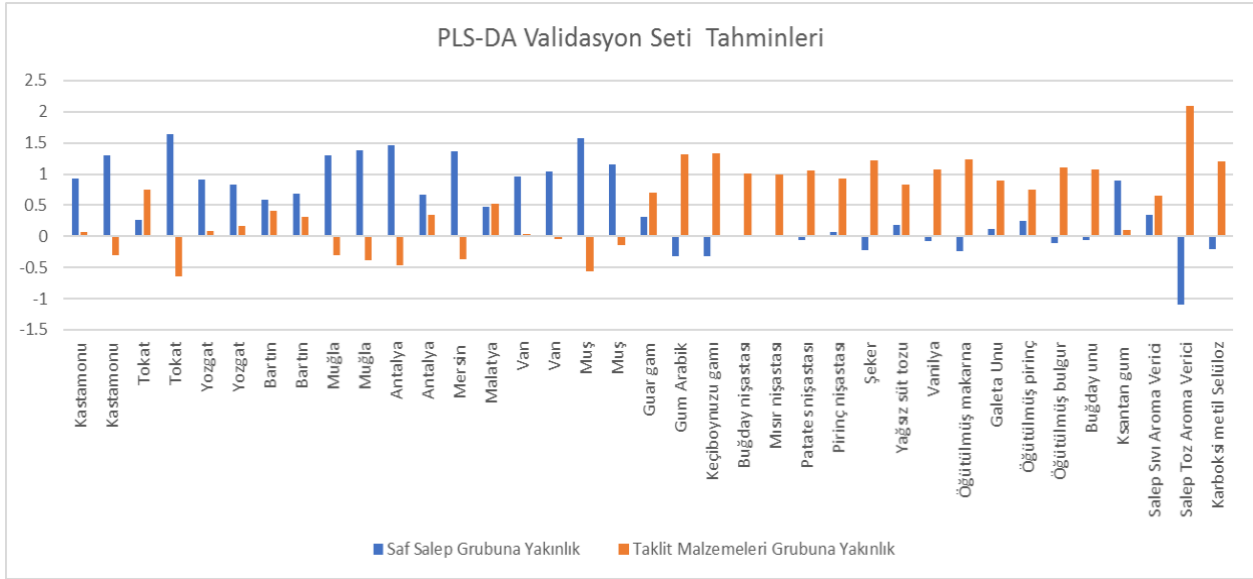


Şekil 40. Kurulan nihai PLS-DA modeli ile model setinin tahmin sonuçları



Şekil 41. Kurulan nihai PLS-DA modeli ile doğrulama setinin tahmin sonuçları

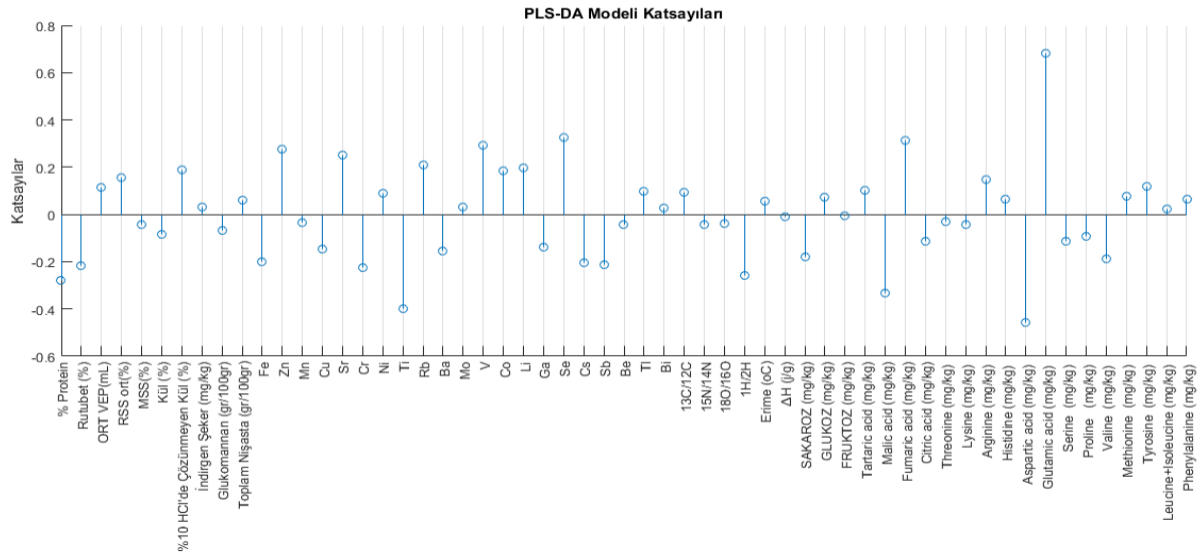
PLS-DA sonuçları her bir örnek için incelendiğinde model seti için %100 tahmin başarısı elde edildiği görülebilir. Ancak doğrulama tahminlerinde normalde 0 ila 1 arasında olması beklenen gruba yakınlık değerlerinin çok daha küçük ya da çok daha büyük değerler almasına bakılarak konyak gam ve keçiyoynuzu gamının outlier olduğu ya da iyi modellenemediği söylenebilmektedir. Modellemede sorun oluşturma ihtimali bulunan maddeler uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen grafik Şekil 42’de sunulmaktadır.



Şekil 42. Hatalı örnekler ayıklandıktan sonra elde edilen PLS-DA modeli ile doğrulama tahminleri grafiği

Şekil 42 incelendiğinde sadece Malatya’dan alınan salep örneğinin ve ksantan gamın yanlış sınıflandırıldığı görülebilir. Çıkarılan örnekler de dahil olmak üzere doğrulama tahminleri %89,7 doğruluk oranıyla gerçekleştirilmiştir.

Kimyasal analizlerin PLS-DA sınıflandırmasındaki etkileri karşılaştırılmak istendiğinde analizlere tekabül eden katsayıların incelenmesi gerekmektedir. Ölçümleme işlemi olduğu gibi sayının işaretinden ziyade 0’a mutlak uzaklık dikkate alınmalıdır. Ayrıca PLS-DA modellemesinde kullanılan girdi matrisinin (kimyasal analiz sonuçları) ve çıktı matrisinin (örneklerin hangi gruba ait olduğu bilgisinin ikili sistemde gösterildiği matris) normalize edildikten sonra modellenmesi katsayıları doğrudan birbirleriyle büyüklük olarak karşılaştırılabilir hale getirmiştir. Şekil 43’te bu katsayılar ve analiz isimleri gösterilmektedir.



Şekil 43. PLS-DA modelinden elde edilen, analiz adlarına karşı sınıflandırmada kullanılan katsayılar grafiği

Katsayılar incelendiğinde neredeyse tüm kimyasal analizlerin PLS-DA modelinde etkili olduğu, buna karşın elementel analiz ve özellikle aspartik asit ve glutamik asidin göreceli olarak daha yüksek etkisi olduğu gözlemlenmiştir.

Uygulanan yönlendirmeli sınıflandırma modeli incelendiğinde neredeyse tüm analiz sonuçlarından faydalanılabildiği görülse de daha az sayıda analiz ile aynı veya benzer sınıflandırma performansının yakalanması zaman, işgücü ve ekonomiklik avantajları açısından önem arz etmektedir. Bu amaçla yeteri kadar değişken içeren ve sınıflandırmaya katkısı önceki çalışmada da gözlemlenmiş olan elementel analiz, aminoasit analizleri ve temel analizler ile enzimatik analiz gruplarının her biri ile ayrı PLS-DA modelleri öncelikle optimal bileşen sayıları çapraz doğrulama ile seçilerek oluşturulmuştur. Oluşturulan bu modellerin başarıları Tablo 37 üzerinden sunulmuştur.

Tablo 37. Analiz grupları ile PLS-DA kullanılarak yapılan modelleme çalışmalarının başarı oranları

| Analiz grubu | Model seti doğru tahmin | Doğrulama setinin doğru |
|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Elementel analizler | 97,3 | 89,7 |
| Amino asit analizleri | 94,6 | 92,3 |
| Temel analizler | 66,2 | 69,2 |
| Enzimatik analizler | 79,7 | 84,6 |
| İzotop analizleri | 79,7 | 79,5 |
| Karbonhidrat bileşikleri | 77,0 | 72,4 |
| Organik asit analizleri | 73,0 | 69,2 |

Tablo 37 incelendiğinde en yüksek doğrulama seti tahmin başarısının %92,3 ile aminoasit analizlerinin sağladığı ve bu başarının tüm analizlerin kullanıldığı çalışmadan daha yüksek olduğunu söylemek mümkündür. Ancak model setindeki başarıya bakıldığında gözlenen düşüş, tüm analiz kullanılarak oluşturulan modelin kısmen overfit olduğu ve örneğin sadece aminoasit analizleri kullanılarak oluşturulan modelde böyle bir durumla karşılaşmadığını göstermektedir. Elementel analizler ile de tüm analizler kullanılarak oluşturulan modeldeki başarıya ulaşılabildiği görülmüştür. Oluşturulan modellerde her bir analizinin sınıflandırmaya katkısını incelemek amacıyla standardize edilmiş veriye uygulanacak ve kendi içinde karşılaştırılabilir PLS-DA regresyon katsayıları Tablo 38’de sunulmuştur.

Tablo 38. Her bir analiz grubuna ait kimyasal analiz sonuçlarının sınıflandırmaya katkılarını gösterir katsayılar

| Elementel bileşimler | | Amino asit bileşikleri | | Temel analizler | | İzotop oranları | | Organik asit bileşikleri | | Karbonhidrat bileşikleri | | Enzimatik bileşikler | |
|----------------------|-------|------------------------|-------|-----------------|-------|----------------------------------|-------|--------------------------|-------|--------------------------|-------|----------------------|-------|
| Prm. | Katkı | Prm. | Katkı | Prm. | Katkı | Prm. | Katkı | Prm. | Katkı | Prm. | Katkı | Parametre | Katkı |
| Zn | 0,36 | Glutamik A. | 0,90 | Rutubet | -0,24 | ¹ H/ ² H | -0,27 | Malik A. | -0,71 | Sakaroz | 0,21 | Glikomannan | 0,543 |
| Cu | -0,29 | Histidin | 0,19 | Kül | -0,43 | ¹³ C/ ¹² C | -0,25 | Fumarik A. | 0,61 | Glikoz | 0,02 | Nişasta | 0,213 |
| Sb | -0,28 | Serin | -0,18 | %10 HCl | 0,31 | ¹⁸ O/ ¹⁶ O | 0,15 | Sitrik A. | -0,31 | Fruktoz | -0,20 | | |
| V | 0,27 | Lisin | 0,17 | Protein | 0,04 | ¹⁵ N/ ¹⁴ N | -0,15 | Tartarik A. | -0,07 | | | | |
| Mo | -0,26 | Aspartik A. | -0,16 | İnd. Şeker | 0,09 | | | | | | | | |
| Li | 0,24 | Valin | -0,14 | | | | | | | | | | |
| Se | -0,19 | Proline | -0,12 | | | | | | | | | | |
| Fe | 0,13 | Fenilalanin | 0,10 | | | | | | | | | | |
| Cr | 0,13 | Tirosin | -0,09 | | | | | | | | | | |
| Co | 0,10 | Lösin+İzol. | -0,07 | | | | | | | | | | |
| Be | -0,10 | Arjinin | 0,02 | | | | | | | | | | |
| Tl | 0,09 | Treonin | 0,02 | | | | | | | | | | |
| Ti | -0,07 | Metiyonin | 0,00 | | | | | | | | | | |
| Ga | -0,06 | | | | | | | | | | | | |
| Ni | -0,05 | | | | | | | | | | | | |
| Ba | -0,04 | | | | | | | | | | | | |
| Mn | 0,03 | | | | | | | | | | | | |
| Rb | -0,02 | | | | | | | | | | | | |
| Cs | -0,02 | | | | | | | | | | | | |
| Sr | 0,02 | | | | | | | | | | | | |
| Bi | 0,01 | | | | | | | | | | | | |

Analizlerin katkıları incelendiğinde özellikle aminoasit analizlerindeki glutamik asit miktarının diğer analizlere göre oldukça dominant şekilde sınıflandırmada etkisi olduğu görülebilir. Ayrıca elementel analizler ile kurulan PLS-DA modeli ile ilişkili kısımda Zn, Cu, Sb, V, Mo ve Li elementlerinin, organik asit bileşenlerinden malik ve fumarik asidin ve enzimatik bileşenlerden ise glikomannanın öne çıktığı söylenebilir.

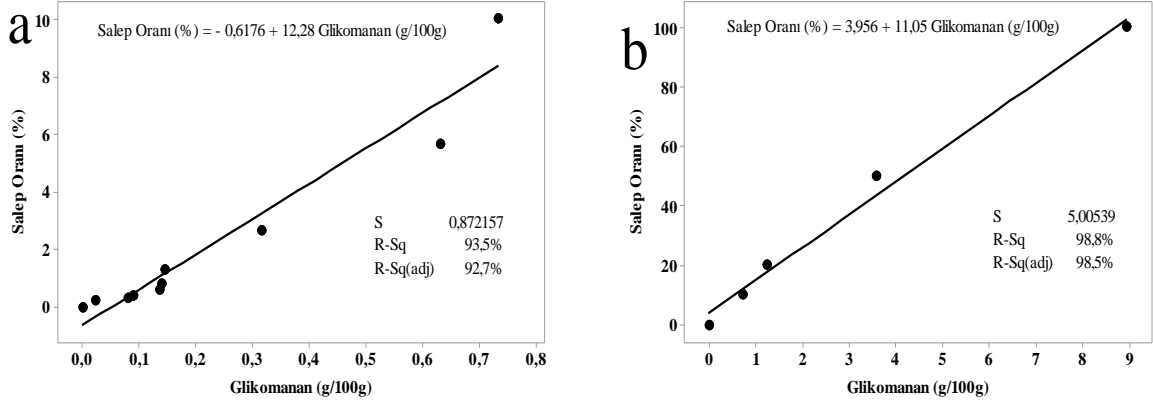
Projenin asıl amaçlarından olan taklit malzemeleri ve saf salep örneklerinin sınıflandırılması PLS-DA ile model seti için %100 ve model başarısını yansıtan doğrulama seti için %89 doğruluk oranıyla gerçekleştirilmiştir. Analizler gruplarının kullanılmasıyla yapılan çalışmada ise, tek başına aminoasit analizleri üzerinden oluşturulan PLS-DA modeli %92 doğru tahmin oranını yakalamış, sadece elementel analiz ile yapılan sınıflandırma çalışmaları ise %89 oranında başarıya ulaşarak bu iki analiz grubundan herhangi birinin tek başına yeterli olabileceğinin ipuçlarını vermiştir.

4.11. Homojen toz karışımlardaki salep miktarlarının belirlenebilmesine yönelik çalışmalar

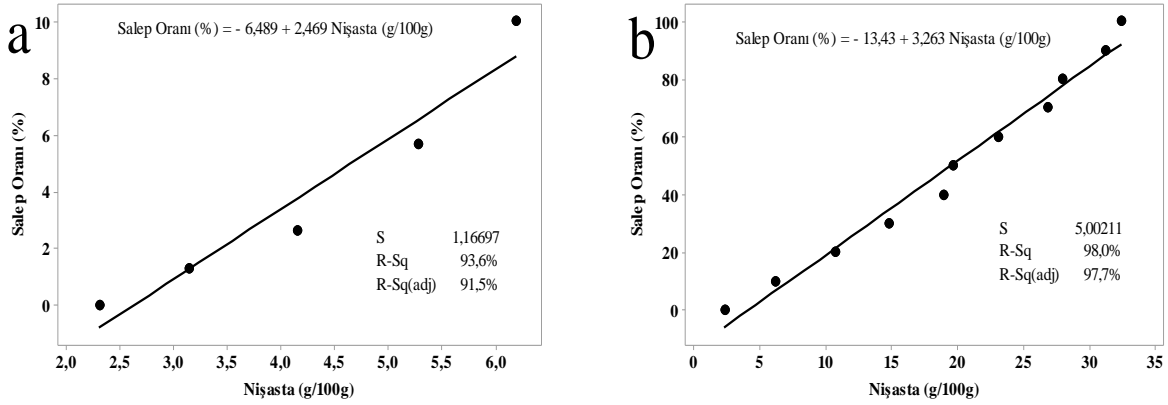
Tablo 38’de sunulan salep numuneleri ile TTK maddeleri arasında taklit ve tağşişin belirlenmesi amacıyla öne çıkan analiz grupları ve parametreler çerçevesinde kullanılacak analitik yöntemler, farklı oranlarda gerçek salep içeren karışım tozların analiz edilmesi ile doğrulanmıştır. Bu kapsamda projemizde danışman olarak görev alan Prof. Dr. Ekrem Sezik hocamızın önerisi üzerine ticari salep içecek tozu reçetesi elde edilmiş ve bu reçete laboratuvar ortamında oluşturularak içerisine farklı oranlarda gerçek salep ilave edilmiştir. Hazırlanan reçetelerin bileşimleri Tablo 5 ve Tablo 6’da sunulmaktadır. Elde edilen karışımlar doğrulanmış yöntemlerle analiz edilerek ilave edilen salep miktarı ile analitik parametreler arasındaki korelasyon ve doğrusallık istatistiksel yöntemlerle incelenmiş ve elde edilen bulgular reçetelerde belirtilen gerçek salep miktarları açısından değerlendirilmiştir. Bu kapsamda, ticari salep içecek tozlarındaki gerçek salep miktarları ile karışımların enzimatik analiz bileşikleri arasındaki korelasyon Tablo 39’da ve doğrusallıkları gösteren grafikler Şekil 44 ve 45’te sunulmaktadır.

Tablo 39. Ticari salep içecek tozu reçetelerine ilave edilen salep miktarları ile enzimatik bileşimler arasındaki korelasyon

| Enzimatik Bileşimler | Salep Oranı : %0 - %10 | | Salep Oranı : %0 - %100 | |
|----------------------|------------------------|----------|-------------------------|----------|
| | Korelasyon | p-değeri | Korelasyon | p-değeri |
| Glikomannan | 0,967 | 0,000 | 0,994 | 0,001 |
| Toplam Nişasta | 0,968 | 0,000 | 0,990 | 0,000 |



Şekil 44. Ticari salep içecek tozu reçetelerine ilave edilen salep miktarları ile karışımdaki glikomannan düzeyleri arasındaki doğrusallık (a:%0-10, b:%0-100 aralığı)



Şekil 45. Ticari salep içecek tozu reçetelerine ilave edilen salep miktarları ile karışımdaki nişasta düzeyleri arasındaki doğrusallık (a:%0-10, b:%0-100 aralığı)

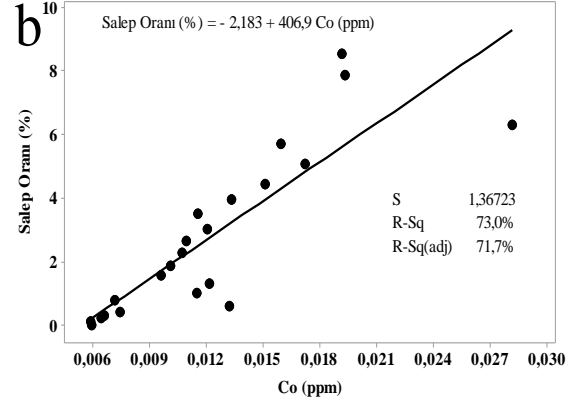
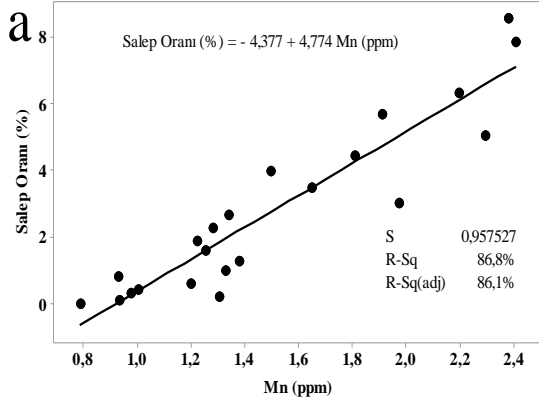
Belirli düzeyde gerçek salep içeren ticari salep içecek tozu karışımlarındaki salep oranları ile karışımların glikomannan düzeyleri arasında önemli düzeyde bir korelasyonun olduğu tespit edilmiştir. Uygulanan regresyon analizi sonucuna göre ise salep oranı ve glikomannan düzeyleri arasındaki doğrusallığın >%93 seviyelerinde olduğu belirlenmiş olup, bu değerlerin saleplerin taklit ve taşışında önemli bir belirteç olduğu ve bu nedenle ticari salep içecek tozlarındaki gerçek salep miktarının belirlenmesinde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Ayrıca karışımlardaki salep miktarı ile nişasta düzeyleri arasında da bir korelasyondan söz etmek mümkündür. Ancak, hazırlanan kontrol (gerçek salep içermeyen) numunesinde %2 seviyelerinde belirlenmiş, reçetelerde artan salep oranları ile birlikte tespit edilen nişasta düzeylerinde de bir artış gözlemlenmiştir. Bu noktadan hareketle karışımlardaki nişasta düzeyleri kullanılarak ürünlerdeki gerçek salep miktarının belirlenmesi çalışmalarında kritik eşik düzeyinin yaklaşık %2 olduğu söylenebilmektedir.

