

**EGE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**GIDALARDA HETEROSİKLİK AMİNLERİN
(HCA) ANALİZ YÖNTEMLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Esra KAÇAR

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ali ÜREN

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 614.01.01

Sunuş Tarihi: 05.10.2012

**Bornova -İZMİR
2012**

Esra KAÇAR tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “Gıdalarda Heterosiklik Aminlerin Analiz Yöntemlerinin Karşılaştırılması” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 05.10.2012 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Ali ÜREN

Raportör : Prof. Dr. Mustafa Kemal ÜNAL

Üye : Prof. Dr. Neriman BAĞDATLIOĞLU

ÖZET**GIDALARDA HETEROSİKLİK AMİNLERİN (HCA) ANALİZ
YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

KAÇAR, Esra

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ali ÜREN

Eylül 2012, 83 sayfa

Bu çalışmada gıdalarda bulunan HCA'ların tayini için en sık kullanılan üç analiz yöntemi çeşitli özellikleri bakımından kıyaslanmıştır. Çalışmada kullanılan yöntemlerin ekstraksiyon metotları farklılık göstermektedir. HCA miktarlarının tespit edilmesi için HPLC cihazı kullanılmıştır. Çalışmada Üren ekstraksiyon metodu, Messner & Murkovic ekstraksiyon metodu ve Santos ekstraksiyon metodu ile çalışılmıştır. Bu metotlar için yöntem kıyaslama, geri kazanım, tekrarlanabilirlik ve tespit limiti analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu analizlerde IQ, MeIQx, DiMeIQx, PhIP, Norharman ve Harman bileşikleri ile çalışılmıştır.

Çalışmada yöntem kıyaslama, geri kazanım ve tekrarlanabilirlik analizleri için fırında 225 °C'de 20 dakika boyunca pişirilen köfte örnekleri kullanılmıştır. Tespit limiti analizi için ise haşlanmış et örneği kullanılmıştır. Örneklerin homojenliğini sağlayabilmek için örnekler analize alınmadan önce parçalanmış, dondurulmuş ve sonrasında freze-drier yardımıyla kurutulmuştur. Örnekler analize kadar -18 °C'de depolanmıştır.

Yöntem kıyaslama verileri incelendiğinde Üren ve Messner & Murkovic ekstraksiyon metotlarının benzer sonuçlar verdiği görülmüştür. Floresans dedektörde tespit edilen bileşikler için ise Messner & Murkovic ekstraksiyon metoduyla genellikle en yüksek veriler elde edilmiştir. Tekrarlanabilirlik analizleri sonucunda elde edilen verilere bakıldığında DAD dedektörde tespit edilen bileşiklerde Üren ve Messner & Murkovic ekstraksiyon metotları benzer sonuçları göstermiştir. Floresans dedektörde tespit edilen bileşikler için ise Üren

ekstraksiyon metodunun en yüksek tekrarlanabilirlik değerine sahip olduğu belirlenmiştir. Tespit limiti analizi sonuçlarına bakıldığında tüm bileşenler için genel olarak en düşük tespit limiti verileri ren ekstraksiyon metoduna aittir. Geri kazanım oranı için yapılan analizlerin sonuçlarına bakıldığında DAD dedektörde tespit edilen bileşiklerde ren ekstraksiyon metodu, floresans dedektörde tespit edilen bileşiklerde de Santos ekstraksiyon metodu genel olarak daha yüksek geri kazanım oranına sahiptir.

Yapılan analizler sonucunda ren ekstraksiyon metodunun tekrarlanabilirlik ve tespit limiti değerlerinde genel olarak en iyi sonuçlara ve geri kazanım oranında da diğer metotlarla eşit veya onlardan daha yüksek geri kazanım oranlarına sahip olduğu grlmştir.

Anahtar Sözcükler: HCA, yöntem kıyaslama, tekrarlanabilirlik, tespit limiti, geri kazanım.

ABSTRACT**COMPARISON OF THE ANALYSIS METHODS OF HETEROCYCLIC
AMINES (HCA) IN FOODS**

KAÇAR, Esra

MSc in Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Ali ÜREN

September 2012, 83 pages

In this study the most frequently used three analysis methods for determination of HCAs present in foods were compared due to several properties. Extraction processes of the methods used in this study have differences. HCA amounts of the samples were determined with HPLC. Üren extraction process, Messner & Murkovic extraction process, Santos extraction process were the methods used in the study. For these methods; method comparing, recovery, repeatability and detection limit analyses were performed. In these analyses IQ, MeIQ_x, DiMeIQ_x, PhIP, Norharman and Harman compounds were investigated.

In the study meatball samples that had been cooked 20 minute at 225 °C were used for method comparing, recovery and repeatability analyses. However for detection limit analysis boiled meat sample was used. To homogenize samples they had been smashed before analysis then frozen and dried by freeze-drier. The samples had been stored at -18 °C until they were analysed.

When the results of method comparing analysis investigated, it showed Üren and Messner & Murkovic extraction processes had similar results. However for the compounds that analysed with flourescent detector, generally the highest values were obtained by Messner & Murkovic extraction process. Results of repeatability analyses showed that Üren and Messner & Murkovic extraction processes have similar results for the compounds detected with DAD detector. Üren extraction process had also the highest repeatability values for the compounds detected with flourescent detector. Üren extraction process has the lowest

detection limit values for all the compounds. Results of recovery analyses show that Üren extraction process has higher values for the compounds detected with DAD detector.

As a result of all analyses Üren extraction process generally has the best results for repeatability and detection limit analyses and also has equal or better results for recovery analysis compared to the other extraction processes.

Key Words: HCA, method comparing, repeatability, detection limit, recovery.

TEŐEKKÖR

Tez alışmam sırasında bilgi ve tecrűbesiyle bana destek olan danışmanım Sayın Prof. Dr. Ali ÜREN'e, her konuda yardımını esirgemeyen Ar. Gör. Dr. Özgöl ÖZDESTAN'a, laboratuvarında alışma arkadaşım olan sevgili Ezgi CANLI'ya, E.Ü. Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne, desteklerinden dolayı TÜBİTAK- Bilim İnsanını Destekleme Daire Başkanlığına, yüksek lisansım boyunca yanımda ve bana destek olan canım annem, babam ve kardeşime teőekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	V
ABSTRACT	VII
TEŞEKKÜR	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIV
ÇİZELGELER DİZİNİ	XVI
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	4
2.1 HCA'ların Oluşum Mekanizması ve Sınıflandırılması	4
2.2 HCA Oluşumunu Etkileyen Faktörler	7
2.2.1 Sıcaklık ve süre	8
2.2.2 Pişirme ekipmanı ve metodu.....	9
2.2.3 Ortamda bulunan öncü maddeler	10
2.2.4 Lipidler	10
2.2.5 Antioksidan maddeler	11
2.3 HCA'ların İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri.....	15
2.4 HCA Analizinde Kullanılan Başlıca Yöntemler.....	16
2.5 Messner & Murkovic Ekstraksiyon Metodu Kullanılarak Yapılan Çalışmalar	17
2.6 Santos Ekstraksiyon Metodu Kullanılarak Yapılan Çalışmalar	21

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3. MATERYAL.....	29
3.1 Köfte Örnekleri	29
3.2 Haşlanmış Et Örnekleri	29
3.3 Kimyasal Maddeler	30
3.3.1 Üren ekstraksiyon metodunda kullanılan kimyasallar	30
3.3.2 Messner & Murkovic ekstraksiyon metodunda kullanılan kimyasallar.....	31
3.3.3 Santos ekstraksiyon metodunda kullanılan kimyasallar	31
3.3.4 HPLC’de kullanılan kimyasallar	32
4. METOT	33
4.1 Üren Ekstraksiyon Yöntemi.....	33
4.2 Messner & Murkovic Ekstraksiyon Yöntemi	33
4.3 Santos Ekstraksiyon Yöntemi	34
4.4 Yöntem Kıyaslama.....	35
4.5 Tekrarlanabilirlik.....	35
4.6 Tespit Limiti.....	35
4.7 Geri Kazanım	35
4.8 HPLC Analizi İçin Standart Çözeltilerin Hazırlanması	36
4.9 HPLC Analizi.....	36
4.10 İstatiksel Analizler	37

İÇİNDEKİLER (devam)**Sayfa**

5. BULGULAR.....	38
5.1 Ekstraksiyon Yöntemlerinin Kıyaslanması.....	38
5.2 Tekrarlanabilirlik	43
5.3 Tespit Limiti.....	47
5.4 Geri Kazanım	51
6. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	56
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	60
ÖZGEÇMİŞ	64

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sekil

Sayfa

2.1 Termik HCA'ların oluşum mekanizması.....	4
2.2 Pirolitik HCA'ların oluşum mekanizması.....	5
2.3 Bazı HCA bileşiklerinin moleküler yapıları	6
2.4 1000ppm karotenoid konsantrasyonunda et suyu model sisteminde ve kimyasal model sistemde HCA inhibisyonu (Vitaglione et al., 2002).	11
2.5 HCA oluşumu üzerine marinyasyon ortamının inhibisyon (%) etkisi.	13
2.6 HCA oluşumu üzerine fesleğen ve güvey otu baharatlarının inhibisyon (%) etkisi.	18
2.7 T0 durumunda farklı marinyasyon ortamlarının radikal eleme aktivitesi (%) (Viegas et al., 2012).	23
2.8 Hazır gıdalarda bulunan HCA miktarları (ng/g) (Puangsombat et al., 2011a).....	25
2.8 Termik ve pirolitik HCA'ların alımı (ng/100g ızgara edilmiş et örneği)	26
2.9 Zerdeçal, Çin zencefil ve havlıcan için inhibisyon oranları (%)	28
3.1 a)Parçalanmış köfte örneği b)Dondurularak kurutulmuş köfte örneği	29
5.1 Yöntem kıyaslama analizinde IQ bileşenine ait veriler (ppm).	38
5.2 Yöntem kıyaslama analizinde MeIQx bileşenine ait veriler (ppm).	39
5.3 Yöntem kıyaslama analizinde DiMeIQx bileşenine ait veriler (ppm).	39
5.4 Yöntem kıyaslama analizinde PhIP bileşenine ait veriler (ppm).	40
5.5 Yöntem kıyaslama analizinde Norharman bileşenine ait veriler (ppm).	41
5.6 Yöntem kıyaslama analizinde Harman bileşenine ait veriler (ppm).	41

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
5.7 Yöntem kıyaslama analizinde IQ, MeIQx, DiMeIQx, PhIP, Norharman ve Harman bileşenlerine ait ortalama veriler (ppm).	42
5.8 Tekrarlanabilirlik analizinde IQ, MeIQx, PhIP, Norharman ve Harman bileşenlerine ait standart sapmalar	46
5.9 MeIQx, PhIP, Norharman ve Harman bileşenlerine ait tespit limiti değerleri (ppm).....	50
5.10 IQ, MeIQx, DiMeIQx, PhIP, Norharman ve Harman bileşenlerine ait tespit limiti değerleri (ppm).	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Gıdalarda tanımlanmış HCA'ların açık isimleri (Öz, 2006).....	6
2.2 Pişirilmemiş, 30 s pişirilmiş ve 60 s pişirilmiş domuz pastırması (DP) örneklerindeki HCA (IQ, IQx, MeIQx, DiMeIQx, PhIP ve toplam) miktarları (Kanithaporn et al., 2012).....	8
2.3 Kızartılmış ve ızgara edilmiş sığır eti örneklerinin HCA (MeIQx, DiMeIQx, PhIP ve toplam) içeriği (Puangsombat et al., 2012).	9
2.4 Doğrudan antioksidan eklenmiş kızartılmış sığır köftelerinde HCA konsantrasyonu(ng/g) ve yüzde olarak azalma miktarı (Balogh et al., 2000).....	12
2.5 210°C'de 6dk kızartılan sığır köftesi örneklerine eklenen meyve ekstraktlarına ait toplam fenolik miktarı ve bu ekstraktların HCA oluşumuna etkileri (Cheng et al., 2010).	13
2.6 Domuz etinde ve soslarda oluşan HCA (ng.g ⁻¹) (Janoszka, 2010).	14
2.7 Üren, Santos ve Messner & Murkovic ekstraksiyon metotlarının kıyaslanması	17
2.8 Çalışmada kullanılan baharatların fenolik içerikleri (Damasius et al., 2011)	17
2.9 HCA bileşenlerine ait minimum ve maksimum değerler (Dündar ve ark., 2012).....	19
2.10 200°C'de 6 dk kızartılan sığır köftelerinde HCA oluşumu üzerine vitaminlerin (0,2 mmol) etkisi (Wong et al., 2012).	20
2.11 Köftede bulunan HCA miktarı (ng/g) (Öz ve Kaya, 2011).....	20
2.12 Marinasyon soslarının bileşim ve baharat kompozisyonu (Smith et al., 2008).....	21

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.13 204 °C’de 10 dk boyunca ızgara edilen sığır eti örneklerinde marinyasyon soslarının HCA konsantrasyonu (ng/g) üzerine etkisi (Smith et al., 2008).	22
2.14 Tavada 180°C’de kızartılmış, 4 saat marine edilmiş sığır etlerinde marinyasyon sıvılarının HCA oluşumu üzerine etkileri (Sonuçlar ortalama±standart sapma (n=3) biçiminde gösterilmiştir, parantez içlerinde inhibisyon (%) oranları verilmiştir.) (Viegas et al., 2012).....	24
2.15 Kızartılmış ve ızgara edilmiş sığır eti örneklerinin HCA (MeIQx, DiMeIQx, PhIP ve toplam) içeriği (Puangsombat et al., 2012).....	26
2.16 Kızartılmış et örneklerinin HCA (MeIQx, DiMeIQx, PhIP ve toplam) içeriği (Puangsombat et al., 2012).	27
2.17 400 °C’de 10 dk boyunca pişirilen sığır köftelerinde oluşan HCA miktarı (ng/g) üzerine kullanılan baharatların etkisi ve baharatların inhibisyon oranı (%) (3 tekrara ait ortalama ± standart sapma) (Puangsombat et al., 2011b).....	28
5.1 Tekrarlanabilirlik analizinde IQ bileşenine ait veriler (ppm).	43
5.2 Tekrarlanabilirlik analizinde MeIQx bileşenine ait veriler (ppm).....	44
5.3 Tekrarlanabilirlik analizinde PhIP bileşenine ait veriler (ppm).	44
5.4 Tekrarlanabilirlik analizinde Norharman bileşenine ait veriler (ppm).	45
5.5 Tekrarlanabilirlik analizinde Harman bileşenine ait veriler (ppm).	46
5.6 Tespit limiti analizinde MeIQx bileşenine ait veriler (ppm).	47
5.7 Tespit limiti analizinde PhIP bileşenine ait veriler (ppm).....	48
5.8 Tespit limiti analizinde Norharman bileşenine ait veriler (ppm).....	49
5.9 Tespit limiti analizinde Harman bileşenine ait veriler (ppm).	49

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
5.10 Geri kazanım oranı belirleme analizinde IQ bileşenine ait veriler (%).	51
5.11 Geri kazanım oranı belirleme analizinde MeIQx bileşenine ait veriler (%).	51
5.12 Geri kazanım oranı belirleme analizinde DiMeIQx bileşenine ait veriler (%).	52
5.13 Geri kazanım oranı belirleme analizinde PhIP bileşenine ait veriler (%).	52
5.14 Geri kazanım oranı belirleme analizinde Norharman bileşenine ait veriler (%).	53
5.15 Geri kazanım oranı belirleme analizinde Harman bileşenine ait veriler (%).	53

1. GİRİŞ

Heterosiklik aminler (HCA) etin yüksek sıcaklıklarda pişirilmesiyle, Maillard Reaksiyonunun bir parçası olarak oluşurlar. Heterosiklik aminler insan sindirim sistemi ve solunum yolu üzerinde mutajenik ve kanserojenik etkilere sahiptir (Jakszyn et al., 2004).

HCA'lar dayanıklı ve çok halkalı aromatik yapıya sahiptirler. Heterosiklik aminler, yapılarında karbon, hidrojen ve azot atomlarını bulundurmaktadırlar ve halka yapıda çift doymamış bağ içermektedirler (Chen and Chiu, 1998).

Yapılan çalışmalar pişirilmiş gıdalarda 25'ten fazla mutajenik ve kanserojenik heterosiklik amin çeşidi olduğunu ortaya koymuştur.

Heterosiklik aminler insan sindirim sistemi ve solunum yolu üzerinde mutajenik ve kanserojenik etkilere sahip olduğundan gıdalarda bulunması istenmez. Yaklaşık 20 yıl önce heterosiklik aminlerin laboratuvar hayvanları üzerinde potansiyel mutajen ve kanserojen maddeler oldukları bulunmuştur. Heterosiklik aminlerle uzun süre beslenen kemirgenlerde sıklıkla tümör, kolon ve prostat kanseri görülmüştür. Ayrıca sıcaklık 300°C üzerine çıktığında, amino asitlerin pirolizine bağlı olarak heterosiklik aminlerin mutajenik aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (Sahar et al., 2010).

Diğer gıda mutajenleri ile karşılaştırıldığında heterosiklik aminlerin aflatoksin B₁'den 100 kat, en yaygın bulunan ve diğer polisiklik aromatik hidrokarbonların indikatörü olan benzo[a]pyrene'den ise 2000 kat daha mutajenik oldukları belirlenmiştir (Öz, 2006).

HCA analizlerinde, HCA'ların pişmiş gıdalarda ng/g gibi çok düşük miktarlarda bulunması, gıda matrisinin kompleks olması ve analizde ekstraksiyon, saflaştırma ve konsantrasyon gibi pek çok izolasyon basamağının gerekmesi

doğru tespiti zorlaştırmaktadır (Meester, 1998). Bunlara ek olarak HCA analiz yöntemleri genel olarak zaman alıcı ve pahalı analizlerdir (Sahar et al., 2010).

Heterosiklik aminler yapılarında konjuge çift bağ içerdiklerinden florasans özellik gösterirler ve onların bu zellikleri HPLC analizlerinde tespit edilmelerinde kullanılmaktadır. Heterosiklik aminlerin tayin edilmesinde en sık kullanılan yöntemler HPLC-UV ve florasans tespit yöntemleridir. HPLC-florasans yöntemi daha yüksek seçicilik ve hassaslık sağlamaktadır (Sahar et al., 2010).

Ülkemizde et tüketiminin yaygın olması ve yüksek ısıl işlem uygulanması sebebiyle tüketilen et ve et rnlerinde HCA bulunması beklenmektedir. Tüketilen HCA miktarının belirlenebilmesi için heterosiklik amin miktarının doğru olarak belirlenmesi gerekmektedir. Kompleks yapıdaki gıdalarda ng/g gibi çok düşük düzeylerde bulunan heterosiklik aminlerin tayininin doğru olarak yapılması çok önemlidir. Heterosiklik amin tayininde uygulanan ekstraksiyon, saflaştırma ve toplama gibi işlem basamakları kaçınılmaz olarak kayba sebep olmaktadır.

HCA tayininde kullanılan analiz yöntemlerinin çoğu pahalı ve çok zaman alan yöntemlerdir. Ayrıca bu yöntemler sonucu elde edilen sonuçlar laboratuvarlar arasında farklılık gösterebilmektedir.

HCA tayinlerinde karşılaşılan problemleri en aza indirebilmek ve doğru sonuçlar elde edebilmek için farklı HCA tayin yöntemleri geliştirilmiştir. Geliştirilen bu yöntemlerin doğrulukları, maliyetleri ve sürelerinin karşılaştırılması en iyi sonucu elde edebilmek için faydalı olacaktır.

HPLC ile yapılan analizler diğer yöntemlere göre daha hassas sonuç verdiğinden ve dezavantajı diğer analiz yöntemlerine göre daha az olduğundan tez çalışmasında değerlendirme basamağında HPLC ile çalışılmış, ekstraksiyon basamağında ise 3 farklı yöntem kullanılmıştır. Tezde uygulanan ekstraksiyon

yöntemlerinin ilki Prof. Dr. Ali Üren ve ark. tarafından geliştirilmiştir. Diğer yöntemler ise Santos et al. (2004) tarafından ve Messner & Murkovic (2004) tarafından geliştirilmiştir. Tezde bu yöntemlerden sırası ile Üren ekstraksiyon yöntemi, Santos ekstraksiyon yöntemi ve Messner & Murkovic ekstraksiyon yöntemi olarak bahsedilecektir.

Tez çalışmasında bahsedilen yöntemlerle ilgili olarak yöntem kıyaslama, tekrarlanabilirlik, tespit limiti ve geri kazanım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmasında HCA çeşit ve miktarları belirlenirken HPLC analizi sonucunda elde edilen piklerden faydalanılmıştır. Bunun için IQ, MeIQx ve DiMeIQx bileşikleri DAD dedektörde, PhIP, Norharman ve Harman bileşikleri ise floresans dedektörde tespit edilmiştir.

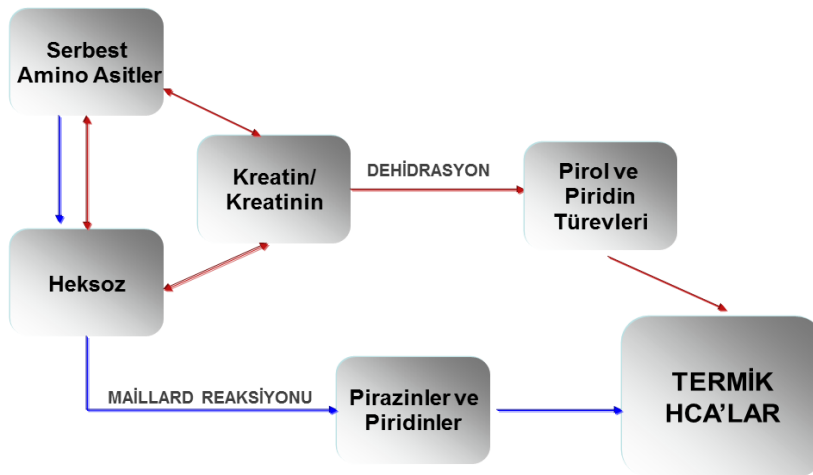
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1 HCA'ların Oluşum Mekanizması ve Sınıflandırılması

HCA'lar proteince zengin gıdaların 150 °C üzerindeki sıcaklıklarda pişirilmesi esnasında oluşurlar. HCA'ların oluşumunda Maillard Reaksiyonları önemli rol oynamaktadır. Çiğ ette bulunan kreatin/kreatinin, serbest amino asitler ve heksozlar HCA oluşumuna yol açan maddelerdir (Skog et al., 1998).

