

**T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI**

**KAYSERİ VE CİVARINDA GELENEKSEL YOLLARLA
ÜRETİLEN PEKMEZLERDEKİ HİDROKSİMETİL
FURFURAL MİKTARLARININ YÜKSEK PERFORMANSLI
SIVI KROMATOĞRAFİSİ İLE TAYİNİ**

**Hazırlayan
Ayla AKÖZLÜ**

**Danışman
Prof. Dr. İbrahim NARİN**

Yüksek Lisans Tezi

**Şubat 2012
KAYSERİ**

**T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI**

**KAYSERİ VE CİVARINDA GELENEKSEL YOLLARLA
ÜRETİLEN PEKMEZLERDEKİ HİDROKSİ METİL
FURFURAL MİKTARLARININ YÜKSEK PERFORMANSLI
SIVI KROMATOĞRAFİSİ İLE TAYİNİ**

**Hazırlayan
Ayla AKÖZLÜ**

**Danışman
Prof. Dr. İbrahim NARİN**

Yüksek Lisans Tezi

**Şubat 2012
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Ayla AKÖZLÜ

İmza :



YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Kayseri ve Civarında Geleneksel Yollarla Üretilen Pekmezlerdeki Hidroksi Metil Furfural Miktarlarının Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Tayini” adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Ayla AKÖZLÜ



Danışman

Prof.Dr.İbrahim NARİN



Anabilim Dalı Başkanı

Prof.Dr.İbrahim NARİN

Prof.Dr.İbrahim NARİN danışmanlığında **Ayla AKÖZLÜ** tarafından hazırlanan “**Kayseri ve Civarında Geleneksel Yollarla Üretilen Pekmezlerdeki Hidroksi Metil Furfural Miktarlarının Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Tayini**” konulu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Analitik Kimya** Anabilim Dalı’nda **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

..... / / 2012

JÜRİ

İmza

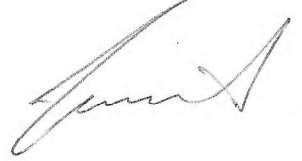
Danışman : Prof. Dr. İbrahim Narin



Üye : Prof. Dr. Şenol Kartal



Üye : Yrd. Doç. Dr. Yeliz Yıldırım



ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulununtarih ve.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof.Dr. Saim ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Çalışmanın planlanması, yürütülmesi ve her aşamasında bana destek veren danışman hocam Prof. Dr. İbrahim NARİN'e, emeklerini esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Şenol KARTAL ve Yrd. Doç. Dr. Yeliz YILDIRIM'a, numunelerimi toplamamda yardımcı olan başta annem olmak üzere aileme ve Türkan KOCA'ya, çalışmalarım esnasında emeğini esirgemeyen Tuğba KOŞKER KAYA, Ali ŞEN ve Musa YILDIZ'a en içten dileklerle teşekkürlerimi sunuyorum.

Ayla AKÖZLÜ

**KAYSERİ VE CİVARINDA GELENEKSEL YOLLARLA ÜRETİLEN
PEKMEZLERDEKİ HİDROKSİ METİL FURFURAL MİKTARLARININ YÜKSEK
PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ İLE TAYİNİ**

Ayla AKÖZLÜ

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Şubat 2012

Danışman: Prof. Dr. İbrahim NARİN

KISA ÖZET

Yapılan çalışmada Kayseri ve çevresinde üretilen üzüm pekmezlerindeki Hidroksi Metil Furfural (HMF) miktarının tayini amaçlanmıştır. HMF'nin denek farelerde kolon kanserinde etkili olduğu, DNA yapısını, hücrenin enzim aktivitesini ve karaciğer fonksiyonlarını bozduğunu gösteren araştırma sonuçları bulunmaktadır. Ayrıca HMF'nin göz, solunum sistemi, deri ve mukozaya karşı tahriş edici etki gösterdiği bilinmektedir. Bu nedenle pek çok ülke HMF oluşumu yüksek olan gıda maddelerinde bulunmasına müsaade edilen HMF miktarları yasal olarak sınırlandırılmıştır. Ülkemizde pekmez ürünleri için ise Türk Gıda Kodeksi Tebliği'ne göre 75 mg kg⁻¹ üst limit belirlenmiştir.

Yapılan literatür çalışmalarında, yöremizde geleneksel yollarla üretilen pekmez örneklerindeki HMF miktarının tayini ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada DAD dedektör ile HPLC yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla, yaklaşık 2 g pekmez örneği, deiyonize su ile 25 mL'lik bir balon jode çözülerek son hacme tamamlandı. Hazırlanan bu çözelti 0.20 µm gözenek çaplı tek kullanımlık filtrelerden süzüldü. HMF derişimi HPLC ile 285 nm dalga boyunda tayin edildi. Hareketli faz olarak %1'lik asetik asit-metanol (9:1 oranında) karışımı kullanıldı. Kromatografik kolon olarak 15 cm uzunluğunda 5 µm tanecik çaplı C18 kolon kullanıldı. Yöntemin doğruluğu, bir pekmez örneğine HMF eklenmesiyle kontrol edildi.