Tablo 40'da hazırlanan reçetelerin elementel analizleri sonucu elde edilen bulguların reçete bileşimindeki gerçek salep oranı ile olan korelasyonu gösterilmektedir.

Tablo 40. Ticari salep içecek tozu reçetelerine ilave edilen salep miktarları ile elementler arasındaki korelasyon

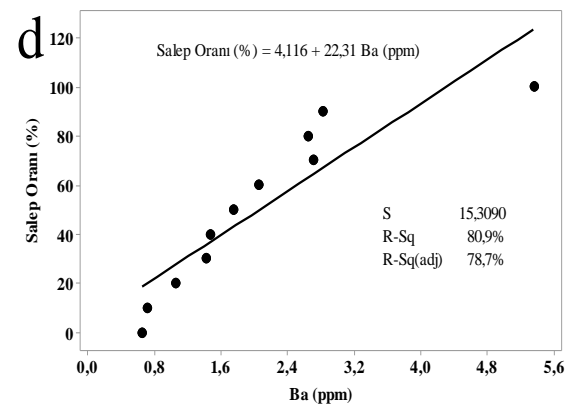
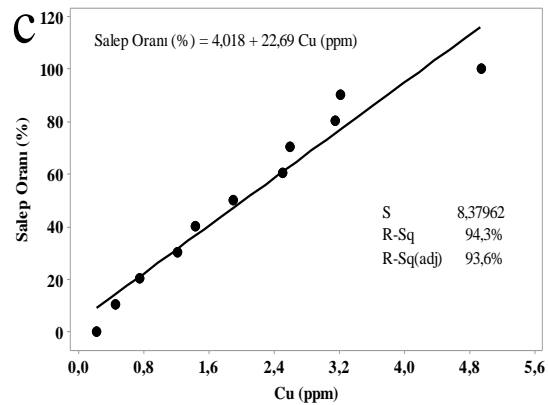
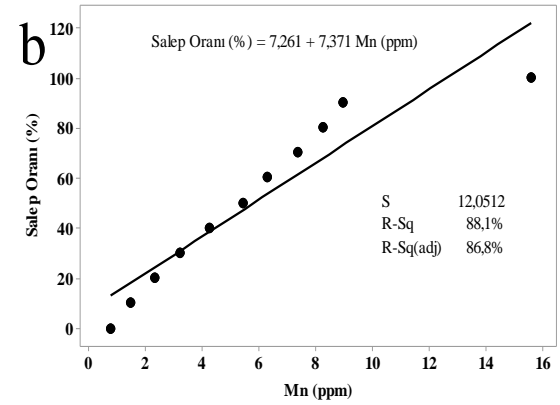
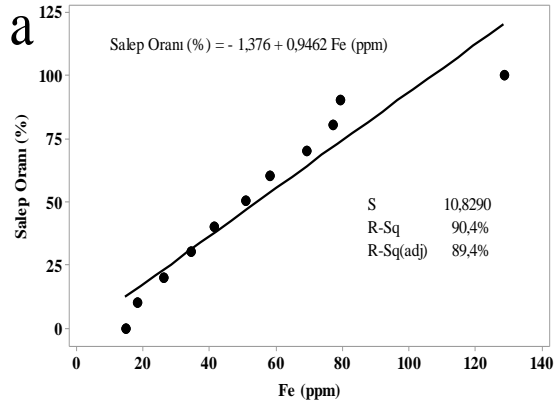
| Elementler | Salep Oranı : %0 - %10 | | Salep Oranı : %0 - %100 | |
|------------|------------------------|--------------|-------------------------|--------------|
| | Korelasyon | p-değeri | Korelasyon | p-değeri |
| Fe | 0,661 | 0,000 | 0,951 | 0,000 |
| Zn | 0,494 | 0,014 | 0,513 | 0,106 |
| Mn | 0,932 | 0,000 | 0,939 | 0,000 |
| Cu | 0,682 | 0,000 | 0,971 | 0,000 |
| Cr | 0,461 | 0,023 | 0,842 | 0,001 |
| Ni | 0,614 | 0,001 | 0,745 | 0,008 |
| Se | -0,470 | 0,020 | -0,684 | 0,020 |
| Tl | 0,552 | 0,005 | 0,548 | 0,081 |
| Rb | -0,098 | 0,650 | 0,211 | 0,534 |
| Ba | 0,631 | 0,001 | 0,899 | 0,000 |
| V | 0,586 | 0,003 | 0,545 | 0,083 |
| Co | 0,855 | 0,000 | 0,951 | 0,000 |
| Li | 0,312 | 0,137 | 0,606 | 0,048 |
| Ga | 0,680 | 0,000 | 0,907 | 0,000 |
| Cs | 0,514 | 0,010 | 0,675 | 0,023 |
| As | -0,400 | 0,053 | 0,088 | 0,797 |
| Al | 0,239 | 0,260 | 0,414 | 0,206 |
| Sr | 0,557 | 0,005 | 0,801 | 0,003 |
| Sb | 0,101 | 0,638 | 0,439 | 0,177 |
| Be | 0,350 | 0,093 | 0,454 | 0,160 |
| Bi | 0,218 | 0,307 | 0,639 | 0,034 |

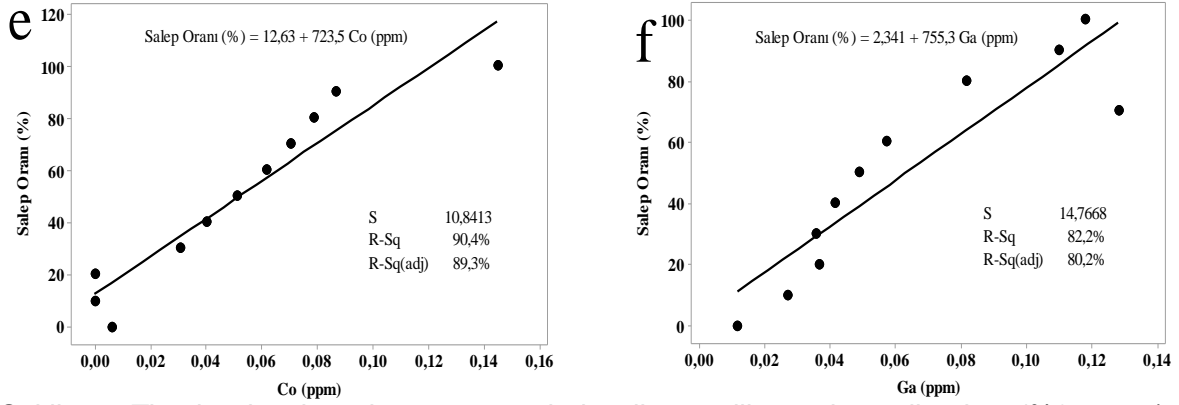
Farklı düzeylerde gerçek salep içeren ticari salep içecek tozu preparatlarındaki salep oranları ile elementel bileşim arasındaki korelasyon incelendiğinde %0 ile %10 arasındaki oranlarda gerçek salep içeren reçetelerle hazırlanan ölçümlene denkliliğine göre; mangan ve kobalt element miktarları ile karışımlara ilave edilen salep yüzdesi arasında doğrusal bir ilişkinin olduğu tespit edilirken, %0 ile %100 arasında farklı oranlarda salep içeren reçetelerle oluşturulan ölçümlene denkliliğine göre ise karışımdaki salep oranları ile demir, mangan, bakır, baryum, kobalt ve galyum elementleri ile arasında bir korelasyon (>0,85) tespit edilmiştir. Şekil 46'da karışımdaki gerçek salep miktarı ile karışımın mangan ve kobalt düzeyleri arasındaki değişimleri sunulmaktadır.



Şekil 46. Ticari salep içecek tozu reçetelerine ilave edilen salep miktarları ile karışımdaki Mn ve Co düzeyleri arasındaki doğrusallık

Elde edilen grafiklere göre, mangan ve kobalt elementlerinin düşük oranda salep içeren karışımlardaki salep oranlarını belirlemede önemli parametreler oldukları sonucuna varılmıştır. Karışıma ilave edilen salep oranlarının %0-%100 aralığında olması durumunda yüksek düzeyde korelasyon tespit edilen elementlere ait regresyon analizi grafikleri Şekil 47'de sunulmaktadır.





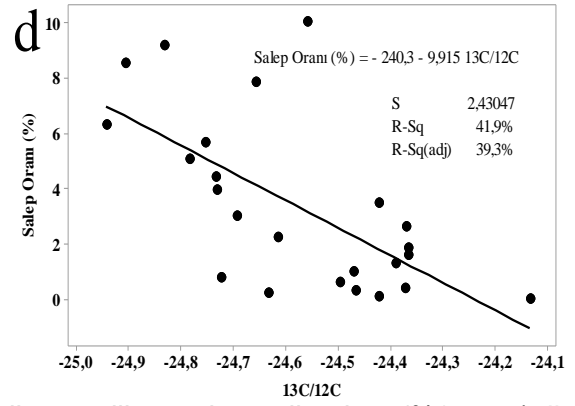
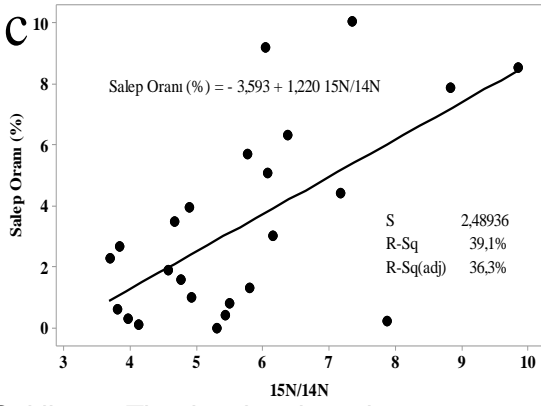
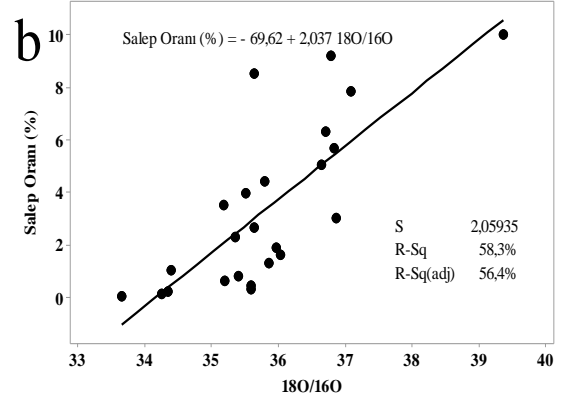
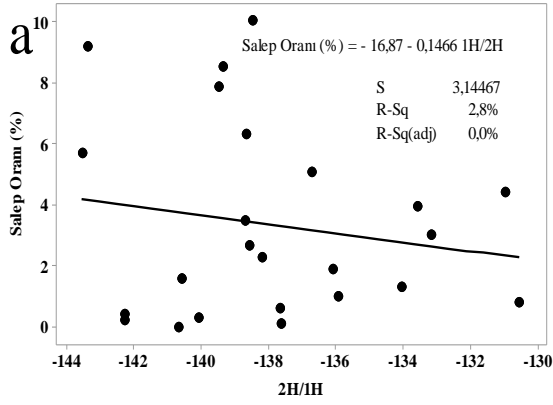
Şekil 47. Ticari salep içecek tozu reçetelerine ilave edilen salep miktarları (%0-%100) ile karışımdaki Fe, Mn, Cu, Ba, Co ve Ga oranları arasındaki doğrusallık

Şekil 47’de sunulan grafiklere göre; karışımdaki salep miktarının artmasıyla birlikte demir, mangan, bakır, baryum, kobalt ve galyum elementlerine ait konsantrasyon değerlerinde de artışlar belirlenmiş ve karışımdaki salep oranı ile element konsantrasyonları arasında ciddi düzeylerde doğrusallıklar (>0.80) belirlenmiştir.

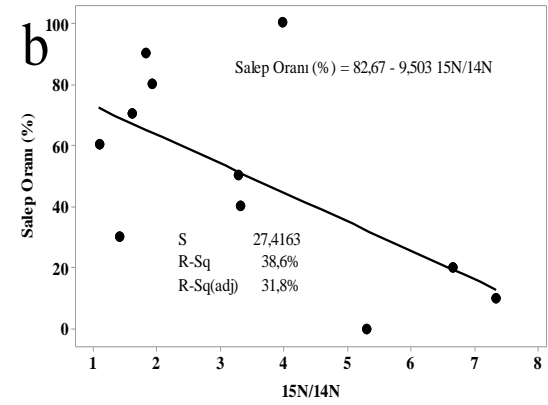
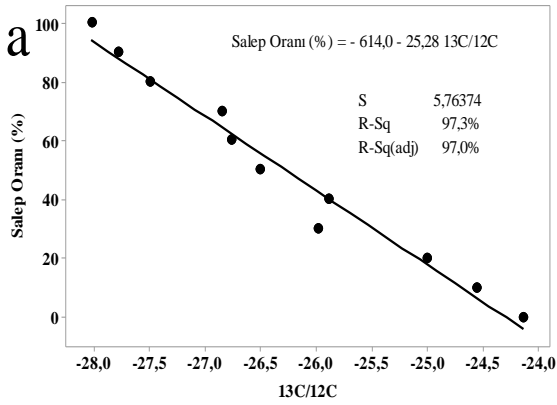
Ticari salep içecek tozlarındaki gerçek salep miktarları ile karışımların izotop oranları arasındaki korelasyon Tablo 41’de ve elde edilen doğrusallıklara ait grafikler Şekil 47 ve 48’de sunulmaktadır.

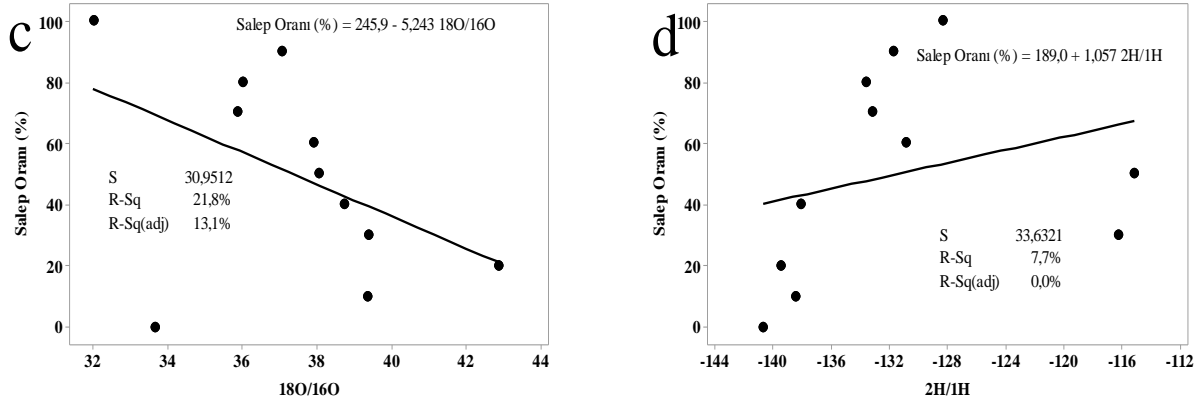
Tablo 41. Ticari salep içecek tozu reçetelerine ilave edilen salep miktarları ile izotop oranları arasındaki korelasyon

| İzotop oranları | Salep Oranı : %0 - %10 | | Salep Oranı : %0 - %100 | |
|-------------------------------|------------------------|----------|-------------------------|--------------|
| | Korelasyon | p-değeri | Korelasyon | p-değeri |
| $^1\text{H}/^2\text{H}$ | -0,168 | 0,434 | 0,277 | 0,410 |
| $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ | 0,764 | 0,000 | -0,467 | 0,148 |
| $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ | 0,625 | 0,001 | -0,622 | 0,041 |
| $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ | -0,648 | 0,001 | -0,986 | 0,000 |



Şekil 48. Ticari salep içecek tozu reçetelerine ilave edilen salep miktarları (%0-%10) ile karışımdaki $^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ve $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ oranları arasındaki doğrusallık





Şekil 49. Ticari salep içecek tozu reçetelerine ilave edilen salep miktarları (%0-%100) ile karışımdaki $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ve $^1\text{H}/^2\text{H}$ oranları arasındaki doğrusallık

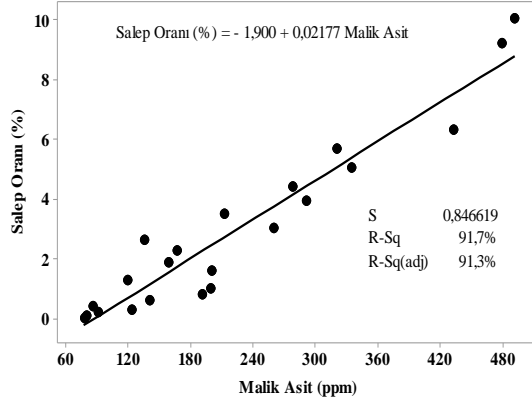
Şekil 49'da sunulan bulgular değerlendirildiğinde, ticari salep içecek tozu reçetesine ilave edilen gerçek salep miktarı ile karışımın izotop oranı değişimi arasında en yüksek doğrusallığın $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ oranları arasında olduğu tespit edilmiştir (Şekil 49a). Ancak, bunun karşılığında reçetelere ilave edilen salep miktarı ile $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ve $^1\text{H}/^2\text{H}$ oranları arasında doğrusal bir ilişki tespit edilememiştir (Şekil 49b, c ve d). Bu nedenle $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ oranları ile salep miktarları arasındaki ilişkinin yüksek salep içeriğine sahip karışımlardaki salep oranlarının belirlenmesinde kullanılabileceği düşünülmektedir.

Ticari salep içecek tozlarındaki gerçek salep oranları ile organik asit bileşikleri arasındaki korelasyon bulguları Tablo 42'de sunulmaktadır.

Tablo 42. Ticari salep içecek tozu reçetelerine ilave edilen salep miktarları ile organik asit bileşikleri arasındaki korelasyon

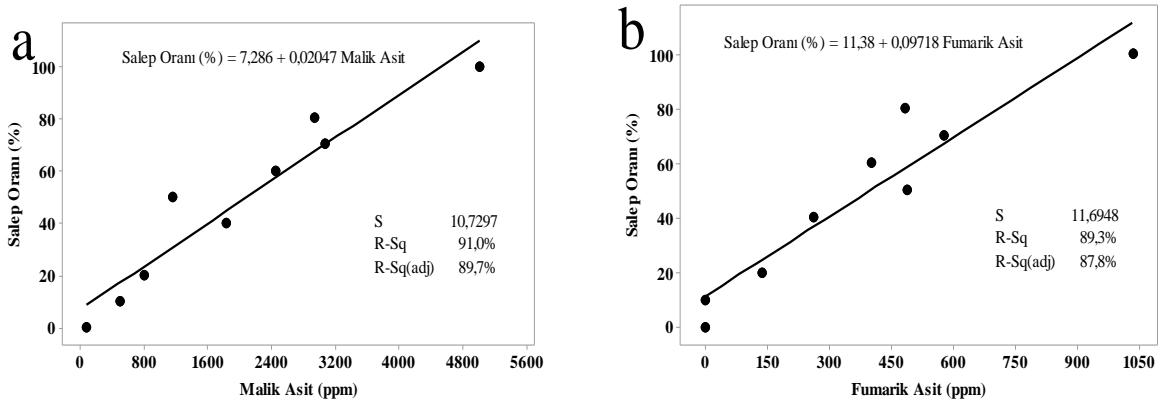
| Organik asitler | Salep Oranı : %0 - %10 | | Salep Oranı : %0 - %100 | |
|-----------------|------------------------|--------------|-------------------------|--------------|
| | Korelasyon | p-değeri | Korelasyon | p-değeri |
| Tartarik asit | -0,206 | 0,357 | 0,587 | 0,126 |
| Malik asit | 0,958 | 0,000 | 0,954 | 0,000 |
| Sitrik asit | 0,009 | 0,968 | -0,416 | 0,265 |
| Fumarik asit | 0,225 | 0,302 | 0,945 | 0,000 |

Tablo 42'de sunulan korelasyon bulgularına göre, karışımlardaki %0-%10 aralığında gerçek salep içeren karışımın malik asit düzeyleri arasında önemli düzeyde bir korelasyon belirlenmiştir. Karışımlardaki malik asit düzeylerindeki değişimin karışıma ilave edilen salep miktarı ile olan doğrusallığını gösterir regresyon analiz sonucu Şekil 50'de sunulmaktadır.



