

TAKVİYE EDİCİ GIDALARDA LC-MS/MS-TQ YÖNTEMİ İLE JELATİN TÜR TAYİNİ*

Nazan BİNGÖL YILMAZ^{1,2}, Selim SÜNNETÇİ¹, Oktay YEMİŞ^{2,3}**

¹İstanbul Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü, Tarım ve Orman Bakanlığı, Şenlikköy -Florya/-Bakırköy, İstanbul, Türkiye

²Sakarya Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Sakarya, Türkiye

³Sakarya Üniversitesi Araştırma ve Geliştirme Merkezi (SARGEM), Sakarya, Türkiye

Geliş / *Received* 18.06.2025; Kabul / *Accepted*: 08.09.2025; Online baskı / *Published online*: 30.09.2025

Bingöl Yılmaz, N., Sünnetçi S., Yemiş, O. (2025). Takviye edici gıdalarda LC-MS/MS-TQ yöntemi ile jelatin tür tayini. *GIDA* (2025) 50 (5) 825-845 doi: 10.15237/ gida.GD25078

Bingöl Yılmaz, N., Sünnetçi S., Yemiş, O. (2025). LC-MS/MS-TQ method for the determination of the origin of gelatine in food supplements. GIDA (2025) 50 (5) 825-845 doi: 10.15237/ gida.GD25078

ÖZ

Bu çalışmada hem ülkemizde hem de tüm dünyada tüketimi çok büyük boyutlara ulaşmış takviye edici gıdalarda, güvenilirlik ve hassasiyet açısından modern analitik bir teknik olan LC-MS/MS-TQ ile jelatin tür tayinine yönelik bir metod geliştirilmiştir. Validasyon çalışmalarında tespit limiti (LOD), hassasiyet, doğruluk, yanlış-pozitif, yanlış negatif ve güvenilirlik olmak üzere altı farklı parametre göz önünde bulundurulmuştur. Tespit limiti %0.012 olarak saptanan yöntemin hassasiyet, doğruluk, yanlış-pozitif, yanlış negatif ve güvenilirliğinin %100 olduğu belirlenmiştir. Valide edilen bu metod ile, piyasada satılan 8 adet yurtiçi ve 17 adet yurtdışı olmak üzere toplam 25 adet takviye edici gıdalarda jelatin tür tayini yapılmıştır. Türkiye menşeli ürünlerin etiketlerinde sığır jelatini olduğu belirtilmesine rağmen bir tanesinde domuz jelatini tespit edilmiş, bir tanesinde ise her iki tür de tespit edilememiştir. Buna karşın, yurtdışı menşeli sekiz adet ürünün etiketlerinde belirtilmemesine rağmen domuz jelatini tespit edilmiştir. Sonuçlar, söz konusu takviye edici gıdalarda jelatin tür tayininin düzenli olarak güvenilir metodlarla yapılmasının önemini ortaya koymuştur. Ayrıca, 37°C'de 16 saatlik enzimatik parçalamayı gerektiren ekstraksiyon işlemi, 15 dakika ultrasonik su banyosunda çözündürme ve daha sonra 15 dakika ultrasonik su banyosunda enzimatik parçalama işlemi ile sadece 30 dakika içinde tamamlanabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar kelimeler: Kütle spektrometresi, üçlü kuadropol, takviye edici gıdalar, kapsül, jelatin, domuz, sığır

LC-MS/MS-TQ METHOD FOR THE DETERMINATION OF THE ORIGIN OF GELATINE IN FOOD SUPPLEMENTS

ABSTRACT

In this study, a method for the determination of gelatin species in dietary supplements was developed by LC-MS/MS-TQ technique, which is at the highest level in terms of reliability and sensitivity. Six

* Bu makale, Nazan Bingöl Yılmaz'ın YL tezinin bir bölümü olup özeti Türkiye 15. Gıda Kongresinde (08-10 Ekim 2025, Sakarya) sözlü bildiri olarak sunulmuştur / *This paper is a part of MSc thesis of Nazan Bingöl Yılmaz and its summary was presented as an oral presentation at the 15th Turkish Food Congress (2025, October 08-10; Sakarya).*

****Yazışmalardan sorumlu yazar/Corresponding Author**

✉: oktayyemis@sakarya.edu.tr

☎ Tel: (+90) 264 295 3192

☎: (+90) 264 295 5601

Oktay Yemiş; ORCID no: 0000-0002-7461-5185

Nazan Bingöl Yılmaz; ORCID no: 0009-0002-3547-8381

Selim Sünnetçi; ORCID no: 0009-0003-8366-2156

parameters were taken into consideration during the validation studies: limit of detection (LOD), precision, accuracy, false-positive, false-negative and reliability. The developed method, which has a 0.012% limit of detection, demonstrated precision, accuracy, false-positive, false-negative, and reliability of 100%. The present study employed a validated method for the determination of gelatin species in a total of 25 dietary supplements (8 produced in Turkey and 17 imported) available on the market. The study revealed the presence of porcine gelatin in one of these supplements, despite the labels of Turkish supplements indicating the use of bovine gelatin. Furthermore, in one sample from this supplement group, the presence of both porcine and bovine gelatine was not detected. Porcine gelatine was identified in eight imported supplements, none of which declared it on their labels. The results of the study demonstrated the importance of regular determination of gelatin species in these dietary supplements by reliable methods. Furthermore, it was concluded that the extraction process, which requires 16 hours of enzymatic digestion at 37°C, can be completed in a reduced timeframe of 30 minutes by dissolving the sample in an ultrasonic water bath for 15 minutes and then undergoing enzymatic digestion in an ultrasonic water bath for a further 15 minutes.

Keywords: Mass spectrometry, triple quadrupole, supplements, capsule, gelatin, porcine, bovine

GİRİŞ

Jelatin, hayvanların bağ dokusundaki kolajenden asidik veya bazik hidroliz yolu ile üretilen, renksiz, kokusuz ve yarı saydam nitelikte yüksek saflıkta ticari bir proteindir (Baziwane ve He, 2003). Kolajen, başlıca sığır, domuz ve balık gibi hayvanların deri ve kemiklerinde bol miktarda bulunan bir bağ dokusudur. Bu bağ dokudan elde edilen biyopolimer, temelde kıvam artırıcı özelliği nedeniyle başta gıda endüstrisi (şekerlemeler, diyet takviyeleri) olmak üzere kozmetik (kremler, losyonlar, yüz maskeleri) ve farmasötik ürünlerde (ilaç kapsülleri) çok yaygın kullanılmaktadır (Boran, 2011). Bu temel özelliğinin yanında jelatin, sahip olduğu benzersiz yapısal stabilitesi, kendine özgü işlevsel ve teknolojik özellikleri ve diğer fiziko-kimyasal özellikleri sayesinde jelleştirici, bağlayıcı, kaplayıcı stabilize edici ve parlatici (glazing) ajan olarak çok fonksiyonlu bir gıda bileşenidir (Ahmad vd, 2017).

Günümüzde birçok üründe kullanılan bu bileşenin hangi kaynaktan elde edildiğinin doğru ve kesin bir şekilde ortaya konması başta dini hassasiyetler olmak üzere sağlık ve etik açıdan çok önemlidir. Müslümanlar ve Yahudiler, sahip oldukları inanç sisteminde dini kurallar gereği domuz ve domuz kaynaklı ürünleri tüketmezler. Bu nedenle, bir ürünün helal ya da koşer sertifikası alabilmesi için içerdiği jelatinin kaynağının belirlenmesi gereklidir (Mursyidi, 2013). Ayrıca tüm dünyada vegan beslenme tercihlerinin artması ile hayvansal bir ürün olan jelatinin kaynağından bağımsız şekilde tüketimi tercih edilmemektedir.

Bu bağlamda bir ürünün etiketi üzerinde jelatin kaynağının belirtilmesi yasal düzenlemelerin yerine getirilmesi açısından zorunludur. Ülkemizde bu konuda yasal düzenlemelerin en son hali, Tarım ve Orman Bakanlığı Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü tarafından 26/01/2017 tarihli 299660 sayılı Resmi Gazete’de yayınlanan Türk Gıda Kodeksi’nde (TGK) yer almaktadır. Hem Avrupa Birliği (AB) Gıda Mevzuatı’nda (1333/2008) hem de ülkemizde gıdaya ilişkin yasal düzenlemelerin olduğu Türk Gıda Kodeksinde (TGK) jelatin bir “gıda katkı maddesi” olarak değil, bir “gıda bileşeni” olarak tanımlanmaktadır (Anonim, 2008). Jelatin jelleştirici, kıvam artırıcı ve stabilizör gibi fonksiyonlara sahip olsa da gıda katkı maddeleri sınıfında yer almamakta ve dolayısı ile bir E koduna sahip değildir. Çoğu zaman sahip olduğu bu özellikler nedeniyle, bir gıda katkı maddesi gibi algılanmakta ve “Gıda Maddeleri Yönetmeliği” ne tabi olduğu düşünülmektedir. Oysa jelatin ile yasal düzenleme TGK Gıda Etiketleme ve Tüketicileri Bilgilendirme Yönetmeliği Ek-2 madde 7.1’de açıklanmıştır. Bu maddede, gıdada bileşen ve/veya bileşik bileşenin bileşeni olarak domuzdan elde edilen herhangi bir madde bulunuyorsa “*Domuzdan elde edilen ... içerir*” ifadesinin belirtilmesi zorunluluğu yer almaktadır (Anonim, 2017). Şu anda yürürlükte olan bu yasal düzenleme, jelatin kaynağının etiketin üzerinde net bir şekilde yazılma zorunluluğunu ortaya koymaktadır. Sağlık açısından ise, gıda ürünlerinde sığır jelatini tespiti deli dana hastalığı (Bovine Spongiform Encephalopathy, BSE) ile

ilişkili potansiyel riskler taşıması önemli bir endişe kaynağı olmaya devam etmektedir (Karim ve Bhat, 2008).

Takviye edici gıdalar, vitaminler, mineraller, aminoasitler, temel yağ asitleri, lif gibi besin öğelerini veya bunların dışında fizyolojik olarak etkileri bulunan biyoaktif maddeleri içeren yoğun besin kaynaklarıdır (Doğan vd., 2020). Günlük alım dozları olan bu ürünler, hap, tablet, kapsül ve sıvı formlarda normal diyeti desteklemek amacıyla kullanılır. Özellikle Covid-19 pandemisi ile beraber hem ülkemizde hem de tüm dünyada bu ürünlere olan talep çok ciddi boyutlara ulaşmıştır (Altun vd., 2021). Ağırlıklı olarak kapsül ve yumuşak şeker formunda bu ürünlerin üretiminde jelatin kullanılmaktadır. Farklı hayvansal kaynaklardan elde edilen jelatinlerden domuz jelatini, diğer hayvansal kaynaklı jelatinlere kıyasla üretimi kolay olup düşük üretim maliyetleri nedeniyle piyasada çok daha ucuza satılmaktadır (Jannat vd., 2018). Piyasada bulunan bazı takviye edici gıdalarda ve farmasötik ürünlerde kullanılan jelatinin kaynağına ilişkin yanlış veya eksik bilgilerle etiketlenmiş olabilir. Bu durum, içeriklerin durumu ve üretim sürecinin dini gereklilikleri karşılamaması nedeniyle, Yahudiler ve Müslümanlar için büyük bir sorun haline gelmiştir.