Toplam 100 örnek ile yapılan çalışmada 18 tanesinde HMF miktarı Türk Gıda Kodeksi'ne göre üzüm pekmezi örneklerinde müsaade edilen en yüksek HMF miktarı olan 75 mg kg⁻¹ düzeyinin üzerinde olduğu belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar insanlarımızın bilinçlendirilmesi büyük önem arz ettiğini göstermektedir. Özellikle kırsal kesimlerde çokça üretimi yapıldığı için bilhassa geleneksel üreticilerimizin bilgilendirilmesi ve almaları gereken önlemlerin anlaşılır şekilde izah edilmesi gerekmektedir

Anahtar Kelimeler: Pekmez, HMF, HPLC

**DETERMINATION OF HYDROXYMETHYLFURFURAL IN MOLASSES PRODUCED
TRADITIONALLY IN KAYSERİ AND ITS NEIGHBOURHOOD BY HIGH
PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY**

Ayla AKÖZLÜ

Erciyes University, Institute of Health Sciences

Department of Analytical Chemistry

MS Thesis, February 2012

Supervisor: Prof.Dr.İbrahim NARİN

ABSTRACT

In the present study, determination of the amount of Hydroxy Methyl Furfural (HMF) in grape molasses produced in and around Kayseri was aimed.

There are research findings which show that HMF is effective in colon cancer in rats, it changes DNA structure and impairs cell enzyme activities and liver functions. It is also known that HMF irritates eyes, respiratory system, skin and mucosa.

Therefore, in many countries, allowed amount of HMF has been legally limited in the food stuffs in which HMF formation was high. The upper limit has been determined as 75 mg kg⁻¹ in molasses products.

There has not been a study in the literature about determination of HMF amount in molasses samples produced by conventional methods in our environment.

DAD detector and HPLC was used in the present study. For this purpose; approximately 2 g of molasses sample was dissolved with some deionized water in a 25 mL volumetric flask and completed to the final volume. The prepared solution was filtered from disposable filters which had pores with a diameter of 0.20 µm. Analysis of HMF was conducted with HPLC at 285 nm. 1% acetic acid–methanol (9:1 ratio, v/v) was used as mobile phase. 15 cm–C18 column with a pore diameter of 5 µm was used as chromatographic column. The accuracy of the method was controlled by adding HMF into one molasses sample.

In the study it was found that 18 a total of 100 case of the samples had HMF higher than the allowed amount (75 mg kg⁻¹) for grape molasses in Turkish Food Codex

The obtained results show crucial to make our people conscious. Especially traditional manufacturers should be informed and precautions should be explained comprehensively because of much more production in rural sides.

Keywords: Molasses, HMF, HPLC

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
İÇ KAPAK	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI	iii
KABUL VE ONAY SAYFASI	iv
TEŞEKKÜR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR	ix
TABLolar LİSTESİ	xi
 1.GİRİŞ VE AMAÇ	 1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1 PEKMEZ	3
2.2.GELENEKSEL ÜZÜM PEKMEZİNİN ÜRETİM TEKNİĞİ	4
2.3. HİDROKSİMETİLFURFURAL	5
2.3.1. HMF'nin Tanımı ve Özellikleri	5
2.3.2. HMF'nin ANALİZ METOTLARI	8
2.3.2.1.Spektrofotometrik HMF Analizi	8
2.3.2.2.Kromatografik HMF Analizi	9
2.4. YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİ	10
2.4.1. Kromatografinin Tanımı	10
2.4.2. Kromatografik Ayırmalar	10
2.4.3. HPLC'nin Temel Prensipleri ve Bazı Temel Tanımlar	11
2.4.4. HPLC Cihazları	14
2.4.4.1. Hareketli Faz Hazneleri ve Çözücü Muamele Sistemleri	16
2.4.4.2. Pompalama Sistemleri	16
2.4.4.3. Numune Enjeksiyon Sistemleri	17
2.4.4.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Kolonları	17
2.4.4.5. Dedektörler	20