Şekil 50. Ticari salep içecek tozu reçetelerine ilave edilen salep miktarları (%0-%10) ile karışımıdaki malik asit düzeyleri arasındaki doğrusallık

Ayrıca %0-%100 aralığında gerçek salep içeren karışımarda ise malik asitle birlikte fumarik asitin de korelasyon gösterdiği sonucuna varılmıştır. Bu kapsamda hazırlanan doğrusallık grafikleri Şekil 51’de gösterilmektedir.



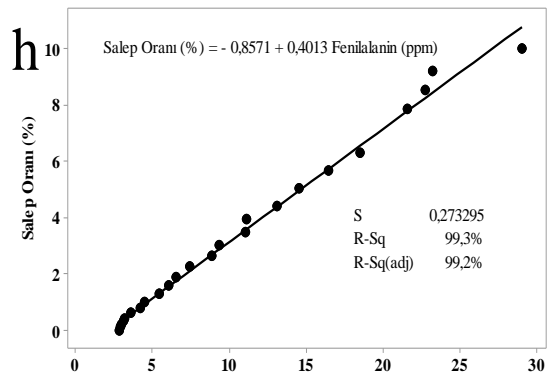
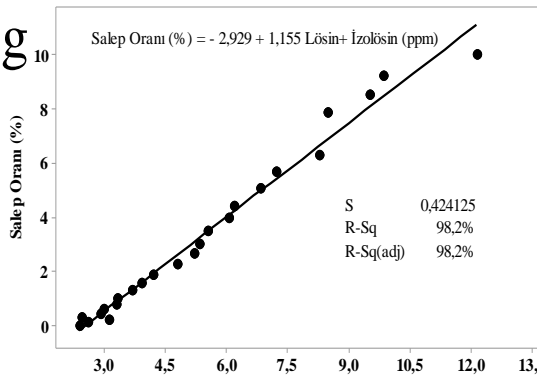
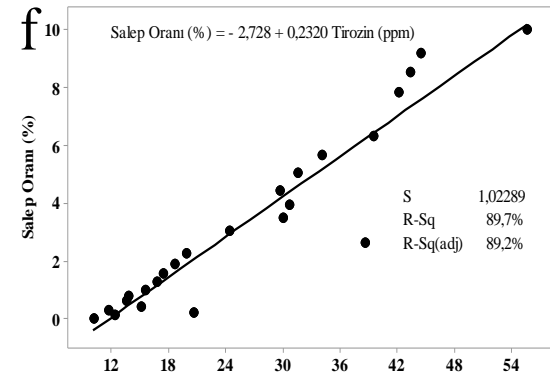
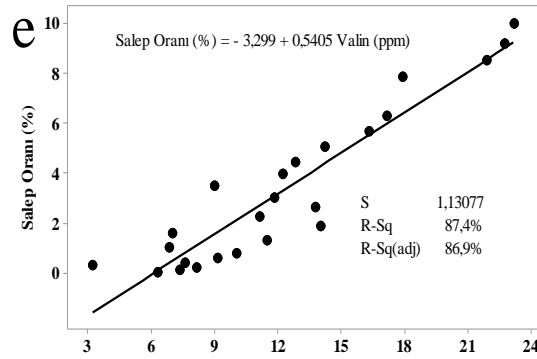
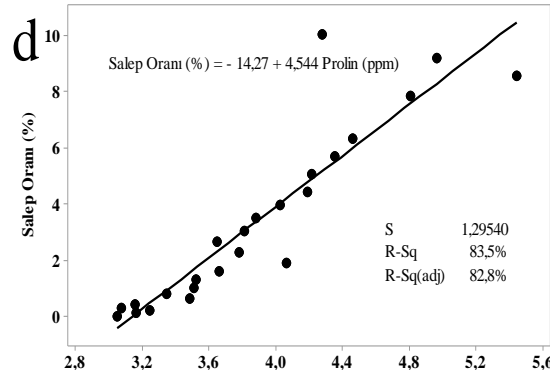
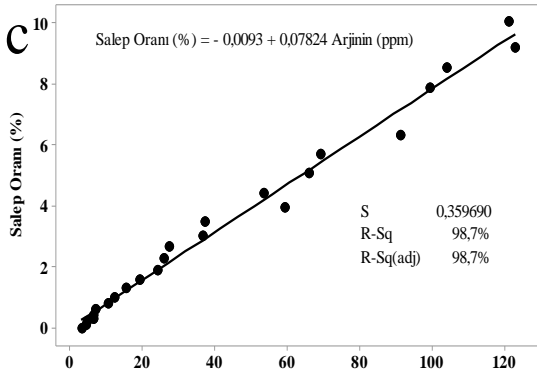
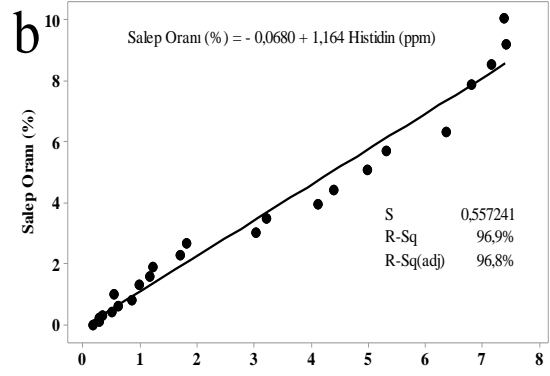
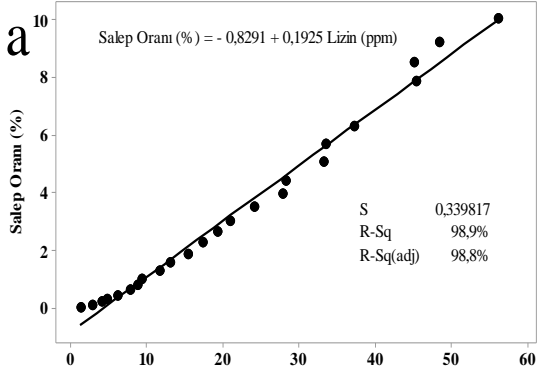
Şekil 51. Ticari salep içecek tozu reçetelerine ilave edilen salep miktarları (%0-%100) ile karışımıdaki malik asit ve fumarik asit düzeyleri arasındaki doğrusallık

Yukarıda organik asit bileşikleri ve salep miktarları arasındaki ilgiyi gösteren tablolar ve şekil birlikte değerlendirildiğinde ticari salep içecek tozu karışımında bulunan gerçek salep miktarı ile reçetelerin malik asit ve fumarik asit düzeyleri arasında ilave edilen miktara bağılı doğrusal bir artışın olduğu dikkati çekmektedir. Bu bulgudan hareketle ticari salep içecek tozu karışımında belirlenen malik asit düzeylerinin salep taklit ve tağışşını belirlemede önemli bir parametre olabileceği sonucuna varılmıştır.

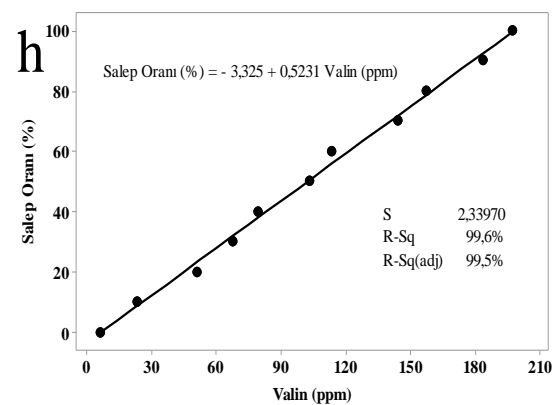
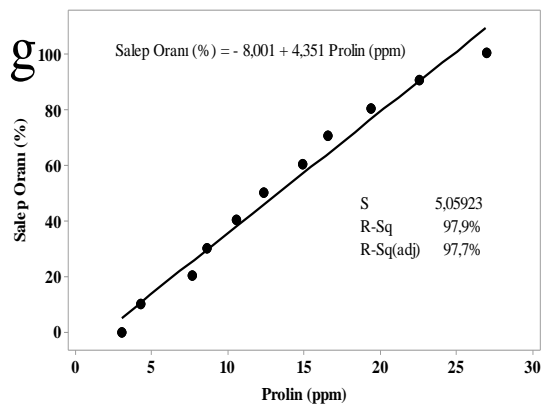
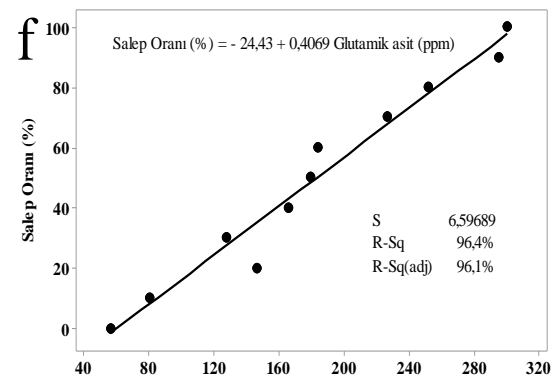
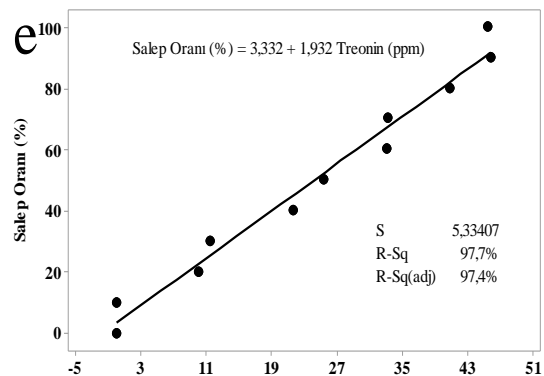
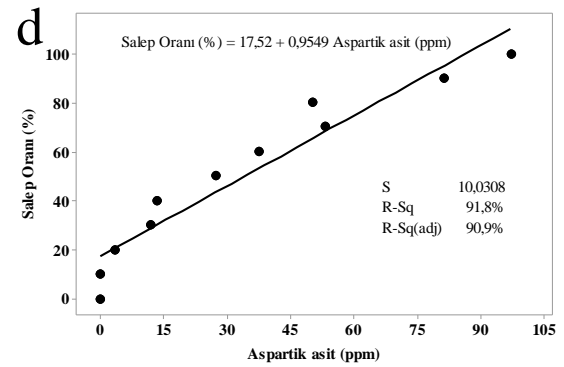
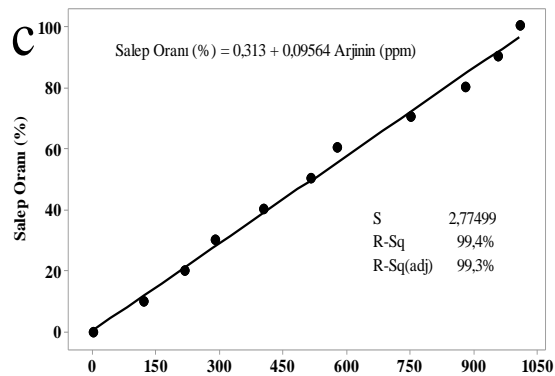
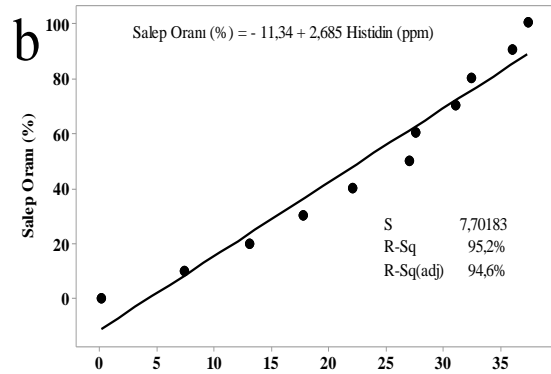
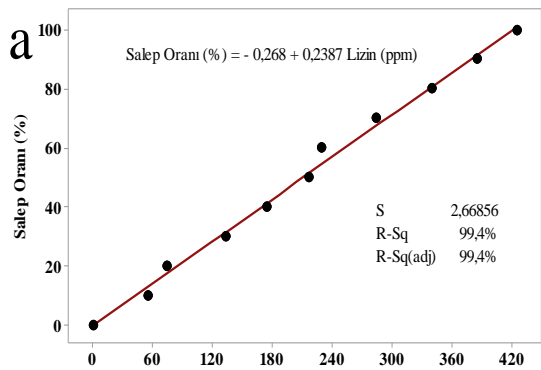
Ticari salep içecek tozlarındaki gerçek salep miktarları ile karışımların amino asit düzeyleri arasındaki korelasyon Tablo 43'te, önemli düzeyde korelasyon bulunan amino asitlerle karışımlardaki gerçek salep miktarları arasındaki doğrusallıkları gösteren grafikler Şekil 52 ve 53'te sunulmaktadır.

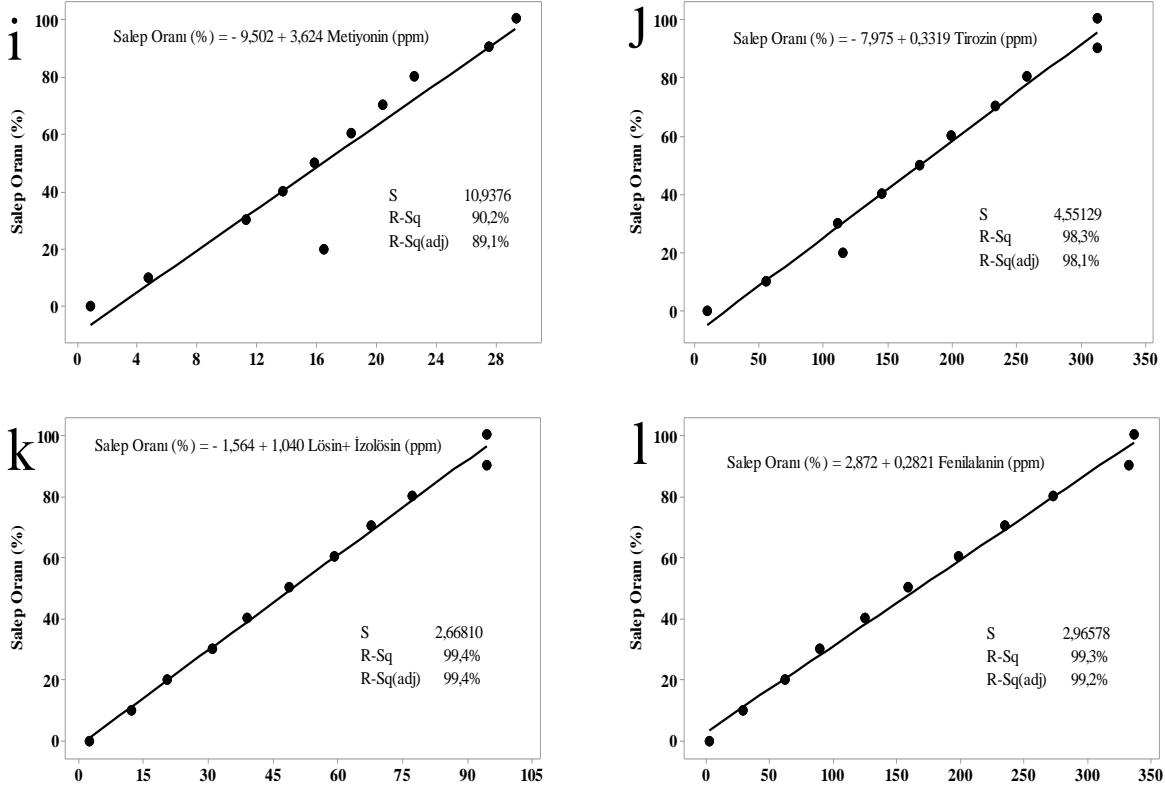
Tablo 43. Ticari salep içecek tozu reçetelerine ilave edilen salep miktarları ile amino asitler arasındaki korelasyon

| Amino asitler | Salep oranı : %0 - %10 | | Salep Oranı : %0 - %100 | |
|-------------------------|------------------------|--------------|-------------------------|--------------|
| | Korelasyon | p-değeri | Korelasyon | p-değeri |
| Lizin | 0,994 | 0,000 | 0,997 | 0,000 |
| Sistein | -0,162 | 0,401 | | |
| Histidin | 0,985 | 0,000 | 0,975 | 0,000 |
| Arjinin | 0,994 | 0,000 | 0,997 | 0,000 |
| Aspartik asit | 0,041 | 0,850 | 0,958 | 0,000 |
| Serin | -0,221 | 0,298 | 0,868 | 0,001 |
| Treonin | -0,262 | 0,163 | 0,988 | 0,000 |
| Glutamik asit | 0,530 | 0,008 | 0,982 | 0,000 |
| Prolin | 0,914 | 0,000 | 0,989 | 0,000 |
| Valin | 0,935 | 0,000 | 0,998 | 0,000 |
| Metiyonin | 0,647 | 0,001 | 0,950 | 0,000 |
| Tirozin | 0,947 | 0,000 | 0,992 | 0,000 |
| Lösin + İzölösin | 0,991 | 0,000 | 0,997 | 0,000 |
| Fenilalanin | 0,996 | 0,000 | 0,996 | 0,000 |



Şekil 52. Ticari salep içecek tozu reçetelerine ilave edilen salep miktarları (%0-%10) ile karışımdaki lizin, histidin, arjinin, prolin, valin, tirozin, lösin + izölösün ve fenilalanin düzeyleri arasındaki doğrusallık





Şekil 53. Ticari salep içecek tozu reçetelerine ilave edilen salep miktarları (%0-%100) ile karışımdaki lizin, histidin, arjinin, aspartik A., prolin, treonin, glutamik A., prolin, valin, metiyonin, tirozin, lösin + izolösün ve fenilalanin düzeyleri arasındaki doğrusallık

Şekil 52 ve 53'te sunulan verilere göre, ticari salep içecek tozu reçetelerine eklenen salep miktarına bağlı olarak %0-%10 aralığında gerçek salep içeren karışımlarda lizin, histidin, arjinin, prolin, valin, tirozin, lösin + izolösün ve fenilalanin amino asitleri ile %0 ile %100 gerçek salep içeren karışımlarda ise lizin, histidin, arjinin, aspartik asit, prolin, treonin, glutamik asit, prolin, valin, metiyonin, tirozin, lösin + izolösün ve fenilalanin amino asitleri düzeyleri ile doğrusal bir artışın bulunduğu tespit edilmiştir. Bu kapsamda adı geçen amino asitlerin salebin taklit ve tağşiş edilmesinde ve ayrıca tağşiş derecesinin belirlenmesinde önemli parametreler olduğu sonucuna varılmıştır.

4.12. Salep miktarlarının belirlenebilmesinde yöntem birleşimleri

Bu çalışmalar kapsamında homojen toz karışımlardaki salep miktarlarının belirlenebilmesi amacıyla yukarıda belirtilen çalışmalara ek olarak ayırım konusundaki tüm yöntemler birlikte değerlendirilerek salep ile TTK maddeleri arası ayırma en fazla katkı sağlayan parametrelerin mutlak korelasyon katsayıları hesaplanmış ve en yüksek korelasyon değerine sahip 5 parametre ile tahmine yönelik modeller oluşturulmuştur. Tablo 44'te önemli parametrelere ait mutlak korelasyon katsayıları sunulmaktadır.