Jelatin kaynağının tam bir kesinlikle belirlenmesi, farklı türlerdeki kollajenlerin amino asit dizilimlerindeki benzerlik nedeniyle özellikle zordur. Bugüne kadar jelatin orijinin belirlenmesine yönelik PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) (Demirhan vd., 2012), ATR-FTIR (Attenuated Total Reflection- Fourier Transform Infrared) (Cebi vd., 2016), ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), (Doi vd., 2009), 2D-SDS-PAGE (Two-dimensional Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) (Tukiran vd., 2016) ve LC-MS/MS (Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry) (Xiao-Mei vd., 2019) analiz yöntemleri geliştirilmiştir. FTIR spektroskopisi tekniğinin, bir ekstraksiyon prosedürü olmadan örneklerin direkt olarak analiz edilebilmesi, analiz süresinin çok kısa olması, numunede tahribat yaratmaması, çok düşük miktarlarda, katı, sıvı, jel

gibi formlarda çalışılabilmesi gibi birçok avantajı vardır. Ancak bu teknikte elde edilen FTIR spektralarının karmaşık olmasından dolayı PCA (Principal Component Analysis), PLS (Partial Least Squares), HCA (Hierarchical Cluster Analysis) gibi kemometrik bir yöntem ile verilerin yorumlanması gerekmektedir (Rohman vd., 2020). Jelatin tür tayininde kullanılan yöntemlerden bir diğeri SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) tekniğidir. Proteinlerin sahip molekül ağırlıklarını tespitine dayanan bu teknikte jelatinin protein profili ortaya konabilir, ancak işlenmiş ürünlerde özellikle ısı uygulanmış materyallerde protein yapısının bozulmasında dolayı güvenilirliği düşüktür (Yap ve Gam, 2019). Protein bazı immünokimyasal yöntemlerden biri olan ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), gıda ve farmasötik ürünlerde hayvan orijinin tespitinde kullanılan en yaygın tekniktir. Antijen-antikor interaksyonu temeline dayanan bu yöntem hızlı ve hassas olmasına karşın, ısı işlem görmüş ürünlerde protein denatürasyonu nedeniyle yanlış sonuç verebilmektedir (Venien ve Leveux, 2005). RT-PCR (Real Time- Polymerase Chain Reaction), spesifik DNA dizilerinden jelatin tür tayininde kullanılan diğer bir yöntemdir. Bu yöntemin en büyük dezavantajı, jelatinin ısı işlem nedeniyle DNA'sının parçalanması durumunda yanlış-negatif sonuç vermesidir (Shabani vd., 2015; Grundy vd., 2016). Jelatin triptofan hariç tüm elzem aminoasitleri bünyesinde barındıran ve çoğu polisakkarit yapısındaki hidrokolloitlerden farklı bir kimyasal yapıya sahiptir. Jelatinin sahip olduğu aminoasit kompozisyonunda yer alan prolin ve hidroksiprolin miktarları domuz, sığır gibi elde edildiği kaynağa göre değişmektedir. Aminoasit kompozisyonundaki bu farklılık, molekül kütlesini belirlemeye yönelik çok yüksek bir hassasiyete sahip bir teknik olan LC-MS/MS-TQ ile belirlenebilmektedir. Bu yöntemde ilk önce jelatin ilgili matriksten (gıda, kapsül vb.) ekstrakte edilmekte ve daha sonra tripsin ile enzimatik parçalanarak spesifik peptitlere dönüştürülmektedir. Enzimatik parçalanma ile açığa bu spesifik peptitler, sıvı kromatografisinde ayrılmakta ve kütle detektörü ile sahip oldukları kütleler belirlenmektedir. Elde edilen kütle

verileri, çeşitli lisanslı veri tabanlarında taranarak tanımlama yapılmaktadır. Jelatin tür tayininde diğer yöntemlere kıyasla bu yöntemin en büyük avantajı, ısıl işlem görmüş ürünlerde dahi yüksek doğrulukta sonuçlar alınabilmesidir (Deng vd., 2020; Rohman vd., 2020). Bu çalışmanın temel amacı, bu teknikler içerisinde güvenilirlik ve hassasiyet açısından en üst düzeyde olan LC-MS/MS-TQ (Liquid Chromatography- Mass Spectrometry/Mass Spectrometry- Triple Quadrupole) tekniği ile takviye edici gıdalarda jelatin tür tayinine yönelik bir metot geliştirilmesidir.

MATERYAL ve YÖNTEM

Takviye edici gıdalar

Araştırmada materyal olarak Türkiye’de üretilen ve yurtdışından ithal edilen kapsül formdaki ve yumuşak şeker formdaki 25 çeşit takviye edici gıda örneği kullanılmıştır. Analiz çalışmalarında bu örneklerin jelatin kısımları kullanılmıştır. İçerisindeki etken maddelerden fiziksel olarak ayırma yapılarak iyice temizlenen numunelerin jelatin kısımları analiz çalışmalarına hazır hale getirilmiştir. Bu hazırlık sırasında sert kapsüllere doldurulan toz maddeler boşaltılarak amonyum bikarbonat çözeltisi ile kapsüller temizlenmiştir. Yumuşak kapsüllerde de benzer şekilde sıvı kısım boşaltılarak amonyum bikarbonat çözeltisi ile jelatin kapsül kısmı temizlenmiştir. Örneklerden 10 tanesi yumuşak kapsül, 3 tanesi yumuşak şeker ve 12 tanesi sert kapsül formundadır. Örneklerden 17 tanesi yurtdışından temin edilmiş olup 8 tanesi yurt içinde üretilen numunelerden temin edilmiştir. Kullanılan numuneler piyasada yaygın tüketilen takviye edici gıdalardan alınmıştır. Ayrıca, metot validasyon çalışmaları için 6 adet numune ile çalışılmıştır. Bu numunelerden domuz jelatini içeren yumuşak şeker ve gıda katkı maddesi numuneleri Kocaeli Gıda Kontrol Laboratuvarından temin edilmiştir. Sığır jelatini numunesi, domuz jelatini numunesi ve bitkisel jelleştirici (agar agar) numunesi ve sığır kapsülü numunesi İstanbul Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğünden temin edilmiştir.

Kimyasal malzemeler

Takviye edici gıda numunelerinde jelatinin türünün belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada

standart madde olarak sığır jelatin standardı (Merck Milipore, G6650), domuz jelatin standardı (Merck Milipore, 48724) kullanılmıştır. Çalışmalarda kullanılan, asetonitril LC-MS/MS grade (%99 saflıkta), formik asit LC-MS/MS grade (%98-100 saflıkta) Merck firmasından satın alınmıştır. Jelatin ve enzim çözeltilerinin hazırlanmasında ultra saf su, amonyum bikarbonat (NH_4HCO_3 , Sigma Aldrich 09830), tripsin enzimi (Sigma Aldrich, T8003) kullanılmıştır.

Yöntem

Jelatin standartlarının hazırlanması ve enzimatik parçalanma

Çavuş (2018)’un LC-QTOF ile yaptığı çalışmada, tespit limitini %1 olarak belirlemiştir. Bu doğrultuda çalışma standartları hazırlanırken, domuz ve sığır jelatin standartları aynı oranda karıştırılarak %1’lik standart karışımı hazırlanmıştır. Bu amaçla, 2 ml’lik santrifüj tüpüne 18 mg sığır ve 18 mg domuz jelatini tartılmıştır. Daha sonra 1800 µL amonyum bikarbonat (50 mM) çözeltisi eklenerek vorteks karıştırıcıda hızlı bir karıştırma yapılmıştır. Enzimatik parçalama için, 2 ml’lik bir santrifüj tüpüne 0.50 mg tripsin enzimi tartılarak üzerine 300 µL amonyum bikarbonat (50 mM) çözeltisi eklenmiştir. Enzim de hızlı bir şekilde vorteks karıştırıcıda karıştırılmıştır.

Karıştırılan enzim ve standart jelatin karışımı 37°C’ye ayarlanmış etüvde 15–20 dakika bekletilmiştir. Sonra 300 µL standart karışımdan ve 300 µL enzimden alınarak başka bir santrifüj tüpünde birleştirilmiştir. Enzimatik parçalanma için, 37°C etüvde 16 saat bekletildikten sonra standart karışım (enzimli) 4000 rpm’de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Daha sonra süpernatant kısmı 0.45 µm’lik naylon filtreden (Chromafil, Macherey-Nage1, Almanya) süzölmüştür. Böylece %0.5’lik domuz ve %0.5’lik sığır jelatini içeren standart karışım hazır hale gelmiştir. Hazır olan %0.5’lik standarttan, %0.1, %0.05, %0.025, %0.012, %0.005 olacak şekilde amonyum bikarbonat (50 mM) çözeltisi ile seyreltme yapılmıştır.

Takviye edici gıdalardan jelatin ekstraksiyonu ve enzimatik parçalanma

Öncelikle çalışılacak tüm örnekler homojen hale getirilmiştir. Örneklerden kapsül formda olanların kapsül içerisindeki toz veya sıvı kısım boşaltılarak sadece jelatin kısımlarının kalması sağlanmıştır. Elde edilen bu jelatin kısımlar laboratuvar tipi bir öğütücü (Retsch GM200, Almanya) yardımı ile 10000 rpm de 3 dakika iyice öğütülmüştür. Yumuşak şeker formunda olanlar ise ince bıçaklı bir öğütücüde (Waring, ABD) homojen hale gelene kadar iyi bir şekilde karıştırılarak parçalanmıştır. Homojen hale getirilen numuneden 2 ml'lik santrifüj tüpüne 15 mg tartılmıştır. Üzerine 50 mM amonyum bikarbonat çözeltisinden 1800 µL ilave edilerek vorteks karıştırıcıda yüksek hızda 1–2 dakika karıştırılmıştır. Başka bir santrifüj tüpüne her numune için ayrı ayrı 25 mg enzim tartılıp üzerine 300 µL amonyum bikarbonat çözeltisi eklenmiştir. Enzim çözeltisi vorteks karıştırıcıda 1–2 dakika hızlı bir şekilde karıştırılmıştır. Numunenin ve enzim çözeltisinin iyi bir şekilde çözünmesini sağlamak amacıyla 37°C'lik etüvde 15–20 dakika bekletilmiştir. Etüvden çıkarılan homojen enzim ve numune çözeltilerinin oda sıcaklığına gelmesi için beklenmiştir. Bu çözeltiden 300 µL alınıp ayrı bir 2 mL'lik santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Santrifüj tüpüne aktarılan örnek çözeltisinin üzerine 300 µL enzim çözeltisi ilave edilip vorteks karıştırıcı ile hızlı bir şekilde homojen hale getirilmiştir.

Enzimatik reaksiyonun gerçekleşmesi amacıyla enzim ve örnek çözeltisi 37°C'ye ayarlanmış etüvde 16 saat bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda etüvden çıkarılan çözelti 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra 0.45 µm'lik naylon filtreden (Chromafil, Macherey-Nage1, Almanya) direkt olarak HPLC viallerine süzölmüş ve LC-MS/MS cihazına enjekte edilmiştir.

Kromatografi koşulları

LC-TQ sisteminin sıvı kromatografi (LC) kısmında Agilent 1290 serisi G7120A pompa, G7116B kolon fırını, G7167B multisampler ve G7122A degasser kullanılmıştır. Ayrışmalar Agilent marka Poroshell 120 EC-C18 HPLC kolonu (4.6x100 mm, 2.7 micron, 120 Å) üzerinde Çizelge

1'de verilen gradien akış programında gerçekleşmiştir. Numune enjeksiyon hacmi 2 µL olup, 0.6 ml/dak akış hızında ve kolon sıcaklığı 40°C'de çalışılmıştır. Söz konusu bu değerler yapılan ön denemeler ile belirlenmiştir. LC-TQ sisteminin kütle spektrometresi (TQ) kısmında Agilent 1290 serisi G1958-65638 iyonizer, G6475A kütle analizörü ve dedektör kullanılmıştır. Kütle spektrometresine ilişkin çalışma koşulları Çizelge 2'de toplu halde verilmiştir. Ayrıca jelatin örneklerinde tür tayinin belirlenmesinde Agilent MassHunter Quantitative yazılım programı kullanılmıştır.