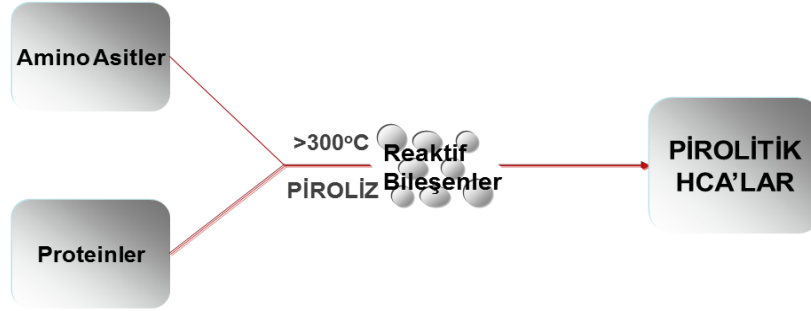
HCA'lar oluşum mekanizmalarına göre iki ana kimyasal sınıfa ayrılırlar. Bunlardan birincisi aminoimidazoazoarenler (AIA) ve ikincisi ise aminokarbolinlerdir.

Aminoimidazoazoarenler: Isıl işlem görmüş gıdalarda en önemli grubu oluşturmaktadırlar, IQ tipi bileşikler veya termik HCA'lar olarak da adlandırılır ve gıdaların, normal ev tipi pişirme sıcaklıklarında (150–300°C) pişirilmesi süresince serbest aminoasitler, kreatin/kreatinin ve heksozlar arasındaki reaksiyonlarla oluşturmaktadırlar. Şekil 2.1.1'de termik HCA'ların oluşumu şematize edilmiştir. Bu gruba giren başlıca HCA'lar IQ, MeIQ, MeIQx, DiMeIQx, ve PhIP'dir.



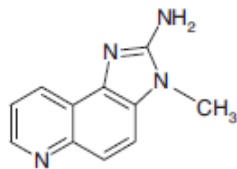
Şekil 1.1 Termik HCA'ların oluşum mekanizması

Aminokarbolinler: 300°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda proteinler ve aminoasitlerin pirolizi sonucu oluşmaktadır (Toribio et al., 2002). Bu yüzden pirolitik HCA'lar olarak da adlandırılırlar. Şekil 2.2'de pirolitik HCA'ların oluşum mekanizmaları şematize edilmiştir. Bu gruba giren başlıca HCA'lar ise Glu-P-1, Glu-P-2, Phe-P-1, Trp-P-1, Trp-P-2, AαC ve MeAαC'dir.

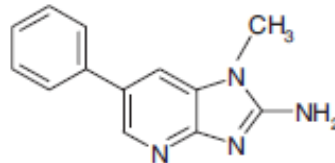


Şekil 2.2 Pirolitik HCA'ların oluşum mekanizması

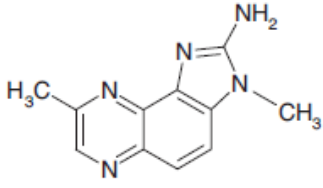
Başka bir sınıflandırma da HCA'ların kanserojen özelliklerine göre yapılmıştır. Bu sınıflandırmada uluslararası kanser araştırmaları ajansı heterosiklik aminlerin bir kısmını kuvvetle muhtemel (possible) kanserojen (2B sınıfı: MeIQ, 8-MeIQx, PhIP, AαC, MeAαC, Trp-P-1, Trp-P-2) ve bir tanesini de muhtemel (probable) kanserojen (2A sınıfı: IQ) olarak sınıflandırmıştır. Buna ek olarak yapılan pek çok epidemiyolojik çalışma, et tüketimi ile kolon kanseri arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir ve heterosiklik aminler bu ilişkiden sorumlu bileşik olarak görülmektedir (Sun et al., 2010). Şekil 2.3'te bazı HCA'ların molekül yapıları görülmektedir.



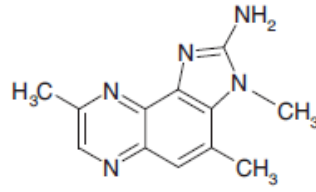
IQ



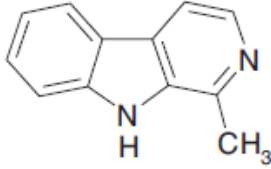
PhIP



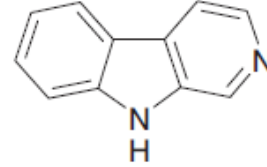
MeIQx



DiMeIQx



Harman



Norharman

Şekil 2.3 Bazı HCA bileşiklerinin moleküler yapıları

Yapılan çalışmalar sonucunda tespit edilen heterosiklik aminler Çizelge 2.1'de yer almaktadır. (Öz, 2006).

Çizelge 2.1 Gıdalarda tanımlanmış HCA'ların açık isimleri (Öz, 2006).

Kimyasal İsmi ve Sınıfı	Kısaltması
Aminoimidazoazoarenler	
2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]kinolin	IQ
2-amino-3,4-dimetilimidazo[4,5-f]kinolin	MeIQ
2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]kinokzalin	IQx
2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]kinokzalin	MeIQx
2-amino-3,4,8-trimetilimidazo[4,5-f]kinokzalin	4,8-DiMeIQx
2-amino-3,7,8-trimetilimidazo[4,5-f]kinokzalin	7,8-DiMeIQx
2-amino-3,4,7,8-tetrametilimidazo[4,5-f]kinokzalin	4,7,8-TriMeIQx
2-amino-4-hidroksimetil-3,8-dimetilimidazo [4,5-f]kinokzalin	4-CH ₂ OH-8-MeIQx
2-amino-1,7,9-trimetilimidazo[4,5-g]kinokzalin	7,9-DiMeIQx
2-amino-1,6-dimetilimidazo[4,5-b]piridin	1,6-DMIP
2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridin	PhIP

2-amino-1-metil-6-(4-hidroksifenil)-imidazo[4,5- <i>b</i>]piridin	4i-OH-PhIP
2-amino-1,5,6 trimetilimidazo[4,5- <i>b</i>]piridin	1,5,6-TMIP
2-amino-3,5,6 trimetilimidazo[4,5- <i>b</i>]piridin	3,5,6-TMIP
2-amino-1,6-dimetilfuro[3,2- <i>e</i>]imidazo[4,5- <i>b</i>]piridin	IFP

Aminokarbolinler

2-amino-9 <i>H</i> -pirido[2,3- <i>b</i>]indol	AαC
2-amino-3-metil-9 <i>H</i> -pirido[2,3- <i>b</i>]indol	MeAαC
1-metil-9 <i>H</i> -pirido[4,3- <i>b</i>]indol	Harman
9 <i>H</i> -pirido[4,3- <i>b</i>]indol	Norharman
3-amino-1,4-dimetil-5 <i>H</i> -pirido[4,3- <i>b</i>]indol	Trp-P-1
3-amino-1-metil-5 <i>H</i> -pirido[4,3- <i>b</i>]indol	Trp-P-2
2-amino-6-metildipirido[1,2- <i>a</i> :3 ₁ ,2 ₁ - <i>d</i>]imidazol	Glu-P-1
2-aminodipirido[1,2- <i>a</i> :3 ₁ ,2 ₁ - <i>d</i>]imidazol	Glu-P-2
3,4-cyclopentenopirido[3,2- <i>a</i>]karbazol	Lys-P-1
2-amino-5-fenilpiridin	Phe-P-1
4-amino-6-metil-1- <i>H</i> -2,5,10,10 <i>b</i> tetraazafluoranten	Orn-P-1
4-amino-1,6-dimetil-2-metilamino-1 <i>H</i> ,6 <i>H</i> pirolo[3,4- <i>f</i>]benziimidazol-5,7-dion	Cre-P-1

2.2 HCA Oluşumunu Etkileyen Faktörler

Gıdalarda HCA konsantrasyonu öncelikle etin yapısında bulunan serbest amino asit, kreatin, kreatinin ve şekerlerin miktarına bağlıdır. Bunlara ek olarak pişirme sıcaklığı, pişirme süresi, pişirmede kullanılan ekipman ve metot da HCA konsantrasyonunu etkileyen faktörler arasındadır. Ayrıca ortamda bulunan lipidler, antioksidanlar ve su da pişirme sırasında HCA oluşumuna etki eden faktörlerdendir (Lee et al., 2011).

2.2.1 Sıcaklık ve süre

Kondjayan et al. (2010) yaptıkları bir çalışmada kızgın buhar uygulanan sığır etlerinde HCA oluşumunu incelemiştir. Çalışmada dilim halindeki sığır etlerine ısı uygulanmıştır. Isı uygulaması 170 ve 220°C arasında, 1 ve 20 dakika arasında değişen sürelerde gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmada ısı uygulamasında sıcaklık ve süre arttıkça HCA oluşumunun arttığı tespit edilmiştir. Bu artış kinetik olarak modellenmiş ise birinci dereceden reaksiyon kinetiğine uyduğu görülmüştür.

Kanithaporn et al. (2012), yaptıkları bir çalışmada pişirilen farklı et örneklerinde HCA oluşumunu incelemiştir. Çalışmada 170 ve 230°C arasında farklı sıcaklıklarda pişirme işlemi uygulanmıştır. Ayrıca farklı pişirme sürelerinin de HCA oluşumu üzerine etkileri incelenmiştir. Elde edilen veriler çizelge 2.2'de gösterilmiştir. Sonuç olarak çok pişirilmiş et örneklerinde toplam HCA miktarının orta derecede pişirilmiş et örneklerinden 3,5 kat fazla olduğu belirtilmiştir.

Çizelge 2.2 Pişirilmemiş, 30 s pişirilmiş ve 60 s pişirilmiş domuz pastırması (DP) örneklerindeki HCA (IQ, IQx, MeIQx, DiMeIQx, PhIP ve toplam) miktarları (Kanithaporn et al., 2012).

Örnek	HCA (ng/g)					
	IQ	IQx	MeIQx	DiMeIQx	PhIP	Toplam
Pişirilmemiş DP	0,33±0,07 ^b	0,00±0,00 ^a	0,09±0,06 ^b	te	0,10±0,02 ^b	0,53±0,11 ^b
30 s pişirilmiş DP	0,60±0,05 ^a	0,04±0,03 ^a	0,14±0,02 ^a	te	0,14±0,03 ^a	0,91±0,06 ^a
60 s pişirilmiş DP	0,52±0,03 ^a	0,03±0,02 ^a	0,36±0,15 ^a	te	0,18±0,00 ^a	1,10±0,14 ^a

te = tespit edilemedi

Tüm değerler ortalama±standart sapma (n=4) olarak gösterilmiştir. Aynı kolonda farklı üst simgeye sahip ortalamalar p<0,05 için anlamlı olarak birbirinden farklıdır.

2.2.2 Pişirme ekipmanı ve metodu

Pişirme sırasında kullanılan farklı ekipmanlar HCA oluşumu üzerine farklı etkiler gösterebilmektedir. Örneğin fırında pişirme işlemi tavada kızartma işlemine göre daha az miktarda HCA oluşumu sağlar. Bunun sebebi gıdanın doğrudan tava ile temas ettiğinde gerçekleşen ısı transferinin, fırında hava ile sağlanan ısı transferinden yüksek olmasıdır. Ayrıca fırında pişirmede eğer ortamda buhar bulunuyorsa, sadece konveksiyonel ısıtma sağlayan fırına göre daha az mutajen madde oluştuğu belirtilmiştir (Skog et al. 1997).

Yapılan çalışmalarda kızartma ile oluşan yüksek HCA miktarını önlemek için gıdaya kızartma işleminden önce mikrodalga ısıtma işlemi uygulamasının etkili olduğu belirtilmiştir. Mikrodalga ısıtma sırasında et suyunun kaybıyla HCA öncü maddelerinde gerçekleşen azalma bu işlemin etkinliğinin temel prensibini oluşturmaktadır (Felton et al., 1994).

Puangsoombat et al. (2012) yaptıkları çalışmada farklı pişirme ekipmanlarının HCA oluşumu üzerine etkilerini incelemiştir. Bu amaçla sığır eti örnekleri fırında ızgara edilmiş ve teflon tavada kızartılmıştır. Elde edilen bulgular çizelge 2.3'te gösterilmiştir. Sonuç olarak sığır eti örneklerindeki toplam HCA miktarı tavada kızartılan et örneklerinde daha yüksek olarak bulunmuştur.

Çizelge 2.3 Kızartılmış ve ızgara edilmiş sığır eti örneklerinin HCA (MeIQx, DiMeIQx, PhIP ve toplam) içeriği (Puangsoombat et al., 2012).

Pişirilen Örnekler	HCA (ng/g)				
	MeIQx	DiMeIQx	PhIP	Toplam	
Kızartılmış sığır eti	Orta pişmiş	1,75±1,43 ^a	0,04±0,07 ^a	0,94±0,70 ^b	2,73±2,01 ^c
	Tam pişmiş	3,33±0,38 ^a	0,33±0,38 ^a	5,27±0,81 ^a	8,92±1,08 ^a
Izgara edilmiş sığır eti	Orta pişmiş	0,08±0,07 ^b	0,06±0,04 ^a	1,58±0,36 ^b	1,72±0,43 ^c
	Tam pişmiş	0,12±0,07 ^b	0,11±0,02 ^a	5,63±0,95 ^a	6,04±0,97 ^b

Tüm değerler ortalama±standart sapma (n=4) olarak gösterilmiştir. Aynı kolonda farklı üst simgeye sahip ortalamalar p<0,05 için anlamlı olarak birbirinden farklıdır.

2.2.3 Ortamda bulunan öncü maddeler

HCA oluşumu ortamda bulunan öncü maddelere bağlı olarak gerçekleşmektedir. HCA oluşumu için ortamda kreatin veya kreatinin bulunması gerekmektedir. Daha önce yapılan bir çalışmada domuz eti püresine eklenen kreatininin HCA oluşumunda az miktarda bir artırıcı etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Yine aynı çalışmada domuz eti püresine bazı amino asitler (glutamin, tirozin, treonin ve alanin) eklenmiş ve bunların da HCA oluşumunu artırıcı etkisi olduğu gözlenmiştir.(Lee et al., 1994).

Yapılan bir çalışmada ortamda doğal sığır eti kombinasyonu ile aynı oranda kreatin, amino asit ve şeker bulunması durumunda, HCA oluşumu için optimum koşulların sağlandığı görülmüştür. Fakat ortamda bulunan şeker miktarının artmasıyla HCA artışının azaldığı belirtilmiştir (Skog and Jagerstad, 1991).

Shin et al. tarafından 2003 yılında yapılan bir çalışmada da sığır köftesine bal eklenmiş ve HCA oluşumu üzerine etkileri incelenmiştir. Çalışma sonucunda balın HCA oluşumunu önleyerek toplam mutajeniteyi azalttığı görülmüştür. Bu azalmanın temel sebebi balda bulunan antioksidan maddeler olmakla birlikte bunun yanında balın içerdiği şeker de katkı sağlamıştır.

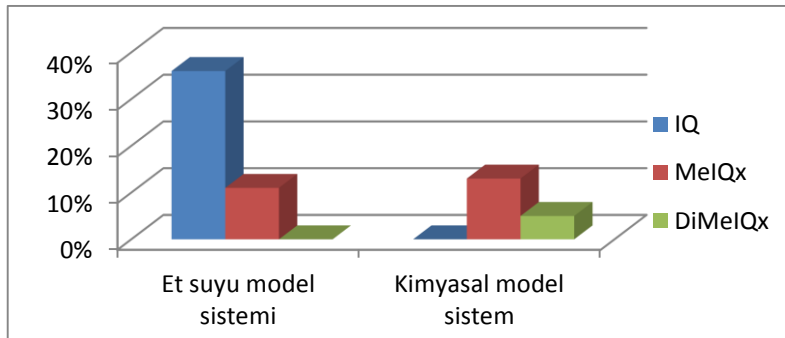
2.2.4 Lipidler

Ortamda bulunan lipidlerin HCA oluşumu üzerine etkisi farklı olabilmektedir. Örneğin yapılan bir çalışmada zeytin yağında kızartılan sığır köftelerinde HCA oluşumu azalma göstermiştir (Monti et al., 2001). Buna karşın yapılan bir başka çalışmada kreatin, glisin ve glikoz içeren model sisteme 10 dakika boyunca ısı uygulandığında oluşan MeIQx miktarının ortamda bulunan yağ asitleri veya lipitlerden etkilenmediği belirtilmiştir. Aynı model sisteme 30 dakika boyunca ısı uygulanması sonucunda ise mısır yağı ve zeytin yağı eklenen model sistemde MeIQx oluşumunun, hiç yağ eklenmeyen model sistemdeki

MeIQx oluşumunun yaklaşık iki katına denk geldiği belirtilmiştir (Johansson et al., 1993).

2.2.5 Antioksidan maddeler

Ortamda çeşitli antioksidan maddelerin bulunması sonucunda HCA oluşumunda azalma görülmektedir. Vitaglione et al. 2002 yılında yaptıkları çalışmada domateste bulunan karotenoidlerin ve önemli bir flavanol olan kuersetinin HCA oluşumu üzerine etkileri incelemiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda 1000ppm karotenoid konsantrasyonunun optimum azalmaya sebep olduğu belirlenmiştir. Şekil 2.4'te görüldüğü gibi bu konsantrasyonda karotenoid eklenen kimyasal sistemde IQx bileşiği oluşumu %36, MeIQx bileşiği oluşumu %11 azalırken; et suyu sisteminde MeIQx bileşiği oluşumu %13 ve 4,8-DiMeIQx bileşiği oluşumu ise %5 azalmıştır. Buna ek olarak et suyu model sistemine 0,1-100ppm saf kuersetin eklenmiş ve MeIQx bileşiği oluşumunda %9 ila %57 azalma gözlenmiştir. Sonuç olarak bu bileşenler domateste yer aldığı için etin domates ile pişirilmesi sonucu HCA oluşumunda azalma gözleneceği belirtilmiştir.



Şekil 2.4 1000ppm karotenoid konsantrasyonunda et suyu model sisteminde ve kimyasal model sistemde HCA inhibisyonu (Vitaglione et al., 2002).

Başka bir çalışmada Balogh et al. (2000) sığır köftesine E vitamini ve biberiye oleoresini eklemiş ve bunların HCA oluşumu üzerine etkilerini incelemiştir. Çalışmada sığır köfteleri 225°C'de 10 dakika süreyle kızartılmış ve örnekler %1 ve %10 oranlarında E vitamini ve biberiye oleoresini eklenmiştir.

Elde edilen bulgular çizelge 2.4'te verilmiştir. Her iki bileşiğin de toplam HCA miktarında azalmaya sebep olduğu görülmüştür.

Çizelge 2.4 Doğrudan antioksidan eklenmiş kızartılmış sığır köftelerinde HCA konsantrasyonu(ng/g) ve yüzde olarak azalma miktarı (Balogh et al., 2000).

HCA	Kontrol	E Vitamini (%1)	E Vitamini (%10)	Biberiye Oleoresini(%1)	Biberiye Oleoresini(%10)
IQ					
Konsantrasyon	5,3 + 3,5 ^a	0,7 + 0,2 ^b	0,6 + 0,6 ^b	1,5 + 0,6 ^b	1,5 + 1,3 ^b
İnhibisyon(%)	0	85,7	88,1	72,4	71,9
MeIQ					
Konsantrasyon	3,5 + 3,5 ^a	0,8 + 0,4 ^b	1,3 + 0,6 ^b	0,7 + 0,7 ^b	1,8 + 1,7 ^b
İnhibisyon(%)	0	78,6	64,3	87,0	47,9
MeIQx					
Konsantrasyon	5,7 + 1,7 ^a	2,9 + 1,9 ^b	4,1 + 0,8 ^a	3,8 + 0,7 ^a	5,1 + 0,3 ^a
İnhibisyon(%)	0	48,0	26,0	30,1	12,1
DiMeIQx					
Konsantrasyon	4,7 + 4,4 ^a	1,0 + 0,3 ^b	1,4 + 0,2 ^b	1,1 + 0,6 ^b	1,4 + 0,1 ^b
İnhibisyon(%)	0	79,2	70,5	77,0	68,3
PhIP					
Konsantrasyon	31,3 + 13,5 ^a	9,6 + 5,3 ^b	8,6 + 3,9 ^b	17,4 + 2,9 ^b	17,3 + 12,1 ^b
İnhibisyon(%)	0	69,0	72,5	44,0	44,6

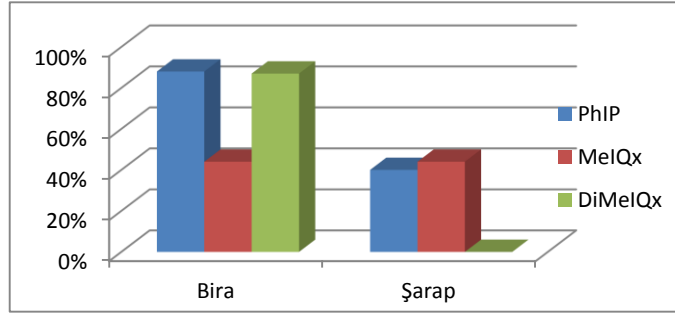
^a Antioksidan konsantrasyonları sığır köftelerinin yağ içeriğine(%15) bağlıdır.

^b Her değer üç tekrar sonucunda elde edilen değerlerin ortalama + standart sapma değerlerine eşittir.

^c Her dizideki farklı harfler kontrol grubundan istatistiki olarak farklı anlamına gelmektedir(p<0,05) ve p<0,1'de MeIQx için anlamlı olmalıdır.