Sayfa no

2.4.5. HPLC Cihazının Diğer Sıvı Kromatografi Türlerine Göre Üstünlükleri.....	22
2.5. HPLC'DE AYIRMA TEKNİKLERİ.....	23
2.5.1. Yüksek Performanslı Dağılma Kromatografisi.....	23
2.5.1.1. Normal-faz Kromatografisi.....	24
2.5.1.2. Ters-faz Kromatografisi	24
2.5.2. Adsorpsiyon Kromatografisi.....	25
2.5.3. İyon Değiştirme Kromatografisi	26
2.5.3.1. İyon Değiştirici Reçineler	26
2.5.3.1.1. Mikrogözenekli veya Jel Yapısındaki Reçineler	26
2.5.3.1.2. Makrogözenekli Reçineler	26
2.5.3.1.3. Pelikular Reçineler	27
2.5.3.1.4. Yüzeysel Gözenekli Reçineler	27
2.5.3.2. İyon-Elme Kromatografisi.....	28
2.5.4. Yüksek Performanslı Boyut Ayırıcı Kromatografisi	29
2.6. HPLC KULLANIRKEN ALINMASI GEREKEN ÖNLEMLER.....	30
2.6.1. Hareketli Faz Çözücüleri İçin Önlemler	30
2.6.2. Kolon Kullanımı İçin Önlemler	31
2.6.3. Örnek Hazırlanması.....	32
2.6.3.1. Katı Örnekler.....	32
2.6.3.2. Sıvı Örnekler	32
2.6.3.3. Örneklerin Süzülmesi	32
2.7 YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİDE YÖNTEM	
GELİŞTİRME.....	32
2.8. HPLC'NİN UYGULAMA ALANLARI	33
2.9. pH ÖLÇÜMÜ.....	34
2.10. TOPLAM ASİTLİK TAYİNİ	34
3.GEREÇ VE YÖNTEM	35
3.1 MATERYAL	35
3.2. KULLANILAN CİHAZLAR	35
3.3 KULLANILAN KİMYASAL MALZEMELER	36
3.4. YÖNTEM.....	36
3.4.1. HMF Analizi	36
3.4.1.1.Örneklerin Hazırlanması.....	36
3.4.1.2. HPLC Metodunun Oluşturulması.....	37
3.4.1.3. HPLC Metodunun Doğruluğunun Belirlenmesi	37
3.4.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması ve Kalibrasyon Doğrusunun Çizilmesi	37

	<u>Sayfa no</u>
3.4.2. pH Tayini	37
3.4.3. Asitlik Tayini	38
4. BULGULAR	39
4.1. KROMATOĞRAFİK ŞARTLAR	39
4.2. YÖNTEMİN DOĞRULUĞU VE KALİBRASYON EĞRİSİ	40
4.3. KALİBRASYON DOĞRUSUNUN ÇİZİLMESİ	41
4.4. PEKMEZ ÖRNEKLERİNİN HMF, pH VE TOPLAM ASİTLİK SONUÇLARI.....	41
5.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	45
6.KAYNAKLAR.....	48
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. HPLC dedektörlerinin başlıca özelliklerinin karşılaştırılması	22
Tablo 2.2. Normal ve ters faz kromatografisi özellikleri	24
Tablo 4.1. Pekmez örneğine HMF ilavesi ve geri kazanım değerleri	40
Tablo 4.2. Pekmez örnekleri ile ilgili elde edilen sonuçlar	42
Şekil 2.1. Hidroksimetilfurfural'ın kimyasal yapısı	5
Şekil 2.2. Heksozların asidik ortamda ısıtılması sonucu 5-HMF oluşumu	6
Şekil 2.3. Maillard reaksiyonu oluşumu	7
Şekil 2.4. HMF nin belirlenmesinde spektrofotometrik analiz akım şeması	8
Şekil 2.5. HMF' nin belirlenmesinde kromatografik analiz akım şeması.....	9
Şekil 2.6. Kromatografi türleri	10
Şekil 2.7. (A) % 50 oranında ACN. (B) % 70 oranında ACN. (C) İlk 5 dk. % 50 5. dakikadan sonra % 70 ACN. (D) 7 dakika boyunca %30-85 aralığı oranında ACN kullanılmıştır (Gradient elüsyon).	14
Şekil 2.8. Alıkonma zamanı kromatogramı.....	14
Şekil 2.9. HPLC cihazının şematik gösterimi.....	15
Şekil 2.10. Kolon dolgu maddelerinin tipleri	19
Şekil 2.11. Kolon dolgu maddesi.....	19
Şekil 4.1. HMF standart görüntüsü	39
Şekil 4.2. Pekmez örnek kromatogramı	40
Şekil 4.3. Kalibrasyon doğrusu.....	41

KISALTMALAR

HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HMF	: Hidroksi Metil Furfural
DAD	: Diyot Array Dedektör
ELSD	: Buharlaştırılmalı Işık Dedektörleri
CSP	: Kiral Durgun Faz
TLC	: İnce Tabaka Kromatografisi
TBA	: Tiyo Barbütirik Asit
TCA	: Tri Kloro Asetik Asit
ppb	: Milyarda Bir Kısım
ODS	: Okta Desil Silan
RP	: Ters Faz