Sığır ve domuz jelatinlerine ait marker peptitlerin belirlenmesinde üç aşamalı bir prosedür uygulanmıştır. Birinci aşamada, domuz ve sığır jelatininin tripsin enzimi ile açığa çıkabilecek olası spesifik peptitlere http://www.matrixscience.com/search_form_select.html adresindeki veri tabanı programı kullanılarak karar verilmiş ve bu spesifik peptitler LC-MS/MS sisteminde kullanılacak metotta tanımlanmıştır. İkinci aşamada, saf haldeki standart sığır ve domuz jelatinleri tripsin enzimi ile muamele edilerek enzimatik olarak parçalanmıştır. Enzimatik parçalanma sonrası bu standart örnekler (sığır ve domuz) LC-MS/MS-TQ sistemine enjekte edilerek analiz edilmiştir. Bu analiz enzimatik parçalanma ile açığa çıkan peptit dizilimlerin MS/MS spektrumlarına ilişkin veriler ortaya koymaktadır. Üçüncü aşamada ise, saf haldeki standart jelatinlere ilişkin ortaya konan bu MS/MS spektrumları veri tabanındaki sığır ve domuz olarak tanımlanan veriler ile kıyaslanarak tanımlama yapılmıştır. Tanımlanan peptitlerden domuz ve sığır tür tayini için hangilerinin kullanılacağına, peptit diziliminde 7–20 aminoasit uzunluğunda olması, yüksek MS sinyali vermesi ve çalışılacak materyal (yumuşak şeker, yumuşak ve sert kapsül) içinde gözlenebilir olması kriterleri göz önünde bulundurularak karar verilmiştir. Çalışılan numunelerin tümünde en net şekilde tespit edilen domuz ve sığır jelatinlerine ait ikişer spesifik peptit belirlenerek çalışmalar bu peptitler üzerinden yürütülmüştür. Domuz ve sığır peptitlerinin kütlesi, bu peptitlere ait öncü iyonlar (precursor ions) ve yavru iyonlar (product ions) ile alıkonma zamanları belirlenmiştir (Çizelge 3).

Ayrıca sistemde iyon taramaları yapılarak bölünme voltajı (fragmentor), çarpışma enerjisi (Collision Energy CE), polarite değiştirme süresi (Dwell), iyonun polaritesi (polarity) gibi analiz için en uygun sistem parametreleri oluşturulmuştur (Çizelge 4). Sığır ve domuz jelatin standartları enzimatik reaksiyon sonrasında LC-TQ cihazına enjekte edilerek datalar elde edilmiştir. Elde edilen MS/MS datalarının veri tabanı adresinden elde edilen peptit dizilimlerden domuz ve sığır jelatini için ayırt edici peptit (marker) nitelik

taşıyanlar tespit edilmiştir. Numunelerin ekstraksiyonu sonucunda marker peptitlerin alıkonma zamanı, (tolerans %1–2) (Anonim, 2021), öncü iyon (precursor ion) ve yavru iyon (product ion) değerleri kullanılarak numune içeriğinde olup olmadığı incelenmiştir. % 0.012'lik jelatin standartları ile karşılaştırması yapılarak kalitatif olarak sonuçlandırılmıştır.

Çizelge 1. Hareketli faz gradyen akış programı

Table 1. Gradient program of mobile phase

Zaman (dakika)	Su (%0,1 Formik asit), [%]	Asetonitril (%0,1 Formik asit), [%]
0.0	95.0	5.0
0.5	95.0	5.0
25.0	5.0	95.0
28.0	5.0	95.0
28.10	95.0	5.0

Çizelge 2. MS/MS çalışma parametreleri

Table 2. MS/MS working parameters

MS/MS parametreleri <i>MS/MS Parameters</i>	Değer <i>Value</i>
İyonizasyon modu ve sıcaklığı (<i>Ionization mode and temperature</i>)	Elektrosprey (ESI), 300 °C
Gaz sıcaklığı (<i>Gas temperature</i>)	180 °C
Kaplama sıcaklığı (<i>Sheath gas temperature</i>)	330 °C
Kapiler voltaj (<i>Capillary voltage</i>)	2600 V
Nebulizer basıncı (<i>Nebulizer pressure</i>)	43 psi
Gaz akışı (<i>Gas flow</i>)	12 L/dk
Kaplama gaz akışı (<i>Sheath gas flow</i>)	10 L/dk
Hortum girişi voltajı (<i>Nozzle voltage</i>)	500 V
Çarpışma enerjisi öncül iyon varlık eşiği (<i>Precursor abundance threshold</i>)	5000
Çarpışma enerjisi yavru iyon varlık eşiği (<i>Product abundance threshold</i>)	500
Çarpışma enerjisi MRM varlık eşiği (<i>MRM abundance threshold</i>)	100
Bölünme voltajı (<i>Fragmentor voltage</i>)	115 V'den 155 V'ye

Çizelge 3. LC-MS/MS sisteminde kullanılan belirteç domuz ve sığır peptitleri
 Table 3. Peptides used in the LC-MS/MS system as markers for porcine and bovine species

Belirteç peptit (Marker peptide)	Peptidin Kütlesi (Mass of peptide)	Peptit dizilimi (Peptide sequence)	z	Öncü iyon (Precursor m/z)	Yavru iyon (Product m/z)	Alıkonma zamanı, dk (Retention time, min)
Domuz-1 (Porcine-1)	1310.62	GETGPSGPAGPTGAR	2	656.3	726.4 784.3 870.4 809.4	4.15
Domuz-2 (Porcine-2)	1465.73	SAGISVPGPMGPSGPR	2	773.9	880.5 977.6 1034.5	5.71
Sığır-1 (Bovine-1)	1559.80	GETGPAGPAGPIGPVGAR	2	780.9	766.5 823.5 991.6 513.3 669.4	6.23
Sığır-2 (Bovine-2)	1192.66	IDQPGAVGPAGIR	2	596.8	740.4 797.5 894.5	5.97

Metot validasyonu

Validasyon çalışmaları, saf kristalize jelatinler (domuz jelatini, sığır jelatini, bitkisel jelleştirici) sığır jelatinli kapsül, yumuşak şeker ve toz gıda katkı maddesi olmak üzere 6 ayrı örnek ile gerçekleştirilmiştir. Yöntem validasyonunda, tespit limiti (LOD), hassasiyet, doğruluk, yanlış-pozitif, yanlış-negatif ve güvenilirlik kriterleri göz önünde bulundurulmuştur. Yöntemin performansının değerlendirilmesinde Resmi Analitik Kimyagerler Derneği (AOAC-Association of Official Analytical Chemists)'nin Standart Metot Performans Gereksinimleri Kılavuzu (Anonim, 2016), Eurachem-Analitik yöntemlerin amaca uygunluğu (The Fitness for Purpose of Analytical Methods) (Anonim, 2014) ile Tarım ve Orman Bakanlığı Kimyasal ve Fiziksel Analizlerde Metot Validasyonu/Verifikasyonu Rehberi (Anonim, 2018) kullanılmıştır.

LOD (Limit of detection)

Bu amaçla, domuz ve sığır jelatini standartlarından %1'lik standart karışım numunesi hazırlanmıştır. Daha sonra %0.1, %0.05, %0.025, %0.012, %0.005 konsantrasyonlara seyreltilen domuz ve sığır karışım standartları, LC-TQ cihazına analiz edilerek okunan sonuçlarla kalibrasyon eğrisi çizilmiştir.

Hassasiyet (Precision)

Hassasiyet çalışmalarında 6 farklı numune ile çalışılmıştır. Bu numuneler bitkisel jelleştirici, domuz jelatini numunesi, sığır jelatini numunesi, yumuşak şeker (domuz jelatini içeren), gıda katkısı (domuz jelatini içeren) ve sığır kapsülü numunesidir. Tüm bu numunelerden iki farklı kişi ile toplam 140 çalışma yapılmıştır.

Çizelge 4. Kullanılan belirteç peptitler için MS/MS şartları
 Table 4. MS/MS parameters for the peptide markers

Peptit kaynağı (Peptide origin)	Yük z	Öncü iyon (Precursor m/z)	MS1 res	Yavru iyon (Product m/z)	MS2 res	Dwell (ms)	Bölünme voltajı, V (Fragmentor, V)	CAV (V)	CE (V)	Polarite (Polarity)
Domuz-1 (Porcine-1)	2	656.3	Unit	726.4	Unit	100	135	5	35	Positive
Domuz-1 (Porcine-1)	2	656.3	Unit	784.3	Unit	100	135	5	35	Positive
Domuz-1 (Porcine-1)	2	656.3	Unit	870.4	Unit	100	135	5	35	Positive
Domuz-2 (Porcine-2)	2	773.9	Unit	809.4	Unit	100	135	5	35	Positive
Domuz-2 (Porcine-2)	2	773.9	Unit	880.5	Unit	100	135	5	35	Positive
Domuz-2 (Porcine-2)	2	773.9	Unit	977.6	Unit	100	135	5	35	Positive
Domuz-2 (Porcine-2)	2	773.9	Unit	1034.5	Unit	100	135	5	35	Positive
Sığır-1 (Bovine-1)	2	780.9	Unit	766.5	Unit	100	135	5	35	Positive
Sığır-1 (Bovine-1)	2	780.9	Unit	823.5	Unit	100	135	5	35	Positive
Sığır-1 (Bovine-1)	2	780.9	Unit	991.6	Unit	100	135	5	35	Positive
Sığır-2 (Bovine-2)	2	596.8	Unit	513.3	Unit	100	135	5	35	Positive
Sığır-2 (Bovine-2)	2	596.8	Unit	669.4	Unit	100	135	5	35	Positive
Sığır-2 (Bovine-2)	2	596.8	Unit	740.4	Unit	100	135	5	35	Positive
Sığır-2 (Bovine-2)	2	596.8	Unit	797.5	Unit	100	135	5	35	Positive
Sığır-2 (Bovine-2)	2	596.8	Unit	894.5	Unit	100	135	5	35	Positive

CAV(Cell Accelerator Voltage): Hücre hızlandırıcı voltaj, Dwell: Polarite değiştirme süresi, CE: Çarpışma enerjisi (Collision Energy)

Doğruluk (Accuracy)

İçerisinde domuz ve sığır jelatini bulunmayan bitkisel jelleştirici numunesine domuz jelatini ve sığır jelatini eklenmiştir. Kalibrasyon eğsinin içinde kalacak şekilde % 0.03 oranında domuz ve sığır jelatini eklenerek numune hazırlanmıştır ve homojenize edilmiştir. Hazırlanan numunelerin LC-TQ cihazında okumaları yapılarak sonuçlar gözlemlenmiştir. Çalışmalar iki ayrı kişi tarafından

yürütülmüştür. Her iki kişi de 10 adet numune üzerinden çalışmalarını yapmıştır.

Yanlış-pozitif

Yanlış pozitif çalışmaları iki ayrı kişi ile gerçekleştirilmiştir. Bu kriterde, içerisinde domuz jelatini olmayan bitkisel jelleştirici, sığır jelatini ve sığır kapsülünde domuz jelatini varlığı aranırken, içerisinde sığır jelatini bulunmayan domuz jelatini,

yumuşak şeker (domuz jelatini içeren), gıda katkısı (domuz jelatini içeren), numunelerinde sığır jelatini aranmıştır.

Yanlış-negatif

Yanlış negatif çalışmaları iki ayrı kişi ile gerçekleştirilmiştir. Bu kriterde, içerisinde sığır jelatini katılan bitkisel jelleştirici, sığır jelatini ve sığır kapsülünde sığır jelatini varlığı aranırken, içerisinde domuz jelatini bulunan domuz jelatini, yumuşak şeker (domuz jelatini içeren), gıda katkısı (domuz jelatini içeren) numunelerinde domuz jelatini aranmıştır.