2008'de gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise bira ve kırmızı şarap marinyasyonlarının tavada kızartılmış sığır etlerinde HCA oluşumu üzerine etkileri incelenmiştir. Çalışma sonucunda her iki marinyasyon ortamının da içerdikleri antioksidan maddeler sebebiyle HCA oluşumunda azalmaya sebep olduğu belirlenmiştir. Şekil 2.5'te de görüldüğü gibi bira ve şarap ile marinyasyon sonunda PhIP bileşiğinde %88 ve 40 azalma sağlanırken sürenin istatistiki olarak anlamlı bir farka sebep olmadığı görülmüştür.. MeIQx bileşiği için de aynı durum %44

azalma için söz konusudur. 4,8-DiMeIQx bileşiği için sadece bira marinasyonu için anlamlı bir azalma göstermiştir ve bu azalma miktarı %87 olarak belirtilmiştir. (Melo et al., 2008).



Şekil 2.5 HCA oluşumu üzerine marinasyon ortamının inhibisyon (%) etkisi.

Cheng et al. 2010 yılında yaptıkları araştırmada sığır köftesi örneklerine 4 farklı meyve ekstraktı ekleyerek bunların HCA oluşumu üzerine etkilerini incelemiştir. Çalışmada kullanılan meyve ekstraktları elma, mürver, üzüm çekirdeği ve ananastır. Elde edilen bulgular çizelge 2.5'te verilmiştir. Çalışmada HCA oluşmasını önleme açısından en etkili 2 ekstrakt elma ve üzüm çekirdeği ekstraktı olarak belirtilmiştir. Bu ekstraktların toplam HCA miktarını kontrol grubuna göre %70 dolayında azalttıkları belirlenmiştir.

Çizelge 2.5 210°C'de 6dk kızartılan sığır köftesi örneklerine eklenen meyve ekstraktlarına ait toplam fenolik miktarı ve bu ekstraktların HCA oluşumuna etkileri (Cheng et al., 2010).

Uygulama	Toplam Fenolik İçeriği (g gallik a. /g ekstrakt)	HCA oluşumu ve (ng/g sığır köftesi) ve inhibisyonu (%)			
		PhIP	4,8-DiMeIQx	MeIQx	Toplam HCA
Kontrol		10,10 ± 0,86 ^a	0,95 ± 0,11 ^a	2,96 ± 0,49 ^a	14,01
Üzüm Çekirdeği	0,88 ± 0,04	2,80 ± 0,40 ^b (72)	0,32 ± 0,07 ^b (66)	1,00 ± 0,41 ^b (67)	4,13 (71)
Elma	0,82 ± 0,03	3,14 ± 0,16 ^b (69)	0,34 ± 0,07 ^b (63)	1,24 ± 0,38 ^b (59)	4,72 (66)
Mürver	0,24 ± 0,01	5,54 ± 0,49 ^b (45)	0,76 ± 0,13 ^a (19)	2,80 ± 0,76 ^a (6)	9,10 (35)
Ananas	0,10 ± 0,00	8,85 ± 0,11 ^a (13)	0,77 ± 0,06 ^a (18)	2,23 ± 0,96 ^a (27)	11,86 (15)

^aOrtalama ± standart sapma; tüm uygulamalar için N-3.

Liao et al., 2008 yılında yaptıkları çalışmada domuz etine farklı sıcaklık uygulamışlar, çeşitli antioksidan maddeler eklemişler ve bunların HCA oluşumu üzerine etkilerini incelemişlerdir. Sıcaklık ve süre artışının HCA oluşumunu artırdığı belirtilmiştir. Antioksidan olarak farklı düzeylerde (% 0,01-0,05-0,1) E ve C vitamini eklenmiş, C vitamininin HCA oluşumunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya sebep olmadığı, buna karşın E vitamininin Norharman, PhIP, AαC ve MeAαC bileşiklerinde azalmaya sebep olduğu görülmüştür.

Janoszka 2010'da yaptığı bir çalışmada tavada kızartılmış etlerde kullanılan sosa sarımsak ve soğan eklemiş ve bunların HCA oluşumu üzerine etkisi incelemiştir. Çalışmada domuz etinden elde edilen boyun, pirzola ve kıyma örnekleri kullanılmıştır. Sonuç olarak HCA miktarının sosa %30 soğan eklenince %31-49 arasında; %15 sarımsak eklenince ise %26-36 arasında azaldığı görülmüştür (Çizelge 2.6). Çalışmada soğan ve sarımsağın HCA oluşumu üzerine azaltıcı etkisi olduğu belirlenmekle birlikte bu ikisinin kıyaslaması yapılmamıştır.

Çizelge 2.6 Domuz etinde ve soslarda oluşan HCA (ng.g^{-1}) (Janoszka, 2010).

Bileşen (HCA)	Boyun		Pirzola		Kıyma
	Et	Sos	Et	Sos	Et
Katkısız					
MeIQ	ND	7,34 ± 0,63	9,28 ± 0,82	10,54 ± 0,70	6,28 ± 1,55
8-MeIQx	2,62 ± 0,20	1,02 ± 0,11	4,58 ± 0,02	1,40 ± 0,11	3,71 ± 0,49
4,8-DiMeIQx	ND	ND	1,74 ± 0,39	1,62 ± 0,26	ND
PhIP	4,59 ± 0,72	1,87 ± 0,18	ND	1,52 ± 0,15	2,22 ± 0,58
Soğan Ekli					
MeIQ ^d	ND	6,23 ± 0,66	4,49 ± 1,11	6,97 ± 0,92	5,27 ± 1,30
8-MeIQx	0,50 ± 0,07	0,64 ± 0,10	1,74 ± 0,10	2,30 ± 0,38	1,77 ± 0,27
4,8-DiMeIQx	ND	ND	ND	ND	ND
PhIP	2,40 ± 0,48	3,95 ± 0,24	ND	ND	ND
Sarımsak Ekli					
MeIQ ^d	ND	7,61 ± 0,94	6,38 ± 1,59	10,45 ± 1,11	6,10 ± 0,72
8-MeIQx	1,26 ± 0,20	2,22 ± 0,42	2,63 ± 0,27	3,32 ± 0,19	2,95 ± 0,44
4,8-DiMeIQx	ND	ND	ND	ND	ND
PhIP	ND	ND	ND	ND	ND

Ayrıca Hirose et al., 1999 yılında yaptıkları çalışmada HTHQ, BHA, BHT, TBHQ ve PG antioksidanlarının kanser önleyici etkilerini kıyaslamak ve farelerde MeIQx'in indüklediği hepatokarsinojen oluşumuna etkilerini incelemiştir. Çalışma sonucunda HTHQ antioksidan bileşiğinin MeIQx tarafından indüklenen hepatokarsinogene karşı en etkili bileşik olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu bileşin antikanserojen etkisi de BHA, BHT, TBHQ ve PG bileşiklerinden yüksek bulunmuştur. Ayrıca HTHQ'nun bahsedilen diğer antioksidan bileşiklere göre diğer önemli HCA bileşikler olan Glu-P-1, Glu-P-2, Trp-P-1, Trp-P-2, IQ, MeIQ ve PhIP'in neden olduğu mutajen özelliği de daha fazla inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bu çalışma ortamında bulunan antioksidanların HCA oluşumunu önlemek dışında HCA'ların olumsuz etkilerini de azalttığını göstermektedir.

2.3 HCA'ların İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri

Yaklaşık 20 yıl önce heterosiklik aminlerin laboratuvar hayvanları üzerinde potansiyel mutajen ve kanserojen maddeler oldukları bulunmuştur. Heterosiklik aminlerle uzun süre beslenen kemirgenlerde sıklıkla tümör, kolon ve prostat kanseri görülmüştür. Ayrıca sıcaklık 300°C üzerine çıktığında, amino asitlerin pirolizine bağlı olarak heterosiklik aminlerin mutajenik aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (Sahar et al., 2010).

Heterosiklik aminler insan sindirim sistemi ve solunum yolu üzerinde mutajenik ve kanserojenik etkilere sahiptir (Jakszyn et al., 2004). Bu yüzden gıdalarda bulunması istenmez. Diğer gıda mutajenleri ile karşılaştırıldığında heterosiklik aminlerin aflatoksin B₁'den 100 kat, en yaygın bulunan ve diğer polisiklik aromatik hidrokarbonların indikatörü olan benzo[a]pyrene'den ise 2000 kat daha mutajenik oldukları belirlenmiştir (Öz, 2006).

Yapılan çalışmalar HCA'ların sadece bakteriler için değil, aynı zamanda memeliler için de mutajenik olduğu görülmüştür. HCA'lar bazı kromozomal sapmalara sebep olarak kardeş kromatitlerde değişikliğe sebep olurlar ve böylece

bazı memelilerin hücre sistemlerinde mutajenik etki gösterirler (Alaejos and Afonso, 2011).

2.4 HCA Analizinde Kullanılan Başlıca Yöntemler

Heterosiklik aminlerin ilk olarak tespit edilmesi ve sınıflandırılması büyük miktardaki pişmiş et örneklerinden pek çok kromatografik basamakla izole edilmeleri ile yapılmaktaydı. Mutajenler Ames bakteriyel mutajenez yöntemi ile izlenmekte, NMR ve kütle spektroskopisi yöntemleri ile tanımlanmaktaydı. Sonrasında heterosiklik aminlerin ekstraksiyonu için sıralı katı faz(tandem solid phase) yöntemi ve tespiti için de UV diyotlu HPLC yöntemi kullanılmıştır. Son zamanlarda ise heterosiklik aminlerin tespit edilmesi ve henüz keşfedilmemiş heterosiklik aminlerin tanımlanması için sıvı kromatografi-elektrosprey iyonazisasyon/sıralı kütle spektrometrisi (LC – ESI – MS/MS) kullanılmaktadır (Sahar et al., 2010).

Heterosiklik aminlerin bazıları yapılarında konjuge çift bağ içerdiklerinden floransans özellik gösterirler ve onların bu özellikleri HPLC analizlerinde tespit edilmelerinde kullanılmaktadır. Heterosiklik aminlerin tayin edilmesinde en sık kullanılan yöntemler HPLC-UV ve floransans tespit yöntemleridir. Yapılan çalışmalar HPLC-floransans yönteminin daha yüksek seçicilik ve hassaslık sağladığını göstermektedir (Sahar et al., 2010).

Tezde uygulanan ekstraksiyon yöntemlerinin ilki Prof. Dr. Ali Üren ve ark. tarafından geliştirilmiştir. Diğer yöntemler ise Santos et al. (2004) tarafından ve Messner & Murkovic (2004) tarafından geliştirilmiştir. Çizelge 2.7'de bu yöntemlerin ekstraksiyon basamakları genel hatlarıyla kıyaslanmıştır. Tezde bu yöntemlerden sırası ile Üren ekstraksiyon yöntemi, Santos ekstraksiyon yöntemi ve Messner & Murkovic ekstraksiyon yöntemi olarak bahsedilecektir.

Çizelge 2.7 Üren, Santos ve Messner & Murkovic ekstraksiyon metotlarının kıyaslanması

	Üren	Santos	Messner
Ekstraksiyonda kullanılan kimyasallar	HCl Carrez I ve Carrez II	NaOH Diatome Toprağı Etil asetat	NaOH Diatome Toprağı Etil asetat
Kartuşlar	Bond Elut C ₁₈ SPE kartuş OASIS MCX kartuş	PSR kartuş C ₁₈ kartuş OASIS kartuş	OASIS MCX kartuş
Çözgen	Metanol/%25'lik NH ₃ (19:1) Metanol	Metanol- NH ₃ (%25)/H ₂ O (95/5) Metanol	Metanol/ NH ₃ (19:1) Metanol

2.5 Messner & Murkovic Ekstraksiyon Metodu Kullanılarak Yapılan Çalışmalar

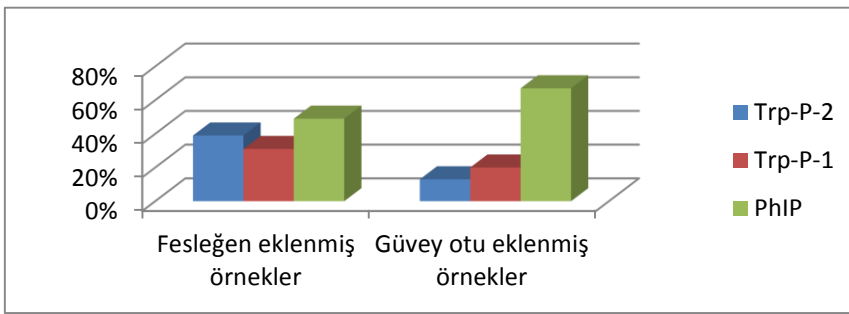
Damasius et al., 2011 yılında yaptıkları çalışmada sığır eti örneklerine fesleğen, güveyotu, mercanköşk, biberiye, geyik otu, sweetgrass, kekik ve kişniş ekstraktları eklemiş ve bunların HCA oluşumu üzerine etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada örnekler dietilen glikol içerisinde 200°C'de 20 dakika boyunca değiştirilmişlerdir. Eklenen bu bileşikler antioksidan olarak fenolik bileşikler içermektedir ve çizelge 2.8'de toplam fenolik içerikleri gösterilmektedir.

Çizelge 2.8 Çalışmada kullanılan baharatların fenolik içerikleri (Damasius et al., 2011).

Materyal	DPPH IC ₅₀ (mg/ml)	Fenolik İçeriği (mg/g gallik a.)
Güvey otu	0,41 ± 0,01	136,0 ± 0,82
Fesleğen	1,30 ± 0,01	75,5 ± 1,15
Biberiye	0,25 ± 0,02	142,0 ± 3,58
Mercanköşk	0,74 ± 0,03	104,0 ± 1,90
Kekik	0,75 ± 0,01	77,8 ± 1,71
Geyik otu	0,82 ± 0,01	68,2 ± 0,07
Sweetgrass	1,48 ± 0,01	87,9 ± 0,95
Kişniş	0,98 ± 0,02	97,1 ± 3,64

Çalışmada baharatların temelde PhIP, Trp-P-1 ve Trp-P-2 bileşenleri üzerine etkileri incelenmiştir. Sonuç olarak ise baharat farklı baharat çeşitlerinin, farklı HCA bileşenleri üzerine etki ettikleri görülmüştür. Örneğin fesleğen ve

güveyotu ilavesinin PhIP miktarında artışa sebep olduğu görülürken, Trp-P-1’de ise azalmaya sebep olduğu görülmüştür. Eklenen tüm baharatların Trp-P-2’de azalmaya sebep olduğu belirtilmiştir. En etkili inhibisyon sağlayan baharatlar fesleğen ve güvey otu olarak belirtilmiş ve bunların etkileri Şekil 2.6’da gösterilmiştir. Sığır eti örneklerinde kontrol grubuna göre PhIP bileşiğinde fesleğen %49’luk bir azalma sağlarken güvey otu %67’lik bir azalma sağlamıştır. Bunun yanında fesleğen ve güvey otu baharatları Trp-P-1 bileşeninde sırasıyla %31 ve %20 azalma sağlarken Trp-P-2 bileşeninde ise %39 ve %13 azalma sağlamıştır.



Şekil 2.6 HCA oluşumu üzerine fesleğen ve güvey otu baharatlarının inhibisyon (%) etkisi.

Dündar ve ark. yaptıkları çalışmada pişirilmiş köftelerde 5 farklı faktörün HCA oluşumu üzerine etkilerini incelemiştir. Seçilen bu faktörler NaCl (%0-2), yağ (%10-30), askorbik asit (0-600 ppm), pişirme sıcaklığı (150-230 °C) ve pişirme süresidir (5-15 dk). İncelenen HCA’lar ise 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]-quinoline (IQ), 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]-quinoxaline (MeIQx), 2-amino-3,4-dimethylimidazo [4,5-f]-quinoline (MeIQ), 2-amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5-f]-quinoxaline (4,8-DiMeIQx) and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]-pyridine (PhIP)’dir. Yapılan çalışma sonucunda çizelge 2.9’da görüldüğü gibi yağ, pişirme süresi ve pişirme sıcaklığı artışının söz konusu HCA’ların miktarında artışa sebep olurken, askorbik asit miktarındaki artışın yine söz konusu olan HCA’ların miktarında azalmaya sebep olduğu görülmüştür. NaCl’nin ise sadece MeIQx bileşeninde artışa sebep olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Çalışmada NaCl’nin köftelerde bulunan suyun uzaklaşmasına engel olarak bu etkiyi göstermiş olabileceği belirtilmiştir (Dündar ve ark., 2012).

Çizelge 2.9 HCA bileşenlerine ait minimum ve maksimum değerler (Dündar ve ark., 2012).

HCA (ng/g)	Deney Faktörleri					Minimum	Maksimum
	NaCl (%)	Askorbik asit (%)	Yağ (%)	Pişirme Sıcaklığı (%)	Pişirme Süresi (%)		
IQ	0,69	572,4	18,1	168,1	5,0	0,086	
	2,0	0,0	30,0	230,0	15		21,8
MeIQx	1,71	600	13,77	150,0	5,0	0,077	
	2,0	0,0	30,0	230,0	15,0		25,7
MeIQ	0,3	520,0	23,6	155,3	8,2	0,0200	
	2,0	0,0	30,0	230,0	15,0		31,1
DiMeI	0,47	328,3	19,4	155,3	8,6	0,0020	
Qx	2,0	424,5	10,2	230,0	15,0		4,06
PhIP	0,0	600,0	20,4	177,9	10,0	0,0068	
	2,0	0,0	30,0	230,0	15,0		36,7

Wong et al. (2012), 11 tane suda çözünebilir vitaminin HCA oluşumu üzerine etkisini incelemiştir. Araştırmada kullanılan vitaminler pridoksal(B6 vitamini), piridoksamin (B6 vitamini), pridoksin (B6 vitamini), nikotik asit (B3 vitamini), biyotin (B7 vitamini), tiyamin (B1 vitamini), L-askorbik asit (C vitamini), riboflavin (B2 vitamini), pantotenik asit (B5 vitamini), folik asit (B9 vitamini) ve B12 vitaminidir. Söz konusu vitaminlerin PhIP ve MeIQx bileşenleri üzerine etkileri incelenmiştir. Örnek olarak model sistem ve sığır köftesi kullanılmıştır. Elde edilen bulgular çizelge 2.10'da verilmiştir. Araştırma sonucunda piridoksamin, pridoksin, nikotik asit, biyotin, tiyamin ve L-askorbik asidin HCA oluşumunda %40'tan fazla inhibisyon sağladığı görülmüştür. Bunlar arasında pridoksaminin en etkili bileşik olduğu belirlenmiştir ve bu vitaminin inhibisyon etkisinin konsantrasyonuna bağlı olarak arttığı ve bu artışın da lineer olmadığı görülmüştür. Çizelge 2.9'da HCA oluşumu üzerine en yüksek inhibisyon etkisine sahip olan askorbik asit, niasin ve pridoksamin bileşiklerinin etkileri gösterilmiştir.

Çizelge 2.10 200°C’de 6 dk kızartılan sığır köftelerinde HCA oluşumu üzerine vitaminlerin (0,2 mmol) etkisi (Wong et al., 2012).

Uygulama	HCA’lar (ng/g sığır köftesi) ve inhibisyon (%)			
	PhIP	DiMeIQx	MeIQx	Toplam HCA
	7,44 ± 1,12 ^a	2,46 ± 0,32 ^a	7,39 ± 0,84 ^a	17,3
Askorbik asit	6,02 ± 0,13 ^b (19)	2,12 ± 0,04 ^b (14)	6,13 ± 0,25 ^b (17)	14,3 (17)
Niasin	6,03 ± 0,27 ^b (19)	2,09 ± 0,09 ^b (15)	5,99 ± 0,20 ^b (19)	14,1 (18)
Pridoksamin	4,24 ± 0,45 ^c (43)	1,53 ± 0,16 ^c (38)	4,29 ± 0,49 ^c (42)	10,0 (42)

^a Değerler ortalama±Standart sapma (n=3) şeklinde gösterilmiştir.

^b Parantez içindeki değerler kontrole kıyasla % inhibisyon değerini belirtmektedir.

^c Aynı kolonda farklı harflerle işaretli ortalama değerleri anlamlı olarak farklıdır (p<0,05).

Öz ve Kaya (2011) yaptıkları bir çalışmada karabiberin yüksek yağ içerikli köftelerde HCA oluşumu üzerine etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada 175 °C, 200 °C ve 225 °C olmak üzere 3 farklı sıcaklıkta kızartma işlemi yapılmıştır. Karabiberin IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx ve PhIP bileşenleri üzerine etkileri incelenmiştir. Elde edilen bulgular çizelge 2.11’de verilmiştir. Karabiber içermeyen kontrol grubunda sıcaklık artışıyla birlikte bahsedilen HCA’ların miktarlarında artış olduğu görülmüştür. Karabiber eklenen örneklerle yapılan analizler sonucunda ise karabiberin PhIP bileşiği üzerinde %100 etkili olduğu belirlenmiştir. Toplam HCA oluşumunda karabiberin inhibisyon etkisi olduğu ve bunun %12 ila %100 arasında değişkenlik gösterdiği belirtilmiştir. Çalışmaya ait bulgular çizelge 2.10’da gösterilmiştir.

Çizelge 2.11 Köftede bulunan HCA miktarı (ng/g) (Öz ve Kaya, 2011).

Uygulama	Sıcaklık (°C)	IQ	MeIQ	DiMeIQx	PhIP	Toplam HCA
Kontrol	175	1,40	te	te	te	1,40
	200	5,46	0,24	te	te	5,70
	225	te	2,66	3,35	31,80	37,81
Karabiber	175	0,93 (33,57)	te	te	te	0,93 (33,57)
	200	4,85	0,18 (25,00)	te	te	5,03 (11,75)
	225	te	te (100)	te (100)	te (100)	Te (100)

te: tespit edilemedi; parantez içindeki değerler kontrol grubuna dayanarak % inhibisyon oranıdır.