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hidroksi metil furfural (HMF), aminoasit ve şekerlerin reaksiyonuyla ortaya çıkan maillard reaksiyonunun bir ürünüdür. HMF, bal gibi doğal gıdalarda eser miktarda bulunabilmektedir. Aynı zamanda ısıtıl işlem uygulanan meyve suyu, bal, reçel, marmelat, jöle, domates salçası gibi birçok sebze ve meyve kaynaklı gıda maddeleri de HMF içerebilmektedir. Bu ürünlerde HMF miktarının belirli bir düzeyde bulunması; rengin esmerleşmesine, ürünün tat ve kokusunda önemli bozulmalara, besleyici değerlerinde azalmalara yol açabilmektedir. Ayrıca HMF'nin kanserojen etkisi de bulunmaktadır. Denek fareler üzerinde yapılan epidemiyolojik çalışmalardan elde edilen bulgular ışığında HMF'nin tümörojenik etkisinin bulunduğu ve kolon kanserinin başlatıcı faktörü olduğu bildirilmektedir. Bu nedenle pek çok ülke HMF oluşumu yüksek olan gıda maddelerinde bulunmasına müsaade edilen HMF miktarlarını yasal olarak sınırlandırmışlardır. Bu ürünler arasında meyve suyu, reçel, marmelat, bal, pekmez, kuru meyveler ile şarap ve bira gibi alkollü içecekler sayılabilir.

Ülkemizde de Türk Gıda Kodeksi Tebliği'ne göre bal için 40 mg kg^{-1} , meyve suyu için 20 mg kg^{-1} , pekmez ürünleri için ise 75 mg kg^{-1} üst limit belirlenmiştir.

HMF oluşumu; üretim aşamasında ve depolama şartlarında özellikle sıcaklık ve ortam pH'ına bağlı olarak değişmektedir. Bu nedenle gıdadaki HMF düzeyi, ısıtıl işlem şiddetinin ve süresinin belirlenmesi için bir belirteç olarak da kullanılmaktadır (1-3).

Yapılan literatür çalışmalarında, yöremizde geleneksel yollarla üretilen pekmez örneklerindeki HMF miktarının tayini ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır.

Yapılan çalışmada, Kayseri ve ilçelerinden toplanan geleneksel yöntemlerle üretilmiş üzüm pekmezleri örneklerindeki HMF düzeyinin, tayin edilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. PEKMEZ

Geleneksel gıdalarımızdan biri olan pekmez, çabuk bozulabilen taze meyvelerin geleneksel yöntemlerle işlenerek, içerisindeki şeker oranının % 18-20'den % 60-75'e getirilerek dayanıklı hale dönüştürülmesi esasına dayanarak hazırlanmaktadır (4). Ancak, ısıtıl işlem parametreleri kontrol edilmediği takdirde, kalitenin bozulmasına neden olabilmektedir. Özellikle hidroksi metil furfural (HMF) içeriği ısıtıl işleminden etkilenmektedir (5). Bazı meyvelerden pekmez üretilmesi ülkemize özgü bir değerlendirme şeklidir. Taze veya kurutulmuş üzüm, dut, incir, elma, erik, keçiboynuzu, karpuz, şeker kamışı ve şeker darısı gibi sekerli ürünlerden pekmez üretilmektedir. Her pekmez çeşidi üretildiği meyvenin ismiyle belirtilir. Pekmezin bileşimi ve üretim şartları, üretildiği meyveye göre değişebilmektedir (6).

Kuru üzüm ve pekmez, enerji (kalori) değerinin yüksek oluşunun yanı sıra mineral maddeler bakımından da zengin bir gıda maddesidir.

Üzüm pekmezi, taze ve kuru üzüm şirasının asitliğini azaltmaksızın yada kalsiyum karbonat veya sodyum karbonat ile asitliği azaltılarak tanen, jelatin veya uygun enzimlerle durultulduktan sonra tekniğine uygun olarak vakum altında veya açıkta koyulaştırılması ile elde edilen koyu kıvamlı veya bal, çöven, süt, süttozu, yumurta akı gibi maddeler ilavesi ile katılaştırılan bir mamuldür (7). Ülkemizde yapılan üzüm

pekmezleri çok çeşitlidir. Bunları renklerin kıvamlarına ve tatlarına göre birbirinden ayırmak mümkün olur.

Üzüm pekmezi, yurdumuzun her yerinde üretilmekte, özellikle kırsal bölgelerde daha yaygın olup çok eski geçmişe sahiptir. Önceki yıllarda insanların temel gıda maddelerinden biri olan pekmez değişen dünya koşulları içinde daha az tüketilen bir ürün haline gelmiştir (8).