Güvenirlilik (Robustness)

Beklenen (gerçek) sonuçlar ile gözlenen (verifikasyon çalışmasında elde edilen) sonuçların istatistiksel olarak %90 güven aralığında ne oranda uyumlu olduğunu belirlemek için Cohen'nin Kappa Katsayısı Testi (Cohen's Kappa Coefficient Test) kullanılır. Kappa değeri %90 güven aralığında aşağıdaki formüle göre hesaplanır:

$$\text{Kappa (K)} = \frac{p_0 - p_e}{1 - p_e}$$

$$p_0 = \frac{(N_{11} + N_{12})}{N}$$

$$p_e = \frac{(N_{1_} \times N_{_2}) + (N_{_2} \times N_{1_})}{(N \times N)}$$

N11: Gerçekte pozitif olup, analiz sonucunda da pozitif saptanan örnek sayısı

N22: Gerçekte negatif olup, analiz sonucunda da negatif saptanan örnek sayısı

N1_: Gerçekte pozitif olan toplam örnek sayısı

N2_: Gerçekte negatif olan toplam örnek sayısı

N_1: Analiz sonucunda pozitif saptanan toplam örnek sayısı

N_2: Analiz sonucunda negatif saptanan toplam örnek sayısı

N: Çalışmada kullanılan toplam örnek sayısı

Enzimatik parçalanma süresinin optimizasyonu

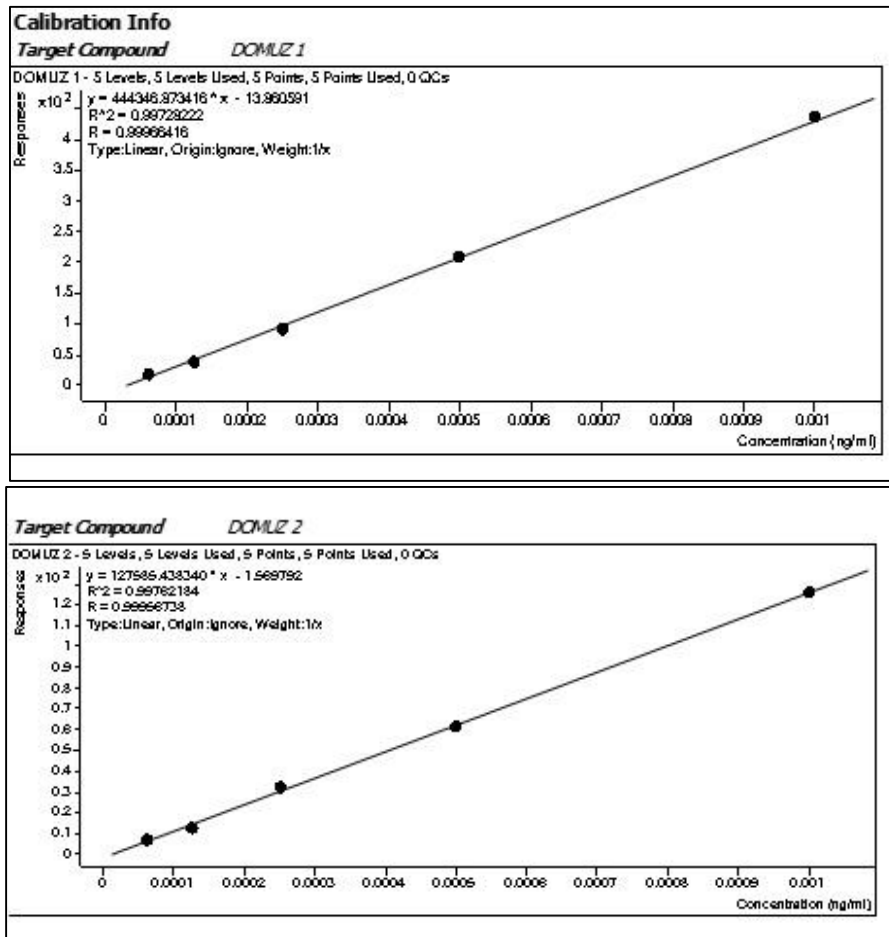
Bu amaçla, numune ve enzim "Takviye edici gıdalardan jelatin kısımlarının ayrılması ekstraksiyonu ve enzimatik parçalanma" başlığı altında anlatıldığı gibi tartılarak üzerlerine ayrı ayrı amonyum bikarbonat çözeltisi eklenmiştir. Hem numunenin hem de enzimin çözünmesi için 37°C'ye ayarlanmış ultrasonik su banyosunda 15

dakika bekletilmiştir. Çözünen numune ve enzim çözeltilerinden 300 µL alınarak başka bir santrifüj tüpünde birleştirilmiş ve bir vorteks yardımı ile homojenize edilmiştir. Bu sürenin sonunda enzimatik parçalanmada sıcaklığın ve sürenin etkisi belirlemek için, sıcaklık ayarı yapılarak (37°C) ve yapılmayarak (oda sıcaklığında ~20°C) ultrasonik su banyosunda 15, 20, 30, 45, ve 60 dakika enzimatik uygulamalar gerçekleştirilmiştir.

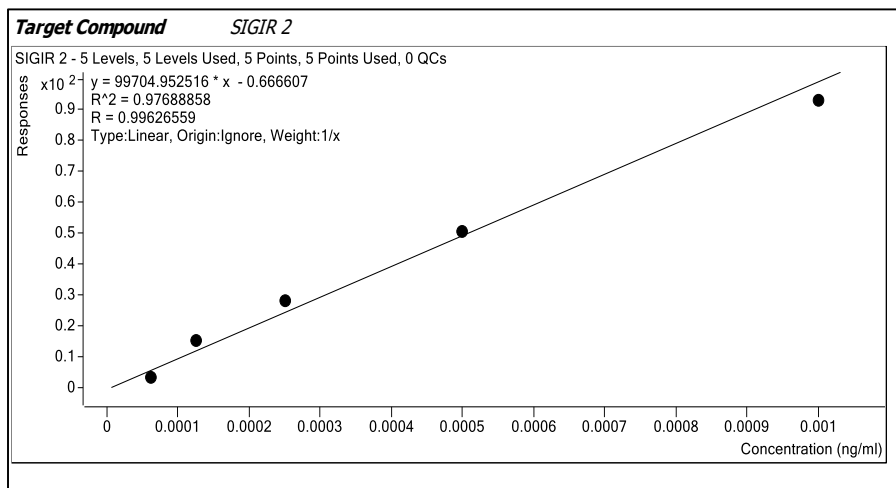
BULGULAR ve TARTIŞMA

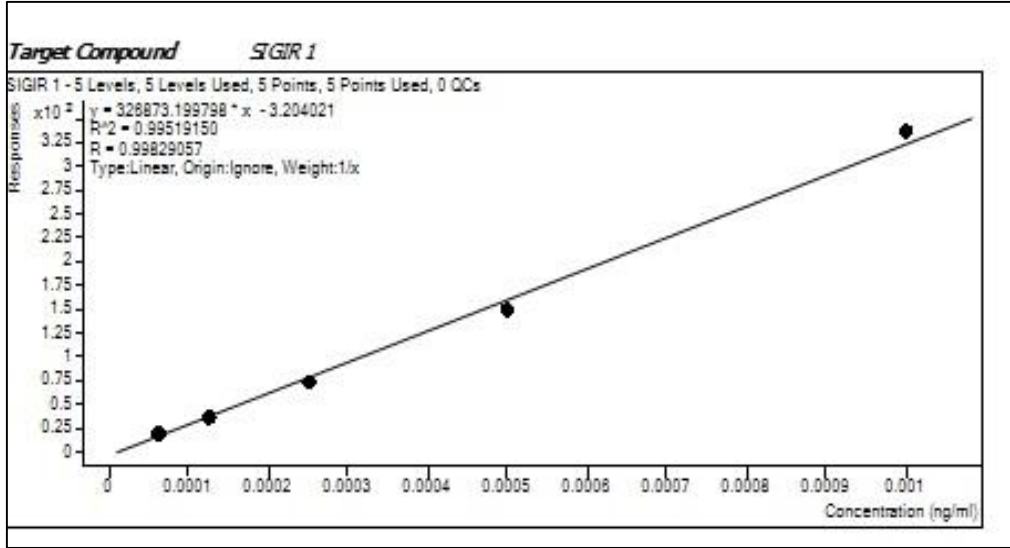
Metot validasyon sonuçları

Çalışmada geliştirilen LC-MS/MS-TQ yönteminin validasyonu kapsamında tespit limiti (LOD), hassasiyet, doğruluk, yanlış-pozitif, yanlış-negatif ve güvenirlilik parametreleri kapsamlı şekilde değerlendirilmiştir. Domuz ve sığır jelatin standartlarından beş farklı konsantrasyon seviyesinde kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir. Domuz jelatini standardı ile elde edilen kalibrasyon eğrilerinde (Şekil 1a-Domuz1 ve Şekil 1b-Domuz2) korelasyon katsayıları (R) 0.9996–0.9995 ve determinasyon katsayısı (R²) 0.9972–0.9976 düzeyinde, sığır jelatini standardı ile elde edilen kalibrasyon eğrilerinde ise (Şekil 2a-Sığır1 ve Şekil 2b-Sığır2) korelasyon katsayısı (R) 0.9982–0.9962 ve determinasyon katsayısı (R²) 0.9951–0.9768 düzeyinde olduğu saptanmıştır. Elde edilen bu değerler, çalışılan bu konsantrasyon aralığında hem domuz hem de sığır jelatini kalibrasyon eğrilerinin oldukça yüksek bir doğrusalığa sahip olduğunu ortaya koymuştur. Domuz1, domuz2, sığır1 ve sığır2 belirteç peptitlerinin kütle kromatogramları incelendiğinde %0.1, %0.05, %0.025 noktalarında pikler net bir şekilde görülmüştür. %0.012 düzeyinde piklerin (Şekil 3) ayırt edilebildiği ancak %0.005 düzeyinde (Şekil 4) gürültü pikleri ile jelatin iç içe geçmesi dolayısıyla ayrımının net bir şekilde yapılamadığı görülmüştür. %0.005 düzeyinde standart pikleri ile gürültü piklerinin seviyelerinin çok yakın olması ve ayırt edilmesinin zor olması sebebiyle %0.005 noktası kalibrasyon eğrisinden çıkarılmıştır. Bu değerlere bakıldığında standart piklerinin gürültü piklerinden ayrılabilirdiği en düşük düzeyin (LOD) %0.012 olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 1. Domuz jelatinine ait kalibrasyon eğrileri
 Figure 1. Calibration curves of porcine gelatine