Tablo 44. Salep ve TTK maddeleri ayırımına katkı sağlayan parametrelere ait mutlak korelasyon katsayıları

| Parametre | Katsayı | Parametre | Katsayı | Parametre | Katsayı |
|----------------------------------|---------|----------------------------------|---------|----------------------------------|---------|
| Fenilalanin | 0,9969 | ¹³ C/ ¹² C | 0,7139 | Galyum | 0,4167 |
| Lösin + İzolösin | 0,9932 | Selenyum | 0,6690 | ¹⁵ N/ ¹⁴ N | 0,3584 |
| Lizin | 0,9927 | Nikel | 0,6336 | Çinko | 0,3271 |
| Arjinin | 0,9910 | Arsenik | 0,6208 | Tartarik asit | 0,2578 |
| Histidin | 0,9849 | Demir | 0,6128 | Rubidyum | 0,2255 |
| Prolin | 0,9830 | Sezyum | 0,6020 | Vanadyum | 0,2038 |
| Malik asit | 0,9446 | Metiyonin | 0,5323 | ² H/ ¹ H | 0,1375 |
| Valin | 0,9231 | Bakır | 0,5252 | Antimuan | 0,1227 |
| Mangan | 0,9114 | Baryum | 0,5107 | Krom | 0,1197 |
| Kobalt | 0,9083 | Glutamik Asit | 0,4958 | Sitrik asit | 0,0918 |
| Tirozin | 0,9044 | Stronsiyum | 0,4619 | Alüminyum | 0,0287 |
| ¹⁸ O/ ¹⁶ O | 0,7482 | Lityum | 0,4278 | | |

Tablo 44'te sunulan verilere göre, salep ve TTK maddeleri arası ayırmada en yüksek düzeyde mutlak korelasyon katsayısına sahip parametrelerin amino asit bileşenlerinden sırasıyla fenilalanin, lösin + izolösin, lizin arjinin ve histidin olduğu bu nedenle kurulacak modele en fazla katkı sağlayan parametreler oldukları görülmektedir. Ayrıca, organik asit parametreleri içinde malik asitin, elementel parametreler içinde mangan ve kobaltın, izotop bileşenleri parametrelerinden ¹⁸O/¹⁶O ve ¹³C/¹²C'nin kendi grupları içinde en yüksek mutlak korelasyon katsayısına sahip oldukları dikkati çekmektedir.

Korelasyon katsayıları en yüksek ve bu nedenle salep ile taklit tağşiş maddeleri ayırımına en yüksek düzeyde katkı sağlayan ilk beş parametre (fenilalanin, lösin + izolösin, lizin, arjinin ve histidin) kullanılarak ILS ve PLS modellemeleri gerçekleştirilmiş ve bu çalışmalar sonucu elde değerler Tablo 45'te sunulmuştur.

Tablo 45. PLS ve ILS modellerine ait tahmin ve mutlak hata düzeyleri

| Referans salep (%) | PLS | | ILS | |
|-----------------------|-------------------|-------------|-------------------|-------------|
| | Tahmini salep (%) | Mutlak Hata | Tahmini salep (%) | Mutlak Hata |
| 0,110 | 0,142 | 0,032 | 0,092 | 0,018 |
| 0,210 | 0,228 | 0,018 | 0,126 | 0,084 |
| 0,309 | 0,305 | 0,004 | 0,366 | 0,057 |
| 0,408 | 0,380 | 0,028 | 0,364 | 0,044 |
| 0,606 | 0,551 | 0,055 | 0,572 | 0,034 |
| 0,804 | 0,805 | 0,001 | 0,794 | 0,010 |
| 1,000 | 0,943 | 0,057 | 1,056 | 0,056 |
| 1,585 | 1,581 | 0,004 | 1,674 | 0,089 |
| 2,258 | 2,199 | 0,059 | 2,253 | 0,005 |
| 2,639 | 2,654 | 0,015 | 2,748 | 0,109 |
| 3,016 | 2,942 | 0,074 | 2,831 | 0,185 |
| 3,485 | 3,472 | 0,013 | 3,471 | 0,014 |
| 3,948 | 4,037 | 0,089 | 3,999 | 0,051 |
| 4,407 | 4,380 | 0,027 | 4,302 | 0,105 |
| 5,043 | 5,154 | 0,111 | 5,143 | 0,100 |
| 5,670 | 5,666 | 0,004 | 5,621 | 0,049 |
| 6,289 | 6,692 | 0,403 | 6,556 | 0,267 |
| 9,183 | 8,839 | 0,344 | 9,002 | 0,181 |

Tablo 45'te ILS ve PLS'e ait tahmin oranlarının referans salepteki düzeylere oldukça yakın ve mutlak hata düzeylerinin oldukça düşük seviyelerde olduğu görülmektedir. Bu kapsamda her iki modele ait karşılaştırma tablosu Tablo 46'da sunulmaktadır.

Tablo 46. PLS ve ILS modelleri başarı karşılaştırma tablosu

| Model | SEP (%) | R ² |
|-------|---------|----------------|
| ILS | 0,170 | 0,997 |
| PLS | 0,255 | 0,998 |

Elde edilen sonuçlara göre, SEP değerinin daha düşük ve R² değerinin daha fazla 1'e yakın olması nedeni ile ILS modelinin homojen toz karışımlardaki gerçek salep düzeylerini tahmin etmede daha başarılı olduğu sonucuna varılmıştır. Sonuç olarak, belirtilen bileşenlerin kullanılmış olduğu toz karışımındaki gerçek salep oranının ILS modeli kullanılarak ±0,170 (%) oranında tespit edileceği belirlenmiştir.

Bu şekilde ILS kullanılarak hazırlanan modelin regresyon eşitliği aşağıdaki şekilde oluşturulmuştur:

$$\text{Numunedeki Salep Miktarı (\%)} = [\text{Fenilalanin (mg/kg)} * 0,275] - [\text{Lösin+İzolösin (mg/kg)} * 0,153] + [\text{Lizin (mg/kg)} * 0,079] + [\text{Arjinin (mg/kg)} * 0,027] - [\text{Histidin (mg/kg)} * 0,331] - 0,553$$

4.13. Çok değişkenli ölçümler ve modelleme çalışmaları

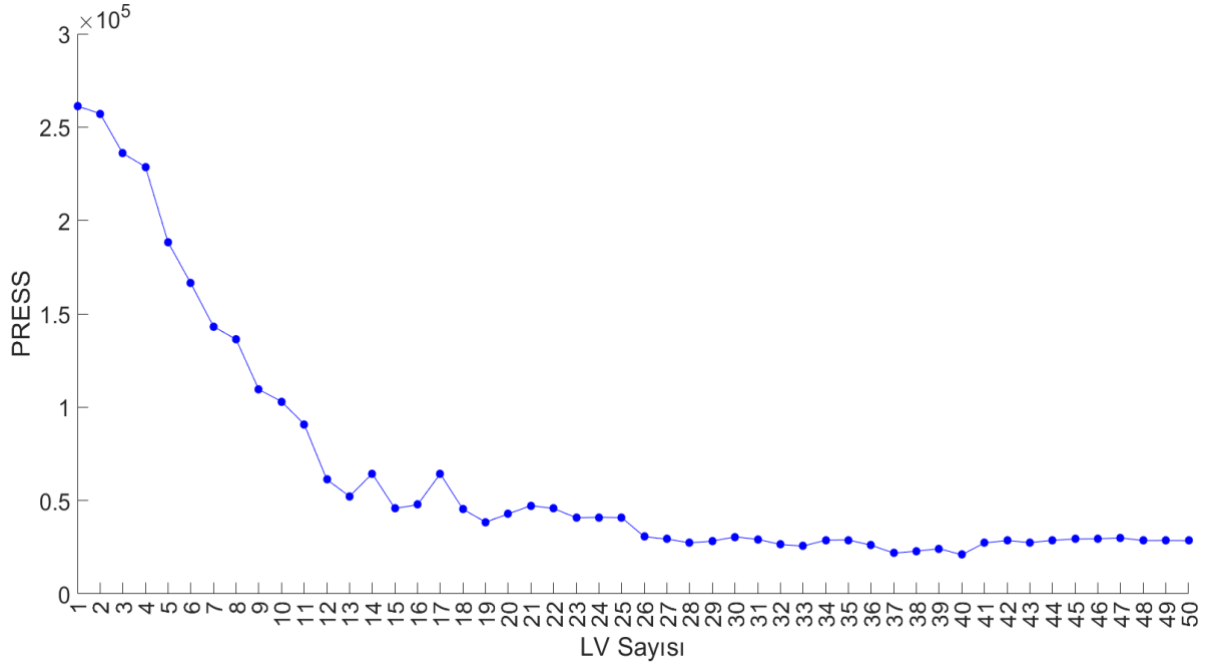
Bu kapsamda; salebin taklit ve taşıma uğratılmasında kullanılacak pratik, hızlı, ekonomik ve güvenilir bir yöntemin geliştirilebilmesi amacıyla son dönemlerde kullanımı oldukça artan çok değişkenli kemometrik ölçümler yöntemleri ile birlikte kombine edilen FTIR spektrometresi kullanılarak ölçümler ve modelleme çalışmaları yürütülmüştür. Literatürde bu çerçevede kullanılan 15 civarı model bildirilmesine rağmen, en yaygın kullanılan iki model Kısmi En Küçük Kareler 1 (Partial Least Squares 1. PLS 1) ve Genetik Algoritma Tabanlı Ters En Küçük Kareler (Genetic Inverse Least Squares. GILS) yöntemlerinin olduğu bildirilmektedir. Bu nedenle bu iki modelden hangisinin daha iyi sonuç verdiği yönünde bir model çalışma gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmalar kapsamında, 20 farklı taşıma malzemesi ile oluşturulacak reçetenin tüm senaryoları verimli şekilde kapsamı hedeflenmiş ve bu doğrultuda bir reçete oluşturma algoritması geliştirilmiştir. Belirtilen algoritma ile her bir örnekte kesinlikle belirli bir oranda gerçek salep bulunmasını sağlanmış bunun yanı sıra en az 1 en fazla 4 adet olmak üzere taşıma malzemesi de rastgele miktarlarda reçetelerde tanımlanmıştır. Böylelikle kemometrik modelin kapsadığı değişkenliğinin artırılarak daha yüksek tahmin başarısının elde edilmesi amacıyla toplamda 290 adet taşıma senaryosu hazırlanmıştır. İlave olarak reçetelerdeki her bir maddenin saf halleri de çalışılmıştır. Bu kapsamda oluşturulan liste proje sonuç raporunda yer alan "Ek 1. FTIR spektrum kütüphanesi oluşturmak için kullanılan reçete bileşimleri" dosyasında sunulmaktadır. İlgili dosyada verilen 290 adet farklı oranlarda salep içeren karışımların yanı sıra 54 adet saf salep ve 21 (bir adedi saf salep numunelerinin harmanı olacak şekilde) adet reçetelerde kullanılan her bir maddenin saf halinin FTIR spektrum taraması gerçekleştirilmiştir.

Bu spektrumlardan ölçümleme setine ayrılan toplamda 280 örnekten 259'u rastgele seçilmiş olup kalan 21 tanesi ise saf numunelerdir. Geriye kalan 85 spektrum ise model başarısının belirlenmesi amacıyla bağımsız doğrulama seti olarak tanımlanmıştır. Elde edilen ölçümleme seti ile PLS ve GILS modellemeleri gerçekleştirilmiş ve doğrulama seti ile bu modeller test edilmiştir.

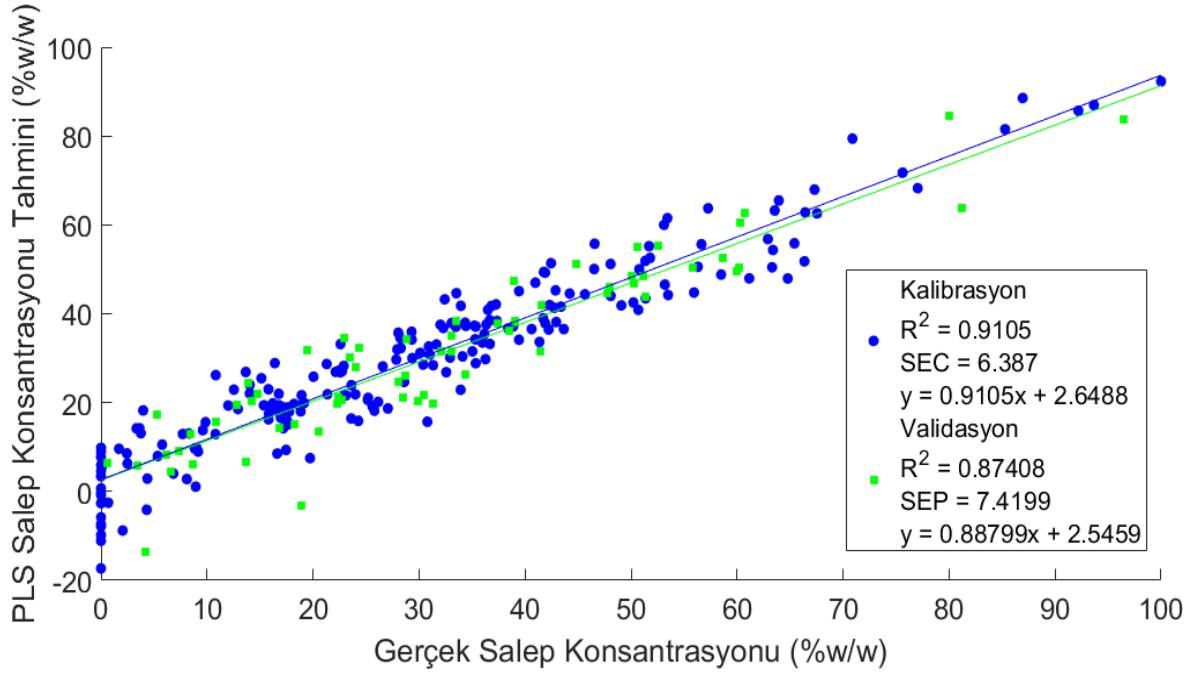
4.13.1. PLS ile Modelleme Çalışması

Salep miktarının belirlenmesi amacıyla oluşturulacak PLS modelinde ilk olarak LV sayısının belirlenmesi için LOOCV işlemi gerçekleştirilmiş ve aşağıda elde edilen sonuçlara ait grafik Şekil 54'te verilmiştir.



Şekil 54. LOOCV ile edilmiş LV sayısına karşı PRESS değerleri grafiği

Şekil 54'teki grafikte 37 LV kullanılması ile en düşük tahmin hatasının elde edildiği gözlemlenmiş ve nihai PLS modeli 37 LV ile kurulmuştur. Elde edilen bu modelin ölçümleme ve doğrulama setlerindeki tahmin başarıları ve gerçek konsantrasyon değerlerine karşı tahmin edilen konsantrasyon değerleri Şekil 55'te sunulmuştur.



Şekil 55. Gerçek salep konsantrasyonlarına karşı PLS tahminleri grafiği

Şekil 55'e göre, kurulan PLS modelinin overfit etmediği ve hem ölçümleme seti hem de doğrulama seti başarılarının birbirine oldukça yakın olduğu gözlemlenmiştir. Bunu destekler nitelikte R^2 değerleri ölçümleme seti için 0,99 ve doğrulama seti için 0,95 bulunmuştur. Oluşturulan modelin başarısını belirten bir diğer kriter ise Standart Ölçümleme Hatası (Standard Error of Calibration, SEC) ve Standart Tahmin Hatası'dır. (Standart Error of Prediction, SEP). SEC ve SEP değerlerinin hesaplanması Eşitlik 15 ve 16'da verilmiştir.

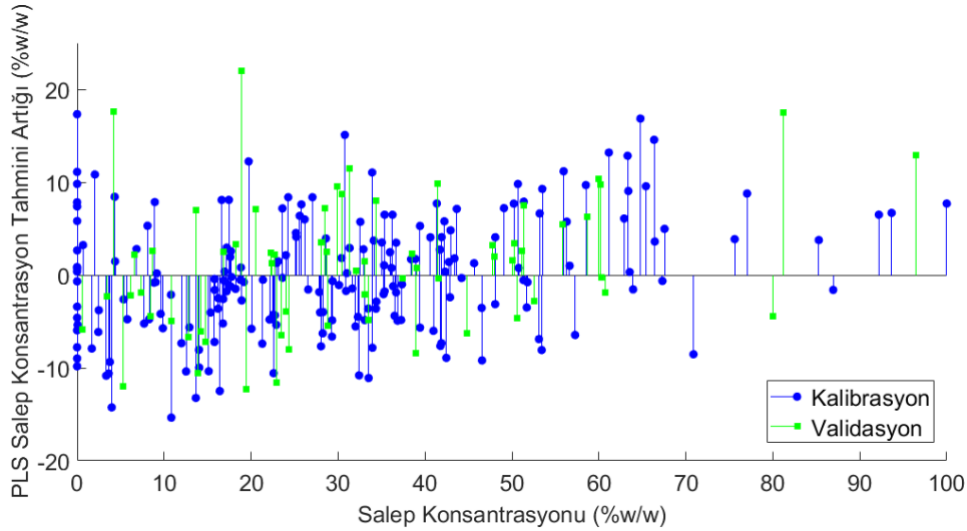
$$SEC = \sqrt{\frac{\sum_{m=1}^M (\hat{c}_m - c_m)^2}{m-2}} \quad \text{Eşitlik 15}$$

$$SEP = \sqrt{\frac{\sum_{m=1}^M (\hat{c}_m - c_m)^2}{m}} \quad \text{Eşitlik 16}$$

İsimlerinden de anlaşılacağı üzere SEC değerinin küçüklüğü model kurulurken kullanılan veri setinin tahminlerinin başarısını, SEP değerinin ne kadar küçük olduğu ise model kurulurken kullanılmayan ve doğrulama için ayrılmış veri seti tahminlerinin başarısını göstermektedir. Ancak tek başına SEC değerinin düşüklüğü yanıltıcı olabilmektedir ve SEP değeri bu bağlamda modelin gerçek başarısını daha çok yansıtır niteliktedir. Kurulan PLS

modelinden elde edilen SEC ve SEP değerleri sırasıyla 3,81 (% w/w) ve 6,14 (% w/w) olarak hesaplanmıştır.

Model başarısının analizi için kullanılan bir diğer grafik ise artıklar grafiğidir. Şekil 56'da PLS modeli ölçümlenme ve doğrulama seti tahminlerinin artıkları verilmiştir.

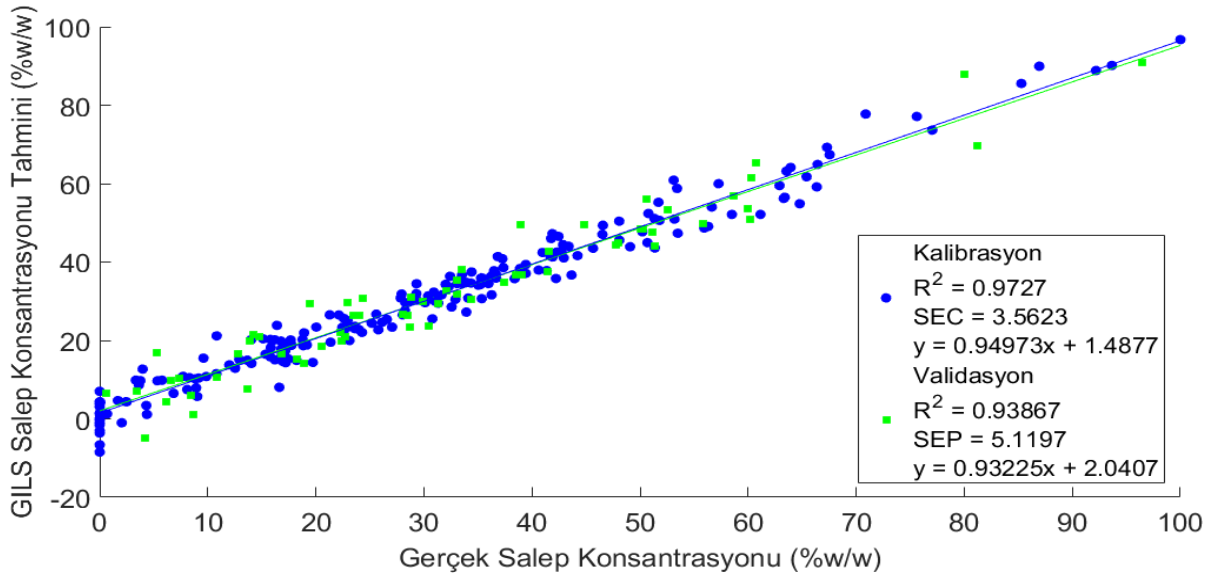


Şekil 56. Ölçümlenme ve doğrulama seti PLS tahmini artıkları grafiği

Şekil 56'da verilen artıklar grafiği incelendiğinde, tahmin hataların %20 (% w/w) mertebesinin neredeyse hiğ dışına çıkmadığı görülmekle beraber yaklaşık olarak bu artıkların %95'inde sapmaların ± 10 aralığında olduğu anlaşılmaktadır. Ayrıca artıkların gelişine dağıldığı ve herhangi bir konsantrasyon aralığında hataların artan ya da azalan bir eğilim göstermediği gözlemlenmiştir.