2.2.GELENEKSEL ÜZÜM PEKMEZİNİN ÜRETİM TEKNİĞİ

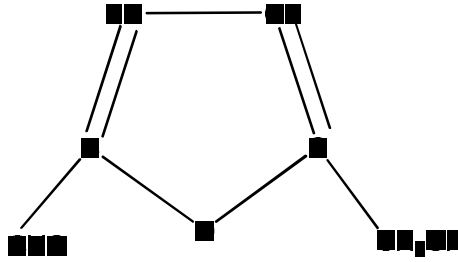
Çalışmamız için örnek toplanması sırasında üretimi yapan kişilerle yapılan görüşmeler sonucu ilçeden ilçeye pekmez yapım tekniğinin farklı olduğu görüldü. Bu durum, ısı ile işlemle oluşan HMF içeriklerinin farklı olmasının önemli bir sebebi olarak görülebilir. Bununla birlikte genel olarak pekmez yapım şekli aşağıda anlatıldığı gibidir.

Geleneksel yolla pekmez üretmek için üzümler toplanıp yıkandıktan sonra ayağına oldukça temiz bir çizme giyen kişi tarafından ezilir ve sırası çıkartılır. Çıkarılan bu sıra posasından ayırmak için ince delikli torbalardan veya ince delikli süzgeçten süzülür ve kaynama kazanına aktarılır. Elde edilen bu sıra yayvan kaba aktarıldıktan sonra kap ateşin üzerine konulur ve genellikle odun ateşinde kaynatılır. Kaynama esnasında pekmezin dip tutup yanık kokusunun oluşmaması için devamlı karşılaştırılır. Bu sırada kaynatma kabının kenarında ve şiranın yüzünde toplanan kirli köpükler bir kepçe ile alınır. Pekmez kıvama geldiğinde pekmezde kırmızı köpük oluşur ve ağdalaşma dediğimiz durum gelir. Tatlı pekmez yapımının ekşi pekmez yapımından farkı üzüm ve şiraya pekmez toprağı yani ekşilik (asitlik) giderici bir madde katılmasıdır. Bu madde halkın özel olarak seçtiği yerlerden toplanan pekmez toprağı olabileceği gibi karbonat, sönmüş kireç (Ca(OH)_2) veya odun külü de olabilir. Bundan sonra sıra ocağa konur, bir taşım kaynatılır ve ocaktan alınır. Temiz bir kaba aktarılacak 5-6 saat veya bir gün kendi haline bırakılır ve dinlendirilir. Bu dinlenme esnasında tortu yapan maddeler dibe çöker ve sıra berraklaşır. Bir gün sonra yavaş yavaş kaynatma kazanına aktarılır. Böylece kabın dibindeki tortu kaynatma kazanına geçmez. Böylece asitlik azaldığı gibi şiranın durulması da sağlanır. Kaynatma kazanına alınan sıra ateşe konur ve tıpkı ekşi pekmezde olduğu gibi pekmezin kıvama geldiği anlaşılınca kadar ateşte kaynatılır. Arzu edilen kıvama gelince ateşten alınır ve muhafaza kaplarına aktarılır. Serin ve kuru bir yerde kullanılıncaya kadar bekletilir.

2.3. HİDROKSİMETİLFURFURAL

2.3.1. HMF'nin Tanımı ve Özellikleri

Hidroksi metil furfural, ısı işlemi sonucu indirgen şekerler ve aminoasitler arasındaki reaksiyon ile oluşan ve birçok üründe kanserojen etkisi nedeniyle miktarı sınırlanan bir bileşiktir (Şekil 2.1). HMF, pişirim ya da sterilizasyon esnasında gıdalara uygulanan ısı işlemleri sonucu indirgen şekerlerin, aminoasitlerle oluşturduğu ve enzimatik olmayan “maillard reaksiyonu” neticesinde oluşan üründür.

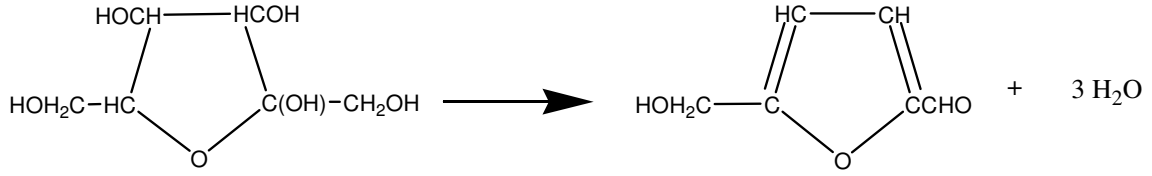


Şekil 2.1. Hidroksimetilfurfural'ın kimyasal yapısı (9)