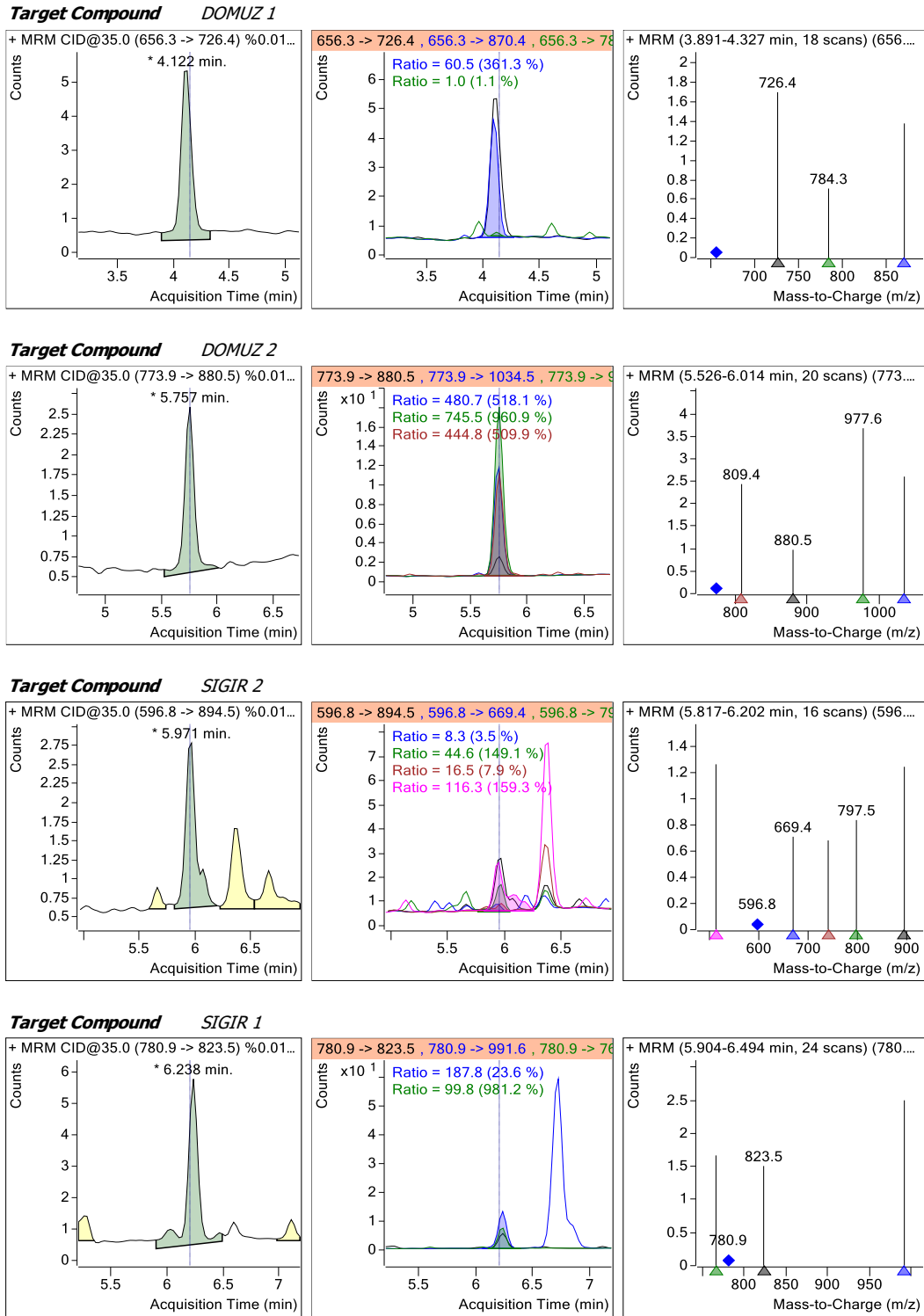


Şekil 2. Sığır jelatinine ait kalibrasyon eğrileri

Figure 2. Calibration curves of bovine gelatine

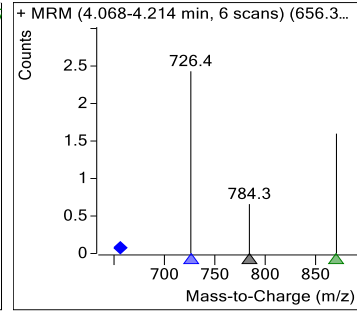
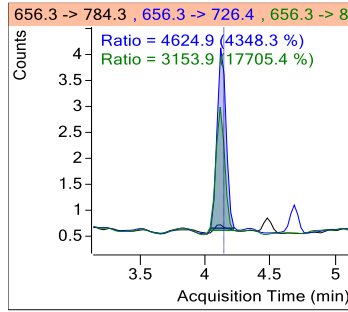
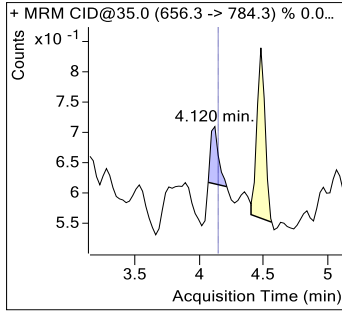
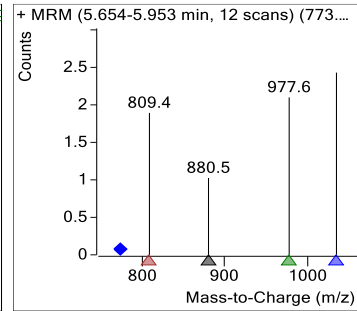
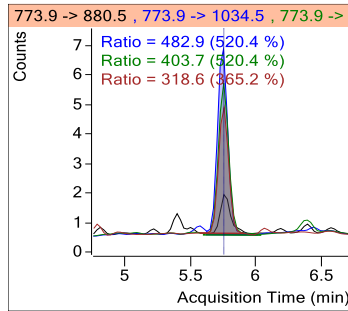
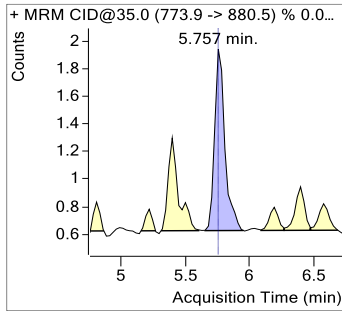
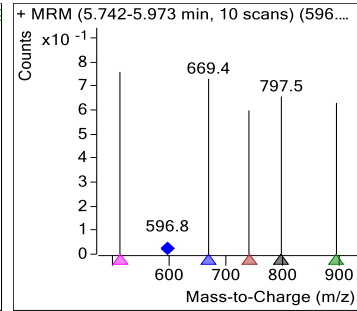
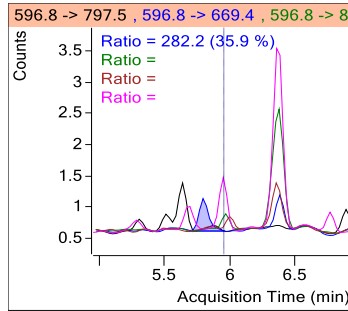
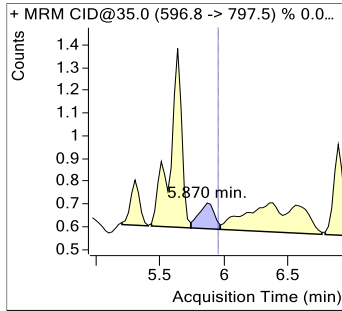
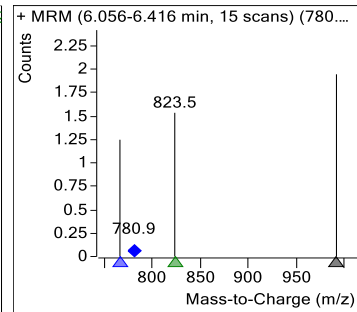
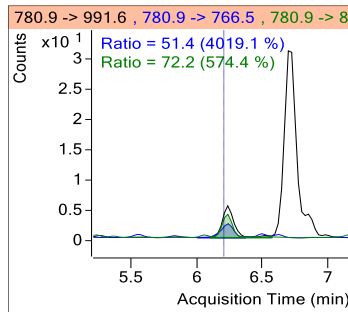
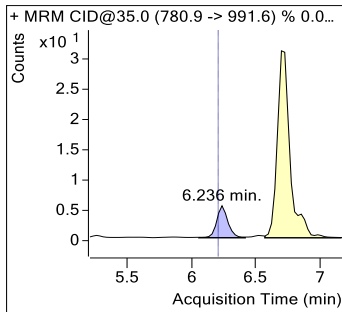
Literatür çalışmaları incelendiğinde Shimadzu'nun "Targeted Proteomics Approach for Sensitive Detection of Bovine and Porcine Gelatins in Food, Pharmaceutical Capsules and Personal Care Products" Shimadzu Application News No. AD-0179 metodunda tespit limiti %0.1 olarak belirlenmiştir. Xiao- Mei vd. (2020), LC-MS/MS ile miktar tayini çalışmaları yapmış ve LOD değerini %0.06–0.48 aralığında bulmuştur. Çavuş (2018)'un LC-QTOF ile yaptığı çalışmada ise tespit limitinin %1 olarak saptamıştır. Bu çalışmalar ile kıyaslandığında mevcut çalışmada bulunan %0.012 tespit limitinin oldukça düşük bir düzey olduğu görülmektedir. Elde edilen tespit limitini doğrulamak amacıyla, içerisinde domuz ve sığır jelatini bulunmayan bitkisel jelatin numunesine, domuz jelatini ve sığır jelatininden %0.012 oranında olacak şekilde eklenerek

numune hazırlanmıştır ve homojenize edilmiştir. Çizelge 5'ten de görüleceği üzere, %0.012'lik domuz ve sığır jelatini içeren gıdalarda, jelatin türünün tespitinin yapılabildiği görülmüştür. İki ayrı kişiyle 20 numunede yapılan çalışmalarda bitkisel jelleştirici içerisine sığır ve domuz jelatini eklenmiş ve tüm numunelerde iki jelatin türü de tespit edilebilmiştir. Dolayısıyla bu çalışmada çok düşük düzeylerde bile domuz ve sığır piklerinin ayırt edilebildiği anlaşılmıştır. Elde edilen LOD değeri, jelatin peptitlerinin kompleks matrisler içinde güvenilir şekilde tespit edilebileceğini göstermektedir. Böylece, yöntem hem iz miktardaki jelatin varlığını hem de potansiyel kontaminasyonu etkin biçimde belirleme yeteneğine sahip olduğunu kanıtlamıştır.



Şekil 3. Kalibrasyon eğrisinde %0.012 jelatin standartlarına ait domuz1, domuz2, sığır1, sığır2 peptitlerine ait MS kromatogramları

Figure 3. MS chromatograms of porcine1, porcine2, bovine1, and bovine2 marker peptides from 0.012% gelatin standards

Compound Graphics**Target Compound DOMUZ 1****Target Compound DOMUZ 2****Target Compound SIGIR 2****Target Compound SIGIR 1**

Şekil 4. Şekil 4. Kalibrasyon eğrisinde %0.005 jelatin standartlarına ait domuz1, domuz2, sığır1, sığır2 peptitlerine ait MS kromatogramları

Figure 4. MS chromatograms of porcine1, porcine2, bovine1, and bovine2 marker peptides from 0.005% gelatin standards

Çizelge 5. Jelatin tespit limiti doğrulanması (% 0.012)
 Table 5. Verification of the gelatin detection limit (0.012%)

	1. Kişi		2. Kişi	
	Domuz Jelatini <i>Porcine gelatin</i>	Sığır Jelatini <i>Bovine gelatin</i>	Domuz Jelatini <i>Porcine gelatin</i>	Sığır Jelatini <i>Bovine gelatin</i>
1	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi
2	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi
3	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi
4	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi
5	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi
6	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi
7	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi
8	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi
9	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi
10	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi

Bitkisel jelatine %0.03 oranında domuz ve sığır jelatini eklenerek gerçekleştirilen doğruluk çalışmalarında her grup için verilen pozitif numunelerin sonuçlarının pozitif olduğu oransal olarak $20/20 = 1 \times 100 = \%100$ doğruluk oranına ulaşıldığı görülmüştür. Yapılan çalışmada doğruluk oranının %100 olduğu görülmüştür. Yanlış-pozitif/yanlış-negatif kriteri için yanlış-pozitif ve yanlış-negatif çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İki kişi tarafından yapılan çalışmalar sonunda her bir parametre için negatif çalışmaların sonucunun yine negatif bulunduğu, domuz jelatini için $60/60=1$ oranında negatif, sığır jelatini için $80/80=1$ oranında negatif tespit edilmiştir. Aynı sonuçlar yanlış-pozitif çalışmaları için de elde edilmiştir. Resmi Analitik Kimyagerler Derneği (AOAC-Association of Official Analytical Chemists)'nin Standart Metot Performans Gereksinimleri Kılavuzu, Eurachem-Analitik yöntemlerin amaca uygunluğu (The Fitness for Purpose of Analytical Methods) ile Tarım ve Orman Bakanlığı Kimyasal ve Fiziksel Analizlerde Metot Validasyonu/Verifikasyonu Rehberi'ne göre metodun yanlış-pozitif ve yanlış-negatif oranının %10'u aşmaması durumunda kabul edilebilir olarak değerlendirilmektedir. Yapılan çalışmada bu oran %0 olduğundan çalışmalar uygun bulunmuştur. Güvenirlik ve hassasiyet kriterleri açısından, sığır jelatini yanlış pozitif çalışması için yapılan 80 adet sığır jelatini çalışmasının 80 tanesi negatif olarak tespit edilmiş olup hassasiyeti, $80/80=1 \times 100 = \%100$ olarak