2.6 Santos Ekstraksiyon Metodu Kullanılarak Yapılan Çalışmalar

Smith et al. (2008), yaptıkları bir çalışmada marinasyonda kullanılan sosların sığır bifteğinde HCA oluşumu üzerine etkilerini incelemişlerdir. Marinasyon sosları hazır olarak marketlerden temin edilmiştir. Tüm marinasyon sosları ve kontrol grubu su, sirke ve soya yağı içermektedir. Bunun dışında marinasyon soslarının içerdikleri farklı bileşenler çizelge 2.12’de gösterilmektedir. Sığır bifteği örnekleri bu soslarla 1 saat muamele edildikten sonra 204 °C’de ızgara edilerek pişirilmiştir.

Çizelge 2.12 Marinasyon soslarının bileşim ve baharat kompozisyonu (Smith et al., 2008).

Uygulama	Bileşim ^a	Baharatlar
Kontrol (marine edilmemiş ve hiçbir şey eklenmemiş)	yok	yok
Kör sosla marine edilmiş	su, soya yağı, sirke	yok
Caribbean sosu + sıvı	tuz (%5,4), şeker, karamel renk	yok
Caribbean marinasyonu	tuz, şeker, karamel renk	kekik, kırmızıbiber, karabiber, yenibahar, biberiye, frenk soğanı
Southwest sosu + sıvı	tuz (%3,1), şeker, maltodekstrin, silikon dioksit	yok
Southwest marinasyonu	tuz, şeker, maltodekstrin, silikon dioksit	paprika, kırmızıbiber, keklilotu, kekik, karabiber, sarımsak, soğan
Herb sosu + sıvı	tuz (%2,2), şeker, maltodekstrin, modifiye edilmiş mısır nişastası, peynir altı suyu tozu, soya proteini, buğday gluteni, kalsiyum silikat	yok
Herb marinasyonu	tuz, şeker, maltodekstrin, modifiye edilmiş mısır nişastası, peynir altı suyu tozu, soya proteini, buğday gluteni, kalsiyum silikat	keklilotu, fesleğen, sarımsak, soğan, jalepeno biber, maydonoz, kırmızıbiber

^a Marinasyon soslarıyla kullanılan sıvı ve marinasyonlar 60 ml su, 30 ml soya yağı ve 30 ml sirke içermektedir

^b Tuz değerleri ürünlerin orijinal etiketinden alınmıştır.

Uygulamanın MeIQx, PhIP, harman ve norharman bileşenleri üzerine etkileri incelenmiştir. Elde edilen bulgular çizelge 2.13’te verilmiştir. Çalışma sonunda her üç marinasyon sosunun MeIQx ve PhIP bileşenlerinde kontrol

grubuna göre anlamlı bir azalmaya sebep olduğu görülmüştür. Caribbean sos karışımı toplam HCA miktarında %88 azalmaya sebep olarak en etkin azalmayı sağlayan sos olarak belirtilmiştir. Bunu toplam HCA miktarında %72 azalmaya sebep olan Herb sos karışımı ve %57 azalmaya sebep olan Southwest sos karışımı izlemiştir. Sadece su, sirke ve soya sosu ile marine edilen kontrol grubu örneklerinde de marinasyon uygulanmayan örneklere göre daha az miktarda HCA oluştuğu belirtilmiştir. Çalışmada Caribbean sosunun en yüksek oranda polifenolik antioksidan maddelere sahip olduğu belirtilmiştir ve bu maddelerin başlıcaları karnosik asit, karnosol ve rosmarinik asit olarak tanımlanmıştır. Çalışma sonucunda genel olarak temin edilebilen baharatlı marinsayon soslarının pişirme sırasında oluşan HCA inhibisyonunu sağlama ve kanserojen madde oluşumunu önlemede etkin oldukları saptanmıştır (Smith et al., 2008)

Çizelge 2.13 204 °C’de 10 dk boyunca ızgara edilen sığır eti örneklerinde marinasyon soslarının HCA konsantrasyonu (ng/g) üzerine etkisi (Smith et al., 2008).

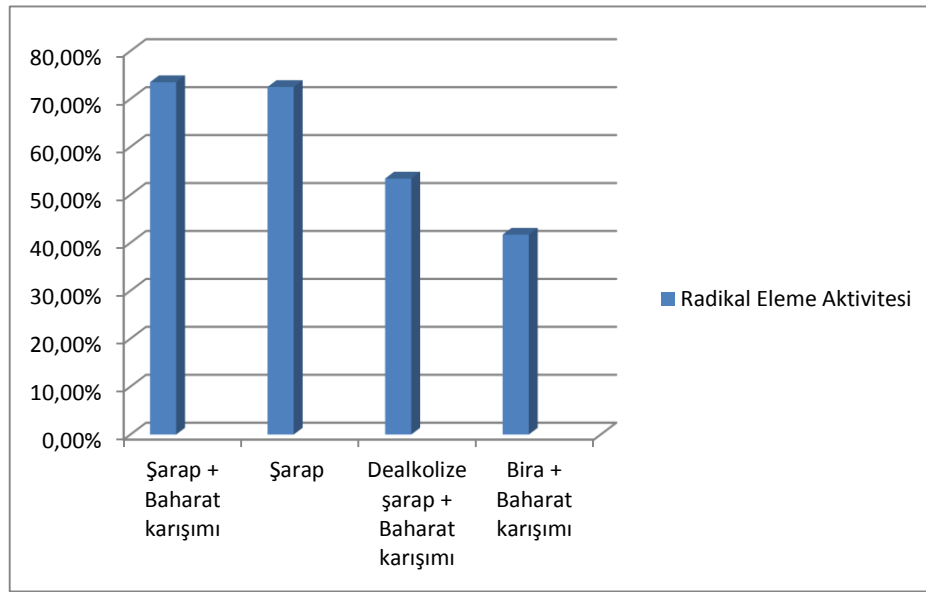
Uygulama	HCA (ng/g)			
	MeIQx	PhIP	Harman	Norharman
Kontrol	30,2 ± 4,17 ^a	17,4 ± 4,73 ^a	2,26 ± 0,35 ^{ab}	2,2 ± 0,07 ^{ab}
Kör sosla marine edilmiş	30,3 ± 6,01 ^a	24,8 ± 10,1 ^a	2,86 ± 0,55 ^a	2,21 ± 0,69 ^{ab}
Caribbean sosu + sıvı	14,4 ± 0,61 ^c	4,10 ± 0,26 ^{cd}	1,24 ± 0,05b ^{cd}	1,41 ± 0,1 ^{bc}
Southwest sosu + sıvı	22,6 ± 2,5 ^{ab}	9,26 ± 1,75 ^b	1,2 ± 0,1 ^{dc}	3,46 ± 0,35 ^a
Herb sosu + sıvı	12,8 ± 0,41 ^c	8,2 ± 1,35 ^{bc}	1,1 ± 0,17 ^{cd}	2,6 ± 0,17 ^{ab}
Caribbean marinasyonu	3,10 ± 0,62 ^e	2,33 ± 0,15 ^f	0,54 ± 0,05 ^e	0,52 ± 0,18 ^c
Southwest marinasyonu	15,8 ± 2,2 ^{bc}	5,03 ± 0,5 ^{cd}	0,8 ± 0,4 ^{de}	1,63 ± 0,85 ^{bc}
Herb marinasyonu	7,16 ± 1,04 ^d	3,0 ± 0,32 ^{ef}	1,7 ± 0,05 ^{abc}	1,96 ± 1,10 ^{abc}

^A Değerler 3 tekrardan ortalama ± standart sapma biçiminde verilmiştir.

^B Aynı kolonda bulunan ortalamalardan farklı harfe sahip olanlar birbirinden anlamlı olarak farklıdır (p<0,05).

Viegas et al. (2012), yaptıkları çalışmada antioksidan maddelerce zengin marinasyon soslarının tavada kızartılan sığır etlerinde HCA oluşumu üzerine etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada marinasyon sosu olarak antioksidan

bakımından zengin olan sadece bira ve beyaz şarap (alkollü/alkolsüz) içeren veya bunun yanında eti lezzetlendirmede genel olarak kullanılan baharatları (sarımsak, zencefil, kekik, biberiye ve kırmızıbiber) da içeren soslar kullanılmıştır. Şekil 2.7’de farklı marinasyon ortamlarının radikal eleme aktivitesi gösterilmiştir.(Sığır eti örneklerinin marinasyon öncesinde (T0) ve 4 saat marinasyon yapıldıktan sonra (T4) radikal eleme aktiviteleri DPPH serbest kök bağlama metodu ile belirlenmiştir. T0 durumunda en yüksek radikal eleme aktivitesini %73,5 ile baharat karışımı ve şaraptan oluşan marinasyon sosu sağlamış, bunu %72,5 azalma sağlayan sadece şarap içeren sos, %53,4 ile dealkolize edilmiş şarap ve baharatlardan oluşan sos, %41,7 ile bira ve baharatlardan oluşan sos, %39,6 ile dealkolize şaraptan oluşan sos ve %25,9 ile sadece biradan oluşan sos izlemiştir. T4 durumunda ise tüm marinasyon sosları radikal eleme aktivitesini azaltmakla birlikte birbirine benzer azaltma profili sergilemiştir.



Şekil 2.7 T0 durumunda farklı marinasyon ortamlarının radikal eleme aktivitesi (%) (Viegas et al., 2012).

Tüm marinasyon sosları toplam HCA miktarında azalma sağlamıştır. Elde edilen bulgular çizelge 2.14’te verilmiştir. Bira içeren marinasyon sosları şarap içeren marinasyon soslarından daha etkin azalmaya sebep olurken, baharat ilavesinin daha üstün inhibisyon etkisi sağlayarak HCA miktarında %90’a kadar azalmaya sebep olduğu belirtilmiştir. Marinasyon soslarının radikal eleme

aktiviteleri ve toplam HCA oluşumu üzerine etkileri arasında bir korelasyona sahip olmadığı çalışmada belirtilmiştir. Yapılan araştırmada söz konusu baharatlar PhIP oluşumunda %30 civarında inhibisyon sağlarken, alkol PhIP oluşumunu artırmıştır (Viegas et al., 2012).

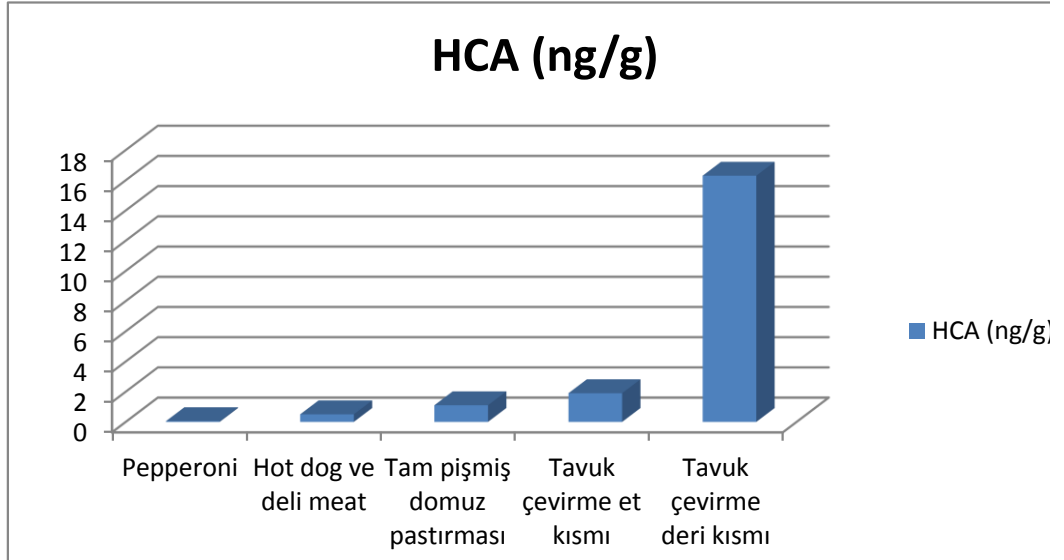
Çizelge 2.14 Tavada 180°C’de kızartılmış, 4 saat marine edilmiş sığır etlerinde marinasyon sıvılarının HCA oluşumu üzerine etkileri (Sonuçlar ortalama±standart sapma (n=3) biçiminde gösterilmiştir, parantez içlerinde inhibisyon (%) oranları verilmiştir.) (Viegas et al., 2012).

Et örnekleri	HCA (ng/g kızartılmış et) ve inhibisyon (%)			
	PhIP	IQ	MeIQx	DiMeIQx
Kontrol grubu	9,69 ± 2,27 ^a	6,45 ± 0,35 ^a	9,07 ± 0,6 ^a	3,60 ± 1,64 ^a
Bira ile marine	4,84 ± 0,93 ^{b,c} (50)	TE ^c (>97)	TE ^c (>99)	TE ^b (>98)
Bira + Baharat Karışımı ile marine	0,83 ± 0,04 ^c (91)	TE ^c (>97)	TN ^c (>76)	1,30 ± 0,62 ^b (64)
Şarap ile marine	9,82 ± 2,19 ^a (-1)	TE ^c (>97)	TN ^c (>76)	1,08 ± 1,52 ^b (70)
Şarap + Baharat karışımı ile marine	6,61 ± 2,14 ^{a,b} (32)	1,82 ± 0,11 ^b (72)	6,09 ± 3,27 ^{a,b} (33)	1,29 ± 0,48 ^b (64)
Dealkolize şarap ile marine	3,81 ± 1,03 ^{b,c} (61)	TE ^c (>97)	4,38 ± 0,79 ^b (52)	TE ^b (>98)
Dealkolize şarap + Baharat karışımı ile marine	2,25 ± 1,32 ^c (77)	TE ^c (>97)	4,44 ± 0,23 ^b (51)	TE ^b (>98)

^a Aynı kolonda bulunan ortalamalardan farklı harfe sahip olanlar birbirinden anlamlı olarak farklıdır (p>0,05). TE ve TN kısaltmaları tespit edilemedi ve tanımlanamadı anlamına gelmektedir. Parantez içindeki değerler kontrol grubuna kıyasla %inhibisyon oranını göstermektedir.

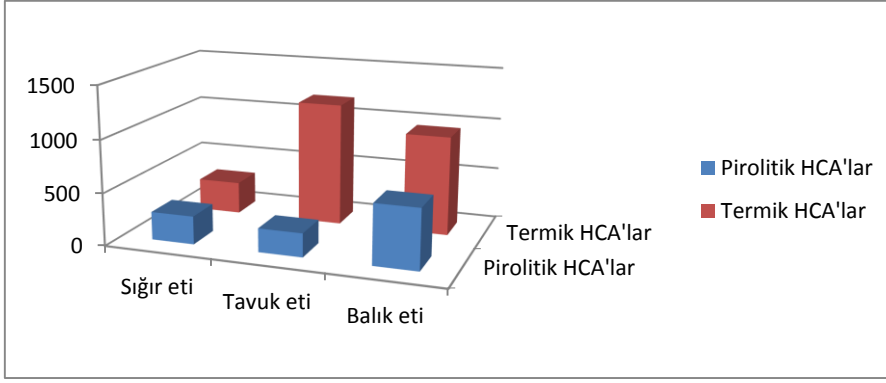
Puangsoombat et al. (2011a), yaptıkları bir çalışmada hazır gıdalardaki HCA miktarlarını araştırmıştır. Araştırmada örneklerdeki PhIP ve MeIQx bileşenleri incelenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda hazır gıdalarda HCA içerikleri artan sırayla şu şekilde bulunmuştur: pepperoni (0.05 ng/g) < hot dog ve hazır pişirilmiş et ürünleri (deli meat) (0.5 ng/g) < tam pişmiş domuz pastırması (1.1 ng/g) < tavuk çevirme et kısmı (1.9 ng/g) < tavuk çevirme deri kısmı (16.3 ng/g). Sonuçlar şekil 2.8’de gösterilmiştir. Çalışmada pişirme koşulları ve hazır yiyeceklerde bulunan bileşenlerin HCA miktarı üzerinde etkilere sebep olduğu

belirtilmiştir. Ayrıca araştırmacılar hazır gıda tüketiminin çok az miktarda HCA alımına sebep olduğunu bildirmiştir.



Şekil 2.8 Hazır gıdalarda bulunan HCA miktarları (ng/g) (Puangsombat et al., 2011a).

Viegas et al. (2012), yaptıkları bir çalışmada kullanılan mangal kömürü ve ızgarada pişirme koşullarının et ürünlerinde HCA oluşumu üzerine etkilerini incelemiştir. Araştırmada tam pişmiş balık ve et örnekleri üzerinde çalışılmıştır. Mangal kömürü olarak odun ve Hindistan cevizi kabuğu kömürleri kullanılmış ve 200°C’de pişirme işlemi uygulanmıştır. Araştırma sonucunda aynı tip kömür kullanılarak pişirilen et ve balık örneklerinde HCA miktarlarının farklı olduğu ve balık örneklerinin pişirme işlemi sonucunda daha yüksek HCA miktarına sahip olduğu belirlenmiştir. Farklı kömür tipleri et örneklerinde oluşan HCA miktarı üzerinde etkiye sahip olmazken, balık örneklerinde Hindistan cevizi kabuğu kömürüyle pişirilen örneklerin odun kömürüyle pişirilen balık örneklerine göre daha az HCA içerdiği sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca ızgarada pişirme işlemi boyunca örneklerden damlayan yağın daha yüksek miktarda HCA oluşumuna sebep olduğu belirtilmiştir. Çalışma sonunda mangalda pişirilen farklı tiplerdeki etlerden termik HCA’ların (IQ, MeIQ, MeIQx, DiMeIQx, ve PhIP) ve pirolitik HCA’ların (Glu-P-1, Glu-P-2, Phe-P-1, Trp-P-1, Trp-P-2, AαC ve MeAαC) alımı da incelenmiş ve sonuç şekil 2.9’da gösterilmiştir.



Şekil 2.9 Termik ve pirolitik HCA'ların alımı (ng/100g ızgara edilmiş et örneği)

Puangsoombat et al. (2012), yaptıkları çalışmada çeşitli et ürünlerindeki HCA miktarlarını araştırmıştır. Araştırmada kullanılan et ürünleri sığır eti, tavuk eti, domuz eti ve balık etidir. Ayrıca tavada kızartma, fırında ızgara etme ve fırında pişirme gibi farklı pişirme teknikleri 170 ve 200°C arasındaki sıcaklıklarda uygulanmıştır. Kullanılan örneklerde belirlenen başlıca HCA'lar PhIP (1,49–10,89 ng/g), MeIQx (tespit edilemedi-4.0 ng/g) ve DiMeIQx (tespit edilemedi-3.57 ng/g) olarak belirtilmiştir. Çalışmada örneklerde oluşan HCA miktarlarının yüksek oranda pişirme koşullarına bağlı olduğu belirtilmiştir ve buna ilişkin sonuçlar Çizelge 2.15'te verilmiştir. Tam pişmiş etteki toplam HCA miktarının orta derecede pişmiş etin HCA miktarından 3,5 kat fazla olduğu görülmüştür.

Çizelge 2.15 Kızartılmış ve ızgara edilmiş sığır eti örneklerinin HCA (MeIQx, DiMeIQx, PhIP ve toplam) içeriği (Puangsoombat et al., 2012).

Pişirilmiş Örnekler	HCA (ng/g)	HCA (ng/g)			
		MeIQx	DiMeIQx	PhIP	Toplam
Kızartılmış örnekler	Orta pişmiş	1.75±1.43 ^a	0.04±0.07 ^a	0.94±0.70 ^b	2.73±2.01 ^c
	Tam pişmiş	3.33±0.38 ^a	0.33±0.38 ^a	5.27±0.81 ^a	8.92±1.08 ^a
Izgara edilmiş örnekler	Orta pişmiş	0.08±0.07 ^b	0.06±0.04 ^a	1.58±0.36 ^b	1.72±0.43 ^c
	Tam pişmiş	0.12±0.07 ^b	0.11±0.02 ^a	5.63±0.95 ^a	6.04±0.97 ^b

Değerler ortalama±standart sapma (n=4) biçiminde gösterilmiştir. Aynı kolonda bulunan ortalamalardan farklı harfe sahip olanlar birbirinden anlamlı olarak farklıdır (p<0,05).

Ayrıca HCA miktarları kızartılmış domuz etinde (13,91 ng/g), kızartılmış sığır etinden (8,92 ng/g) ve kızartılmış tavuk etinden (7,00 ng/g) fazla bulunmuştur. Kullanılan farklı et tiplerinin etkisine ilişkin veriler Çizelge 2.16'da verilmiştir.

Çizelge 2.16 Kızartılmış et örneklerinin HCA (MeIQx, DiMeIQx, PhIP ve toplam) içeriği (Puangsombat et al., 2012).

Et Tipleri (Kızartılmış)	İç Sıcaklık (°C)	HCA (ng/g)			
		MeIQx	DiMeIQx	PhIP	Toplam
Sığır eti	77	3,33±0,38	0,33±0,38	5,27±0,81	8,92±1,08
Domuz eti	71	2,39±0,50	2,33±0,52	9,20±1,20	13,91±1,81
Tavuk eti (derisiz)	74	0,46±0,34	0,54±0,19	6,06±0,10	7,06±0,56

Değerler ortalama±standart sapma (n=4) biçiminde gösterilmiştir.

Çalışma sonucunda toplam HCA miktarları artan sırayla şu şekilde belirtilmiştir; düşük düzeyde HCA içeren örnekler (<5 ng/g): fırınlanmış sığır eti, kızartılmış derisiz tavuk eti, orta derecede pişirilmiş biftek ve kızartılmış domuz köftesi; orta düzeyde HCA içeren örnekler (5-10 ng/g): kızartılmış sığır köftesi, kızartılmış derili tavuk eti, fırınlanmış balık ve tam pişirilmiş biftek; yüksek düzeyde HCA içeren örnekler (>10 ng/g): kızartılmış domuz eti, kızartılmış balık eti ve kızartılmış domuz pastırması (Puangsombat et al., 2012).