HMF, doğal ürünlerden balın yapısında eser miktarda bulunabilmektedir. Meyvelerin doğal bileşim unsurları içerisinde ve ısı işlem uygulanmamış meyve sularında HMF bulunmamaktadır. Isıl işlem uygulanan meyve suyu, bal, reçel, marmelat, jöle, domates salçası gibi birçok sebze ve meyve kaynaklı gıda maddelerinde HMF bulunabilmektedir. Bu ürünlerde HMF miktarının belirli bir düzeyde bulunması; rengin esmerleşmesine, ürünün tat ve kokusunda önemli bozulmalara, besleyici değerlerinde azalmalara yol açabilmektedir. Bu nedenle gıda maddelerinde bulunmasına müsaade edilen HMF miktarları sınırlandırılmıştır. Meyve suyu, reçel, süt tozu, bebek mamaları gibi ürünlerde HMF, maillard reaksiyonunda oluşabileceği gibi, heksozların doğrudan ısıtılması ile de oluşabilmektedir.

HMF miktarı, ürünün üretiminde aşırı ısı uygulamasının yapıp yapılmadığı konusunda fikir vermektedir. Örneğin, baldaki HMF miktarı bal analizlerinde göz önüne alınan en önemli parametrelerden biridir. Ülkemizde balda HMF miktarı 40 mg kg^{-1} 'dan fazla olmamalıdır (10). Hazır meyve sularında ve pürelerde en fazla 20 mg kg^{-1} HMF

miktarına izin verilir (11). Pekmez’de müsaade edilen maksimum HMF miktarı 75 mg kg⁻¹’dir (Şekil 2.2.).

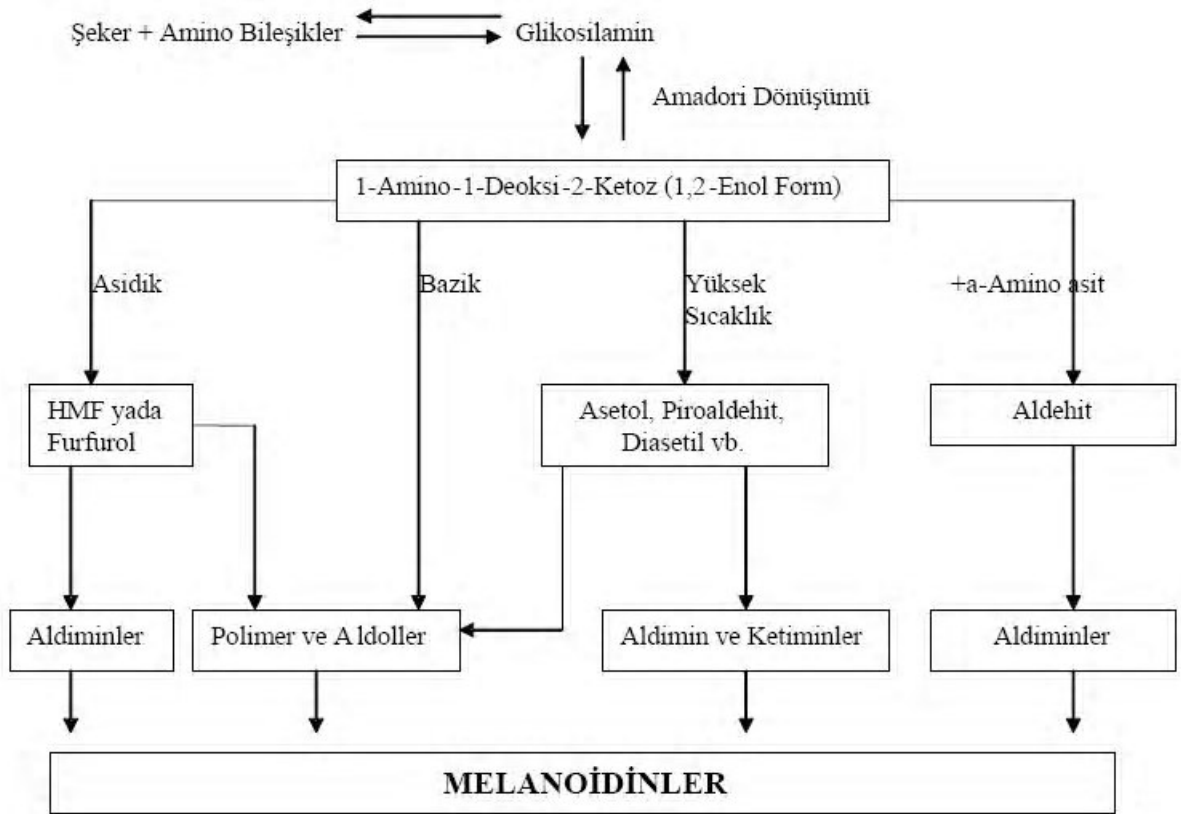


Şekil 2.2. Heksozların asidik ortamda ısıtılması sonucu 5-HMF oluşumu (10)