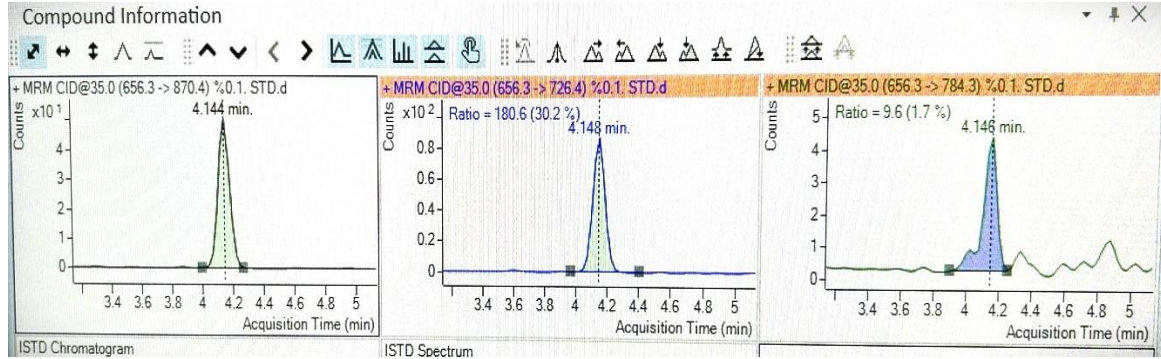
saptanmıştır. Domuz jelatini yanlış pozitif çalışması için yapılan 60 adet sığır jelatini çalışmasının 60 tanesi negatif olarak tespit edilmiş olup hassasiyeti, $60/60=1 \times 100 = \%100$ olarak hesaplanmıştır. Sığır jelatini yanlış negatif çalışması için yapılan 40 adet sığır jelatini çalışmasının 40 tanesi pozitif olarak tespit edilmiş olup hassasiyeti, $40/40=1 \times 100 = \%100$ olarak tespit edilmiştir. Domuz jelatini yanlış negatif çalışması için yapılan 60 adet sığır jelatini çalışmasının 60 tanesi pozitif olarak tespit edilmiş olup hassasiyeti, $60/60=1 \times 100 = \%100$ olarak saptanmıştır. Beklenen (gerçek) sonuçlar ile gözlenen (verifikasyon çalışmasında elde edilen) sonuçların istatistiksel olarak %90 güven aralığında ne oranda uyumlu olduğunu belirlemek için "Cohen's Kappa Coefficient Test" kullanılmıştır. Kappa değeri $K=1$ olduğu tespit edilmiş ve bu değer Kappa (K) ≥ 0.80 olması nedeniyle metot validasyon çalışmasının "Çok iyi uyum" içerisinde olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular, geliştirilen metodun gıda takviyeleri gibi çok bileşenli ve karmaşık örneklerde güvenilir analitik tarama amacıyla kullanılabileceğini ortaya koymuştur.

Ticari takviye edici gıdalarda jelatin türünün tayini

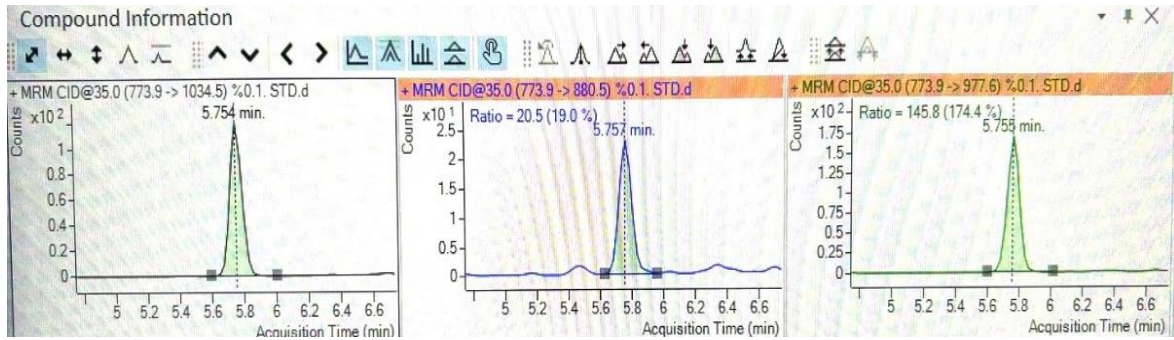
Optimize ve valide edilmiş LC-MS/MS-TQ yöntemi, yurtdışı menşeli 17 ve Türkiye menşeli 8 adet ticari nitelikteki takviye edici gıda örneğine uygulanmıştır. Tespit limiti dikkate alınarak %0.1,

0.05 ve %0.012 düzeyinde standartlar hazırlanmış ve bu standartlardan kalibrasyon eğrileri çizilmiştir (data gösterilmemiştir). Standart okumaların ardından takviye edici gıda örnekleri analiz edilmiştir. Her belirteç peptide ait iyonlar

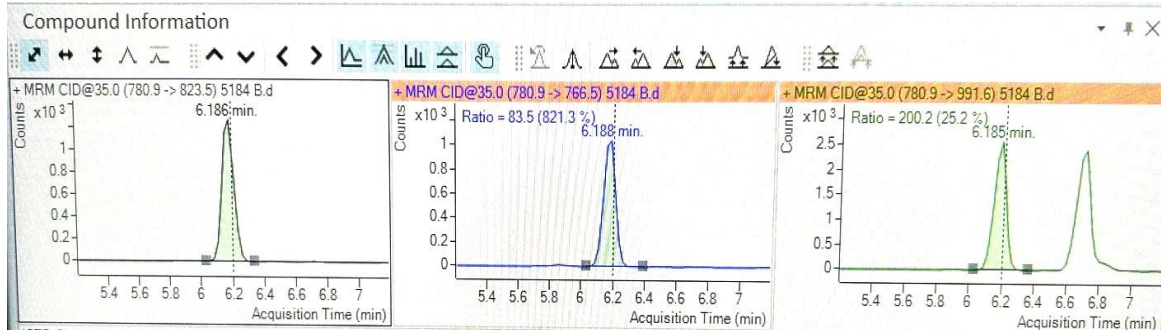
(precursor ion) ve bu iyonların yavru iyonları (product ion) incelenmiştir. Bu iyonlar ve iyonlara ait görseller Şekil 5, Şekil 6, Şekil 7 ve Şekil 8'te verilmiştir.



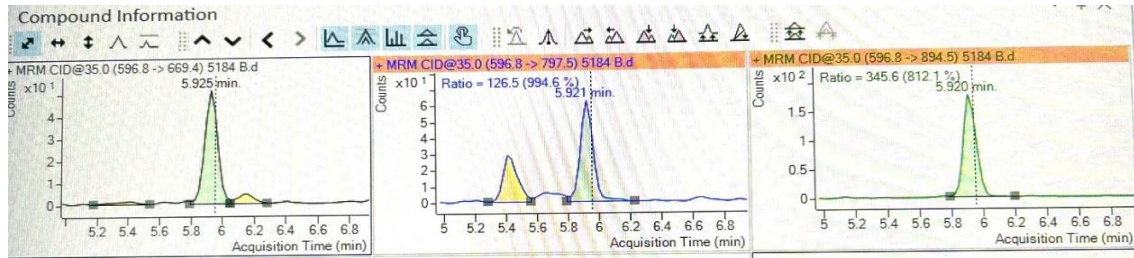
Şekil 5. Domuz1 (GETGPSGPAGPTGAR) belirteç peptidine ilişkin MS kromatogramı
Öncü iyon (kütle/yük oranı 656.3) ve bu iyonun 3 adet yavru iyonu (kütle/yük oranları; 726.4, 784.3 ve 870.4)
Figure 5. MS chromatogram for the marker peptide porcine1 (GETGPSGPAGPTGAR)
Precursor ion (mass/charge ratio 656.3) and its 3 products ions (mass/charge ratios; 726.4, 784.3 and 870.4)



Şekil 6. Domuz2 (SAGISVPGPMGPSGPR) belirteç peptidine ilişkin MS kromatogramı
Öncü iyon (kütle/yük oranı 773.9) ve bu iyonun 3 adet yavru iyonu (kütle/yük oranları; 809.4, 880.5 ve 977.6)
Figure 6. MS chromatogram for the marker peptide porcine2 ((SAGISVPGPMGPSGPR)
Precursor ion (mass/charge ratio 773.9) and its 3 products ions (mass/charge ratios; 809.4, 880.5 and 977.6)



Şekil 7. Sığır1 (GETGPAGPAGPIGVGAR) belirteç peptidine ilişkin MS kromatogramı
Öncü iyon (kütle/yük oranı 780.9) ve bu iyonun 3 adet yavru iyonu (kütle/yük oranları; 766.5, 823.5 ve 991.6)
Figure 7. MS chromatogram for the marker peptide bovine1 (GETGPAGPAGPIGVGAR)
Precursor ion (mass/charge ratio 780.9) and its 3 products ions (mass/charge ratios; 766.5, 823.5 and 991.6)



Şekil 8. Sığır2 (IDQPGAVGPAGIR) belirteç peptidine ilişkin MS kromatogramı

Öncü iyon (kütle/yük oranı 596.8) ve bu iyonun 3 adet yavru iyonu (kütle/yük oranları; 669.4, 740.4 ve 797.5)

Figure 8. MS chromatogram for the marker peptide bovine2 (DQPGAVGPAGIR)

Precursor ion (mass/charge ratio 596.8) and its 3 products ions (mass/charge ratios; 669.4, 740.4 and 797.5)

Türkiye piyasasında satılan ticari nitelikteki 25 adet takviye edici gıdalar TEG-1'den TEG-25'e kadar kodlanmıştır. Söz konusu takviye edici gıdaların menşeleri ve sahip oldukları jelatin türleri ile ilgili bilgiler Çizelge 6' da toplu halde verilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde, Türkiye'de üretilen 8 numuneden 6'sında (TEG-3, TEG-5, TEG-10, TEG-12, TEG-17 ve TEG-19) sadece sığır jelatini ve 1 tanesinde (TEG-6) domuz jelatini tespit edilmiştir. Çalışılan örneklerden 1 tanesinde (TEG-15) ise ne domuz ne de sığır jelatini tespit edilememiştir. Yurtdışı

menşeli ürünler incelendiğinde ise, 17 numunenin 5 tanesinde (TEG-4, TEG-9, TEG-14, TEG-20 ve TEG-25) hem domuz hem sığır jelatini, 3 tanesinde (TEG-13, TEG-16 ve TEG-22) sadece domuz jelatini, ve 1 tanesinde (TEG-23) sadece sığır jelatini tespit edilmiştir. Yurtdışı menşeli numaların 8 tanesinde (TEG-1, TEG-2, TEG-7, TEG-8, TEG-11, TEG-18, TEG-21 ve TEG-24) ne sığır ne de domuz jelatini saptanamamıştır.