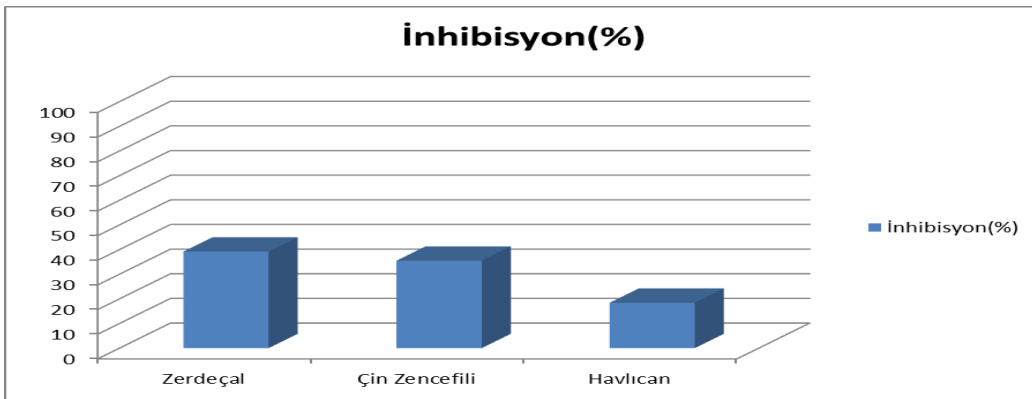
Yapılan bir başka çalışmada Asya baharatlarının pişirilmiş sığır eti köftelerindeki HCA oluşumu üzerine etkileri incelenmiştir. Çalışmada kullanılan baharatlar havlıcan (*Alpinia galangal*), Çin zencefili (*Boesenbergia pandurata*), zerdeçal (*Curcuma longa*), kimyon (*Cuminum cyminum*) ve kişniş tohumudur (*Coriandrum sativum*). Araştırmada pişirme işlemi 204 °C'de 10 dakika boyunca gerçekleştirilmiştir. Tüm baharatlar köftelere %0,2 oranında pişirme işleminden önce eklenmiştir. Örneklerde tespit edilen HCA'lar MeIQx ve PhIP'dir ve sonuçlar Çizelge 2.17'de verilmiştir. Kontrol grubu olarak belirtilen ve hiçbir baharat içermeyen sığır köftesi örneklerinin ortalama 7 ng/g MeIQx ve 6,53 ng/g PhIP içerdiği belirtilmiştir (Puangsombat et al., 2011b).

Çizelge 2.17 400 °C'de 10 dk boyunca pişirilen sığır köftelerinde oluşan HCA miktarı (ng/g) üzerine kullanılan baharatların etkisi ve baharatların inhibisyon oranı (%) (3 tekrara ait ortalama ± standart sapma) (Puangsombat et al., 2011b).

Uygulama	HCA (ng/g)			% İnhibisyon
	MeIQx	PhIP	Toplam	
Kontrol	7.00 ± 0.62 ^a	6.53 ± 0.19 ^a	13.53 ± 0.59 ^a	
Cumin	6.94 ± 0.33 ^a	6.14 ± 0.23 ^a	13.08 ± 0.10 ^a	% 3.33
Kişniş tohumu	6.78 ± 0.55 ^{ab}	6.15 ± 0.23 ^a	12.93 ± 0.32 ^a	% 4.46
Havlıcan	5.73 ± 0.48 ^{bc}	5.31 ± 0.32 ^b	11.04 ± 0.62 ^b	% 18.43
Çin zencefili	4.86 ± 0.44 ^{cd}	4.13 ± 0.13 ^c	9.00 ± 0.31 ^c	% 33.51
Biberiye	3.50 ± 0.30 ^e	4.15 ± 0.16 ^c	7.65 ± 0.41 ^d	% 43.46
Zerdeçal	4.14 ± 0.06 ^{de}	4.08 ± 0.02 ^c	8.22 ± 0.05 ^{cd}	% 39.22

Aynı kolonda bulunan ortalamalardan farklı harfe sahip olanlar birbirinden anlamlı olarak farklıdır (p<0,05).

Şekil 2.10'da görüldüğü gibi kontrol grubu ile kıyaslandığında HCA oluşumunda eklenen baharatlardan zerdeçal %39,2, Çin zencefili %35,5 ve havlıcan %18,4 oranında inhibisyon sağlamıştır. Bu baharatlardan sadece zerdeçal ve Çin zencefilinin HCA oluşumunu önlemede biberiye kadar etkili olduğu belirtilmiştir. Çalışmada baharat içeren sığır köftelerindeki HCA inhibisyonunu baharatlarda bulunan toplam fenolik içeriği ile doğrudan ilişkili bulunmuştur. Sonuç olarak Asya baharatları ilavesinin kızartılmış et köftelerinde oluşan HCA miktarını azaltmada etkin bir faktör olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Puangsombat et al., 2011b).



Şekil 2.10 Zerdeçal, Çin zencefili ve havlıcan için inhibisyon oranları (%)

3. MATERYAL

3.1 Köfte Örnekleri

Denemelerde kullanılan köfte örnekleri marketten hazır olarak temin edilmiştir. Köfteler yüksek oranda HCA oluşması için fırında 225°C’de 20 dakika boyunca pişirilmiştir (Balogh et al., 2000). Fırında pişirilen köfte örnekleri yöntem kıyaslama, geri kazanım ve tekrarlanabilirlik analizlerinde kullanılmıştır. Üç ekstraksiyon yöntemini doğru bir şekilde kıyaslayabilmek için aynı köftelerde analiz yapmak gerektiği için köftelerin homojenliğini sağlayabilmek için köfte örnekleri öncelikle parçalanmıştır (Bkz. Şekil 3.1.a). Parçalanmış örnekler -18 °C’de 24 saat bekletilerek dondurulmuştur. Dondurulan örnekler toplamda 24 saatte freze-drier ile kurutulmuştur (Bkz. Şekil 3.1.b) (Sun et al., 2002). Örnekler sonrasında -18 °C’de kilitli naylon poşetlerde nem almayacak şekilde depolanmıştır.



a)

b)

Şekil 3.1 a)Parçalanmış köfte örneği b)Dondurularak kurutulmuş köfte örneği

3.2 Haşlanmış Et Örnekleri

Denemelerde kullanılan haşlanmış et örnekleri marketten temin edilmiştir. HCA oluşumunu önlemek için yağsız dana eti alınarak haşlama işlemi

uygulanmıştır. Haşlanmış et örnekleri geri kazanım analizinde kullanılmıştır. Üç ekstraksiyon yöntemine ait geri kazanım değerlerini doğru bir şekilde kıyaslayabilmek için öncelikle köfte örneklerinin homojenliği sağlanmıştır. Bu amaçla öncelikle parçalanan haşlanmış et örnekleri sonrasında $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat bekletilerek dondurulmuştur. Dondurulan örnekler toplamda 24 saatte freze-drier ile kurutulmuştur (Sun et al., 2002). Örnekler sonrasında $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de kilitli naylon poşetlerde nem almayacak şekilde depolanmıştır.

3.3 Kimyasal Maddeler

Denemelerde kimyasal malzemeler ve çözeltiler analitik veya HPLC (High Performance Liquid Chromatography) grade kalitesinde kullanılmıştır. HPLC analizi için hazırlanan tüm çözeltiler mavi bant süzgeç kağıdından ($0,45\text{ }\mu\text{m}$, Millipore) süzülmüştür. Tez çalışmasında aşağıda belirtilen kimyasal madde ve çözeltiler kullanılmıştır.

3.3.1 Üren ekstraksiyon metodunda kullanılan kimyasallar

1. $0,2\text{ M HCl}$: $16,6\text{ ml } \%37$ 'lik hidroklorik asit (Merck) alınarak saf su ile 1 L 'ye tamamlanmıştır.
2. Carrez I: $\%15$ 'lik (w/v) $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Merck)
3. Carrez II : $\%23$ 'lik (w/v) $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck)
4. $0,1\text{M HCl}$: $8,3\text{ ml } \%37$ 'lik hidroklorik asit (Merck) alınarak saf su ile 1 L 'ye tamamlanmıştır.
5. Metanol (CH_3OH): Kartuş yıkama ve son ekstraksiyonda (Merck) kullanılmıştır.
6. $\%95\text{ CH}_3\text{OH}$: $\%5\text{ NH}_3$: 19 birim metanol ve 1 birim $\%25$ 'lik amonyağın (Merck) karıştırılması ile hazırlanmıştır.
7. OASIS kartuş (Waters).
8. C18 kartuş (Agilent).

3.3.2 Messner & Murkovic ekstraksiyon metodunda kullanılan kimyasallar

1. 1 M NaOH: 40 g sodyum hidroksit (*), 1 litrelik ölçü balonuna tartılıp bir miktar su ile çözüldükten sonra litreye tamamlanmıştır.
2. Extrelut NT Paketleme Materyali: Cam kolona dolum esnasında extrelut NT paketleme materyali (Merck) kullanılmıştır.
3. Etil asetat: Ekstraksiyon aşamasında etil asetat (*) kullanılmıştır.
4. 0,1M HCl: 8,3 ml %37'lik hidroklorik asit (Merck) alınarak saf su ile 1 L'ye tamamlanmıştır.
5. Metanol (CH₃OH): Ekstraksiyonda (Merck) kullanılmıştır.
6. %95 CH₃OH: %5 NH₃: 19 birim metanol ve 1 birim %25'lik amonyağın (Merck) karıştırılması ile hazırlanmıştır.
7. OASIS kartuş (Waters).

3.3.3 Santos ekstraksiyon metodunda kullanılan kimyasallar

1. 1 M NaOH: 40 g sodyum hidroksit (Merck), 1 litrelik ölçü balonuna tartılıp bir miktar su ile çözüldükten sonra litreye tamamlanmıştır.
2. Extrelut NT Paketleme Materyali: Cam kolona dolum esnasında extrelut NT paketleme materyali (Merck) kullanılmıştır.
3. Diklormetan: Ekstraksiyon aşamasında diklormetan (Fluka) kullanılmıştır.
4. %40 CH₃OH: %60 H₂O: 2 birim metanol(Merck) ve 3 birim saf suyun karıştırılması ile hazırlanmıştır.
5. 0,5 M Amonyum asetat: 38,54 g amonyum asetat (Merck),1 litrelik ölçü balonuna tartılıp bir miktar su ile çözüldükten sonra litreye tamamlanmıştır. Sonrasında %25'lik NH₃ ile pH 8,5'e ayarlanmıştır.
3. %90 CH₃OH: %10 NH₃: 9 birim metanol ve 1 birim %25'lik amonyağın (Merck) karıştırılması ile hazırlanmıştır.
4. PRS kartuş (Varian).
5. C18 kartuş (Agilent).

3.3.4 HPLC’de kullanılan kimyasallar

1. DAD dedektör kullanılan HPLC cihazında hareketli faz olarak A: %25 lik NH_3 ile pH si 5’e ayarlanmış metanol/asetonitril/su/asetik asit (8/14/76/2, v/v/v/v) çözeltisi ve B: asetonitril kullanılmıştır.
2. Floresans dedektör kullanılan HPLC cihazında hareketli faz olarak A: 0,5 M amonyum asetat ve B: metanol kullanılmıştır.
3. HCA standardı olarak IQ, MeIQx, DiMeIQx, PhIP, Harman (Toronto Reserch Chemicals, Toronto, Kanada) ve Norharman (Sigma, İsviçre) standart maddeleri kullanılmıştır.
4. HPLC kolonları: Her iki HPLC cihazında da Thermo Scientific BDS HYPERSIL C18 DIM. (mm) 150x4,6 kolon kullanılmıştır.

4. METOT

Tez çalışmasında yöntemler 4 farklı özellik bakımından kıyaslanmıştır. Bunlar yöntem kıyaslama, geri kazanım, tekrarlanabilirlik ve tespit limiti özellikleridir. Bu kıyaslamalar üç farklı ekstraksiyon yöntemi için gerçekleştirilmiştir. Uygulanan ekstraksiyon yöntemlerinin ilki Prof. Dr. Ali Üren ve ark. tarafından geliştirilmiştir. Diğer yöntemler ise Santos et al., (2004) tarafından ve Messner & Murkovic (2004) tarafından geliştirilmiştir.

4.1 Üren Ekstraksiyon Yöntemi

Bu ekstraksiyon yöntemine göre tez çalışmasında erlene 4 g örnek tartılmış ve üzerine 25 ml 0,2 M HCl eklenerek 1 saat boyunca çalkalayıcıda 100 rpm devirde karıştırılmıştır. Bu süre sonunda erlene 2 ml Carrez I eklenerek 2dk daha çalkalanmış ve ardından 2 ml de Carrez II çözeltisi eklenmiş ve tekrar 2 dk çalkalama işlemi yapılmıştır. Karışım mavi bant süzgeç kağıdından süzülüş ve elde edilen süzüntü iki eşit kısma ayrılmıştır. Her iki kısım ayrı ayrı 2 ml 0,1 M HCl ile şartlanmış olan C18 kartuştan geçirilerek alt faz bir deney tüpünde toplanmıştır. Deney tüpündeki süzüntü 2 ml 0,1 M HCl ile şartlanan OASIS kartuştan geçirilmiştir. Söz konusu kartuş öncelikle 2 ml 0,1 M HCl ile sonrasında da 2 ml metanol ile yıkanmıştır. Son olarak kartuş 3 ml metanol:amonyak (19:1) ile yıkanarak alt faz bir cam santrifüj tüpünde toplanmıştır. Cam tüp azot düzeneğine yerleştirilerek solventin azot gazı altında uzaklaşması sağlanmıştır. Söz konusu santrifüj tüpünün çeperlerinde yer alan ve HCA bileşenlerini içeren kalıntı 0,5 ml metanol ile çözülüp mavi bant süzgeç kağıdından süzülerek 1,5 ml'lik viallerde toplanmıştır.

4.2 Messner & Murkovic Ekstraksiyon Yöntemi

Bu ekstraksiyon yöntemine göre tez çalışmasında erlene 1 g örnek tartılmış ve üzerine 12 ml 1 M NaOH eklenerek 1 saat boyunca çalkalayıcıda 150 rpm

devirde karıştırılmıştır. Üzerine 13 g Extrelut NT paketleme materyali konularak bir spatül yardımıyla iyice karıştırılmıştır. Karışım daha sonra bir cam kolona aktarılmıştır. Kolon öncelikle 45 ml etil asetat ile dengelenmiştir ve ardından musluğu açılarak 30 ml daha etil asetat eklenmiştir. Kolon altına yerleştirilen bir beherde kolondan gelen süzöntü toplanmıştır. Toplanan süzöntü 2 ml etil asetat ile şartlanmış olan *OASIS* kartuştan geçirilmiş ve alt faz atılmıştır. Daha sonra kartuş öncelikle 2 ml 0,1 M HCl ile sonrasında da 2 ml metanol ile yıkanmıştır. Son olarak kartuş 2 ml metanol:amonyak (19:1) ile yıkanarak alt faz bir cam santrifüj tüpünde toplanmıştır. Cam tüp azot düzeneğine yerleştirilerek solventin azot gazı altında uzaklaşması sağlanmıştır. Söz konusu santrifüj tüpünün çeperlerinde yer alan ve HCA bileşenlerini içeren kalıntı 0,5 ml metanol ile çözülüp mavi bant süzgeç kağıdından süzülerek 1,5 ml'lik viallerde toplanmıştır.

4.3 Santos Ekstraksiyon Yöntemi

Bu ekstraksiyon yöntemine göre tez çalışmasında erlene 1 g örnek tartılmış ve üzerine 12 ml 1 M NaOH eklenerek 1 saat boyunca çalkalayıcıda 150 rpm devirde karıştırılmıştır. Üzerine 13 g Extrelut NT paketleme materyali konularak bir spatül yardımıyla iyice karıştırılmıştır. Karışım daha sonra bir cam kolona aktarılmıştır. Kolon öncelikle 45 ml diklormetan ile dengelenmiştir ve ardından musluğu açılarak 30 ml daha diklormetan eklenmiştir. Kolon altına yerleştirilen bir beherde kolondan gelen süzöntü toplanmıştır. Toplanan süzöntü ilk olarak 2 ml diklormetan ile şartlanmış olan PRS kartuştan geçirilmiş ve alt faz atılmıştır. Daha sonra bu kartuş öncelikle 15 ml metanol:su (40:60) karışımı ile sonra da 2 ml saf su ile yıkanmıştır. Ardından söz konusu kartuştan 20 ml 0,5 M amonyum asetat geçirilmiş ve bu kez alt faz toplanmıştır. Toplanan alt faz 2 ml 0,5 M amonyum asetat ile şartlanan *C18* kartuştan geçirilmiştir. Daha sonra bu *C18* kartuş 5 ml saf su ile yıkanmıştır. Son olarak kartuş 0,8 ml metanol:amonyak (9:1) ile yıkanarak alt faz bir cam santrifüj tüpünde toplanmıştır. Cam tüp azot düzeneğine yerleştirilerek solventin azot gazı altında uzaklaşması sağlanmıştır. Söz konusu santrifüj tüpünün çeperlerinde yer alan ve HCA bileşenlerini içeren kalıntı 0,5 ml metanol ile çözülüp mavi bant süzgeç kağıdından süzülerek 1,5 ml'lik viallerde toplanmıştır.

4.4 Yöntem Kıyaslama

Tez çalışmasında yöntem kıyaslama yapmak için 10 ayrı örnek kullanılmıştır. Örneklerin analizinde Üren Ekstraksiyon Metodu, Messner & Murkovic Ekstraksiyon Metodu ve Santos Ekstraksiyon Metodu kullanılmıştır. Her bir örnek 3 ekstraksiyon yöntemiyle de analiz edilmiştir. Elde edilen ekstraktlar aynı HPLC metodu ile analiz edilmiştir.

4.5 Tekrarlanabilirlik

Tez çalışmasında tekrarlanabilirlik deneyi için 3 ayrı örnek kullanılmıştır. Her bir örnekten Üren Ekstraksiyon Metodu, Messner & Murkovic Ekstraksiyon Metodu ve Santos Ekstraksiyon Metodu ile ekstraksiyon yapılmıştır. Her bir ekstraksiyon metodu için aynı örnekten 5 paralel ekstraksiyon yapılmıştır. Elde edilen ekstraktlar aynı HPLC metodu ile analiz edilmiştir.

4.6 Tespit Limiti

Tez çalışmasında tespit limiti deneyi için haşlanmış et örneği kullanılmıştır. Örnek Üren Ekstraksiyon Metodu, Messner & Murkovic Ekstraksiyon Metodu ve Santos Ekstraksiyon Metodu ile ekstrakte edilmiştir. Her bir ekstraksiyon yöntemi ile 5 kez ekstraksiyon işlemi yapılmıştır. Elde edilen ekstraktlar aynı HPLC metodu ile analiz edilmiştir.

4.7 Geri Kazanım

Tez çalışmasında geri kazanım deneyi için Üren Ekstraksiyon Metodu, Messner & Murkovic Ekstraksiyon Metodu ve Santos Ekstraksiyon Metodu ile dokuz ayrı örnekten ekstraksiyon yapılmıştır. Her bir ekstraksiyon metodu için üç örnek kullanılmıştır. Bu örneklerin öncelikle içerdikleri HCA miktarları belirlenmiştir. Sonrasında örneklere 1ppm konsantrasyonunda IQ, MeIQx, DiMeIQx, PhIP, Norharman ve Harman HCA standartlarını içeren standart karışımı eklenmiştir. Standart karışımı eklenen bu örneklerden yine aynı

yöntemlerle ekstraksiyon yapılmıştır. Elde edilen ekstraktlar aynı HPLC metodu ile analiz edilmiştir.

4.8 HPLC Analizi İçin Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Tez çalışmasında kalibrasyon eğrisi oluşturmak amacıyla farklı HCA standartlarından değişik konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanmıştır. Bu amaçla IQ, DiMeIQx, MeIQx, PhIP, Norharman ve Harman bileşiklerinin 0,2 ppm, 1ppm ve 5 ppm'lik çözeltileri hazırlanmıştır. Bunlardan IQ, MeIQx ve DiMeIQx bileşenlerine ait standart çözeltileri DAD detektöre sahip HPLC cihazında analiz edilirken; PhIP, Norharman ve Harman bileşenlerine ait standart çözeltileri floresans detektöre sahip HPLC cihazında analiz edilmiştir. Elde edilen verilerden her bileşen için ayrı bir kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.

Tez çalışmasında geri kazanım analizlerinde kullanılmak üzere IQ, DiMeIQx, MeIQx, PhIP, Norharman ve Harman bileşenlerine ait standartları 1 ppm düzeyinde içeren bir standart karışım çözeltisi de hazırlanmıştır.

4.9 HPLC Analizi

Tez çalışmasında IQ, MeIQx, DiMeIQx, PhIP, Norharman ve Harman HCA bileşenleri için analizler gerçekleştirilmiştir. Bunlardan PhIP, Norharman ve Harman bileşikleri floresans özellik gösterdiği için floresans detektöre sahip HPLC cihazında, IQ, MeIQx ve DiMeIQx bileşenleri ise DAD detektöre sahip HPLC cihazında analiz edilmiştir.

MeIQx, DiMeIQx ve IQ bileşiklerinin DAD dedektör ile yapılan analizinde hareketli faz olarak A: %25 lik NH₃ ile pH si 5,0 e ayarlanmış metanol/asetonitril/su/asetik asit (8/14/76/2, v/v/v/v) çözeltisi ve B: asetonitril kullanılmış ve kolona 20 µl örnek enjekte edilmiştir. Uygulanan gradient programda zaman (dk), A çözgeni yüzdesi ve debi (ml/dk) sırasıyla; 0 100 0,3; 12 100 0,3; 20 70 0,3; 29 70 0,3; 34 0 0,3; 35 0 1; 44 0 1; 49 100 0,3 ve 55 100 0,3

şeklinde gerçekleştirilmiştir. MeIQ_x, DiMeIQ_x ve IQ bileşenleri ile 263 nm de çalışılmıştır.

PhIP, norharman ve harman analiz edilirken hareketli faz olarak A: 0,5 M amonyum asetat ve B: metanol, 0,5 ml/dk akış hızında kullanılmıştır ve 15 µl örnek enjekte edilmiştir. Gradient program 0-10 dk arası %90-75 A, 10-15 dk arası %75-0 A, 15-20 dk arası %0 A, 20-22 dk arası %0-90 A ve 22-27 dk arası %90 A hattı olacak şekilde ayarlanmıştır. Floresans dedektörde uyarma dalga boyu 340 nm ve emisyon dalga boyu 370 nm olarak seçilmiştir.