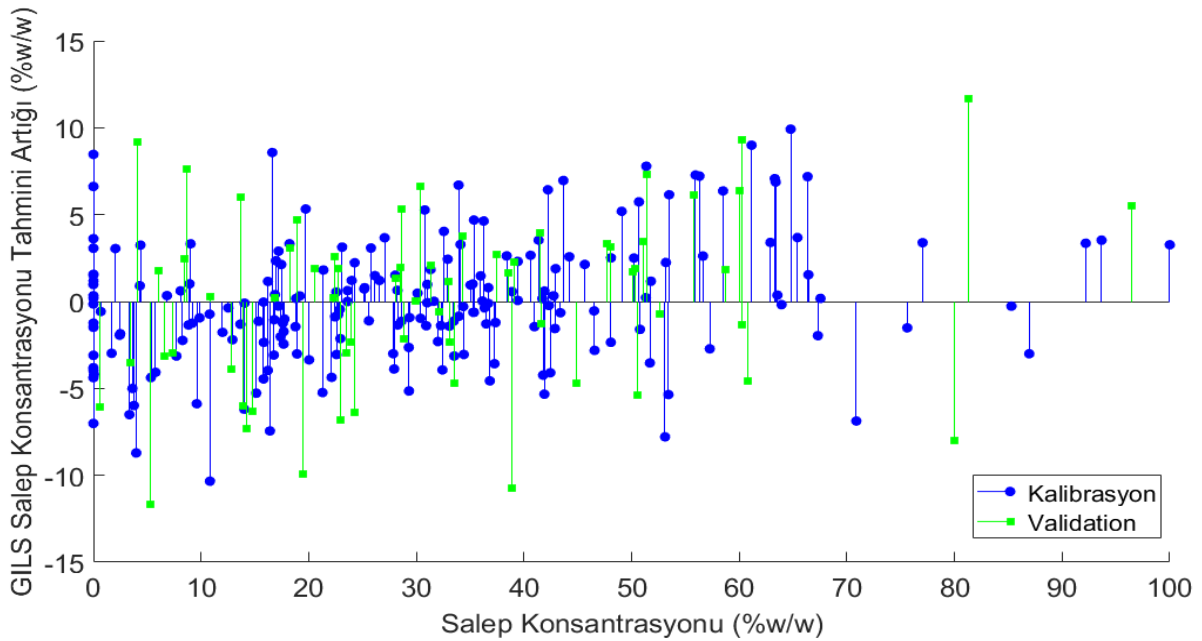
4.13.2. GILS Modelleme Çalışması

GILS modelinin oluşturulmasında ilk gen seğimi başarı eşiği R^2 cinsinden 0,5 olarak ayarlanmış; 30 gen, 50 iterasyon ile toplamda 100 alt-model kurulmuştur. Ardından bu alt-modellerin ortalaması alınarak nihai GILS modeli elde edilmiştir. Ölçümlenme ve doğrulama seti tahminlerine karşılık geręek salep konsantrasyon değerleri Şekil 57'de verilmiştir.



Şekil 57. Gerçek salep konsantrasyonlarına karşı GILS tahminleri grafiği

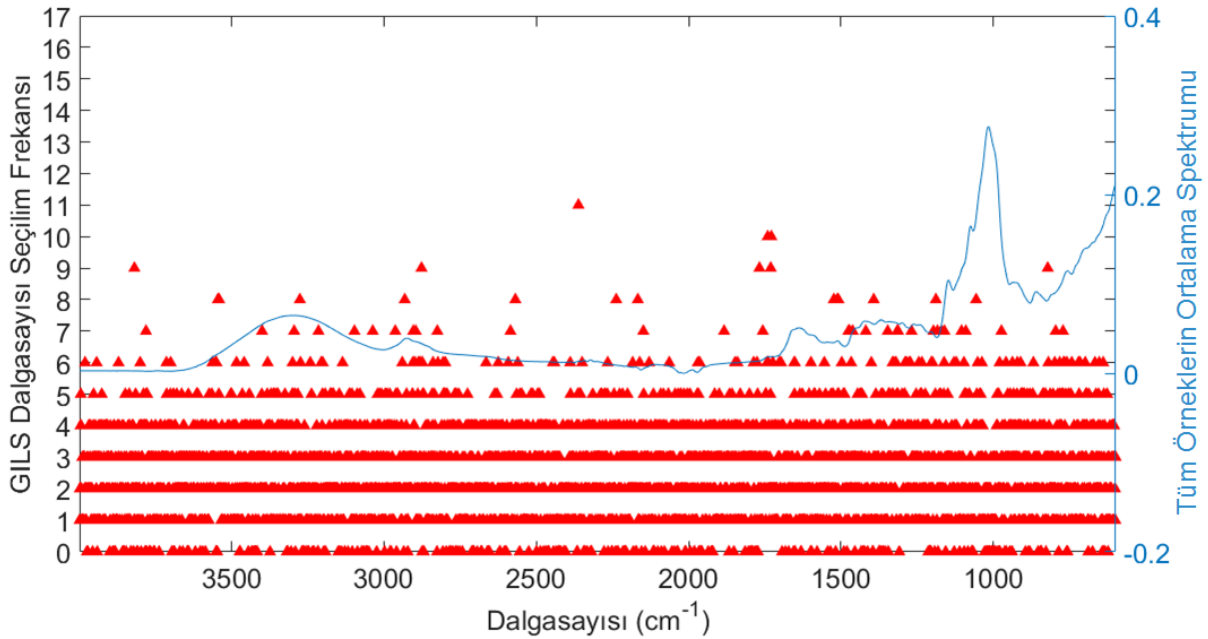
Şekil 57'deki grafik incelendiğinde GILS model tahminlerinin gerçek değerlere oldukça yakın olduğu gözlemlenmiştir. Ölçümleme ve doğrulama seti için R^2 değerleri sırasıyla 0,98 ve 0,96 olarak hesaplanmıştır. Modelin ortalama hatasını gösteren SEC ve SEP değerleri ise 3,99 (% w/w) ve 5,76 (% w/w) olarak bulunmuştur. Hem R^2 değerlerinin hem de standart hataların ölçümleme ve doğrulama seti için yakın olması modelin sadece ölçümleme setinde değil modele dahil edilmeyen verilerde de benzer başarı yakalayacağını göstermektedir. Aşağıda Şekil 58'de bir diğer önemli ölçüt olan artıkların grafiği sunulmuştur.



Şekil 58. Ölçümleme ve doğrulama seti GILS tahmini artıkları grafiği

GILS modeli tahminlerinin gerçek konsantrasyonlarla karşılaştırılmasından elde edilen artıkların belirli bir düzende olmadığı; aynı zamanda da artıkların negatif ve pozitif yönde düzgün dağıldığı gözlemlenmiştir. Bu bağlamda elde edilen GILS modelinde tahmin başarısını düşürecek bir yönelim olmadığı söylenebilir. Artık aralığına bakıldığında ise örneklerin büyük çoğunluğu için sapma aralığının $\pm 5\%$ civarında olduğu ve neredeyse tüm tahmin artıklarının $\pm 10\%$ seviyesinin dışına çıkmadığı söylenebilir. Bu bağlamda GILS ile elde edilen modelin başarısı PLS yöntemine göre daha iyi olduğu ortaya çıkmaktadır.

Genetik Algoritmanın sağladığı bir diğer yararlı grafik ise değişkenlerin (spektral veriler için dalgasayıları/dalgaboyları) seçim frekansı grafiğidir. Kısaca bu ölçüt, her bir dalgasayısının nihai GILS modeli oluşturulurken kullanılan alt-modellerden elde edilen en iyi genlerde toplamda kaç kez kullanıldığını gösterir. Oluşturulan nihai GILS modelinden elde edilen seçim frekansı grafiği Şekil 59'da verilmiştir.



Şekil 59. GILS modelinde dalga sayılarının seçim frekansının tüm örneklerin ortalama spektrumu üzerinde gösterimi

Genetik tabanlı algoritmalarda bir dalgasayısının kaç kez seçildiği, o dalgasayısının modellenmesi hedeflenen maddenin konsantrasyonu ile ilgili içerdiği bilgiyle doğru orantılıdır. Ancak belirli dalgaboylarının öne çıkmadığı durumlarda GA'nın stokastik yapısından ötürü Şekil 51'dekine benzer kısmen "düz" dağılım grafikleri gözlemlenebilir.

PLS ve GILS modellemelerinden elde edilen sonuçların karşılaştırılması için model başarımları Tablo 47'de sunulmuştur.

Tablo 47. GILS ve PLS modellerinin ölçümlene ve doğrulama seti tahmin başarıları

| Model | Ölçümlene Seti | | Doğrulama Seti | |
|-------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | SEC (%w/w) | R ² | SEP (%w/w) | R ² |
| PLS | 3,81 | 0,99 | 6,14 | 0,95 |
| GILS | 3,98 | 0,98 | 5,76 | 0,96 |

Tablo 47 ve modellerden elde edilen grafikler (Şekil 55-59) incelendiğinde. GILS yönteminin PLS yöntemine kıyasla daha yüksek SEC değerleri sağlamasına karşın daha düşük SEP değerlerine ulaştığı ve artıkların daha dar bir aralıkta dağıldığı görülmüştür. Bu bağlamda salep konsantrasyonlarının kemometrik modellenmesinde GILS yönteminin PLS yönteminden daha başarılı olduğu söylenebilir. GILS modelinin SEP değeri ve artıkların aralığı dikkate alındığında, bu model ile yapılacak tahminlemelerin ortalama hatasının %6 mertebesinde, hata aralığının ise $\pm\%10$ seviyesinde olacağı öngörülmektedir.

4.14. Piyasa izleme çalışmaları

Bu kapsamda ülkemizde ticari olarak satışa sunulan 40 adet salep içecek tozu numunesi (TS kodlu numuneler) ve orijinal salep olduğu ifade edilen 20 adet toz salep numunesi (PS kodlu numuneler) geliştirilen yöntem kullanılarak incelenmiş edilmiş ve analizler sonucunda bileşimlerdeki salep miktarları ile etiketlerinde beyan edilen miktarlar ile karşılaştırılmıştır. TS kodlu numunelerdeki % salep miktarının belirlenmesinde numunelerin glikomannan düzeyleri, PS kodlu numuneler için FTIR analizinden elde edilen sonuçlar dikkate alınmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 48 ve 49'da sunulmaktadır.

Tablo 48. Piyasa izleme çalışmaları kapsamında izlenen salep toz içecek numunelerinde glikomannan düzeylerine göre tespit edilen salep oranları

| KOD | Etiket açıklaması | Salep (%) |
|------|---|-----------|
| TS01 | Şeker, yağsız süt tozu, kıvam artırıcı, doğal salep , aroma vericiler, tuz, tatlandırıcılar | 1,59 |
| TS02 | Şeker, nişasta, süt tozu, salep aroması, vanilya, ksantan gam, tarçın | 0,00 |
| TS03 | Şeker, yağsız süt tozu, mısır nişastası, kıvam artırıcı, salep aroması, tarçın, salep tozu, vanilin aroması, tuz | 2,61 |
| TS04 | Şeker, yağsız süt tozu, kıvam artıcılar, salep aroma verici, salep tozu (%0,3) , tarçın aroma verici | 0,00 |
| TS05 | Nişasta, yağsız süt tozu, şeker, kahve beyazlatıcısı, süt proteini, emülgatör, aroma vericiler, topaklanma önleyici, tuz, tarçın, tatlandırıcı, salep tozu (%0,01) | 0,00 |
| TS06 | Şeker, patates nişastası, yağsız süt tozu, salep tozu (%1) , aroma verici, toz tarçın, topaklanma önleyici, tuz, kıvam artırıcı | 3,42 |
| TS07 | Şeker, yağsız süt tozu, patates nişastası, aroma vericiler, tarçın, topaklanma önleyici, salep tozu (%0,3) | 0,00 |
| TS08 | Şeker, modifiye patates nişastası, yağsız süt tozu, laktoz, aroma vericiler, kıvam artırıcılar, tarçın, salep tozu (%0,1) , tatlandırıcı | 1,63 |
| TS09 | Şeker, yağsız süt tozu, kıvam artırıcı, doğal salep , zencefil, topaklanma önleyici, salep aroması, süt aroması, vanilya aroması, tarçın, tuz, | 0,00 |
| TS10 | Şeker, mısır nişastası, süt tozu, salep , tarçın, trisodyum sitrat, vanilin | 0,00 |
| TS11 | Şeker, yağsız süt tozu, mısır nişastası, aroma vericiler, glikoz şurubu, emülgatör, sodyum kazeinat, tarçın, salep (%0,1) , renklendirici | 3,42 |
| TS12 | Şeker, süt tozu, mısır nişastası, kıvam artırıcı, aroma vericiler, topaklanma önleyiciler | 0,00 |
| TS13 | Şeker, mısır nişastası, süt tozu, kıvam artırıcı, tarçın, aroma vericiler, tatlandırıcı karışım, | 0,00 |
| TS14 | Şeker, süt tozu, , topaklanma önleyiciler, kıvam artırıcı, vanilin, toz tarçın, aroma vericiler, renklendiriciler | 0,00 |
| TS15 | Şeker, süt tozu, kıvam artırıcı, emülgatör, aromalar, topaklanma önleyici, tarçın | 0,00 |
| TS16 | Şeker, patates nişastası, yağsız süt tozu, modifiye tapyoka nişastası, maltodekstrin, salep tozu (%0,3) , kıvam artırıcı, tuz, aroma verici, toz tarçın, topaklanma önleyici | 0,00 |

| | | |
|------|---|--------|
| TS17 | Şeker, süt tozu, doğal salep (%6,5) , dekstroz, peynir altı suyu, topaklanma önleyici, stabilizör, aroma vericiler | 1,96 |
| TS18 | Şeker, nişasta, yağsız süt tozu, süt aroması, toz tarçın, salep aroması, topaklanma önleyici | 0,00 |
| TS19 | Saf salep | 28,81 |
| TS20 | Şeker, mısır nişastası, süt tozu, doğal salep , kıvam artırıcı, vanilin, salep aroma, vanilin aroması | 3,66 |
| TS21 | Şeker, modifiye mısır nişastası, yağsız süt tozu, salep tozu (%0,4) , inceltici, aroma verici, topaklanma önleyici | 0,13 |
| TS22 | Şeker, süt tozu, mısır nişastası, kıvam artırıcı, toz tarçın, aroma vericiler, topaklanma önleyici | 0,00 |
| TS23 | Şeker, yağsız süt tozu, guar gam, mısır nişastası, salep aroması, tarçın aroması, silikon 225 | 0,00 |
| TS24 | Bileşim beyan edilmemiş | 0,00 |
| TS25 | Bileşim beyan edilmemiş | 0,00 |
| TS26 | Doğal dağ salebi (%6) , şeker, topaklanma önleyici, mısır nişastası, kıvam artırıcı, guar | 4,56 |
| TS27 | Şeker, nişasta, yağsız süt tozu, süt aroması, guar gum, tarçın, vanilin, salep aroması, topaklanma önleyici | 0,38 |
| TS28 | Şeker, kahve beyazlatıcı, kazeinat, emülgatör, topaklanma önleyici, renklendirici, yağsız süt tozu, modifiye nişasta, kıvam artırıcı, tarçın, aroma, salep (%0,4) , vanilin | 0,27 |
| TS29 | Şeker, mısır nişastası, süt tozu, kıvam artırıcı, damla sakızı, maltodekstrin, tarçın, salep , aroma vericiler | 2,15 |
| TS30 | Saf salep | 27,98 |
| TS31 | Şeker, süt tozu, mısır nişastası, doğal salep , kahve beyazlatıcısı, emülgatör, renklendirici, vanilya, karbonat, adml, xantan gum, guar gum, aroma, tarçın, trikalsiyum fosfat | 1,89 |
| TS32 | Bileşim beyan edilmemiş | 4,12 |
| TS33 | Öğütülmüş saf salep | 100,00 |
| TS34 | Şeker, modifiye mısır nişastası, yağsız süt tozu, laktoz, kıvam artırıcı, salep tozu (%2) , aroma verici | 4,59 |
| TS35 | Şeker, yağsız süt tozu, mısır nişastası, maltodekstrin, peynir altı suyu tozu, aroma vericiler, kıvam vericiler, sodyum kazeinat, tarçın, renklendiriciler | 0,00 |
| TS36 | Şeker, süt tozu, mısır nişastası, salep (%1) , kıvam artırıcı, aroma vericiler | 2,06 |
| TS37 | Şeker, yağsız süt tozu, modifiye mısır nişastası, salep (%1) , kıvam artırıcı, tarçın, aroma verici | 2,40 |
| TS38 | Saf salep | 24,44 |
| TS39 | %100 doğal salep | 100,00 |
| TS40 | Şeker, yağsız süt tozu, buğday nişastası, kıvam artırıcı, salep aroması, tuz, salep (%0,3) , tarçın aroması, vanilya, tarçın | 0,22 |

Tablo 49. Piyasa izleme çalışmaları kapsamında gerçek salep adı altında satışa sunulan ürünler ve tespit edilen salep oranları

| Numune Kodu | Tespit edilen salep miktarı |
|--------------------|------------------------------------|
| PS01 | 29,26 |
| PS02 | 59,79 |
| PS03 | 8,83 |
| PS04 | 22,58 |
| PS05 | 24,22 |
| PS06 | 21,42 |
| PS07 | 12,10 |
| PS08 | 64,55 |
| PS09 | 100,00 |
| PS10 | 82,77 |
| PS11 | 100,00 |
| PS12 | 11,31 |
| PS13 | 9,79 |
| PS14 | 100,00 |
| PS15 | 100,00 |
| PS16 | 18,06 |
| PS17 | 33,63 |
| PS18 | 26,56 |
| PS19 | 80,36 |
| PS20 | 72,10 |

5. SONUÇ

Proje kapsamında ülkemizde salebin doğal olarak bol miktarda bulunduğu bölgelerden (Kuzey Anadolu, Güneybatı Anadolu, Güney Anadolu, Güneydoğu Anadolu ve Doğu Anadolu) yaş salep yumrusu numuneleri toplanılmış ve laboratuvara getirilerek usulüne uygun bir şekilde kurutularak öğütülmüşlerdir. Ayrıca salep taklit ve tağşişinde kullanılan maddeler (TTK) gamlar (guar gam, gum arabik, keçiyoynuzu gamı, konyak gam ve ksantan gam), nişastalar (buğday nişastası, mısır nişastası, patates nişastası ve pirinç nişastası), ticari katkıları (şeker, yağsız süt tozu, vanilya ve tarçın) ve diğer taklit ve tağşiş maddeleri (öğütülmüş makarna, galeta unu, öğütülmüş pirinç, öğütülmüş bulgur, buğday unu, salep sıvı aroma verici, salep katı aroma verici ve karboksimetil selüloz) olmak üzere 4 grupta sınıflandırılmış ve her bir gruptaki malzemeler piyasada satışa sunulan üç farklı tedarikçiden temin edilmişlerdir. Bu şekilde projenin ilk hedefi olan ülkemiz saleplerini temsil edebilir mahiyette salep örnekleri ve taklit tağşişte kullanılacak materyallerin temini hedefine ulaşılmıştır.

Ülkemizin farklı bölgelerinden temin edilen salep numuneleri ile TTK maddelerinin proje kapsamındaki analizlerinin gerçekleştirilmesinde temel analizler için titrimetrik, gravimetrik, kjeldahl ve kromatografik yöntemler, enzimatik analizler için enzim kitleri, elementel bileşimlerin belirlenmesinde ICP-MS yöntemi, kızılötesi spektrumların belirlenmesinde FTIR yöntemi, izotop oranlarının belirlenmesinde IR-MS yöntemi, kalorimetrik ölçümler için DSC yöntemi, karbonhidrat bileşiklerinin belirlenmesi için HPLC yöntemi, organik asit bileşiklerinin, belirlenmesi için ORBITRAP-MS ve amino asit bileşiklerinin belirlenmesi için ise LC-MS/MS yöntemi kullanılmıştır. Belirtilen analizlerin numune çalışmaları öncesinde yöntem doğrulama çalışmalarına tabi tutulmuştur. Bu çerçevede elementel bileşim analizleri (demir, çinko, mangan, bakır, krom, nikel, strosiyum, titanyum, rubidyum, baryum, molibden, vanadyum, kobalt, lityum, galyum, selenyum, sezyum, antimuan, berilyum, talyum ve bizmut), karbonhidrat bileşikleri analizleri (sakaroz, glikoz, fruktoz, maltoz, mannoz, galaktoz ve arabinoz), organik asit bileşikleri (tartarik asit, sitrik asit, fumarik asit, malik asit, propiyonik asit, bütirik asit ve laktik asit) ve amino asit bileşikleri analizleri (lizin, sistein, histidin, arjinin, aspartik asit, serin, treonin, glutamik asit, prolin, valin, metiyonin, tirozin, lösin + izolösin ve fenilalanin) için doğrusal aralık, ölçümleme denklemi, tespit sınırı, tayin sınırı, tekrar edilebilirlik ve geri kazanım değerleri hesaplanırken, temel analizler (rutubet, kül miktarı, %10 HCl'de çözünmeyen kül, protein), enzimatik analizler (glikomannan ve toplam nişasta), kızılötesi spektrumu analizleri, izotop oranları analizleri ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^2\text{H}/^1\text{H}$ ve $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) ve kalorimetrik ölçümler (erime sıcaklığı, erime ısı ve Tg/Step) için tekrarlanabilirlik değerleri hesaplanmıştır.