Çizelge 6. Türkiye piyasasında satılan farklı takviye edici gıdaların sığır ve domuz jelatin içerikleri

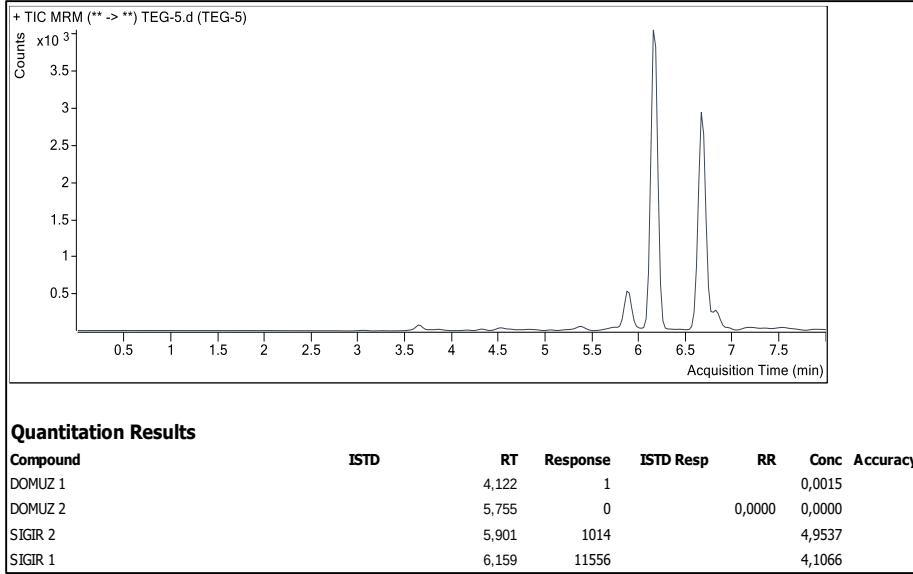
Table 6. Bovine and porcine gelatin contents of different dietary supplements sold in the Turkish market

Numune Sample	Temin edildiği yer Source	Sığır jelatini Bovine gelatin	Domuz jelatini Porcine gelatin
TEG-1	Yurtdışı	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
TEG-2	Yurtdışı	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
TEG-3	Türkiye	Tespit edildi	Tespit Edilemedi
TEG-4	Yurtdışı	Tespit edildi	Tespit Edildi
TEG-5	Türkiye	Tespit edildi	Tespit Edilemedi
TEG-6	Türkiye	Tespit Edilemedi	Tespit Edildi
TEG-7	Yurtdışı	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
TEG-8	Yurtdışı	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
TEG-9	Yurtdışı	Tespit edildi	Tespit Edildi
TEG-10	Türkiye	Tespit edildi	Tespit Edilemedi
TEG-11	Yurtdışı	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
TEG-12	Türkiye	Tespit edildi	Tespit Edilemedi
TEG-13	Yurtdışı	Tespit Edilemedi	Tespit Edildi
TEG-14	Yurtdışı	Tespit edildi	Tespit Edildi
TEG-15	Türkiye	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
TEG-16	Yurtdışı	Tespit Edilemedi	Tespit Edildi
TEG-17	Türkiye	Tespit edildi	Tespit Edilemedi
TEG-18	Yurtdışı	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
TEG-19	Türkiye	Tespit edildi	Tespit Edilemedi
TEG-20	Yurtdışı	Tespit edildi	Tespit edildi
TEG-21	Yurtdışı	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
TEG-22	Yurtdışı	Tespit Edilemedi	Tespit Edildi
TEG-23	Yurtdışı	Tespit edildi	Tespit Edilemedi
TEG-24	Yurtdışı	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
TEG-25	Yurtdışı	Tespit edildi	Tespit edildi

TEG: Takviye Edici Gıda

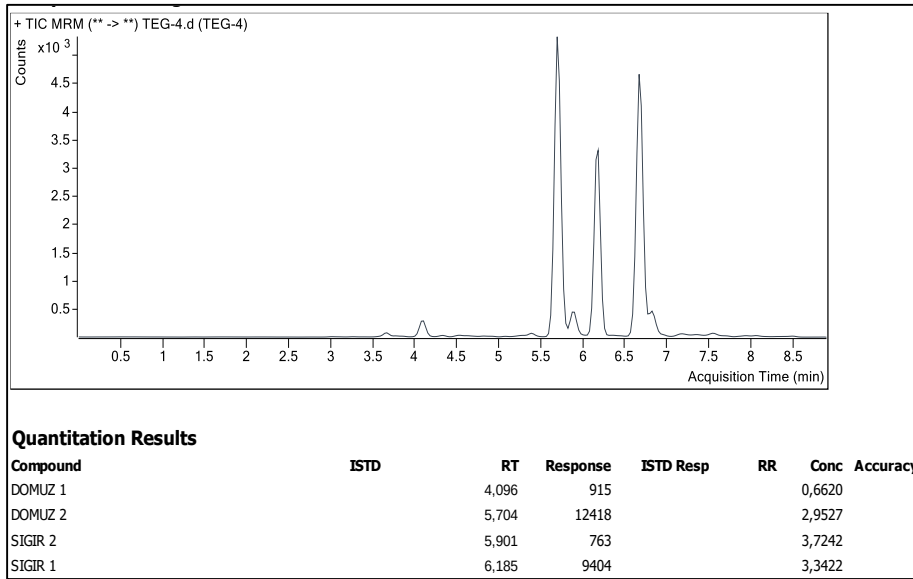
Çalışılan numunelerde içerisinde hem domuz hem sığır jelatini tespit edilen, sadece sığır jelatini içeren, sadece domuz jelatini içeren ve her ikisini de içermeyen numunelere ait toplam iyon kromatogram görüntüleri sırasıyla Şekil 9, Şekil 10, Şekil 11 ve Şekil 12’ de verilmiştir. Söz konusu şekiller incelendiğinde, 4.1 ve 5.7 dakikalarda saptanan pikler domuz jelatini varlığını gösteren

peptitler iken (Şekil 11), 5.9 ve 6.2 dakikalarda görülen pikler ise sığır jelatini varlığını gösteren peptitler (Şekil 10) olduğu belirlenmiştir. Ayrıca içerisinde domuz ve sığır jelatini barındırmayan numunenin kromatogramında, söz konusu geliş zamanlarında herhangi bir pik gözlenmemiştir (Şekil 12).



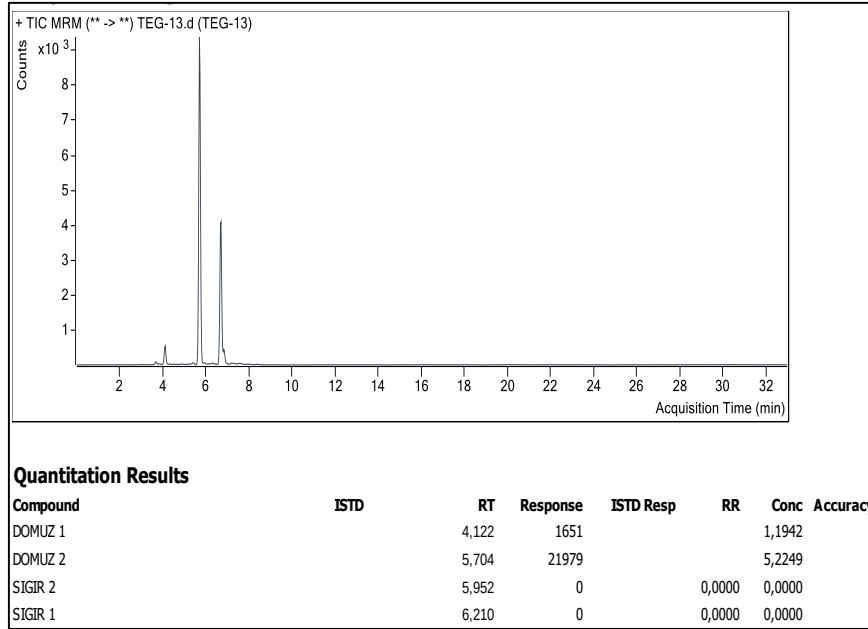
Şekil 9. İçerisinde hem sığır hem domuz jelatini olan numuneye ait toplam iyon kromatogramı

Figure 9. Total ion chromatogram of the sample containing both bovine and porcine gelatin

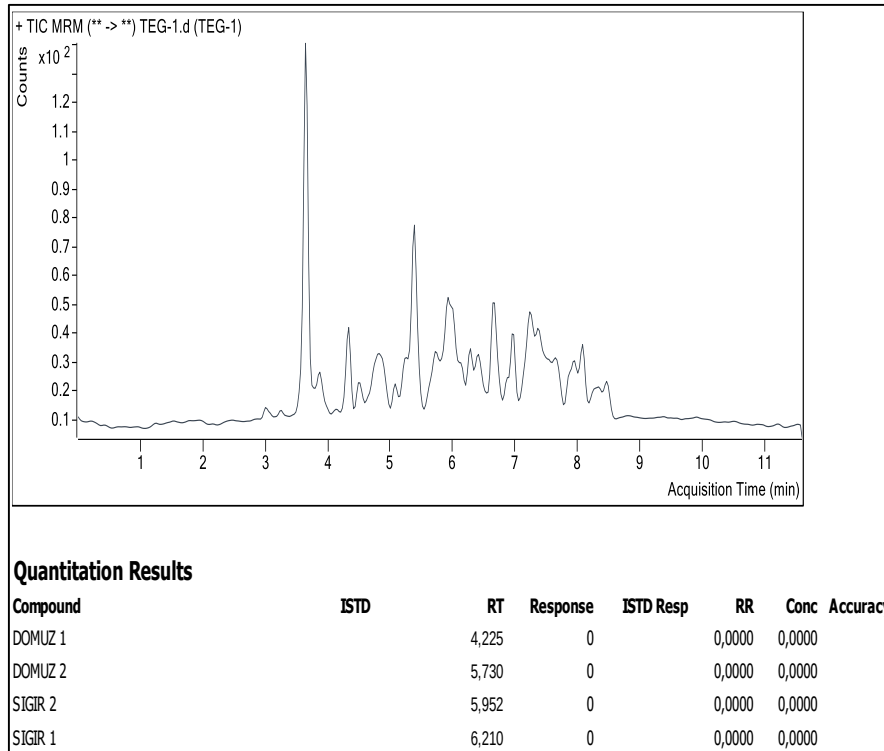


Şekil 10. İçerisinde sadece sığır jelatini olan numuneye ait toplam iyon kromatogramı

Figure 10. Total ion chromatogram of the sample containing only bovine gelatine



Şekil 11. İçerisinde sadece domuz jelatini olan numuneye ait toplam iyon kromatogramı
 Figure 11. Total ion chromatogram of the sample containing only porcine gelatine



Şekil 12. İçerisinde ne sığır ne de domuz jelatini bulundurmeyen numuneye ait toplam iyon kromatogramı
 Figure 12. Total ion chromatogram of the sample containing neither bovine nor porcine gelatine

Enzimatik parçalama süresinin optimizasyonu

Valide edilmiş metotta numuneler amonyum bikarbonat ile çözündürüldükten sonra tripsin enzimi eklenerek 37°C etüvde 15–16 saat bekletilerek hazırlanmıştır. Jelatin tür tayini ile ilgili LC-MS/MS yöntemiyle yapılan önceki çalışmalar incelendiğinde numune hazırlama esnasında enzim ve numunenin birleştirilmesinden sonra etüvde 37°C’de, çeşitli farkli sürelerde bekletilerek çalışıldığı görülmüştür. Bu çalışmalarda genellikle optimum sürenin 15–16 saat olduğu tespit edilmiştir (Çavuş, 2018; Zhang vd., 2008; Guifeng vd., 2009; Zhu vd., 2023). Yürütülen bu çalışmada da hem sığır ve hem de domuz peptitlerinin 37°C’de etüvde farklı bekleme sürelerinde farklı pik alanları olduğunu gözlemlemiş ve enzimatik parçalanma için optimum sürenin 16 saat olduğunu belirlemiştir (data gösterilmemiştir). Etüvde 37°C’de 16 saatlik bu enzimatik parçalanmaya alternatif olacak, çok daha kısa sürede enzimatik parçalama işlemini

sağlayacak ultrases destekli bir teknik geliştirilmiştir. Enzimatik parçalama sonrası numuneler valide LC-MS/MS-TQ yöntemiyle analiz edilmiştir. Sıcaklık ayarı yapılmadan, 15 dak., 20 dak., 30 dak., 45 dak. ve 1 saat bekletilerek yapılan çalışmalarda başarılı sonuçlar elde edilememiştir (data gösterilmemiştir). Ultrasonik su banyosunun sıcaklığı 37°C’ye ayarlandıktan sonra 15 dak., 20 dak., 30 dak., 45 dak. ve 1 saat bekletilerek yapılan sonuçlarda ise etüvde 16 saat bekletilerek çalışılan numuneler ile benzer sonuçlara ulaşılmıştır. Çizelge 7, beş farklı örnek üzerinde etüvde (37°C) 16 saat bekletilerek ve ultrasonik su banyosunda (37°C) 15 dakika bekletilerek gerçekleştirilen enzimatik parçalanmalara ilişkin sonuçları göstermektedir. Çizelge 7’den görüleceği üzere numune ve enzim birleştirildikten sonra 15 dak. 37°C’ye ayarlanmış ultrasonik su banyosunda bekletilerek yapılan enzimatik parçalama işleminin etüvde 16 saat bekletilerek gerçekleştirilen uygulama ile aynı sonuç verdiği tespit edilmiştir.