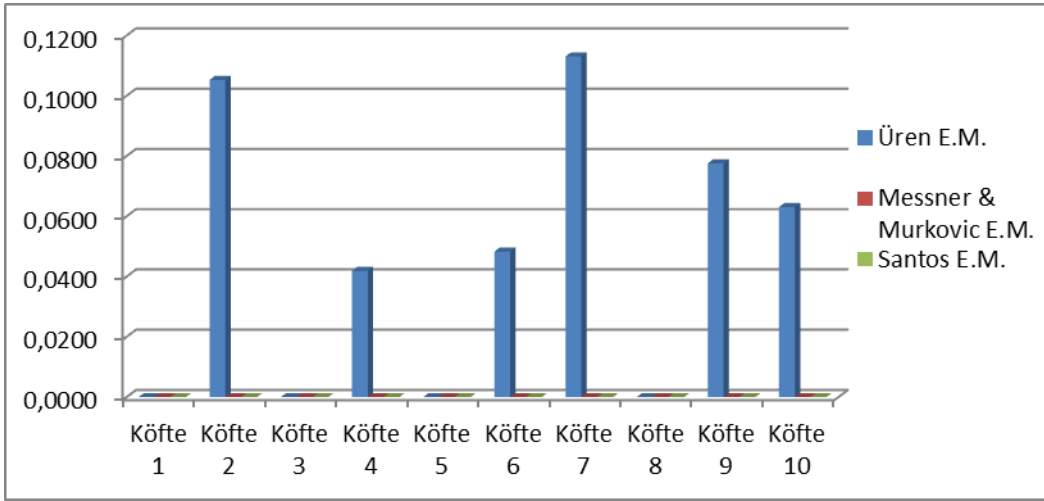
4.10 İstatiksel Analizler

Tez kapsamında yapılan analizlerin istatistiksel değerlendirmesi SPSS 16.0 Windows paket programı (SPSS 16.0 for Windows) ile yapılmıştır. Ortalamalar arası farklılık ANOVA (Analyses of Variance) ve Duncan çoklu karşılaştırma testi ile Independent Samples T Test ve Paired Samples T Test kullanılarak değerlendirilmiştir.

5. BULGULAR

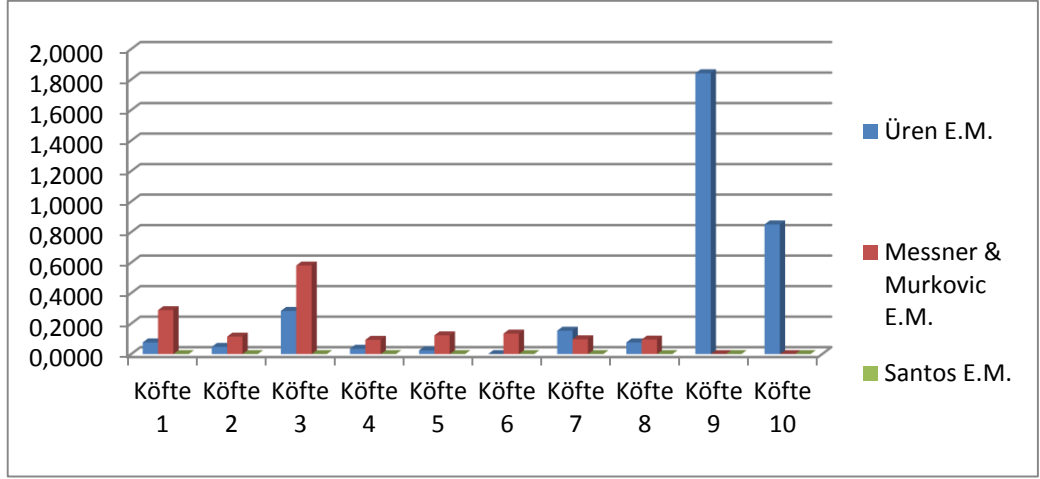
5.1 Ekstraksiyon Yöntemlerinin Kıyaslanması

Tez çalışmasında kullanılan üç ekstraksiyon yönteminin kıyaslanması için on adet fırında pişirilen köfte örneğine ait HCA miktarları her üç yöntemle de analiz edilmiştir. Analiz sonuçları grafik üzerinde gösterilmiştir.



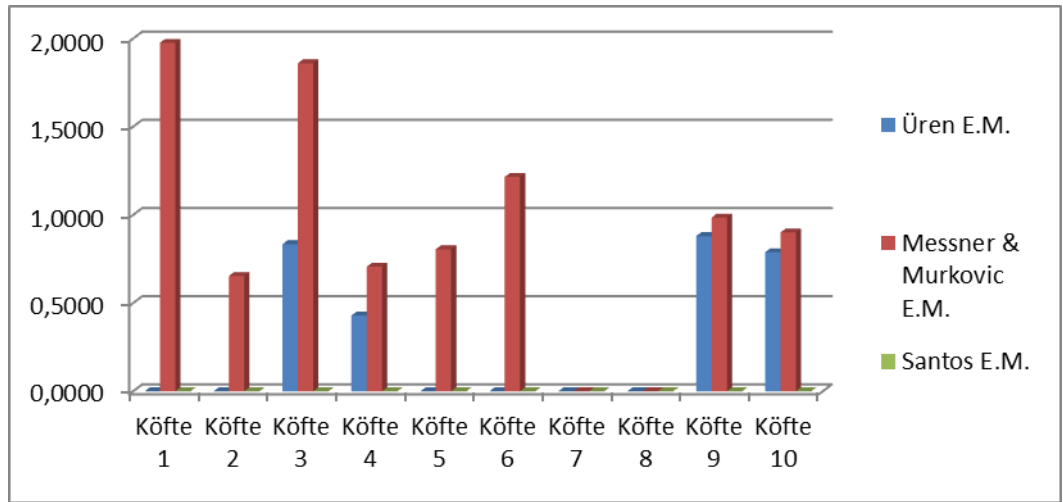
Şekil 5.1 Yöntem kıyaslama analizinde IQ bileşenine ait veriler (ppm).

Tez çalışmasında bahsedilen üç ekstraksiyon yöntemiyle de analiz edilen köfte örneklerinde bulunan IQ bileşenine ait veriler şekil 5.1’de verilmiştir. Grafikte de görüldüğü gibi Messner & Murkovic ve Santos ekstraksiyon metotları ile bu bileşene ait konsantrasyon değerleri tespit edilemezken Üren ekstraksiyon metodu ile bu bileşenin tespiti mümkün olmuştur.



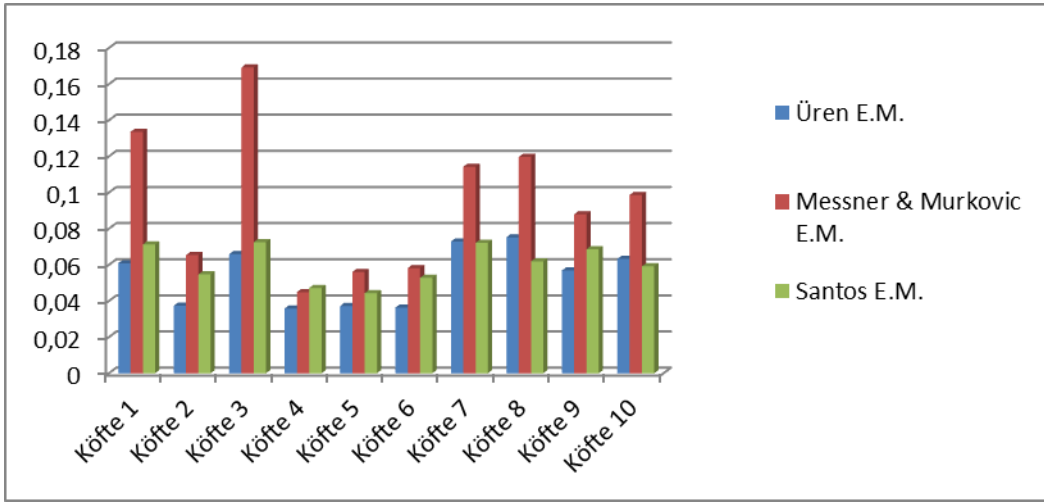
Şekil 5.2 Yöntem kıyaslama analizinde MeIQx bileşenine ait veriler (ppm).

Tez çalışmasında bahsedilen üç ekstraksiyon yöntemiyle de analiz edilen köfte örneklerinde bulunan MeIQx bileşenine ait veriler şekil 5.2’de verilmiştir. Grafikte de görüldüğü gibi Santos ekstraksiyon metotları ile bu bileşene ait konsantrasyon değerleri tespit edilememiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda ise Üren ekstraksiyon metodu ile Messner & Murkovic ekstraksiyon metodu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$).



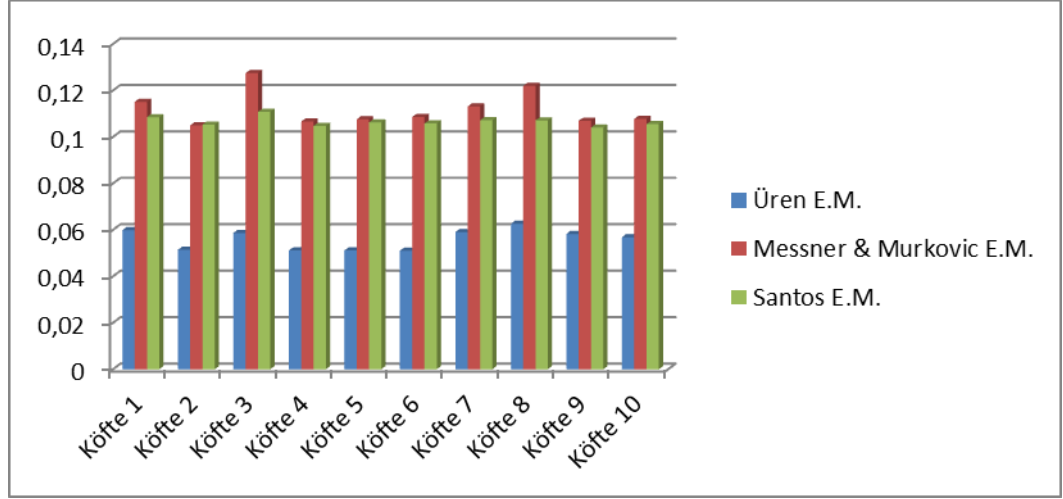
Şekil 5.3 Yöntem kıyaslama analizinde DiMeIQx bileşenine ait veriler (ppm).

Tez çalışmasında bahsedilen üç ekstraksiyon yöntemiyle de analiz edilen köfte örneklerinde bulunan DiMeIQx bileşenine ait veriler şekil 5.3'te verilmiştir. Grafikte de görüldüğü gibi Santos ekstraksiyon metotları ile bu bileşene ait konsantrasyon değerleri tespit edilememiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda ise Messner & Murkovic ekstraksiyon metodu ile elde edilen verilerin ortalamaları Üren ekstraksiyon metodu ile elde edilen verilerin ortalamalarından yüksek bulunmuştur ($p < 0,05$).



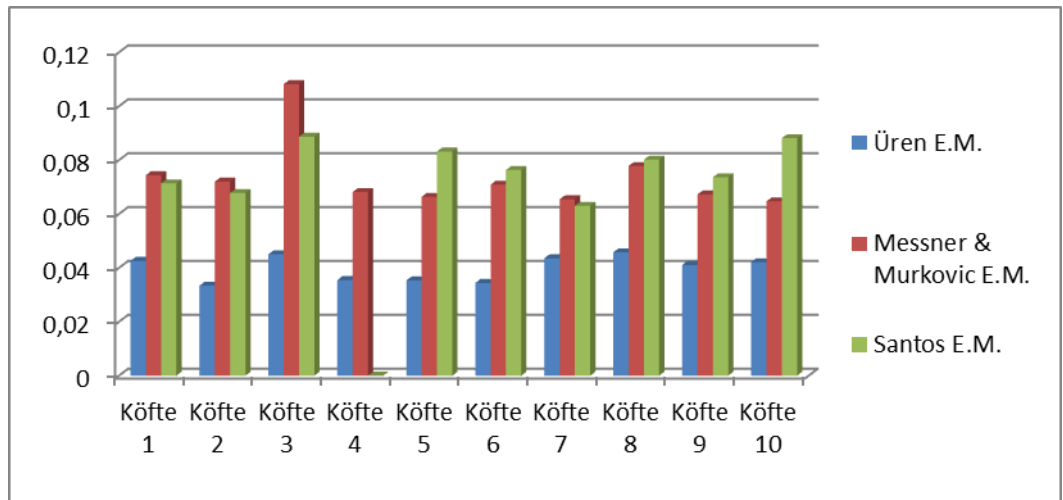
Şekil 5.4 Yöntem kıyaslama analizinde PhIP bileşenine ait veriler (ppm).

Tez çalışmasında bahsedilen üç ekstraksiyon yöntemiyle de analiz edilen köfte örneklerinde bulunan PhIP bileşenine ait veriler şekil 5.4'te verilmiştir. Grafikte de görüldüğü gibi her üç ekstraksiyon metodu ile bu bileşene ait konsantrasyon değerleri tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda ise Messner & Murkovic ekstraksiyon metodu ile elde edilen verilerin ortalamaları Üren ekstraksiyon metodu ve Santos ekstraksiyon metodu ile elde edilen verilerin ortalamalarından yüksek bulunmuştur. Buna karşın Üren ekstraksiyon metodu ve Santos ekstraksiyon metodu arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.



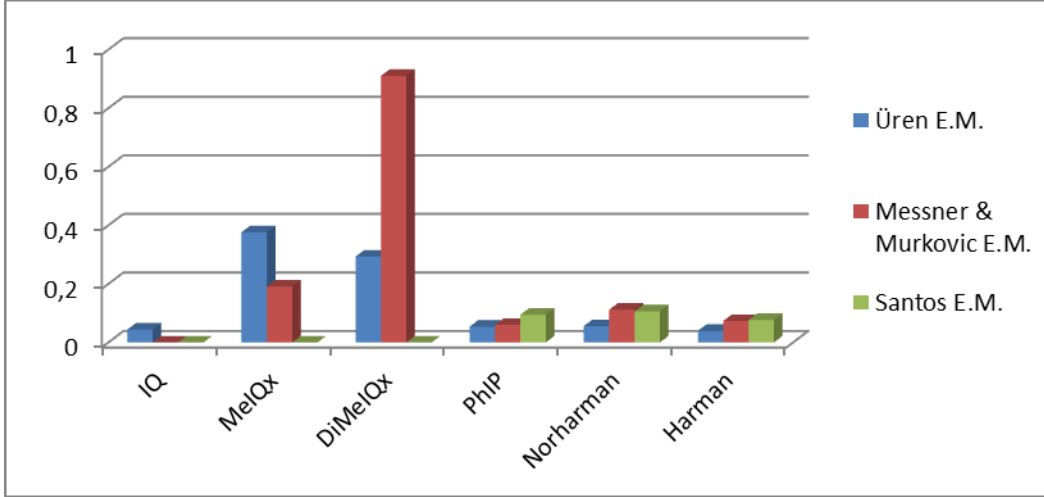
Şekil 5.5 Yöntem kıyaslama analizinde Norharman bileşenine ait veriler (ppm).

Tez çalışmasında bahsedilen üç ekstraksiyon yöntemiyle de analiz edilen köfte örneklerinde bulunan Norharman bileşenine ait veriler şekil 5.5'te verilmiştir. Grafikte de görüldüğü gibi her üç ekstraksiyon metodu ile bu bileşene ait konsantrasyon değerleri tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda üç ekstraksiyon metodu ile elde edilen sonuçların ortalamasının istatistiki olarak anlamlı bir şekilde birbirinden farklı olduğu belirlenmiştir. Buna göre en yüksek ortalamaya Messner & Murkovic ekstraksiyon metodu ile elde edilen veriler sahipken bu metodu Santos ekstraksiyon metodu ile elde edilen veriler takip etmiş, en düşük değerler ise Üren ekstraksiyon metodu ile elde edilen veriler sonucunda bulunmuştur.



Şekil 5.6 Yöntem kıyaslama analizinde Harman bileşenine ait veriler (ppm).

Tez çalışmasında bahsedilen üç ekstraksiyon yöntemiyle de analiz edilen köfte örneklerinde bulunan Harman bileşenine ait veriler şekil 5.6'da verilmiştir. Grafikte de görüldüğü gibi her üç ekstraksiyon metodu ile bu bileşene ait konsantrasyon değerleri tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda Messner & Murkovic ekstraksiyon metodu ile elde edilen verilerin ve Santos ekstraksiyon metodu ile elde edilen verilerin ortalamaları birbirine eşit ve Üren ekstraksiyon metodu ile elde edilen verilerin ortalamasından yüksek bulunmuştur.



Şekil 5.7 Yöntem kıyaslama analizinde IQ, MeIQx, DiMeIQx, PhIP, Norharman ve Harman bileşenlerine ait ortalama veriler (ppm).

Tez kapsamında gerçekleştirilen yöntem kıyaslama analizlerine ait veriler şekil 5.7'de özetlenmiştir. Bu grafiğe göre IQ bileşiği için Messner & Murkovic ve Santos ekstraksiyon metotlarıyla sonuç elde edilemezken, Üren ekstraksiyon metoduyla sonuç elde edilmesi söz konusu olmuştur. MeIQx ve DiMeIQx bileşenleri için Santos ekstraksiyon metodu ile sonuç elde edilemezken MeIQx için elde edilen verilerde Üren ekstraksiyon metodu ve Messner & Murkovic ekstraksiyon metodu arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. DiMeIQx bileşeni ise Messner & Murkovic ekstraksiyon metodu ile daha yüksek değerde tespit edilmiştir. PhIP bileşeni için Üren ve Santos ekstraksiyon metodları aynı değerleri verirken Messner & Murkovic ekstraksiyon metodu bu iki metottan daha yüksek bir değer vermiştir. Norharman bileşiği göz önüne alındığında elde edilen verilerin ortalaması yöntemlere göre artan sırayla Üren, Santos ve Messner & Murkovic ekstraksiyon metotları olarak sıralanmıştır. Son olarak Harman

bileşimine baktığımızda Santos ve Messner & Murkovic ekstraksiyon metotları birbirine eş sonuç verirken Üren ekstraksiyon metoduyla elde edilen veriler bunlardan daha düşük olarak belirlenmiştir.

5.2 Tekrarlanabilirlik

Tez çalışmasında kullanılan üç ekstraksiyon yönteminin tekrarlanabilirliklerinin kıyaslanması için üç farklı fırında pişirilen köfte örneğine ait HCA miktarları her üç yöntemle de analiz edilmiştir. Yapılan analiz sonuçları çizelgelerde gösterilmiştir.

Çizelge 5.1 Tekrarlanabilirlik analizinde IQ bileşenine ait veriler (ppm).

Örnekler	Üren E.M.	Messner & Murkovic E.M.	Santos E.M.
Köfte 1	0,1214	0,0614	-
Köfte 2	0,0779	0,0627	-
Köfte 3	0,0823	0,0629	-
Köfte 4	0,0770	0,0567	-
Köfte 5	0,0827	0,0670	-

Tez çalışmasında bahsedilen üç ekstraksiyon yöntemiyle de analiz edilen köfte örneklerinde bulunan IQ bileşenine ait veriler çizelge 5.1’de verilmiştir. Çizelgede de görüldüğü gibi Santos ekstraksiyon metodu ile bu bileşene ait konsantrasyon değerleri tespit edilememiştir. Üren ve Messner & Murkovic ekstraksiyon metodu ile elde edilen verilerin standart sapmaları hesaplanmış ve sırasıyla 0,1227 ve 0,2431 olarak bulunmuştur. Yapılan istatistik analizler sonucu bu iki yönteme ait tekrarlanabilirlik değerleri karşılaştırılmış ve yöntemlerin tekrarlanabilirlik değerlerinin birbirinden farklı olmadıkları görülmüştür ($p>0,05$).

Çizelge 5.2 Tekrarlanabilirlik analizinde MeIQx bileşenine ait veriler (ppm).

Örnekler	Üren E.M.	Messner & Murkovic E.M.	Santos E.M.
Köfte 1	3,0029	0,4324	-
Köfte 2	1,6799	0,4203	-
Köfte 3	1,0374	0,4919	-
Köfte 4	2,2326	0,4496	-
Köfte 5	0,9315	0,4887	-

Tez çalışmasında bahsedilen üç ekstraksiyon yöntemiyle de analiz edilen köfte örneklerinde bulunan MeIQx bileşenine ait veriler çizelge 5.2’de verilmiştir. Çizelgede de görüldüğü gibi Santos ekstraksiyon metodu ile bu bileşene ait konsantrasyon değerleri tespit edilememiştir. Üren ve Messner & Murkovic ekstraksiyon metodu ile elde edilen verilerin standart sapmaları hesaplanmış ve sırasıyla 0,0325 ve 0,86338 olarak bulunmuştur. Yapılan istatistik analizler sonucu bu iki yöntemle ait tekrarlanabilirlik değerleri karşılaştırılmış ve Messner & Murkovic ekstraksiyon metoduna ait tekrarlanabilirlik değeri Üren ekstraksiyon metoduna ait tekrarlanabilirlik değerinden daha yüksek bulunmuştur ($p < 0,05$).

Tez çalışması kapsamında yapılan analizler sonucunda DiMeIQx bileşenine ait tekrarlanabilirlik analizi yeterli veri elde edilemediğinden gerçekleştirilememiştir.

Çizelge 5.3 Tekrarlanabilirlik analizinde PhIP bileşenine ait veriler (ppm).