Depolama ve saklama aşamalarında gıda maddelerinin kalitesinin azalmasına neden olan önemli değişimler olmaktadır. Şekerli ürünlerde, depolama ve saklama sırasında kalitenin bozulmasına neden olan en önemli kimyasal reaksiyon maillard reaksiyonudur. Bu reaksiyon sırasında oluşan HMF miktarından yararlanılarak; ürünlerde meydana gelen değişiklikler gözlenebilmektedir. HMF’in sitotoksik, genotoksik ve tumorejenik etkileri olduğu tespit edilmiştir (12-15).

Meyve suyu, reçel, jöle gibi gıda maddelerinde asidik ortamda heksozların ısı etkisi ile HMF oluşumu gözlenebilmektedir. Heksozların dehidratasyonu sonucu oluşan HMF oluşumu Şekil 2.2’de gösterilmiştir (16).

Maillard reaksiyonu sonucunda oluşan bileşiklerin antioksidatif etkisi de bilinmektedir. Maillard reaksiyonunda yüksek antioksidan kapasite, maillard reaksiyon ürünlerinin özellikle de melanoidinlerin oluşumu ile ilgilidir. Bu antioksidan durum ise, süreç koşullarından ve sistemin fizikokimyasal özelliklerinden kaynaklandığı bilinmektedir. Yüksek sıcaklık ve pH değerleri maillard reaksiyonu ile ortaya çıkan antioksidan maddelerin antioksidatif etkilerini artırdığı yapılan araştırmalarla ortaya konmuştur (13,17,18). Şekil 2.3’de maillard reaksiyonunun yürümesi görülmektedir.

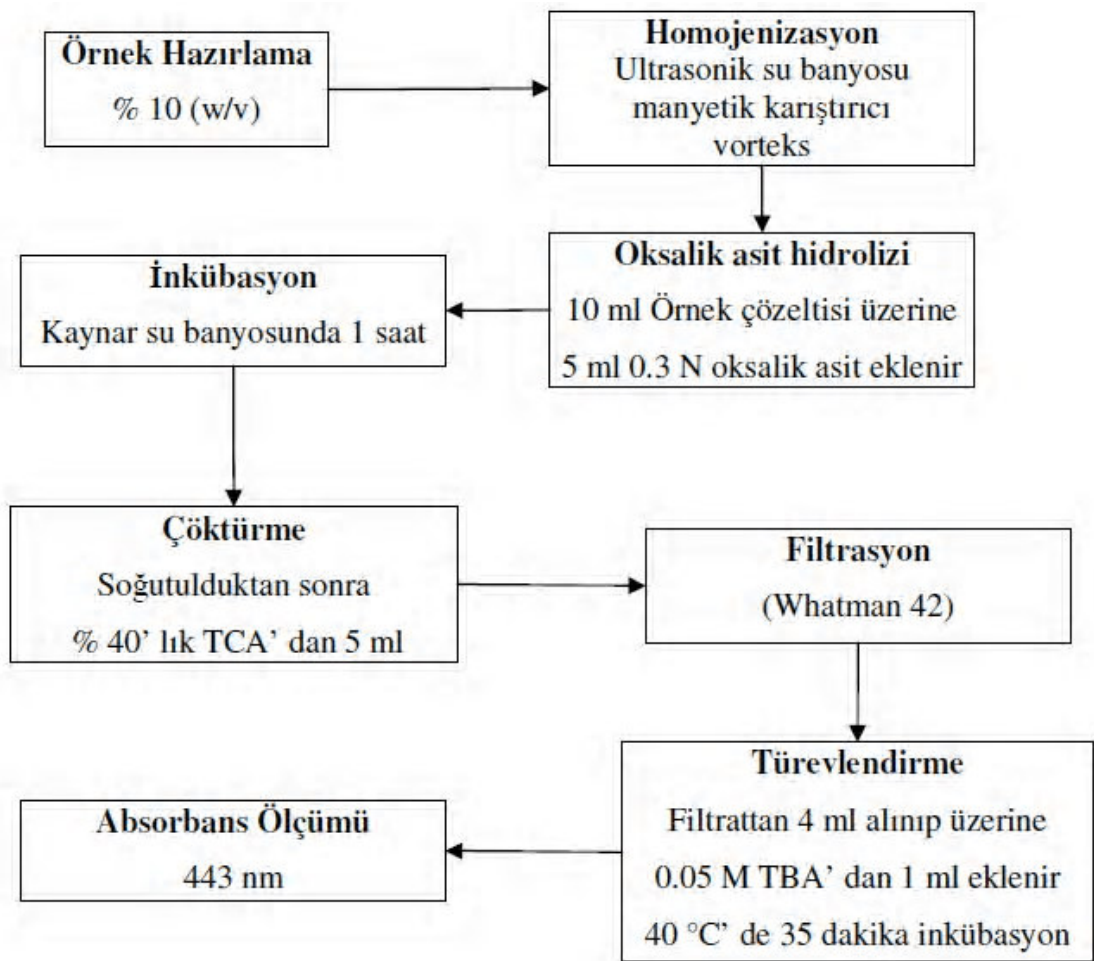


Şekil 2.3. Maillard reaksiyonu oluşumu (19)