Çizelge 7. Enzimatik reaksiyon için etüvde 16 saat bekletilerek hazırlanan ve ultrasonik su banyosunda 15 dakika bekletilerek hazırlanan örneklerin sonuçlarının kıyaslanması

Table 7. Comparison of the results of the samples prepared for the enzymatic reaction after 16 hours in an oven and 15 minutes in an ultrasonic water bath

Uygulama <i>Treatment</i>	Etüvde 16 saat bekletilen <i>Oven (16 h)</i>		Ultrasonik su banyosunda 15 dk <i>Ultrasonic water bath (15 min)</i>	
Jelatin kaynağı <i>Origin of gelatine</i>	Domuz <i>Porcine</i>	Sığır <i>Bovine</i>	Domuz <i>Porcine</i>	Sığır <i>Bovine</i>
Örnek-1	Tespit edildi	Tespit edilemedi	Tespit edildi	Tespit edilemedi
Örnek-2	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi
Örnek-3	Tespit edilemedi	Tespit edildi	Tespit edilemedi	Tespit edildi
Örnek-4	Tespit edilemedi	Tespit edildi	Tespit edilemedi	Tespit edildi
Örnek-5	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi	Tespit edildi

SONUÇ

Bu çalışmada, takviye edici gıdalarda jelatin tür tayinine yönelik LC-MS/MS-TQ tekniği kullanılarak güvenilir valide edilmiş bir yöntem geliştirilmeye çalışılmıştır. Metot validasyonunda LOD, hassasiyet, doğruluk, yanlış-pozitif, yanlış-negatif ve güvenilirlik kriterleri göz önünde bulundurulmuştur. Geliştirilen metodun tespit limiti (LOD) değeri %0.012 olup, hassasiyet, doğruluk, yanlış-pozitif, yanlış-negatif ve güvenilirlik açısından geçerliliği ortaya konmuştur. Ayrıca, klasik 37°C’de 16 saatlik enzimatik

parçalama işlemi 15 dakikada ultrasonik su banyosu yardımı ile yapılabileceği, böyle enerji zaman tasarrufu sağlanabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Geliştirilen bu yöntem ile Türkiye piyasasında satılan takviye edici gıdalarda jelatin tür tayininde, birçok örnekte domuz jelatini varlığı tespit edilmiştir. Bu çalışma, takviye edici gıdaların jelatin tür tayininde güvenilir valide bir yöntem ile analiz sıklığının, denetim ve kontrollerin artırılması gerektiğini ortaya koymuştur.

TEŞEKKÜR

Çalışma boyunca her türlü laboratuvar ortamı cihaz ve malzeme destek ve imkanı sağlayan İstanbul Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğüne teşekkürlerimi sunarım.

YAZAR KATKILARI

Nazan Bingöl Yılmaz, analizlerin gerçekleştirilmesi, verilerin görselleştirilmesi ve makalenin yazımında, Selim Sünnetçi laboratuvar alt yapısının temini, LC-MS/MS-TQ yönteminin geliştirilmesi, Oktay Yemiş verilerin görselleştirilmesi ve makalenin yazımında katkı sağlamışlardır.

KAYNAKLAR

Anonim (2008). Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on food additives. *Official Journal of the European Union*, L 354/16 from 31.12.2008.

Anonim (2014). Eurachem-Analitik yöntemlerin amaca uygunluğu (The Fitness for Purpose of Analytical Methods) https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_TR.pdf

Anonim (2016). Analitik Kimyagerler Derneği (AOAC-Association of Official Analytical Chemists)'nin Standart Metot Performans Gereksinimleri Kılavuzu https://www.aoac.org/wp-content/uploads/2019/08/app_f.pdf

Anonim (2017). Türk Gıda Kodeksi. Gıda Etiketleme ve Tüketicileri Bilgilendirme Yönetmeliği. Resmi Gazete (Sayı: 29960 (Mükerrer). Erişim adresi: <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2017/01/20170126M1-6.htm>

Anonim (2018). TOB Kimyasal ve Fiziksel Analizlerde Metot Validasyonu/Verifikasyonu Rehberi. https://www.tarimorman.gov.tr/GKGM/Belgeler/DB_Gida_Kont/Kimyasal_Fiziksel_Val_Ver_Rehberi.pdf

Anonim (2021). Gıda ve Yemde Pestisit Kalıntıları Analizi için Analitik Kalite Kontrol ve Metot Validasyonu Prosedürleri (Sante/11312/2021 V2)

https://www.tarimorman.gov.tr/GKGM/Belgeler/DB_Gida_Kont/Pestisit_El_Kitabi.pdf

Ahmad, T., Ismail, A., Ahmad, S. A., Khalil, K. A., Kumar, Y., Adeyemi, K. D., Sazili, A. Q. (2017). Recent advances on the role of process variables affecting gelatin yield and characteristics with special reference to enzymatic extraction: A review. *Food Hydrocolloids*, 63, 85–96.

Altun, H. K., Ermumcu, M. S. K., Kurklu, N. S. (2021). Evaluation of dietary supplement, functional food and herbal medicine use by dietitians during the COVID-19 pandemic. *Public Health Nutrition*, 24(5): 861–869. doi:10.1017/S1368980020005297.

Boran, G. (2011). Bir Gıda Katkısı Olarak Jelatin: Yapısı, Özellikleri, Üretimi, Kullanımı ve Kalitesi. *Gıda*, 36(2), 97–104.

Çavuş, F. (2018). Yumuşak Şekerlemelerde Kullanılan Yenilebilir Jelatin Orijininin LC- Q-TOF ile Belirlenmesi (Yüksek Lisans Tezi). Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Bilecik, Türkiye.

Cebi, N., Durak, M. Z., Toker, O. S., Sagdic, O., Arici, M. (2016). An evaluation of Fourier transforms infrared spectroscopy method for the classification and discrimination of bovine, porcine and fish gelatins. *Food Chemistry*, 190, 1109–1115.

Demirhan, Y., Ulca, P., Senyuva, H. Z. (2012). Detection of Porcine DNA in Gelatine and Gelatine-Containing Processed Food Products—Halal/Kosher Authentication. *Meat Science*, 90(3):686–689.

Deng, G., Guo, S., Zaman, F., Li, T., Huang, Y. (2020). Recent advances in animal origin identification of gelatin-based products using liquid chromatography-mass spectrometry methods: A mini review. *Reviews in Analytical Chemistry*, 39(1), 260–271.

Doğan, S., Okumuş, E., Bakkalbaşı, E., Cavidoglu, İ. (2020). Tüketicilerin takviye edici gıdaları kullanım amacı, satın alma tercihleri, ürünlere olan güveni ve yasal düzenlemeler hakkındaki düşünceleri: Van ili örneği. *Yüzüncü Yıl*

- Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi, 30(4): 821–831, doi: 10.29133/yyutbd.733454
- Doi, H. I. D., Atanabe, E. R. W., Hibata, H. A. S., Anabe, S. O. T. (2009). A Reliable Enzyme Linked Immunosorbent Assay for the Determination of Bovine and Porcine Gelatin in Processed Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57:1721–1726.
- Guifeng Z., Tao L., Qian W., Li C., Jiandu L., Guanghui M., Zhiguo S. (2009). Mass Spectrometric detection of marker peptides in tryptic digests of gelatin: A New Method to differentiate between bovine and porcine gelatin, *Food Hydrocolloids*, 23, 2001–2007.
- Grundy, H. H., Reece, P., Buckley, M., Solazzo, C. M., Dowle, A. A., Ashford, D., ... Collins, M. J. (2016). A mass spectrometry method for the determination of the species of origin of gelatine in foods and pharmaceutical products. *Food Chemistry*, 190, 276–284.
- Jannat, B., Ghorbani, K., Shafieyan, H., Kouchaki, S., Behfar, A., Sadeghi, N., ... Sadeghi, M. (2018). Gelatin speciation using real-time PCR and analysis of mass spectrometry-based proteomics datasets. *Food Control*, 87, 79–87.
- Karim, A. A., Bhat, R. (2008). Gelatin alternatives for the food industry: recent developments, challenges and prospects. *Trends in Food Science & Technology*, 19(12), 644–656.
- Mursyidi, A. (2013). The role of chemical analysis in the halal authentication of food and pharmaceutical products. *Journal of Food and Pharmaceutical Sciences*, 1(1).
- Rohman, A., Windarsih, A., Erwanto, Y., Zakaria, Z. (2020). Review on analytical methods for analysis of porcine gelatine in food and pharmaceutical products for halal authentication. *Trends in Food Science & Technology*, 101, 122–132.
- Shabani, H., Mehdizadeh, M., Mousavi, S. M., Dezfouli, E. A., Solgi, T., Khodaverdi, M., ... Alebouyeh, M. (2015). Halal authenticity of gelatin using species-specific PCR. *Food Chemistry*, 184, 203–206.
- Tukiran, N. A., Ismail, A., Mustafa, S., Hamid, M. (2016). Development of Antipeptide Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Determination of Gelatin in Confectionery Products. *International Journal of Food Science and Technology*, 51(1):54–60.
- Venien, A., Levieux, D. (2005). Differentiation of bovine from porcine gelatines using polyclonal anti-peptide antibodies in indirect and competitive indirect ELISA. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 39(3-4), 418–424.
- Yap, B. K., Gam, L. H. (2019). Differentiation of bovine from porcine gelatin capsules using gel electrophoresis method. *Food Chemistry*, 274, 16–19.
- Sha, X. M., Hu, Z. Z., Ye, Y. H., Xu, H., Tu, Z. C. (2019). Effect of extraction temperature on the gelling properties and identification of porcine gelatin. *Food Hydrocolloids*, 92, 163–172, ISSN 0268-005X, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.01.059>.
- Sha, X. M., Wang, G. Y., Li, X., Zhang, L. Z., Tu, Z. C. (2020). Identification and quantification of gelatin by a high-resolution mass spectrometry-based label-free method. *Food Hydrocolloids*, 101, 105476.
- Zhang G. F., Liu, T., Wang, Q., Lei, J-D., Ma, G-H., Su, Z-G. (2008). Identification of Marker Peptides in Digested Gelatins by High Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry, *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 36(11), 1499–1504.
- Zhu, X., Gu, S., Guo, D., Huang, X., Chen, N., Niu, B., Deng, X. (2023). Determination of porcine derived components in gelatin and gelatin-containing foods by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Hydrocolloids*, 134, 107978.