Örnekler	Üren E.M.	Messner & Murkovic E.M.	Santos E.M.
Köfte 1	0,0531	0,1642	0,0780
Köfte 2	0,0564	0,1609	0,0796
Köfte 3	0,0557	0,1658	0,0693
Köfte 4	0,0568	0,0148	0,0901
Köfte 5	0,0582	0,1552	0,2627

Tez çalışmasında bahsedilen üç ekstraksiyon yöntemiyle de analiz edilen köfte örneklerinde bulunan PhIP bileşenine ait veriler çizelge 5.3'te verilmiştir. Üren, Messner & Murkovic ve Santos ekstraksiyon metodu ile elde edilen verilerin standart sapmaları hesaplanmış ve sırasıyla 0,01879, 0,06574 ve 0,08237 olarak bulunmuştur. Yapılan istatistik analizler sonucu bu üç yönteme ait tekrarlanabilirlik değerleri karşılaştırılmış ve Messner & Murkovic ile Santos ekstraksiyon metoduna ait tekrarlanabilirlik değerleri birbirine eşit Üren ekstraksiyon metoduna ait tekrarlanabilirlik değerinden daha düşük bulunmuştur.

Çizelge 5.4 Tekrarlanabilirlik analizinde Norharman bileşenine ait veriler (ppm).

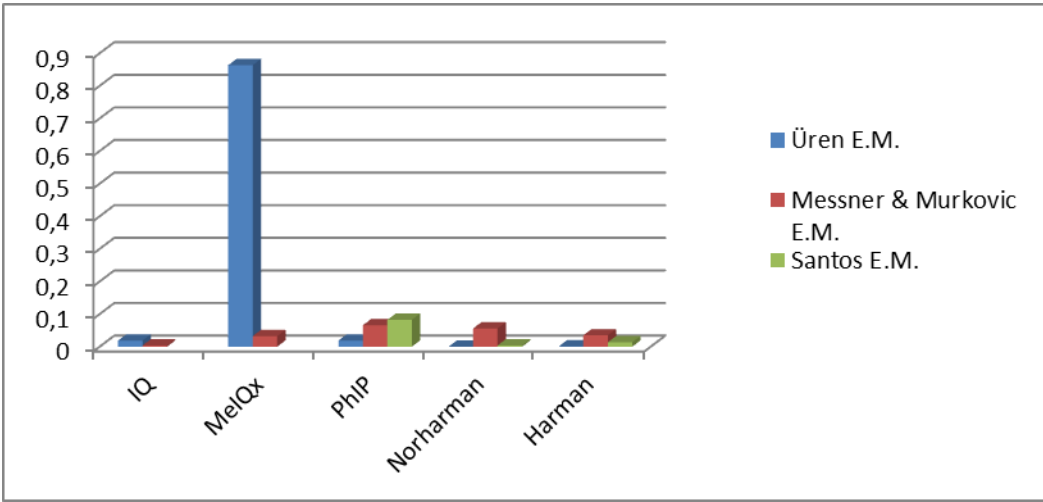
Örnekler	Üren E.M.	Messner & Murkovic E.M.	Santos E.M.
Köfte 1	0,0533	0,1248	0,1226
Köfte 2	0,0531	0,1256	0,1129
Köfte 3	0,0531	0,1240	0,1190
Köfte 4	0,0529	0,0000	0,1190
Köfte 5	0,0529	0,1253	0,1229

Tez çalışmasında bahsedilen üç ekstraksiyon yöntemiyle de analiz edilen köfte örneklerinde bulunan Norharman bileşenine ait veriler çizelge 5.4'te verilmiştir. Üren, Messner & Murkovic ve Santos ekstraksiyon metodu ile elde edilen verilerin standart sapmaları hesaplanmış ve sırasıyla 0,0001673, 0,05587 ve 0,004031 olarak bulunmuştur. Yapılan istatistik analizler sonucu bu üç yönteme ait tekrarlanabilirlik değerleri karşılaştırılmış, Üren ile Santos ekstraksiyon metoduna ait tekrarlanabilirlik değerleri birbirine eşit ve Messner & Murkovic ekstraksiyon metoduna ait tekrarlanabilirlik değerinden daha yüksek bulunmuştur.

Çizelge 5.5 Tekrarlanabilirlik analizinde Harman bileşenine ait veriler (ppm).

Örnekler	Üren E.M.	Messner & Murkovic E.M.	Santos E.M.
Köfte 1	0,0378	0,0735	0,1131
Köfte 2	0,0376	0,0719	0,0791
Köfte 3	0,0375	0,0733	0,1006
Köfte 4	0,0382	0,0000	0,0995
Köfte 5	0,0398	0,0875	0,1108

Tez çalışmasında bahsedilen üç ekstraksiyon yöntemiyle de analiz edilen köfte örneklerinde bulunan Harman bileşenine ait veriler çizelge 5.5'te verilmiştir. Üren, Messner & Murkovic ve Santos ekstraksiyon metodu ile elde edilen verilerin standart sapmaları hesaplanmış ve sırasıyla 0,0009445, 0,03482 ve 0,01345 olarak bulunmuştur. Yapılan istatistik analizler sonucu bu üç yönteme ait tekrarlanabilirlik değerleri karşılaştırılmış, Messner & Murkovic ile Santos ekstraksiyon metoduna ait tekrarlanabilirlik değerleri birbirine eşit ve Üren ekstraksiyon metoduna ait tekrarlanabilirlik değerinden daha düşük bulunmuştur.

**Şekil 5.8** Tekrarlanabilirlik analizinde IQ, MeIQx, PhIP, Norharman ve Harman bileşenlerine ait standart sapmalar

Tez kapsamında gerçekleştirilen tekrarlanabilirlik analizlerine ait standart sapmalar şekil 5.8'de özetlenmiştir. Bu grafiğe göre IQ bileşiği için Santos ekstraksiyon metoduyla sonuç elde edilemezken, Üren ve Messner & Murkovic

ekstraksiyon metoduyla elde edilen sonuçlara bakıldığında bu iki yöntemin tekrarlanabilirliklerinin aynı olduğu görülmüştür. MeIQx bileşeni için Santos ekstraksiyon metodu ile sonuç elde edilemezken MeIQx için elde edilen verilerden Üren ekstraksiyon metoduna ait tekrarlanabilirliğinin Messner & Murkovic ekstraksiyon metodunun tekrarlanabilirliğinden daha düşük olduğu belirlenmiştir. PhIP ve Harman bileşikleri için Messner & Murkovic ve Santos ekstraksiyon metodunun tekrarlanabilirlikleri birbirine eşit ve Üren ekstraksiyon metodunun tekrarlanabilirliğinden düşük olarak bulunmuştur. Norharman bileşiği göz önüne alındığında ise Üren ve Santos ekstraksiyon metodunun tekrarlanabilirlikleri birbirine ve Messner & Murkovic ekstraksiyon metodunun tekrarlanabilirliğinden yüksek olarak hesaplanmıştır.

5.3 Tespit Limiti

Tez çalışmasında kullanılan üç ekstraksiyon yöntemine ait tespit limiti kıyaslanması için haşlanmış et örnekleri ile çalışılmıştır. Analiz sonuçları elde edildikten sonra yöntemlere ait standart sapmalar hesaplanmış ve bunların 3 katı alınarak tespit limiti belirlenmiştir.

Tez çalışmasında yapılan analizler sonucunda IQ ve DiMeIQx bileşenine ait tespit limiti analizi yeterli veri elde edilemediğinden gerçekleştirilememiştir.

Çizelge 5.6 Tespit limiti analizinde MeIQx bileşenine ait veriler (ppm).

Örnekler	Üren E.M.	Messner & Murkovic E.M.	Santos E.M.
Köfte 1	0,0161	0,0143	-
Köfte 2	0,0103	0,0000	-
Köfte 3	0,0102	0,0000	-
Köfte 4	0,0131	0,0229	-
Köfte 5	0,0131	0,0000	-
Standart sapma	0,002189	0,01063	-
Tespit Limiti	0,006567	0,03189	-

Tez çalışmasında bahsedilen üç ekstraksiyon yöntemiyle de analiz edilen haşlanmış et örneklerinde bulunan MeIQx bileşenine ait veriler çizelge 5.6'de verilmiştir. Çizelgede de görüldüğü gibi Santos ekstraksiyon metodu ile bu bileşene ait konsantrasyon değerleri tespit edilememiştir. Üren ve Messner & Murkovic ekstraksiyon metodu ile elde edilen verilerin tespit limitleri hesaplanmış ve sırasıyla 0,006567 ve 0,03189 ppm olarak bulunmuştur. Yapılan istatistik analizler sonucu bu iki yönteme ait tespit limiti değerleri karşılaştırılmış ve Üren ekstraksiyon metoduna ait tespit limiti değeri, Messner & Murkovic ekstraksiyon metoduna ait tespit limiti değerinden düşük bulunmuştur ($p < 0,05$).

Çizelge 5.7 Tespit limiti analizinde PhIP bileşenine ait veriler (ppm).

Örnekler	Üren E.M.	Messner & Murkovic E.M.	Santos E.M.
Köfte 1	0,0242	0,0801	0,7527
Köfte 2	0,0266	0,0784	0,2722
Köfte 3	0,4231	0,1657	0,1051
Köfte 4	0,1499	0,0542	0,8584
Köfte 5	0,0495	0,0458	0,3424
Standart sapma	0,013117	0,017246	0,292292
Tespit Limiti	0,0394	0,0517	0,8769

Tez çalışmasında bahsedilen üç ekstraksiyon yöntemiyle de analiz edilen haşlanmış et örneklerinde bulunan PhIP bileşenine ait veriler çizelge 5.7'de verilmiştir. Üren, Messner & Murkovic ve Santos ekstraksiyon metodu ile elde edilen verilerden tespit limitleri hesaplanmış ve sırasıyla 0,0394, 0,0517 ve 0,8769 olarak bulunmuştur. Yapılan istatistik analizler sonucunda bu üç yönteme ait tespit limiti değerleri karşılaştırılmış, Üren ile Messner & Murkovic ekstraksiyon metoduna ait tespit limiti değerleri birbirine eşit ve Santos ekstraksiyon metoduna ait tekrarlanabilirlik değerinden daha düşük bulunmuştur.

Çizelge 5.8 Tespit limiti analizinde Norharman bileşenine ait veriler (ppm).

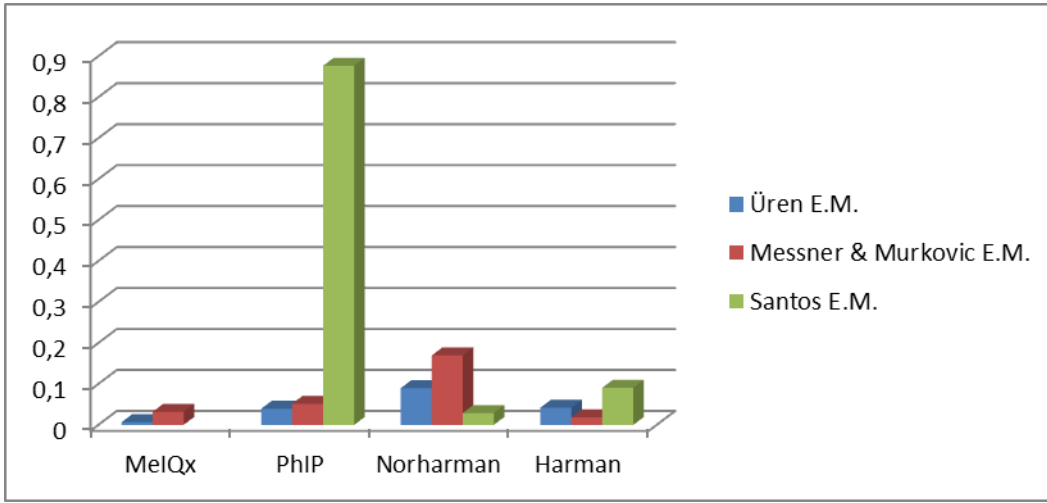
Örnekler	Üren E.M.	Messner & Murkovic E.M.	Santos E.M.
Köfte 1	0,0000	0,1027	0,1266
Köfte 2	0,0000	0,0000	0,1143
Köfte 3	0,0616	0,1037	0,1025
Köfte 4	0,0538	0,0000	0,1216
Köfte 5	0,0000	0,0000	0,1089
Standart sapma	0,02989	0,05652	0,009641
Tespit Limiti	0,0897	0,1696	0,0289

Tez çalışmasında bahsedilen üç ekstraksiyon yöntemiyle de analiz edilen haşlanmış et örneklerinde bulunan Norharman bileşenine ait veriler çizelge 5.8’de verilmiştir. Üren, Messner & Murkovic ve Santos ekstraksiyon metodu ile elde edilen verilerden tespit limitleri hesaplanmış ve sırasıyla 0,0897, 0,1696 ve 0,0289 olarak bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda üç yöntemin tespit limiti değerlerinin birbirinden farklı olduğu belirlenmiştir. En yüksek tespit limiti değerine Messner & Murkovic ekstraksiyon metodu sahipken bunu Üren ve Santos ekstraksiyon metotları takip etmiştir.

Çizelge 5.9 Tespit limiti analizinde Harman bileşenine ait veriler (ppm).

Örnekler	Üren E.M.	Messner & Murkovic E.M.	Santos E.M.
Köfte 1	0,0298	0,0676	0,1461
Köfte 2	0,0297	0,0653	0,0983
Köfte 3	0,0646	0,0751	0,0700
Köfte 4	0,0421	0,0604	0,1271
Köfte 5	0,0305	0,0605	0,0901
Standart sapma	0,01397	0,06067	0,03025
Tespit Limiti	0,0419	0,0182	0,0908

Tez çalışmasında bahsedilen üç ekstraksiyon yöntemiyle de analiz edilen haşlanmış et örneklerinde bulunan Harman bileşenine ait veriler çizelge 5.9'da verilmiştir. Üren, Messner & Murkovic ve Santos ekstraksiyon metodu ile elde edilen verilerden tespit limitleri hesaplanmış ve sırasıyla 0,0419, 0,0182 ve 0,0908 olarak bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda bu üç yöntemle ait tespit limiti değerleri karşılaştırılmış, Üren ile Messner & Murkovic ekstraksiyon metoduna ait tespit limiti değerleri birbirine eşit ve Santos ekstraksiyon metoduna ait tekrarlanabilirlik değerinden daha düşük bulunmuştur.



Şekil 5.9 MeIQx, PhIP, Norharman ve Harman bileşenlerine ait tespit limiti değerleri (ppm).

Tez kapsamında gerçekleştirilen tespit limiti analizlerine ait veriler şekil 5.9'da özetlenmiştir. Bu grafiğe göre MeIQx bileşiği için Santos ekstraksiyon metoduyla sonuç elde edilemezken, Üren ve Messner & Murkovic ekstraksiyon metoduyla elde edilen sonuçlara bakıldığında bu iki yöntemin tespit limitlerinin istatistiki açıdan aynı olduğu görülmüştür. PhIP bileşiği için Messner & Murkovic ve Üren ekstraksiyon metodlarının tespit limiti değerleri birbirine eşit ve Santos ekstraksiyon metodunun tespit limiti değerinden düşük olarak bulunmuştur. Norharman bileşiği göz önüne alındığında üç ekstraksiyon metodunun farklı değerlerde tespit limitine sahip olduğu görülmüştür. En yüksek tespit limiti değerine Messner & Murkovic ekstraksiyon metodu sahipken onu Üren ve Santos ekstraksiyon metodlarının tespit limiti değerleri takip etmiştir. Harman bileşiği için ise Üren ve Messner & Murkovic ekstraksiyon metodlarının tespit limiti değerleri birbirine eşit ve Santos ekstraksiyon metodunun tespit limiti değerinden düşük olarak bulunmuştur.

5.4 Geri Kazanım

Tez çalışmasında kullanılan üç ekstraksiyon yöntemine ait geri kazanım oranlarının kıyaslanması için fırında pişirilen köfte örnekleri kullanılmıştır. Köfte örnekleri analiz edilip içerdikleri HCA miktarları her üç yöntemle de belirlenmiştir. Daha sonra aynı köfte örneklerine son konsantrasyon 1 ppm olacak şekilde IQ, MeIQx, DiMeIQx, PhIP, Norharman ve Harman standartlarını içeren çözeltiden eklenmiştir ve tekrar üç yöntemle de HCA miktarları belirlenmiştir. Bu iki konsantrasyon farkından örneklerin geri kazanım oranları hesaplanmıştır.

Çizelge 5.10 Geri kazanım oranı belirleme analizinde IQ bileşenine ait veriler (%).

Örnekler	Üren E.M.	Messner & Murkovic E.M.	Santos E.M.
Köfte 1	65,92	29,44	-
Köfte 2	29,38	31,72	-
Köfte 3	27,56	34,01	-

Tez çalışmasında bahsedilen üç ekstraksiyon yöntemiyle de analiz edilen fırında pişirilmiş köfte örneklerinde bulunan IQ bileşenine ait veriler çizelge 5.10'da verilmiştir. Santos ekstraksiyon metodu ile yeterli veri elde edilemediğinden bu bileşene ait geri kazanım oranı tespit edilememiştir. Üren ve Messner & Murkovic ekstraksiyon metoduna ait geri kazanım oranlarının ortalamaları sırası ile % 40,95 ve % 31,72 olarak hesaplanmıştır. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda bu iki yöntemin geri kazanım oranları birbirinden farklı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Çizelge 5.11 Geri kazanım oranı belirleme analizinde MeIQx bileşenine ait veriler (%).

Örnekler	Üren E.M.	Messner & Murkovic E.M.	Santos E.M.
Köfte 1	4,78	4,13	-
Köfte 2	4,53	5,18	-
Köfte 3	4,56	6,23	-

Tez çalışmasında bahsedilen üç ekstraksiyon yöntemiyle de analiz edilen fırında pişirilmiş köfte örneklerinde bulunan MeIQx bileşenine ait veriler çizelge 5.11'de verilmiştir. Santos ekstraksiyon metodu ile yeterli veri elde edilemediğinden bu bileşene ait geri kazanım oranı tespit edilememiştir. Üren ve Messner & Murkovic ekstraksiyon metoduna ait geri kazanım oranlarının ortalamaları sırası ile % 4,62 ve % 5,18 olarak hesaplanmıştır. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda bu iki yöntemin geri kazanım oranları birbirinden farklı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Çizelge 5.12 Geri kazanım oranı belirleme analizinde DiMeIQx bileşenine ait veriler (%).

Örnekler	Üren E.M.	Messner & Murkovic E.M.	Santos E.M.
Köfte 1	74,12	70,07	-
Köfte 2	77,45	61,77	-
Köfte 3	75,00	69,33	-

Tez çalışmasında bahsedilen üç ekstraksiyon yöntemiyle de analiz edilen fırında pişirilmiş köfte örneklerinde bulunan DiMeIQx bileşenine ait veriler çizelge 5.12'de verilmiştir. Santos ekstraksiyon metodu ile yeterli veri elde edilemediğinden bu bileşene ait geri kazanım oranı tespit edilememiştir. Üren ve Messner & Murkovic ekstraksiyon metoduna ait geri kazanım oranlarının ortalamaları sırası ile % 75,52 ve % 67,06 olarak hesaplanmıştır. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda Üren ekstraksiyon metoduna ait geri kazanım oranı Messner & Murkovic ekstraksiyon metoduna ait geri kazanım oranından yüksek bulunmuştur ($p<0,05$).

Çizelge 5.13 Geri kazanım oranı belirleme analizinde PhIP bileşenine ait veriler (%).

Örnekler	Üren E.M.	Messner & Murkovic E.M.	Santos E.M.
Köfte 1	89,18	-	90,95
Köfte 2	107,24	-	91,90
Köfte 3	92,46	-	97,77

Tez çalışmasında bahsedilen üç ekstraksiyon yöntemiyle de analiz edilen fırında pişirilmiş köfte örneklerinde bulunan PhIP bileşenine ait veriler çizelge 5.13'te verilmiştir. Messner & Murkovic ekstraksiyon metodu ile anlamlı veriler elde edilemediğinden bu bileşene ait geri kazanım oranı tespit edilememiştir. Üren ve Santos ekstraksiyon metoduna ait geri kazanım oranlarının ortalamaları sırası ile % 96,30 ve % 93,54 olarak hesaplanmıştır. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda bu iki yöntemin geri kazanım oranları birbirinden farklı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Çizelge 5.14 Geri kazanım oranı belirleme analizinde Norharman bileşenine ait veriler (%).

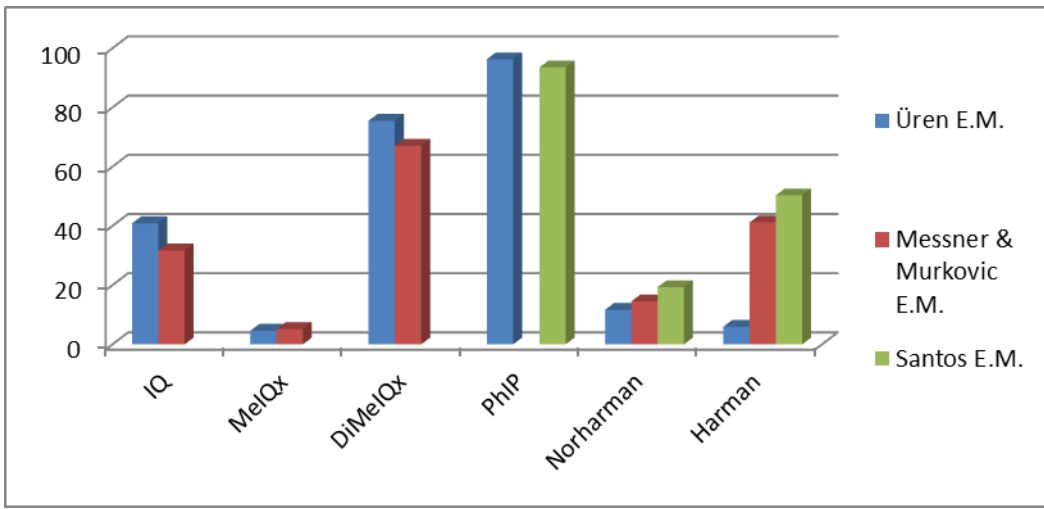
Örnekler	Üren E.M.	Messner & Murkovic E.M.	Santos E.M.
Köfte 1	11,57	12,50	18,93
Köfte 2	12,06	13,82	20,79
Köfte 3	11,45	17,31	18,33

Tez çalışmasında bahsedilen üç ekstraksiyon yöntemiyle de analiz edilen fırında pişirilmiş köfte örneklerinde bulunan Norharman bileşenine ait veriler çizelge 5.14'te verilmiştir. Üren, Messner & Murkovic ve Santos ekstraksiyon metodu ile elde edilen verilerden geri kazanım oranları hesaplanmış ve sırasıyla % 11,69, % 14,54 ve % 19,35 olarak bulunmuştur. Yapılan istatistik analizler sonucunda bu üç yöntemle ait tespit limiti değerleri karşılaştırılmış, Üren ile Messner & Murkovic ekstraksiyon metoduna ait geri kazanım oranları birbirine eşit ve Santos ekstraksiyon metoduna ait geri kazanım oranından daha düşük bulunmuştur.