Elde edilen bulgulara göre; ilgili yöntemlerin numunelerde beklenen konsantrasyon düzeyleri dikkate alındığında doğrusal aralıklarının, tespit sınırı, tayin sınırı, geri kazanım değerlerinin ve aynı numunenin belirtilen yöntemle tekrarlı analizleri sonucu tespit edilen tekrar edilebilirlik değerlerinin kabul edilebilir düzeylerde oldukları belirlenerek, ilgili numunelerde belirtilen analizlerin doğru sonuç elde etmede uygulanabilir oldukları sonucuna varılmıştır.

Yukarıda belirtilen analizler çerçevesinde gerçekleştirilen analizlerde Güneybatı Anadolu Bölgesi'nden temin edilen numunelerin kül, %10 HCl'de çözünmeyen kül ve protein düzeyleri açısından en yüksek değerlere sahip olduğu belirlenirken, indirgen şeker düzeylerinin Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nden temin edilen numunelerde daha yüksek oranda bulunduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte numunelerdeki glikomannan ve nişasta düzeylerinin de bölgelere göre farklılıklar arz ettiği, bu açıdan en yüksek glikomannanın Kuzey Anadolu, en yüksek nişastanın ise Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nden toplanan saleplerde olduğu belirlenmiştir. Salep numunelerindeki elementel bileşim genel hatları ile değerlendirildiğinde ise; numunelerdeki hakim elementlerin sırasıyla demir, çinko, mangan, bakır ve stronsiyum oldukları sonucuna varılırken, en yüksek demir oranının Kuzey ve Doğu Anadolu saleplerinde olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca en yüksek düzeyde mangan, krom, nikel, titanyum, baryum, molibden, vanadyum, kobalt ve galyum Kuzey Anadolu Bölgesi saleplerinde; bakır, stronsiyum ve selenyum Güney Anadolu Bölgesi saleplerinde; çinko Güney Anadolu Bölgesi saleplerinde ve rubidyum Doğu Anadolu Bölgesi saleplerinde belirlenmiştir. Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinden temin edilen salep yumrularında sezyum düzeylerinin diğer bölgelerden temin edilenlere göre 10-20 kat daha fazla tespit edilmiş olması ilgi çeken bir ayrıntıdır. Benzer şekilde krom ve nikel elementleri de Kuzey Anadolu saleplerinde diğer bölgelere göre 2-3 kat daha yüksek oranda belirlenmiştir. Salep numunelerinin kızılötesi spektrum analizlerinde ve kalorimetrik ölçümlerinde benzer spektrumlar veya değerler üretildiği belirlenerek salebin yapısal anlamda bölgelerarası farklılıkların bulunmadığı sonucuna varılmıştır. Aynı durum $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^2\text{H}/^1\text{H}$ ve $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ izotop oranları için de geçerli olmakla birlikte numunelerdeki $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ oranının bölgelere göre farklılıklar arz ettiği ortaya çıkmıştır. Ancak elde edilen izotop oran değerleri iki boyutlu ve üç boyutlu saçılma grafiklerine yerleştirildiğinde bölgelerin ve hatta bölgelerdeki illerin birbirleri arasında kısmen gruplanmaları önemli bir bulgu olarak değerlendirilmiş olup, bu sonuçların gıda otantisitesi ve coğrafi işaretleme çalışmalarında kullanılabileceği öngörülmektedir. Salep numunelerindeki karbonhidrat ve organik asit bileşikleri düzeylerinin geniş bir aralıkta değişmekte olduğu tespit edilmekle birlikte, en yaygın görülen karbonhidrat bileşiklerin sakaroz, glikoz ve fruktoz; organik asit bileşiklerinin ise sitrik, malik, fumarik ve tartarik asit oldukları belirlenmiştir.

Proje sonuçlarına göre, salep numunelerindeki baskın amino asit bileşiklerinin sırasıyla lizin, tirozin, fenilalanin, glutamik asit ve arjinin olmakla birlikte esansiyel amino asit bileşikleri açısından en zengin salep numunelerinin Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinden temin edilenler olduğu sonucuna varılmıştır.

Salep taklit ve tağşişinde kullanılan maddelerin en uygun hale getirilen yöntemlerle yapılan analizlerinde; protein düzeylerinde farklılıklar bulunmakla birlikte, salebin ortalama protein düzeyine (%6,32±2,61) yakınlık açısından keçiyoynuzu gamı ve öğütülmüş pirinç benzerlikler içerdiği tespit edilmiştir. Gerçekleştirilen enzimatik analiz sonuçlarına göre ise; TTK maddelerinin konyak gam, guar gam ve keçiyoynuzu gamı hariç glikomannan düzeylerinin salepte tespit edilen düzeylere kıyasla çok düşük seviyelerde kaldıkları belirlenmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmede konyak gam ve keçiyoynuzu gamındaki glikomannan düzeylerinin salepteki düzeylerle benzerlikler içerdiği belirlenirken, guar gamda tespit edilen glikomannan düzey istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı bulunmuştur ($p<0,05$). Konyak gam, keçiyoynuzu gamı ve guar gamdaki nişasta düzeylerinin ise salebe oranla düşük seviyelerde kalması glikomannan – nişasta parametrelerinin salep ile TTK maddeleri arası ayırımında önemli bir belirteç olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

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

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

Kalorimetrik ölçümler kapsamında yapılan analizlerde camsı geçiş sıcaklığı bakımından salep örnekleri ile TTK maddeleri arasında bir farklılık tespit edilemezken, erime sıcaklığı açısından salep ile konyak gam, patates nişastası, şeker, yağsız süt tozu, vanilya, galeta ve öğütülmüş bulgur arasında ve entalpi değerleri açısından ise konyak gam, ksantan gam, şeker, yağsız süt tozu, vanilya, öğütülmüş pirinç ve buğday unu arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklar bulunduğu belirlenmiştir.

Proje kapsamında TTK maddelerinde incelenen karbonhidrat bileşiklerinden pek çok TTK maddesinin proje kapsamında izlenen karbonhidrat bileşiklerinden birini veya birkaçını ihtiva etmediği belirlenmiş olup, bu bileşiklerin salebin taklit ve tağşişin belirlenebilmesinde kullanılabileceğini düşündürmektedir. Bunlara örnek olarak; guar gam, ksantan gam, mısır nişastası, sıvı salep aroması, katı salep aroması ve karboksimetil selüloz verilebilir. Ayrıca yine düzeyler dikkate alındığında salep numunelerinin yağsız süt tozu, öğütülmüş makarna ve şeker numunelerinden farklılıklar arz ettiği belirlenmiş olup, diğer TTK maddeleri ile ayırım konusunda kemometrik yöntemlerden faydalanılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Genel anlamda organik asit bileşikleri salep ve TTK maddeleri arasındaki ayırımı etkisi az olarak belirlenmiş olmasına rağmen, salebe yapısal benzerlikler içeren ve Avrupa Salebi olarak yurtdışından ucuz bir şekilde getirilerek gerçek salep yerine satılan konyak gam ile salep arasında tartarik asit yönünden birtakım farklılıklar bulunduğu belirlenmiştir. Bu kapsamda gerçekleştirilen analizlerde konyak gamın yüksek düzeyde ($1619,47 \pm 2412,03$ mg/kg) tartarik asit içermesi ve bunun karşılığında proje kapsamında incelenen salep numunelerinde en fazla $60,28$ mg/kg düzeyinde tartarik asit bulunması Avrupa salebi ile ülkemiz salepleri arasında belirleyici bir unsur olabileceği sonucuna varılmıştır.

TTK maddelerinde belirlenen amino asit düzeylerine göre ise; salebin lizin ve glutamik asit amino asidi açısından tüm TTK maddeleri ile, arjinin ve histidin açılardan karboksimetil selüloz harici tüm TTK maddeleri ile, serin açısından buğday nişastası ve sıvı salep aroması harici tüm TTK maddeleri ile, prolin açısından keçiyoynuzu gamı ve karboksimetil selüloz harici tüm TTK maddeleri ile, valin açısından keçiyoynuzu gamı, konyak gam, pirinç nişastası ve öğütülmüş pirinç harici tüm TTK maddeleri ile, metiyonin açısından konyak gam, öğütülmüş makarna ve öğütülmüş bulgur harici tüm TTK maddeleri ile, tirozin açısından guar gam ve konyak gam harici tüm TTK maddeleri ile, lösin+izolösin açısından ksantan gam ve karboksimetil selüloz harici tüm TTK maddeleri ile ve fenilalanin açısından ise karboksimetil selüloz harici tüm TTK maddeleri ile istatistiksel anlamda farklılıklar içerdiği sonucuna varılmıştır. Proje kapsamında salep ve tüm TTK maddelerine aletsel, enzimatik ve kimyasal analizler uygulanmış ve böylelikle projenin 2. sıradaki hedefi olan bileşimlerin belirlenmesi hedefine ulaşılmıştır.

Taklit ve tağşiş tespitine yönelik en uygun kemometrik ve aletsel yöntem birleşimlerinin belirlenmesi çalışmalarında yönlendirmeli ve yönlendirmesiz sınıflandırma çalışmaları gerçekleştirilmiş ve salep ile TTK maddelerini ayırımı için yapılan tüm analizler birlikte değerlendirildiğinde özellikle amino asit analizlerindeki glutamik asit miktarının, elementel analizlerden çinko ve bakırın, organik asitlerden malik ve fumarik asidin ve enzimatik analizlerden ise glikomannan düzeylerinin diğer analizlere göre oldukça baskın şekilde sınıflandırmada etkilerinin oldukları belirlenmiştir. Analizlerden elde edilen verilere kemometrik yöntemler uygulanarak salep taklit ve tağşişinin belirlenmesinde önemli olan analitik parametreler belirlenmesiyle projenin 3. sıradaki hedefi gerçekleştirilmiştir.

Bu bilgiler ışığında homojen toz karışımlardaki salep oranlarının belirlenmesi amacıyla piyasada toz salep içeceği olarak satılan ürünlerdeki ortalama bir reçete göz önünde bulundurularak farklı oranlarda gerçek salep içeren 40 farklı reçete oluşturulmuş ve elde edilen reçeteler %0-%10 ve %0-%100 salep oranları olmak üzere iki grupta sınıflandırılarak salep ile TTK maddeleri arasındaki ayırmada önemli bulunan parametreler yönlerinden analiz edilmişlerdir. Elde edilen analitik bulgular, karışımdaki gerçek salep miktarı ile ilişkilendirilerek ilave edilen salep ile analitik parametre arasındaki doğrusallık incelenmiştir. Bu kapsamda gerçekleştirilen çalışmalarda, enzimatik analiz parametrelerinden glikomannan ve toplam nişastanın, kızılötesi spektrumların, elementel bileşenlerden demir, mangan, bakır, kobalt ve galyumun; izotop bileşenlerinden ¹³C/¹²C oranının, organik asit bileşenlerinden malik ve fumarik asitlerin ve aminoasit bileşiklerinden ise sistein hariç tüm aminoasit parametrelerinin %0-%100 oranlarındaki salep miktarı ile önemli düzeyde doğrusal sonuçlar ürettiği belirlenmiştir.

Ayrıca %0-%10 aralığında gerçek salep içeren reçetelerde ise enzimatik analiz parametrelerinden glikomannan ve toplam nişastanın, elementel bileşenlerden mangan ve kobaltın, organik asit bileşenlerinden malik asitin ve aminoasit bileşiklerinden ise lizin, histidin, arjinin, prolin, valin, tirozin, lösin + izölösün ve fenilalanin parametrelerine ait değerlerin karışımdaki gerçek salep oranı ile yüksek düzeyde ($r^2 > 0,90$) doğrusal olduğu sonucuna varılmıştır.

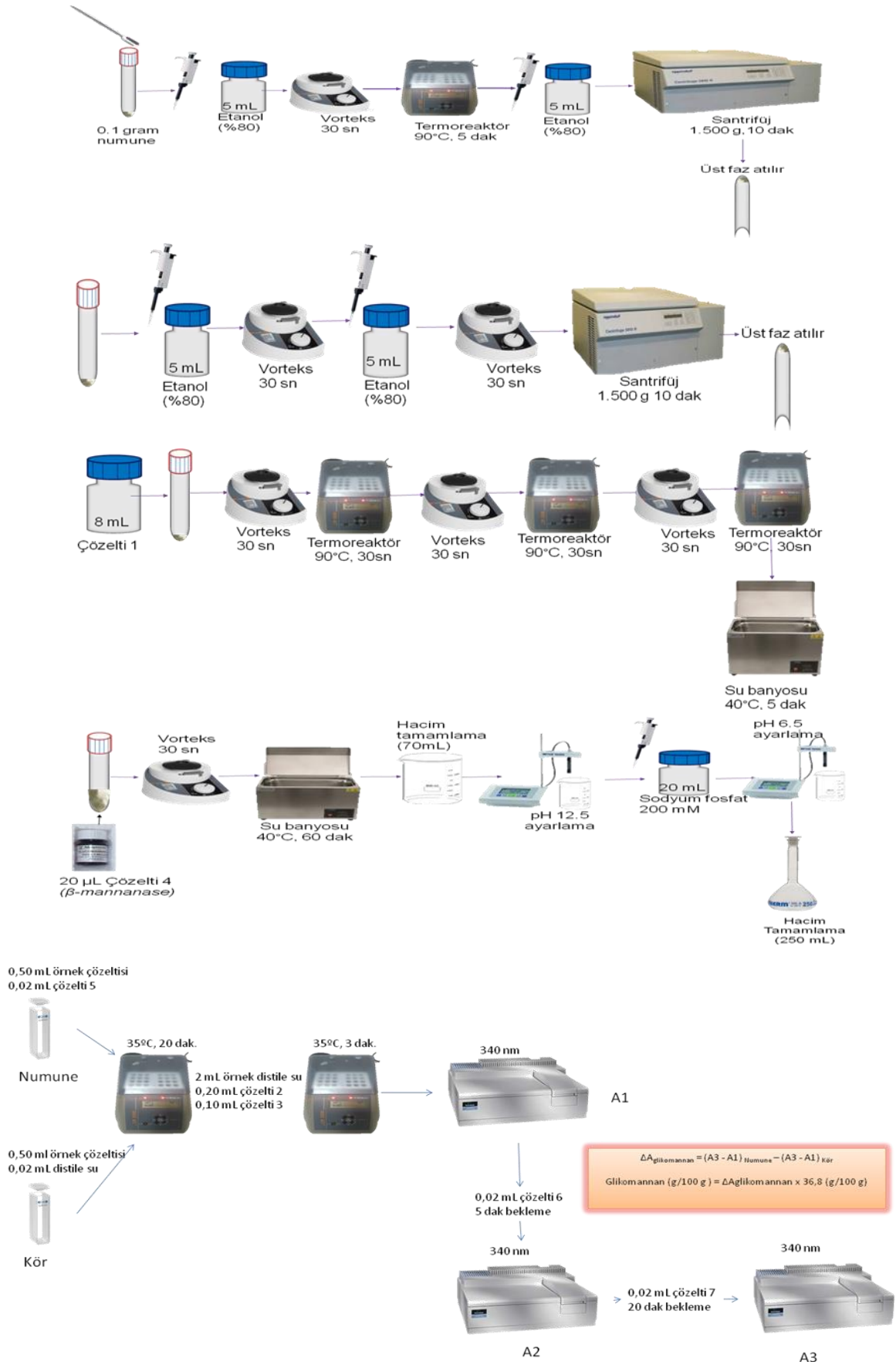
Salep ile TTK maddeleri arasında hızlı ve ekonomik bir yöntemin geliştirilmesi amacıyla çok değişkenli ölçümlene ve modelleme çalışmaları FTIR cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda PLS ve GILS modellemeleri gerçekleştirilmiş ve doğrulama seti ile bu modeller test edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre. GILS yönteminin PLS yöntemine kıyasla daha düşük SEC ve SEP değerleri sağladığı ve artıkların daha dar bir aralıkta dağıldığı görülmüş olup, bu modelle yapılan çalışmalarda bileşiminde salep oranı bilinmeyen toz numunelerdeki salep miktarlarının $\pm\%5,76$ hata payı ile belirlenebileceği sonucuna varılmıştır.

Elde edilen bulgulara göre; salep ve TTK maddeleri arasındaki ayrımın belirlenmesinde; şayet toz karışımdaki salep miktarı gerçek salep adı altında satışa sunulan ürünlerde olduğu gibi yaklaşık bir değerle ifade edilmek isteniliyorsa FTIR cihazı kullanılarak geliştirilen modelin kullanılabilmesi; şayet toz karışımda oldukça düşük düzeylerde bir salep oranından söz ediliyorsa (piyasada satılan toz salep içecekleri gibi) karışımın glikomannan düzeyinin veya amino asit bileşimlerinin incelenmesi önem arz etmektedir. Bu açıdan toz karışımdaki gerçek salep miktarının belirlenmesinde incelenmesi gereken en önemli amino asit bileşenleri fenilalanin, lösin+izölösün, lizin arjinin ve histidin amino asitleridir. Proje kapsamında gerçekleştirilen kemometrik çalışmalarda belirtilen amino asitler kullanılarak hazırlanan ILS modelinin regresyon eşitliği aşağıdaki şekilde oluşturulmuştur:

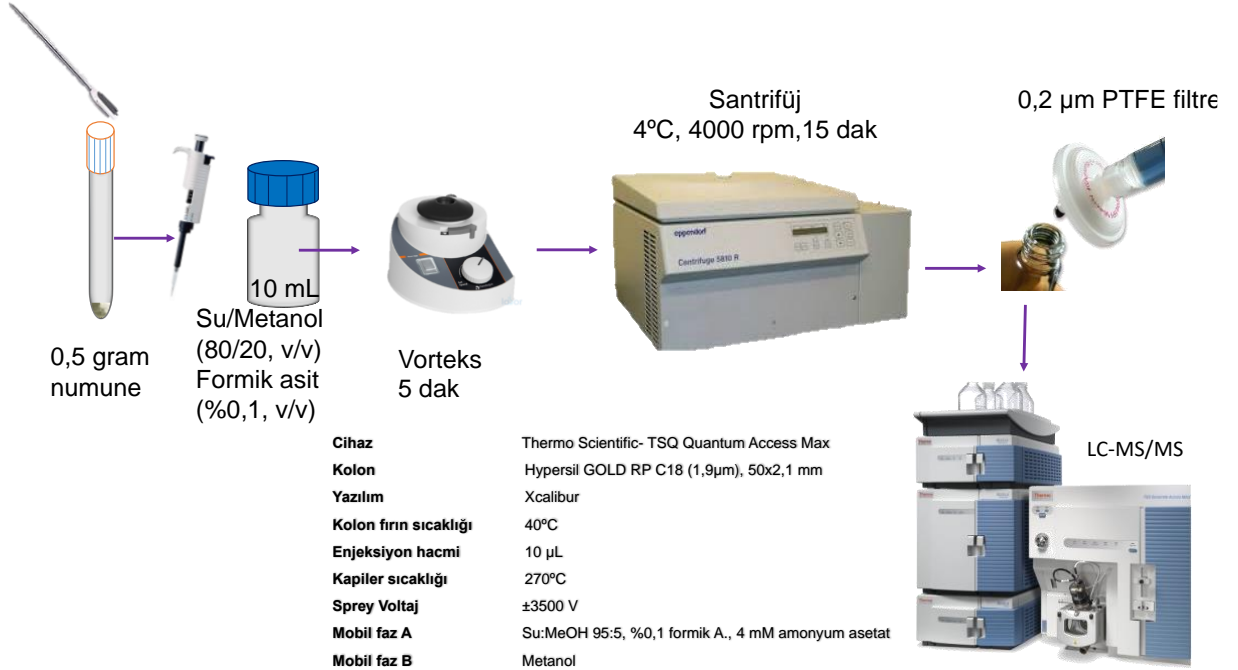
$$\text{Numunedeki Salep Miktarı (\%)} = [\text{Fenilalanin (mg/kg)} * 0,275] - [\text{Lösin+İzölösün (mg/kg)} * 0,153] + [\text{Lizin (mg/kg)} * 0,079] + [\text{Arjinin (mg/kg)} * 0,027] - [\text{Histidin (mg/kg)} * 0,331] - 0,553$$

Bu bilgiler ışığında salep ve TTK maddelerinin ayrımı konusunda ön plana çıkan analitik yöntemler belirlenmiştir. Proje kapsamında sadece ön plana çıkan yöntemler değil aynı zamanda kullanılan tüm yöntemlerin doğrulaması yapılmıştır. Bu nedenle projenin 4. Sıradaki hedefi olan karışım örneklerde öne çıkan yöntemlerin doğrulamasına ilişkin hedefe ulaşılmıştır.

Salep ve TTK maddelerinin ayrımı konusunda öne çıkan yöntemlerden olan glukomannan ve amino asit bileşenleri analizi için hazırlanan iş akış şemaları Şekil 60 ve Şekil 61'de sunulmuştur.



Şekil 60. Glukomannan analizi iş akış şeması



Şekil 61. Amino asit analizi iş akış şeması

Önerilen yöntemler kullanılarak gerçekleştirilen piyasa izleme çalışmalarında 40 farklı markaya ait salep toz içecek numunesi ile gerçek salep adı altında satışa sunulan 20 farklı ürün karışımlardaki salep oranları açısından incelenmiş ve önerilen yöntemlerin piyasa izleme çalışmalarında kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Böylelikle piyasa izleme çalışmalarını konu alan 5. Hedefe de ulaşılmış bulunmaktadır.

6. KAYNAKLAR

- Aktaş. N., Kaya. M. 2001. Detection of Beef Body Fat and Margarine in Butterfat by Differential Scanning Calorimetry. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 66(3):795-801.
- Alonso-Sande. M., Teijeiro-Osorio. D., Remuñán-López. C., Alonso. M. J. 2009. Glucomannan, a promising polysaccharide for biopharmaceutical purposes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 72(2):453-462.
- Altan. S., Altan. T., Ortaş. İ., Sandal. G., Akpınar. Ç. 2007. Çukurova Bölgesin'de saleplerin doğal yayılış alanlarının ve yetiştirme ortamı koşullarının saptanması üzerine araştırmalar. TÜBİTAK TOVAG Proje 104O132:88.
- Andrade-Mahecha. M. M., Tapia-Blácido. D. R., Menegalli. F. C. 2012. Physical–chemical, thermal, and functional properties of achira (*Canna indica* L.) flour and starch from different geographical origin. *Starch - Stärke* 64(5):348-358.
- Anonim. 1989. Soğanlı. Yumrulu ve Rizomlu Süs Bitkilerinin Üretimi ve ihracına Ait Yönetmelik değişikliği. *Resmi Gazete*, 20091989-20288.
- Anonim. 2011a. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği. Gıda Maddelerinin Genel Etiketleme Yönetmeliği. *Resmi Gazete*, 29112011-28157.
- Anonim. 2011b. Doğal Çiçek Soğanlarının 2012 İhracatı Listesi. *Resmi Gazete*, 25112011-28123.
- Anonim. 2014a. Doğal Çiçek Soğanlarının 2015 Yılı İhraç Listesi Hakkında Tebliğ (TEBLİĞ NO: 2014/56). Gıda. Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı.
- Anonim. 2014b. Salep Eylem Planı 2014-2018. TC Orman ve Su İşleri Bakanlığı. Orman Genel Müdürlüğü:36.
- Araujo. P. 2009. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *Journal of Chromatography B* 877(23):2224-2234.
- Arslan. N. 2011. Salep Orkideleri. *Gıda Hattı Dergisi* 34:68-69.
- Aybeke. M., Sezik. E., Olgun. G. 2010. Vegetative anatomy of some Ophrys. Orchis and Dactylorhiza (Orchidaceae) taxa in Trakya region of Turkey. *Flora - Morphology. Distribution. Functional Ecology of Plants* 205(2):73-89.
- Benincasa. C., Lewis. J., Perri. E., Sindona. G., Tagarelli. A. 2007. Determination of trace element in Italian virgin olive oils and their characterization according to geographical origin by statistical analysis. *Analytica Chimica Acta* 585(2):366-370.
- Brereton. R. G. 2003. Signal Processing. *Chemometrics: John Wiley & Sons. Ltd.* p 119-181.

- Brereton. R. G. 2009. Preprocessing. *Chemometrics for Pattern Recognition*: John Wiley & Sons. Ltd. p 107-176.
- Bulut-Solak. B., Alonso-Miravalles. L., O'Mahony. J. A. 2017. Composition, morphology and pasting properties of *Orchis anatolica* tuber gum. *Food hydrocolloids* 69:483-490.
- Cengiz. M. F., Durak. M. Z., Ozturk. M. 2014. In-house validation for the determination of honey adulteration with plant sugars (C4) by Isotope Ratio Mass Spectrometry (IR-MS). *LWT - Food Science and Technology* 57(1):9-15.
- Champagne. A. B., Emmel. K. V. 2011. Rapid screening test for adulteration in raw materials of dietary supplements. *Vibrational Spectroscopy* 55(2):216-223.
- Chatziantoniou. S. E., Triantafillou. D. J., Karayannakidis. P. D., Diamantopoulos. E. 2014. Traceability monitoring of Greek extra virgin olive oil by Differential Scanning Calorimetry. *Thermochimica Acta* 576(0):9-17.
- Cheajesadagul. P., Arnaudguilhem. C., Shiwatana. J., Siripinyanond. A., Szpunar. J. 2013. Discrimination of geographical origin of rice based on multi-element fingerprinting by high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry. *Food Chemistry* 141(4):3504-3509.
- Chiavaro. E., Vittadini. E., Rodriguez-Estrada. M. T., Cerretani. L., Bendini. A. 2008. Differential scanning calorimeter application to the detection of refined hazelnut oil in extra virgin olive oil. *Food Chemistry* 110(1):248-256.
- Chudzinska. M., Baralkiewicz. D. 2010. Estimation of honey authenticity by multielements characteristics using inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) combined with chemometrics. *Food and Chemical Toxicology* 48(1):284-290.
- Cordella. C., Militão. J. S. L. T., Clément. M.-C., Drajnudel. P., Cabrol-Bass. D. 2005. Detection and quantification of honey adulteration via direct incorporation of sugar syrups or bee-feeding: preliminary study using high-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) and chemometrics. *Analytica Chimica Acta* 531(2):239-248.
- Çağlayan. K., Özavcı. A., Eskalen. A. 1998. Doğu Akdeniz Bölgesinde Yaygın Olarak Yetişen Bazı Salep Orkidelerinin Embriyo Kültürü Kullanılarak In Vitro Koşullarda Çoğaltılmaları. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 22:187-191.
- D'Archivio. A. A., Giannitto. A., Incani. A., Nisi. S. 2014. Analysis of the mineral composition of Italian saffron by ICP-MS and classification of geographical origin. *Food Chemistry* 157(0):485-489.
- de Jong. S. 1993. SIMPLS: An alternative approach to partial least squares regression. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 18(3):251-263.

- Di Anibal. C. V., Odena. M., Ruisánchez. I., Callao. M. P. 2009. Determining the adulteration of spices with Sudan I-II-III-IV dyes by UV-visible spectroscopy and multivariate classification techniques. *Talanta* 79(3):887-892.
- Domingues. D. S., Pauli. E. D., de Abreu. J. E. M., Massura. F. W., Cristiano. V., Santos. M. J., Nixdorf. S. L. 2014. Detection of roasted and ground coffee adulteration by HPLC by amperometric and by post-column derivatization UV-Vis detection. *Food Chemistry* 146(0):353-362.
- Dong. M. W. 2006. Regulatory Aspects of HPLC Analysis: HPLC System and Method Validation. *Modern HPLC for Practicing Scientists: John Wiley & Sons. Inc.* p 221-241.
- Dutra. S. V., Adami. L., Marcon. A. R., Carnieli. G. J., Roani. C. A., Spinelli. F. R., Leonardelli. S., Vanderlinde. R. 2013. Characterization of wines according the geographical origin by analysis of isotopes and minerals and the influence of harvest on the isotope values. *Food Chemistry* 141(3):2148-2153.
- Erzurumlu. G. S., Doran. İ. 2011. Türkiye’de Salep Orkideleri ve Salep Kültürü. *Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 15(1):29-34.
- Esslinger. S., Riedl. J., Fauth-Hassek. C. 2014. Potential and limitations of non-targeted fingerprinting for authentication of food in official control. *Food Research International* 60(0):189-204.
- Farhoosh. R., Riazi. A. 2007. A compositional study on two current types of salep in Iran and their rheological properties as a function of concentration and temperature. *Food Hydrocolloids* 21(4):660-666.
- Flores. P., Hellín. P., Fenoll. J. 2012. Determination of organic acids in fruits and vegetables by liquid chromatography with tandem-mass spectrometry. *Food Chemistry* 132(2):1049-1054.
- Gallardo-Velázquez. T., Osorio-Revilla. G., Loa. M. Z.-d., Rivera-Espinoza. Y. 2009. Application of FTIR-HATR spectroscopy and multivariate analysis to the quantification of adulterants in Mexican honeys. *Food Research International* 42(3):313-318.
- Geladi. P., Kowalski. B. R. 1986. Partial least-squares regression: a tutorial. *Analytica Chimica Acta* 185:1-17.
- Gok. S., Severcan. M., Goormaghtigh. E., Kandemir. I., Severcan. F. 2015. Differentiation of Anatolian honey samples from different botanical origins by ATR-FTIR spectroscopy using multivariate analysis. *Food Chemistry* 170(0):234-240.

- González-Martín. M. I., Wells Moncada. G., González-Pérez. C., Zapata San Martín. N., López-González. F., Lobos Ortega. I., Hernández-Hierro. J.-M. 2014. Chilean flour and wheat grain: Tracing their origin using near infrared spectroscopy and chemometrics. *Food Chemistry* 145(0):802-806.
- Gonzalez. A., Armenta. S., de la Guardia. M. 2009. Trace-element composition and stable-isotope ratio for discrimination of foods with Protected Designation of Origin. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 28(11):1295-1311.
- Gönülşen. N., Önal. M. K., Ercan. N., Yıldızgördü. K., Şekeroğlu. E., Biçici. M., Eskalen. A. 1996. Ege ve Doğu Akdeniz Bölgesi'nde doğal yayılış gösteren Orchidaceae familyasına ait bazı türlerin in vitro ve in vivo koşullarda üretimleri üzerinde araştırmalar. *TÜBİTAK TBGAG Proje* 52:33.
- Gurdeniz. G., Ozen. B. 2009. Detection of adulteration of extra-virgin olive oil by chemometric analysis of mid-infrared spectral data. *Food Chemistry* 116(2):519-525.
- Gümüş, 2009. Batı Karadeniz Bölgesi'nde Salep Elde Edilmesinde Kullanılan Bazı Orkide Türlerinin (*Orchidaceae*) Çoğaltım Yöntemleri Üzerinde Araştırmalar. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 200s.
- Gümüş. C., Ellialtıoğlu. Ş. 2012. Salep Bitkisinin Doku Kültürüyle Çoğaltımı ve Arazi Koşullarına Aktarım Çalışmaları. Orkide ve Salep Çalıştayı, 25-26 Nisan 2012. Menemen. İzmir.
- Heussen. P. 2011. Practical Food Applications of Differential Scanning Calorimetry (DSC). Perkin Elmer Application Note:1-4.
- Hossain. M. M. 2011. Therapeutic orchids: traditional uses and recent advances — An overview. *Fitoterapia* 82(2):102-140.
- Husted. S., Persson. D. P., Laursen. K. H., Hansen. T. H., Pedas. P., Schiller. M., Hegelund. J. N., Schjoerring. J. K. 2011. Review: The role of atomic spectrometry in plant science. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 26(1):52-79.
- Jawaid. S., Talpur. F. N., Sherazi. S. T. H., Nizamani. S. M., Khaskheli. A. A. 2013. Rapid detection of melamine adulteration in dairy milk by SB-ATR–Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry* 141(3):3066-3071.
- Jones. D. 1998. Organic acids in the rhizosphere – a critical review. *Plant and Soil* 205(1):25-44.
- Kasperek. M., Grimm. U. 1999. European trade in Turkish Salep with special reference to Germany. *Econ Bot* 53(4):396-406.

- Kaya. S., Tekin. A. R. 2001. The effect of salep content on the rheological characteristics of a typical ice-cream mix. *Journal of Food Engineering* 47(1):59-62.
- Kivrak. I. 2015. Chemical constituents: water-soluble vitamins, free amino acids and sugar profile from *Ganoderma adspersum*. *Natural product research* 29(6):518-523.
- Kreutz. K., Çolak. A. H. 2011. Türkiye Orkideleri (Botanik Özellikleri. Ekolojik İstekleri. Doğal Yayılış Alanları. Yaşam Tehditleri. Koruma Önlemleri. Rota Yayınları:855.
- Kuś. P. M., van Ruth. S. 2015. Discrimination of Polish unifloral honeys using overall PTR-MS and HPLC fingerprints combined with chemometrics. *LWT - Food Science and Technology*(0).
- Lalika. M. C., Dorah. H. M., Urio. P., Gimbic. D. M., Stewart. J. 2013. Domestication potential and nutrient composition of wild orchids from two southern regions in Tanzania. *Time Journals of Biological Sciences and Technology* 1(1):1-11.
- Li, W., Xiao, X., Zhang, W., Zheng. J., Luo, Q., Ouyang. S., Zhang. G. 2014. Compositional, morphological, structural and physicochemical properties of starches from seven naked barley cultivars grown in China. *Food Research International* 58(0):7-14.
- Liu. J., Wen. Y., Dong. N., Lai. C., Zhao. G. 2013. Authentication of lotus root powder adulterated with potato starch and/or sweet potato starch using Fourier transform mid-infrared spectroscopy. *Food Chemistry* 141(3):3103-3109.
- Lohumi. S., Lee. S., Lee, W.-H., Kim. M. S., Mo. C., Bae. H., Cho. B.-K. 2014. Detection of Starch Adulteration in Onion Powder by FT-NIR and FT-IR Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62(38):9246-9251.
- Luo. D., Dong. H., Luo. H., Xian. Y., Wan. J., Guo, X., Wu. Y. 2015. The application of stable isotope ratio analysis to determine the geographical origin of wheat. *Food Chemistry* 174(0):197-201.
- Maggio. R. M., Cerretani. L., Chiavaro. E., Kaufman. T. S., Bendini. A. 2010. A novel chemometric strategy for the estimation of extra virgin olive oil adulteration with edible oils. *Food Control* 21(6):890-895.
- Nicolaou. N., Xu. Y., Goodacre. R. 2010. Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis for the detection and quantification of different milk species. *Journal of Dairy Science* 93(12):5651-5660.
- Ordoudi. S. A., de los Mozos Pascual. M., Tsimidou. M. Z. 2014. On the quality control of traded saffron by means of transmission Fourier-transform mid-infrared (FT-MIR) spectroscopy and chemometrics. *Food Chemistry* 150(0):414-421.

- Ortiz. R. S., Mariotti. K. d. C., Fank. B., Limberger. R. P., Anzanello. M. J., Mayorga. P. 2013. Counterfeit Cialis and Viagra fingerprinting by ATR-FTIR spectroscopy with chemometry: Can the same pharmaceutical powder mixture be used to falsify two medicines? *Forensic Science International* 226(1–3):282-289.
- Özdemir. D. 2005. Determination of Octane Number of Gasoline Using Near Infrared Spectroscopy and Genetic Multivariate Calibration Methods. *Petroleum Science and Technology* 23(9-10):1139-1152.
- Pauli. E. D., Barbieri. F., Garcia. P. S., Madeira. T. B., Acquaro Junior. V. R., Scarminio. I. S., da Camara. C. A. P., Nixdorf. S. L. 2014. Detection of ground roasted coffee adulteration with roasted soybean and wheat. *Food Research International* 61(0):112-119.
- Pilgrim. T. S., Watling. R. J., Grice. K. 2010. Application of trace element and stable isotope signatures to determine the provenance of tea (*Camellia sinensis*) samples. *Food Chemistry* 118(4):921-926.
- Primrose. S., Woolfe. M., Rollinson. S. 2010. Food forensics: methods for determining the authenticity of foodstuffs. *Trends in Food Science & Technology* 21(12):582-590.
- Regueiro. J., Vallverdu-Queralt. A., Simal-Gandara. J., Estruch. R., Lamuela-Raventos. R. 2013. Development of a LC-ESI-MS/MS approach for the rapid quantification of main wine organic acids in human urine. *J Agric Food Chem* 61(27):6763-6768.
- Reis. N., Franca. A. S., Oliveira. L. S. 2013. Performance of diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy and chemometrics for detection of multiple adulterants in roasted and ground coffee. *LWT - Food Science and Technology* 53(2):395-401.
- Ribotta. P. D., León. A. E., Añón. M. a. C. 2003. Effect of freezing and frozen storage on the gelatinization and retrogradation of amylopectin in dough baked in a differential scanning calorimeter. *Food Research International* 36(4):357-363.
- Rodushkin. I., Baxter. D. C., Engström. E., Hoogewerff. J., Horn. P., Papesch, W., Watling. J., Latkoczy. C., van der Peijl. G., Berends-Montero. S., Ehleringer. J., Zdanowicz. V. 2011. Elemental and isotopic characterization of cane and beet sugars. *Journal of Food Composition and Analysis* 24(1):70-78.
- Ruiz-Matute. A. I., Weiss. M., Sammataro. D., Finely. J., Sanz. M. L. 2010. Carbohydrate Composition of High-Fructose Corn Syrups (HFCS) Used for Bee Feeding: Effect on Honey Composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(12):7317-7322.

- Sanvido. G. B., Garcia. J. S., Corilo. Y. E., Vaz. B. G., Zacca. J. J., Cosso. R. G., Eberlin. M. N., Peter. M. G. 2010. Fast Screening and Secure Confirmation of Milk Powder Adulteration with Maltodextrin via Electrospray Ionization–Mass Spectrometry [ESI(+)-MS] and Selective Enzymatic Hydrolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(17):9407-9412.
- Sezik. E. 1967. Türkiye'nin salepgilleri: ticari salep çeşitleri ve özellikle Muğla salebi üzerinde araştırmalar.
- Sezik. E. 1984. Orkidelerimiz; Türkiye'nin Orkideleri. *Sandoz Kültür Yayınları* 6:166.
- Sezik. E. 2002. Destruction and Conservation of Turkish Orchids. In: Şener B, editor. *Biodiversity: Springer US*. p 391-400.
- Sezik. E., Baykal. T. 1991. Maras Salebinin Menşei. *Tübitak Doğa-Tr J of Pharmacy* 1:10-16.
- Sezik. E., İşler. S., Güler. N., Orhan. Ç., Aybeke. M., Deniz. İ. G., Üstün. O. 2007. Salep ve Orkidelerin Tahribi. *TÜBİTAK TBAG-ÇSEK/23 No. 103T008*:125.
- Sezik. E., Özer. B. Y. 1983. Kastamonu Salebinin Menşei ve Kastamonu Civarı Orkideleri. *TÜBİTAK TBAG Projesi* 424(60).
- Sezik. E., Özer. B. Y. 1988. Maraş Salebinin Menşei ve Maraş Civarı Orkideleri. *TÜBİTAK TBAG Projesi* 664:64.
- Sun. D.-W. 2008. *Modern techniques for food authentication: Academic Press*.
- Şimşek. A., Artık. N., Baspınar. E. 2004. Detection of raisin concentrate (Pekmez) adulteration by regression analysis method. *Journal of Food Composition and Analysis* 17(2):155-163.
- Tamer. C. E., Karaman. B., Copur. O. U. 2006. A Traditional Turkish Beverage: Salep. *Food Reviews International* 22(1):43-50.
- Tanker. N., Koyuncu. M., Coşkun. M. 2007. *Farmasötik Botanik. Ankara Üniversitesi Eczacılık Yayınları* 93:434.
- Taverniers. I., De Loose. M., Van Bockstaele. E. 2004. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 23(8):535-552.
- Tekinşen. K. K., Güner. A. 2010. Chemical composition and physicochemical properties of tubera salep produced from some Orchidaceae species. *Food Chemistry* 121(2):468-471.
- Tosun. M. 2014. Detection of adulteration in mulberry pekmez samples added various sugar syrups with ¹³C/¹²C isotope ratio analysis method. *Food Chemistry* 165(0):555-559.