Çizelge 5.15 Geri kazanım oranı belirleme analizinde Harman bileşenine ait veriler (%).

Örnekler	Üren E.M.	Messner & Murkovic E.M.	Santos E.M.
Köfte 1	5,95	42,54	42,49
Köfte 2	5,96	43,27	55,97
Köfte 3	6,02	37,73	52,56

Tez çalışmasında bahsedilen üç ekstraksiyon yöntemiyle de analiz edilen fırında pişirilmiş köfte örneklerinde bulunan Harman bileşenine ait veriler çizelge 5.15'te verilmiştir. Üren, Messner & Murkovic ve Santos ekstraksiyon metodu ile elde edilen verilerden geri kazanım oranları hesaplanmış ve sırasıyla % 5,98, % 41,18 ve % 50,34 olarak bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda üç yöntemin tespit limiti değerlerinin birbirinden farklı olduğu belirlenmiştir. En yüksek geri kazanım oranına Santos ekstraksiyon metodu sahipken bunu Messner & Murkovic ve Üren ekstraksiyon metotları takip etmiştir.



Şekil 5.10 IQ, MeIQx, DiMeIQx, PhIP, Norharman ve Harman bileşenlerine ait tespit limiti değerleri (ppm).

Tez kapsamında gerçekleştirilen geri kazanım analizlerine ait veriler şekil 5.10'da özetlenmiştir. Bu grafiğe göre IQ ve MeIQx bileşiği için Santos ekstraksiyon metoduyla sonuç elde edilemezken, Üren ve Messner & Murkovic ekstraksiyon metoduyla elde edilen sonuçlara bakıldığında bu iki yöntemin geri kazanım oranlarının istatistiki açıdan aynı olduğu görülmüştür. DiMeIQx bileşiği için yine Santos ekstraksiyon metoduyla sonuç elde edilemezken, Üren ekstraksiyon metodunun geri kazanım oranı Messner & Murkovic ekstraksiyon metodunun geri kazanım oranından yüksek bulunmuştur. PhIP bileşiği için Messner & Murkovic ekstraksiyon metoduyla elde edilen veriler anlamlı olmadığı için geri kazanım oranı hesaplanamamıştır. Üren ve Santos ekstraksiyon metotlarının geri kazanım oranları birbirine eşit olarak bulunmuştur. Norharman bileşiği göz önüne alındığında Üren ve Messner & Murkovic ekstraksiyon

metotlarının geri kazanım oranları birbirine eşit ve Santos ekstraksiyon metodunun geri kazanım oranından düşük olarak bulunmuştur. Harman bileşiği için ise üç ekstraksiyon metodunun farklı değerlerde geri kazanım oranlarına sahip olduğu görülmüştür. En yüksek geri kazanım oranına Santos ekstraksiyon metodu sahipken onu Messner & Murkovic ve Üren ekstraksiyon metotlarının geri kazanım oranları takip etmiştir.

6. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Tez çalışması kapsamında üç farklı ekstraksiyon yöntemi kullanılarak yapılan HCA analizlerine ait yöntem kıyaslama, geri kazanım, tekrarlanabilirlik ve tespit limiti değerleri analiz edilmiştir. Çalışmada Üren ekstraksiyon metodu, Messner & Murkovic ekstraksiyon metodu ve Santos ekstraksiyon metodu ile çalışılmıştır. Tez kapsamında incelenen HCA bileşikleri IQ, MeIQx, DiMeIQx, PhIP, Norharman ve Harman'dır.

Yöntem kıyaslama analizinde fırında pişirilmiş köfte örnekleri kullanılmıştır. On adet köfte örneği her üç ekstraksiyon metodu ile de analiz edilmiştir. Analiz sonucunda IQ bileşeni sadece Üren ekstraksiyon metodu ile tespit edilebilmiştir. MeIQx bileşiği ise Üren ve Messner & Murkovic ekstraksiyon metodu ile tespit edilebilmiş ve bu yöntemler arasında bir farklılık bulunamamıştır. DiMeIQx bileşeni de Üren ve Messner & Murkovic ekstraksiyon metodu ile tespit edilebilmiş, Messner & Murkovic ekstraksiyon metodu ile elde edilen sonuçların daha yüksek olduğu görülmüştür. PhIP, Norharman ve Harman bileşenleri her üç yöntemle de tespit edilmiştir. Bu üç bileşik için en yüksek sonuçlar Messner & Murkovic ekstraksiyon metodu ile elde edilmiştir. PhIP bileşeni için Üren ve Santos ekstraksiyon yöntemleri aynı sonucu verirken, Norharman ve Harman bileşenleri için Üren ekstraksiyon metodu en düşük sonuçları vermiştir. Harman bileşiği için yapılan analizlerde Santos ve Messner & Murkovic ekstraksiyon metotlarının aynı sonucu verdiği görülmüştür.

Tekrarlanabilirlik analizlerinde de fırında pişirilmiş köfte örnekleri kullanılmış ve 5 paralelle çalışılmıştır. Yapılan analizler sonucunda IQ, MeIQx ve DiMeIQx bileşenleri Santos ekstraksiyon metoduyla tespit edilememiştir. Üren ve Messner & Murkovic ekstraksiyon metotları IQ bileşiği için aynı tekrarlanabilirlik değerine sahipken, MeIQx bileşiği için Messner & Murkovic ekstraksiyon metodunun tekrarlanabilirlik değeri daha yüksek bulunmuştur. DiMeIQx bileşeni ise bu iki yöntemle de tespit edilememiştir. Üren ekstraksiyon metodunun PhIP, Norharman ve Harman bileşikleri için en yüksek tekrarlanabilirlik değerine sahip olduğu görülmüştür. PhIP ve Harman bileşikleri için Santos ve Messner &

Murkovic ekstraksiyon metotlarının aynı tekrarlanabilirlik değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir. Norharman bileşiği için ise Messner & Murkovic ekstraksiyon metodu en düşük tekrarlanabilirlik değerine sahipken Santos ekstraksiyon metodunun, Üren ekstraksiyon metodu ile aynı tekrarlanabilirlik değerinde olduğu görülmüştür.

Tespit limiti analizinde haşlanmış et örneği kullanılmıştır. IQ ve DiMeIQx bileşenleri için yeterli veri sağlanamadığından tespit limitleri belirlenememiştir. Üren ekstraksiyon metodunun MeIQx, PhIP ve Harman bileşenleri için en düşük tespit limiti değerine sahip olduğu belirlenmiştir. MeIQx bileşeni Santos ekstraksiyon metodu ile tespit edilemediğinden tespit limiti değeri hesaplanamamıştır. PhIP bileşiği için Santos ekstraksiyon metodunun Üren ekstraksiyon metodu ile aynı tespit limiti değerine, Messner & Murkovic ekstraksiyon metodunun ise bunlardan daha yüksek bir tespit limiti değerine sahip olduğu görülmüştür. Harman bileşiği için Messner & Murkovic ekstraksiyon metodunun Üren ekstraksiyon metodu ile aynı tespit limiti değerine sahip olduğu görülürken Santos ekstraksiyon metodunun bunlardan daha yüksek bir tespit limiti değerine sahip olduğu belirlenmiştir. Harman bileşiğine bakıldığında ise üç ekstraksiyon yönteminin de farklı tespit limiti değerlerine sahip olduğu görülmüştür. Bu bileşik için en düşük tespit limiti değerine Messner & Murkovic ekstraksiyon metodu sahipken bu metodu Üren ve Santos ekstraksiyon metotlarının takip ettiği görülmüştür.

Geri kazanım analizlerinde de fırında pişirilmiş köfte örnekleri kullanılmıştır. Yapılan analizler sonucunda yeterli veri elde edilemediği için IQ, MeIQx ve DiMeIQx bileşenleri için Santos ekstraksiyon metoduna ait geri kazanım oranı hesaplanamamıştır. IQ ve MeIQx bileşenleri için Üren ve Messner & Murkovic ekstraksiyon metotlarının geri kazanım oranları eşit bulunurken, DiMeIQx bileşeni için Üren ekstraksiyon metoduna ait geri kazanım oranı Messner & Murkovic ekstraksiyon metoduna ait geri kazanım oranından yüksek olarak bulunmuştur. Messner & Murkovic ekstraksiyon metoduyla PhIP bileşeni için elde edilen veriler anlamsız olduğu için geri kazanım oranı hesaplanamazken, yine bu bileşen için Üren ve Santos ekstraksiyon metotlarının geri kazanım

oranlarının birbirine eşit olduğu görülmüştür. Norharman bileşiğine ait geri kazanım oranlarına bakıldığında en yüksek geri kazanım oranına Santos ekstraksiyon metodunun sahip olduğu ve Messner & Murkovic ekstraksiyon metodlarının eşit geri kazanım oranlarına sahip olduğu belirlenmiştir. Son olarak Harman bileşiğine bakıldığında ise üç ekstraksiyon metodunun da farklı geri kazanım oranlarına sahip olduğu görülmüştür. Bu bileşik için en yüksek geri kazanım oranını Santos ekstraksiyon metodu gösterirken bu metodu Messner & Murkovic ve Üren ekstraksiyon metodları takip etmiştir.

Yapılan tüm analizler göz önüne alındığında DAD dedektörde tespit edilen bileşiklerde Santos ekstraksiyon metodu ile tespit gerçekleştirilememiştir. Bu yüzden IQ, MeIQx ve DiMeIQx bileşenleri için gerçekleştirilecek analizlerde Santos ekstraksiyon metodu tercih edilmemelidir. Yöntem kıyaslama analizlerine bakıldığında DAD dedektör kullanılarak gerçekleştirilen analizlerde Üren ve Messner & Murkovic ekstraksiyon metodları benzer sonuçlar veririrken, floresans dedektörde tespit edilen bileşikler için ise Messner & Murkovic ekstraksiyon metodu ile genel olarak en yüksek düzeyde veriler elde edildiği belirlenmiştir. Tekrarlanabilirlik analizi için DAD dedektörde tespit edilen bileşiklere bakıldığında Üren ve Messner & Murkovic ekstraksiyon metodları benzer sonuçları gösterirken, floresans dedektörde tespit edilen bileşikler için ise Üren ekstraksiyon metodunun en yüksek tekrarlanabilirlik değerine sahip olduğu belirlenmiştir. Tespit limiti değerlerine bakıldığında IQ ve DiMeIQx bileşenleri için yeterli veri elde edilemediğinden hesaplama yapılamamıştır. Tüm bileşenler için genel olarak en düşük tespit limiti verileri Üren ekstraksiyon metoduna aittir. Geri kazanım oranları incelendiğinde ise DAD dedektörde tespit edilen bileşikler için Üren ekstraksiyon metodunun genel olarak daha yüksek geri kazanım oranına sahip olduğu görülürken, floresans dedektörde tespit edilen bileşikler için Santos ekstraksiyon metodunun genel olarak en yüksek geri kazanım oranına sahip olduğu belirlenmiştir.

HCA'lar kompleks yapıdaki gıdalarda ve düşük miktarda bulduklarından belirlenebilmeleri için etkin bir saflaştırma basamağı ve duyarlı, seçici bir analitik yöntemle çalışılması gerekmektedir. Bu amaçla pek çok ekstraksiyon ve

saflaştırma yöntemi belirlenmiştir. Genel olarak kullanılan yöntemler çok zahmetli ve zaman alıcı yöntemlerdir. Çünkü bu yöntemlerde çoğunlukla diatome toprağı ile kolonlar doldurulmakta, ekstraksiyon yapılmakta ve sonrasında kolonlar temizlenerek tekrar kullanılmaktadır. Bu da kısa zamanda birden çok örnek ile çalışmayı neredeyse imkansız hale getirmektedir. Ayrıca bu yöntemlerde çok miktarda organik solvent kullanılmaktadır. Tez çalışmasında kullanılan Messner & Murkovic ve Santos ekstraksiyon metotları da bu gruba girmektedir. Yeni geliştirilmiş olan Üren ekstraksiyon metodu ise bu yöntemlere göre daha pratiktir ve aynı anda çok sayıda örnekle çalışmayı mümkün kılar. Tez kapsamında yapılan analizlere bakıldığında Üren ekstraksiyon metodunun tekrarlanabilirlik ve tespit limiti değerlerinde genel olarak en iyi sonuçlara ve geri kazanım oranında da diğer metotlarla eşit veya onlardan daha yüksek geri kazanım oranlarına sahip olduğu görülmüştür. Tüm bu bilgiler ışığında HCA analizi için Üren ekstraksiyon metodunun en uygun yöntem olduğuna karar verilmiştir. Yine de yöntem seçimi yapılırken tespit edilecek HCA bileşeni için en doğru sonuçları veren yöntemin seçilmesine dikkat edilmelidir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Alaejos, M. S. and Afonso, A. M.**, 2011, Factors That Affect the Content of Heterocyclic Aromatic Amines in Foods.
- Balogh Z., Gray J. L., Gomaa E. A. & Booren A. M.**, 2000, Formation and Inhibition of Heterocyclic Aromatic Amines in Fried Ground Beef Patties. Food and chemical toxicology 38: 395-401.
- Chen, B. H. and Chiu, C. P.**, 1998, Analysis, Formation and Inhibition of Heterocyclic Amines in Foods: An overview.
- Cheng K., Wu Q., Zheng Z. P., Peng X., Simon J. E., Chen F. and Wang M.**, 2010, Inhibitory Effect of Fruit Extracts on the Formation of Heterocyclic Amines.
- Damasius J., Venskutonis, P. R., Ferracane, R. and Fogliano V.**, 2011, Assessment of The Influence of Some Spice Extracts on The Formation of Heterocyclic Amines in Meat.
- Dündar, A., Sariçoban, C., ve Yılmaz, M. T.**, 2012, Response Surface Optimization of Effects of Some Processing Variables on Carcinogenic/Mutagenic Heterocyclic Aromatic Amine (HAA) Content in Cooked Patties. Meat Science 91:325–333.
- Felton, J. S., Fultz, E., Dolbeare, F. A. and Knize, M. G.**, 1994, Effect of Microwave Pretreatment on Heterocyclic Aromatic Amine Mutagens/Carcinogens in Fried Beef Patties. Food and Chemical Toxicology 32, 897-903.
- Hirose M., Takahasi S., Ogawa K., Futakuchi M. and Shirai T.**, 1999, Phenolics: Blocking Agents for Heterocyclic Amine-induced Carcinogenesis.
- Jakszyn, P., Agudo, A., Ibanez, R., Closas, R. G., Pera, G., Amiano, P. and Gonzalez, C.A.**, 2004, Development of a Food Database of Nitrosamines, Heterocyclic Amines and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons.
- Janoszka B.**, 2010, Heterocyclic Amines and Azaarenes in Pan-Fried Meat and Its Gravy Fried Without Additives and in The Presence of Onion and Garlic.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Johansson, M. A. E., Skog K. and Jagerstad M.,** 1993, Effects of Edible Oils and Fatty Acids on the Formation of Heterocyclic Amines in A Model System. *Carcinogenesis* 14, 89-94.
- Kanithaporn, P., Priyadarshini, G., Terry, A.H., Melvin, C.H.J. and Scott S.,** 2012, Occurrence of Heterocyclic Amines in Cooked Meat Products.
- Kondjoyan, A., Chevolleau, S., Grève, E., Gatellier, P., Santé-Lhoutellier, V., Bruel, S., Touzet, C., Portanguen, S. and Debrauwer, L.,** 2010, Formation of Heterocyclic Amines in Slices of Longissimus Thoracis Beef Muscle Subjected to Jets of Superheated Steam. *Food Chemistry* 119: 19–26.
- Lee H., Lin M.Y. and Chan S.C.,** 1994, Formation and identification of carcinogenic heterocyclic aromatic amines in boiled pork juice. *Mutation Research* 308, 77± 88.
- Lee, J., Dong, A., Jung, K. and Shin, H.,** 2011, Shin Influence of Extra Virgin Olive Oil on the Formation of Heterocyclic Amines in Roasted Beef Steak.
- Liao, G., Xu, X. and Zhou, G.,** 2008, Antioxidants on Formation of Heterocyclic Aromatic Amines in Pork Floss. *Journal of Food Processing and Preservation* 33: 159–175.
- Meester C.,** 1998, Chemical Analysis of Heterocyclic Aromatic Amines: The Results of Two European Projects Compared. *Z Lebensm Unters Forsch A* 207: 441-447.
- Melo, A., Viegas, O., Petisca, C., Pinho, O. and Ferreira, I. M. P. L. V. O.,** 2008, Effect of Beer/Red Wine Marinades on the Formation of Heterocyclic Aromatic Amines in Pan-Fried Beef.
- Messner, C. and Murkovic M.,** 2004, Evaluation of A New Model System For Studying The Formation of Heterocyclic Amines. *Journal of Chromatography B*, 802 (2004) 19–26.
- Monti, S.M., Ritieni, A., Sacchi, R., Skog, K., Borgen, E. and Fogliano, V.,** 2001, Characterization of Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil and Their Effect on the Formation of Carcinogenic/mutagenic Heterocyclic Amines in a Model System. *J. Agr. Food Chem.* 49: 3969-3975.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Öz F.**, 2006, Isıl İşlem Uygulanmış Et ve Et Ürünlerinde Heterosiklik Aromatik Aminler.
- Öz F. ve Kaya M.**, 2011, The Inhibitory Effect of Black Pepper on Formation of Heterocyclic Aromatic Amines in High-Fat Meatball. *Food Control* 22:596-600.
- Puangsoombat, K., Gadgil, P., Houser, T., Hunt, M. C. and Smith, J. S.**, 2011a, Heterocyclic Amine Content in Commercial Ready to Eat Meat Products. *Meat Science* 88:227–233.
- Puangsoombat, K., Jirapakkul, W. and Smith, J.S.**, 2011b, Inhibitory Activity of Asian Spices on Heterocyclic Amines Formation in Cooked Beef Patties. *Journal of Food Science* 76: 8.
- Puangsoombat, K., Gadgil, P., Houser, T. and Hunt, M.C.**, 2012, Occurrence of Heterocyclic Amines in Cooked Meat Products. *Meat Science* 90: 739–746.
- Sahar, A., Portanguen, S., Kondjayan, A. and Dufour, E.**, 2010, Potential of Synchronous Fluorescence Spectroscopy Coupled with Chemometrics to Determine the Heterocyclic Aromatic Amines in Grilled Meat.
- Santos, F. J., Barceló-Barrachina, E., Toribio F., Puignou L., Galceran M. T., Persson E., Skog K., Messner C., Murkovic M., Nabinger U. and Ristic, A.**, 2004, Analysis of heterocyclic amines in food products: interlaboratory studies. *Journal of Chromatography B*, 802 (2004) 69–78.
- Shin H. S., Strasburg G. M. and Ustunol Z.**, 2003, Influence of Different Unifloral Honeys on Heterocyclic Aromatic Amine Formation and Overall Mutagenicity in Fried Ground-beef Patties.
- Skog K. and Jagerstad M.**, 1991, Effects of Glucose on the Formation of Phip in A Model System. *Carcinogenesis* 12, 2297-2300.
- Skog, K., Augustsson, K., Steineck, G., Stenberg, M. and Jagerstad M.**, 1997, Polar and Non-Polar Heterocyclic Amines in Cooked Fish and Meat Products and Their Corresponding Pan Residues. *Food and Chemical Toxicology* 35, 555-565.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Skog, K. I., Johansson, A. E. and Jagerstad, N. I.,** 1998, Carcinogenic Heterocyclic Amines in Model Systems and Cooked Foods: A Review on Formation, Occurrence and Intake.
- Smith, J.S., Ameri, F. and Gadgil, P.,** 2008, Effect of Marinades on the Formation of Heterocyclic Amines in Grilled Beef Steaks. *Journal Of Food Science* 73: T100-T105.
- Sun, L., Zhang, F., Yong, W., Chen, S., Yang, M. L., Ling, Y., Chu, X. and Lin, J. M.,** 2010, Potential Sources of Carcinogenic Heterocyclic Amines in Chinese Mutton Shashlik. *Food Chemistry* 123:647–652.
- Toribio, F., Moyano, E., Puignou, L. and Galceran, M.T.,** 2002, Ion-Trap Tandem Mass Spectrometry for the Determination of Heterocyclic Amines in Food.
- Viegas, O., Amaro, L. F., Isabel, M. P. L. V. O. F. and Pinho, O.,** 2012, Inhibitory Effect of Antioxidant-Rich Marinades on The Formation of Heterocyclic Aromatic Amines in Pan-Fried Beef. *J. Agric. Food Chem* 60:6235–6240
- Vitaglione P., Monti S. M., Ambrosino P., Skog K. and Fogliano V.,** 2002, Carotenoids From Tomatoes Inhibit Heterocyclic Amine Formation.
- Wong, D., Cheng, K. and Wang, M.,** 2012, Inhibition of Heterocyclic Amine Formation by Water-Soluble Vitamins in Maillard Reaction Model Systems and Beef Patties. *Food Chemistry* 133:760–766.

ÖZGEÇMİŞ

Esra KAÇAR, Türkiye Cumhuriyeti vatandaşı olup 21 Mayıs 1987 yılında Manisa'nın Demirci ilçesinde doğmuştur. İlköğretim ve lise eğitimini Alaşehir'de tamamlamıştır. 2005 yılında Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümünde lisans eğitimine başlamıştır. 2010 yılında lisans eğitimini tamamlamış ve aynı yıl Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Gıda Kimyası Bilim Dalında yüksek lisans eğitimine başlamıştır.