- van Wetten. I. A., van Herwaarden. A. W., Splinter. R., Boerrigter-Eenling. R., van Ruth. S. M. 2015. Detection of sunflower oil in extra virgin olive oil by fast differential scanning calorimetry. *Thermochimica Acta*(0).
- Wang. S., Zhou. B., Wang. Y., Li. B. 2015. Preparation and characterization of konjac glucomannan microcrystals through acid hydrolysis. *Food Research International* 67(0):111-116.
- Wu. Y., Luo. D., Dong. H., Wan. J., Luo. H., Xian. Y., Guo. X., Qin. F., Han. W., Wang. L., Wang. B. 2015. Geographical origin of cereal grains based on element analyser-stable isotope ratio mass spectrometry (EA-SIRMS). *Food Chemistry* 174(0):553-557.
- Xu. L., Shi. W., Cai. C.-B., Zhong. W., Tu. K. 2015. Rapid and nondestructive detection of multiple adulterants in kudzu starch by near infrared (NIR) spectroscopy and chemometrics. *LWT - Food Science and Technology*(0).
- Yilmaz. M. T., Tatlisu. N. B., Toker. O. S., Karaman. S., Dertli. E., Sagdic. O., Arici. M. 2014. Steady, dynamic and creep rheological analysis as a novel approach to detect honey adulteration by fructose and saccharose syrups: Correlations with HPLC-RID results. *Food Research International* 64(0):634-646.
- Yousfi. S., Serret. M. D., Voltas. J., Araus. J. L. 2010. Effect of salinity and water stress during the reproductive stage on growth, ion concentrations, $\Delta^{13}C$, and $\delta^{15}N$ of durum wheat and related amphiploids. *Journal of Experimental Botany* 61(13):3529-3542.
- Zhao. H., Guo. B., Wei. Y., Zhang. B. 2013. Near infrared reflectance spectroscopy for determination of the geographical origin of wheat. *Food Chemistry* 138(2-3):1902-1907.

7. EKLER

Ek 1. FTIR spektrum kütüphanesi oluşturmak için kullanılan reçete bileşimleri

Ek 1. FTIR spektrum kütüphanesi oluşturmak için kullanılan reçete bileşimleri

| No | SLP | GUM | GAR | KBG | KJG | BNT | MNT | PAN | PIN | SKR | YST | VNL | TRC | OMK | OPR | OBL | BUN | GLT | SKA | CMC |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 2R001 | 0,240 | 0,000 | 0,000 | 1,345 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,374 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,356 | 0,000 | 0,685 | 0,000 |
| 2R002 | 4,645 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,355 |
| 2R003 | 1,956 | 0,000 | 0,000 | 1,337 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,073 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,904 | 0,000 | 0,000 | 1,731 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R004 | 2,933 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,142 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 3,159 | 0,766 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R005 | 3,141 | 2,650 | 1,209 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R006 | 2,171 | 0,510 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,217 | 1,337 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,765 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R007 | 3,195 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,580 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,431 | 0,000 | 0,000 | 0,793 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R008 | 0,539 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,884 | 0,000 | 0,000 | 1,070 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,478 | 0,000 | 2,029 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R009 | 2,734 | 0,000 | 0,000 | 0,827 | 0,000 | 0,792 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,648 |
| 2R010 | 1,187 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,084 | 1,468 | 0,000 | 0,882 | 0,000 | 0,000 | 1,379 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R011 | 1,980 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,264 | 2,717 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,851 | 0,188 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R012 | 1,106 | 1,734 | 0,000 | 0,532 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,021 | 0,000 | 0,000 | 2,606 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R013 | 2,007 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 4,993 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R014 | 0,756 | 0,000 | 2,726 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,503 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 3,015 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R015 | 0,404 | 0,000 | 0,018 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,935 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 3,643 |
| 2R016 | 2,164 | 0,000 | 2,463 | 0,000 | 0,000 | 0,714 | 0,000 | 0,492 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,167 | 0,000 | 0,000 |
| 2R017 | 4,199 | 0,000 | 0,000 | 2,801 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R018 | 1,831 | 0,000 | 0,000 | 2,677 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,396 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,096 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R019 | 3,037 | 0,000 | 0,000 | 3,963 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R020 | 3,436 | 1,785 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,779 | 0,000 | 0,000 |
| 2R021 | 0,608 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,129 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 4,263 | 0,000 |
| 2R022 | 2,956 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 4,044 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R023 | 1,764 | 0,000 | 0,215 | 0,000 | 0,844 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,077 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 4,101 |
| 2R024 | 2,155 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,744 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,934 | 0,000 | 1,167 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R025 | 2,128 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,221 | 0,000 | 0,000 | 2,535 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,116 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R026 | 1,618 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,685 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,697 |
| 2R027 | 1,148 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,887 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,023 | 1,185 | 0,000 | 0,000 | 0,756 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R028 | 1,894 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 3,396 | 0,000 | 0,783 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,927 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R029 | 2,402 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 4,598 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R030 | 0,625 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 3,314 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 3,061 | 0,000 |
| 2R031 | 2,260 | 0,000 | 0,000 | 3,290 | 0,000 | 1,450 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R032 | 1,342 | 0,000 | 2,297 | 0,000 | 1,919 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,442 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R033 | 6,754 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,246 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R034 | 1,180 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,596 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,406 | 1,340 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,477 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R035 | 1,581 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,469 | 3,950 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R036 | 3,740 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 3,260 | 0,000 | 0,000 |
| 2R037 | 2,313 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 4,687 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R038 | 0,983 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 6,017 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R039 | 2,972 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,099 | 0,000 | 2,930 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R040 | 1,403 | 2,539 | 0,000 | 0,000 | 1,347 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,711 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R041 | 0,957 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,150 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 4,638 | 0,000 | 1,255 | 0,000 | 0,000 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 2R042 | 2,962 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,080 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,958 | 0,000 |
| 2R043 | 2,608 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 4,392 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R044 | 2,466 | 0,000 | 0,512 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,770 | 2,252 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R045 | 3,597 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,704 | 0,756 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,364 | 0,000 | 0,580 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R046 | 1,203 | 0,000 | 1,813 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,843 | 0,000 | 1,246 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,896 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R047 | 4,280 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,720 |
| 2R048 | 1,075 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 3,012 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,913 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R049 | 2,722 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 4,278 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R050 | 0,956 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,112 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,709 | 2,223 | 0,000 | 0,000 |
| 2R051 | 3,965 | 0,000 | 0,000 | 2,227 | 0,129 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,679 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R052 | 2,279 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,987 | 0,000 | 0,000 | 1,497 | 0,874 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,363 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R053 | 5,599 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,401 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R054 | 1,237 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,427 | 0,000 | 3,032 | 0,000 | 0,000 | 1,303 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R055 | 0,254 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,926 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,614 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,072 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,134 |
| 2R056 | 1,318 | 1,460 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,769 | 0,000 | 3,453 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R057 | 4,215 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,222 | 0,000 | 0,000 | 2,109 | 0,454 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R058 | 1,977 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,462 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,666 | 0,895 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R059 | 4,534 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,466 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R060 | 2,475 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 4,525 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R061 | 2,622 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,826 | 0,000 | 1,552 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R062 | 1,174 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,822 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,276 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,728 |
| 2R063 | 3,001 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,224 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,774 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R064 | 3,554 | 0,004 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,647 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,794 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R065 | 4,252 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,194 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,554 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R066 | 5,293 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,707 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R067 | 2,722 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 3,382 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,895 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R068 | 2,108 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 4,224 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,668 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R069 | 1,559 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,531 | 0,000 | 0,000 | 1,635 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,275 |
| 2R070 | 4,650 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,350 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R071 | 2,452 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,115 | 0,000 | 0,000 | 1,325 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,108 |
| 2R072 | 1,792 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,877 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,395 | 1,054 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,882 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R073 | 1,322 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,472 | 0,000 | 1,067 | 0,000 | 1,110 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,029 | 0,000 |
| 2R074 | 4,431 | 0,000 | 0,000 | 2,569 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R075 | 2,470 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,498 | 0,000 | 2,032 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R076 | 0,263 | 0,000 | 0,000 | 2,415 | 1,488 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,360 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,474 |
| 2R077 | 3,577 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,392 | 1,032 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R078 | 0,981 | 2,779 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,788 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,452 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R079 | 2,544 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,113 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,440 | 1,903 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R080 | 1,761 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 3,637 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,602 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R081 | 0,512 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,590 | 1,873 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,776 | 0,000 | 2,249 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R082 | 0,580 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 3,432 | 0,000 | 2,988 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R083 | 0,641 | 0,000 | 0,000 | 2,650 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,403 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,306 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R084 | 0,478 | 0,000 | 0,666 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,381 | 0,000 | 0,000 | 1,738 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,737 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R085 | 4,220 | 0,000 | 2,780 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R086 | 2,002 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,752 | 0,000 | 0,000 | 0,001 | 2,004 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,240 |
| 2R087 | 1,237 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,099 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,237 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,427 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 2R134 | 0,672 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,070 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,122 | 0,000 | 2,135 |
| 2R135 | 1,134 | 0,000 | 0,000 | 0,527 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,936 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 4,403 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R136 | 4,437 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,563 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R137 | 2,092 | 0,000 | 0,000 | 0,113 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,491 | 0,000 |
| 2R138 | 2,615 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 4,385 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R139 | 1,490 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 5,390 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,120 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R140 | 2,688 | 0,000 | 0,000 | 1,488 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,871 | 0,000 | 1,953 | 0,000 |
| 2R141 | 1,678 | 0,000 | 0,983 | 0,000 | 0,000 | 1,507 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,915 | 0,000 | 0,000 | 0,917 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R142 | 2,993 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,232 | 1,775 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R143 | 0,877 | 0,000 | 0,554 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,463 | 0,000 | 1,494 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,612 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R144 | 2,215 | 3,817 | 0,000 | 0,968 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R145 | 2,344 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 3,930 | 0,000 | 0,726 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R146 | 2,375 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 4,069 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,556 | 0,000 |
| 2R147 | 4,728 | 2,272 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R148 | 1,949 | 1,741 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,714 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,597 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R149 | 3,521 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,652 | 1,827 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R150 | 4,448 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,135 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,416 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R151 | 6,556 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,444 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R152 | 2,241 | 2,275 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,551 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,584 | 0,349 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R153 | 1,035 | 5,965 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R154 | 1,381 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,016 | 1,565 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,351 | 0,687 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R155 | 3,941 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 3,059 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R156 | 2,376 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,247 | 0,000 | 2,377 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R157 | 0,970 | 0,000 | 2,657 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,948 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,425 | 0,000 | 0,000 |
| 2R158 | 0,758 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 4,379 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,863 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R159 | 2,055 | 1,008 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,114 | 1,878 | 0,000 | 1,945 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R160 | 4,095 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,905 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R161 | 2,696 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,379 | 3,285 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,641 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R162 | 1,242 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 5,758 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R163 | 2,934 | 4,066 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R164 | 0,904 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,195 | 0,000 | 0,000 | 3,900 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R165 | 1,280 | 2,072 | 1,102 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,546 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R166 | 1,222 | 0,000 | 0,000 | 2,874 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,905 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R167 | 0,374 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,938 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,190 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,498 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R168 | 1,218 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,085 | 3,697 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R169 | 2,246 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,229 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,462 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,063 |
| 2R170 | 0,143 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,598 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,260 | 0,000 | 0,000 | 2,967 | 0,000 | 1,032 | 0,000 | 0,000 |
| 2R171 | 0,306 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,902 | 2,243 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,549 |
| 2R172 | 0,567 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,570 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,420 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 3,443 | 0,000 | 0,000 |
| 2R173 | 1,993 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,437 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 3,570 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R174 | 3,723 | 2,553 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,724 |
| 2R175 | 3,006 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,311 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 3,612 | 0,000 | 0,071 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R176 | 1,860 | 0,000 | 0,000 | 1,055 | 0,000 | 1,787 | 0,000 | 0,000 | 2,298 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R177 | 0,464 | 0,000 | 0,000 | 4,574 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,962 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R178 | 3,366 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 3,634 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R179 | 1,680 | 3,984 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,256 | 0,000 | 0,000 | 1,081 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 2R226 | 0,004 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,241 | 0,000 | 0,000 | 2,003 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,013 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,739 | 0,000 |
| 2R227 | 2,538 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,541 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,920 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R228 | 3,095 | 0,000 | 0,000 | 1,318 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,766 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,821 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R229 | 0,039 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 3,747 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,108 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,106 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R230 | 2,475 | 1,147 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,145 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,484 | 0,000 | 1,749 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R231 | 2,346 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 3,953 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,468 | 0,233 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R232 | 1,805 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,876 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 3,319 | 0,000 |
| 2R233 | 1,593 | 0,000 | 0,000 | 0,389 | 0,000 | 1,849 | 0,000 | 2,612 | 0,557 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R234 | 5,393 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,607 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R235 | 2,555 | 0,000 | 1,139 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 3,306 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R236 | 1,653 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,329 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,373 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,120 | 0,000 | 0,000 | 0,525 |
| 2R237 | 1,604 | 0,000 | 5,396 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R238 | 2,171 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,241 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,859 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,082 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,647 |
| 2R239 | 1,232 | 0,000 | 1,932 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,837 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,999 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R240 | 1,571 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,569 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 3,860 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R241 | 0,758 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,662 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,370 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,211 |
| 2R242 | 2,568 | 0,000 | 4,164 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,268 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R243 | 1,324 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,025 | 0,000 | 1,177 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,473 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R244 | 1,163 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 5,837 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R245 | 4,109 | 0,000 | 0,000 | 0,149 | 2,498 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,244 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R246 | 1,204 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 1,471 | 1,971 | 0,000 | 1,610 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,744 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R247 | 0,619 | 0,000 | 1,779 | 0,000 | 0,000 | 1,832 | 0,000 | 0,000 | 0,437 | 0,000 | 0,000 | 2,333 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R248 | 4,579 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,421 |
| 2R249 | 0,290 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,767 | 0,000 | 0,000 | 2,340 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 3,603 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 2R250 | 2,920 | 1,724 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 2,356 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

| | |
|---|--|
| Proje Yürütücüsü: | Doç. Dr. MEHMET FATİH CENGİZ |
| Proje No: | 115O058 |
| Proje Başlığı: | Salebin Taklit ve Tağışının Belirlenmesinde Kullanılabilecek Hızlı Analiz Yöntem(ler)inin Geliştirilmesi |
| Proje Türü: | 1003 - Öncelikli Alanlar (2. Aşama) |
| Proje Süresi: | 24 |
| Araştırmacılar: | BARÇIN KARAKAŞ BUDAK, DURMUŞ ÖZDEMİR, CEVDET GÜMÜŞ, SERPİL KILIÇ |
| Danışmanlar: | EKREM SEZİK |
| Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: | AKDENİZ Ü. |
| Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: | 01/03/2016 - 01/07/2018 |
| Onaylanan Bütçe: | 496735.0 |
| Harcanan Bütçe: | 392197.48 |

TÜBİTAK

| | |
|---|---|
| <p>Öz:</p> | <p>Bu projenin amacı, toz salep ürününün hakiki olup olmadığının ortaya konulmasında veya tağşişe uğratılıp uğratılmadığının belirlenmesinde kullanılacak yenilikçi, hızlı, güvenilir ve ekonomik analiz yöntem(ler)inin geliştirilmesidir.</p> <p>Bu kapsamda, Türkiye'nin farklı bölgelerindeki salep toplama alanlarından salep yumruları toplanılmış ve tekniğine uygun olarak hazırlanarak gerçek olduğundan emin olunan salep tozları elde edilmiştir. Taklit ve tağşiş materyalleri ise gamlar, nişastalar, ticari katkılar ve diğer taklit/tağşiş maddeleri olmak üzere dört ana grupta sınıflandırılmış ve gruptaki malzemelerin her biri üç farklı tedarikçiden temin edilmiştir. Hazırlanan gerçek salep tozları ve taklit/tağşiş maddeleri temel analizler (rutubet, kül, protein ve indirgen şeker), enzimatik analizler (glikomannan ve toplam nişasta) ve aletsel analizler (elementel bileşimler, kızılötesi spektrumlar, izotop oranları, karbonhidrat bileşikler, organik asit bileşikler ve amino asit bileşikler) açısından analizlere tabi tutulmuş ve elde edilen sonuçlar kemometrik yöntemlerle değerlendirilerek incelenen parametrelerin salep ve taklit/tağşiş maddeleri arasındaki ayrımındaki doğru tahmin oranları belirlenmiştir.</p> <p>Salep ile taklit ve tağşiş maddeleri arasındaki ayrımın belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen tüm yöntemler değerlendirildiğinde; doğru tahmin oranları açısından sırasıyla amino asit, elementel, enzimatik, izotop, karbonhidrat, organik asit ve temel bileşenler analizlerinin önemli olduğu sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte, hızlı ve ekonomik bir yöntemin geliştirilmesi için FTIR cihazı kullanılarak çok değişkenli ölçümleme ve modelleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Belirtilen cihazla yapılan çalışmalarda, GILS modeli ile yapılan çalışmalarda bileşiminde salep oranı bilinmeyen toz numunelerdeki salep miktarlarının $\pm\%5,76$ hata payı ile ölçülebileceği tespit edilmiştir.</p> <p>Projenin sonraki aşamasında ayırım konusunda önemli bulunan yöntemler $\%0$-$\%100$ ve $\%0$-$\%10$ aralıklarında farklı oranlarda salep içerecek şekilde hazırlanmış karışımlarla denenerek yöntemlerdeki parametrelerin hangi düzeyde tespit sağlayabildiği ve tekrarlanabilirliği araştırılmıştır. Bu çalışmalarda, enzimatik analiz parametrelerinden glikomannan ve toplam nişastanın, elementel bileşenlerden Fe, Mn, Cu, Co ve Ga; izotop bileşenlerinden $^{13}C/^{12}C$ oranının, organik asit bileşenlerinden malik ve fumarik asitler ve aminoasit bileşiklerinden ise sistein hariç tüm aminoasit parametrelerinin $\%0$-$\%100$ oranlarındaki salep miktarı ile önemli düzeyde doğrusal sonuçlar ürettiği belirlenmiştir. Ayrıca, $\%0$-$\%10$ aralığında gerçek salep içeren reçetelerde ise enzimatik analiz parametrelerinden glikomannan ve toplam nişastanın, elementel bileşenlerden Mn ve Co, organik asit bileşenlerinden malik asitin ve aminoasit bileşiklerinden ise lizin, histidin, arjinin, prolin, valin, tirozin, lösin + izölösin ve fenilalanin parametrelerine ait değerlerin karışımdaki gerçek salep oranı ile yüksek düzeyde doğrusal olduğu belirlenmiştir. Salep ile taklit tağşiş maddeleri arası ayırmada öne çıkan en önemli parametre glikomannan olarak bulunmasına rağmen, gerçekleştirilen çok değişkenli regresyon analizi sonuçlarına göre; fenilalanin, lösin+izölösin, lizin, arjinin ve histidin birleşimin salep oranı bilinmeyen örneklerde kritik olduğu sonucuna varılmıştır. Belirtilen kombinasyonun regresyon formülünün kullanılması durumunda ise karışımdaki salep oranının $\pm\%1$ hassasiyetle belirlenebileceği mümkün görülmüştür.</p> <p>Proje sonucunda, ülkemizin profilini yansıtan salep numunelerinin enzimatik ve kimyasal analizleri gerçekleştirilerek kapsamlı bileşimleri açığa çıkarıldığı gibi, salep ve diğer taklit tağşiş maddeleri arasında önemli bulunan parametreler belirlenmiştir. Bu çerçevede geliştirilen yöntemlerin ilgili birimler tarafından kullanılması ile salebin yurt dışına çıkışının önlenmesi ve böylelikle endemik olan veya olmayan Türkiye orkidelerinin korunmasına katkıları sağlanması ümit edilmektedir.</p> |
| <p>Anahtar Kelimeler:</p> | <p>Gıda katkı maddesi, salep, taklit ve tağşiş, yöntem, kemometri.</p> |
| <p>Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:</p> | <p>Hayır</p> |
| <p>Projeden Yapılan Yayınlar:</p> | <p>1- Comparison of glucomannan and starch contents of Salep collected from five different regions of Turkey (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Sözlü Sunum), 2- Glucomannan Compositions Of Salep Powder For The Determination Of Salep And Its Adulteration (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Sözlü Sunum), 3- Compositions of amino acids in different varieties of salep tubers (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum), 4- Determination of salep adulteration with starches and gums using the DSC technique (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum),</p> |