2.3.2. HMF'nin Analiz Metotları

2.3.2.1. Spektrofotometrik HMF Analizi

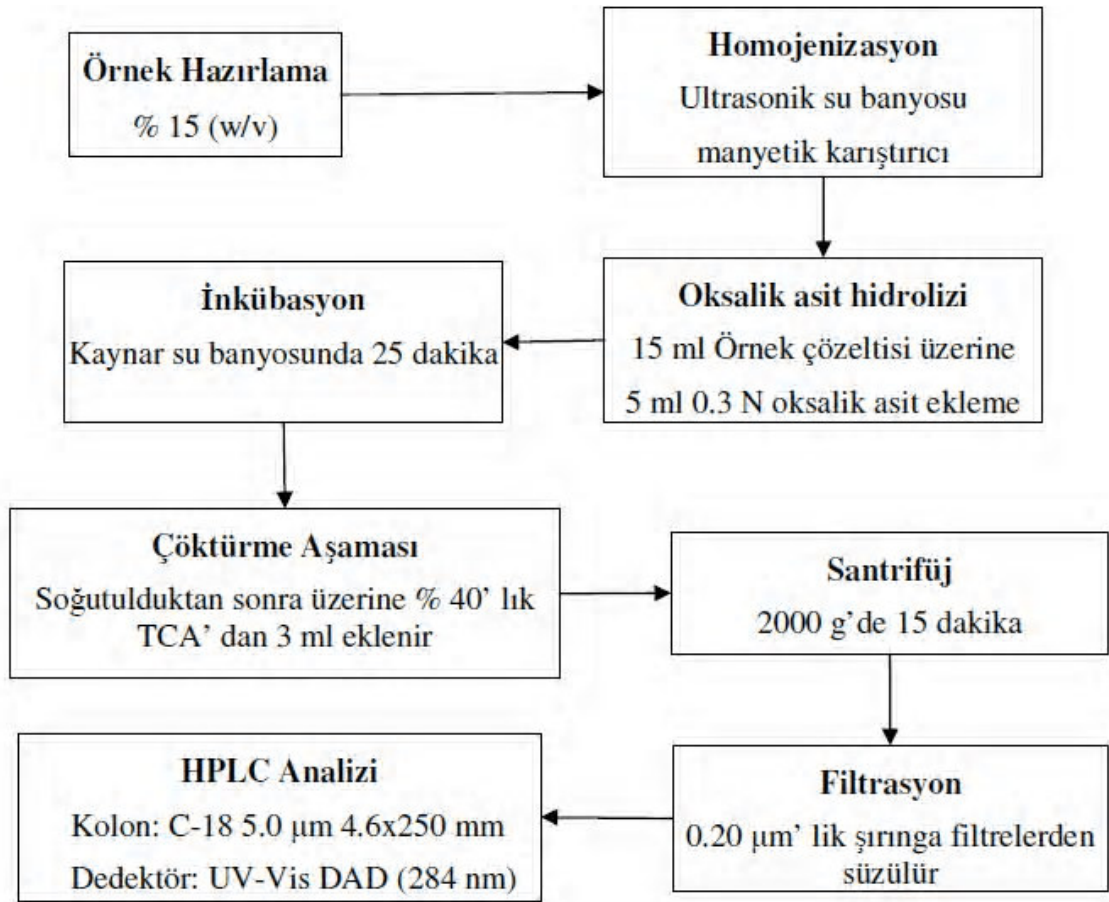
Spektrofotometrik HMF analizi Mistry ve Pulgar (20) tarafından tanımlanan yöntemle göre yapılmaktadır. Yöntemin aşamaları Şekil 2.4'de görüldüğü gibidir.



Şekil 2.4. HMF nin belirlenmesinde spektrofotometrik analiz akım şeması

2.3.2.2. Kromatografik HMF Analizi

HMF analizinde kromatografik analiz'e örnek olması amacıyla bir kromatografik örnek hazırlama ve analiz basamakları Şekil 2.5'de verilmiştir (1).



Şekil 2.5. HMF'nin belirlenmesinde kromatografik analiz akım seması

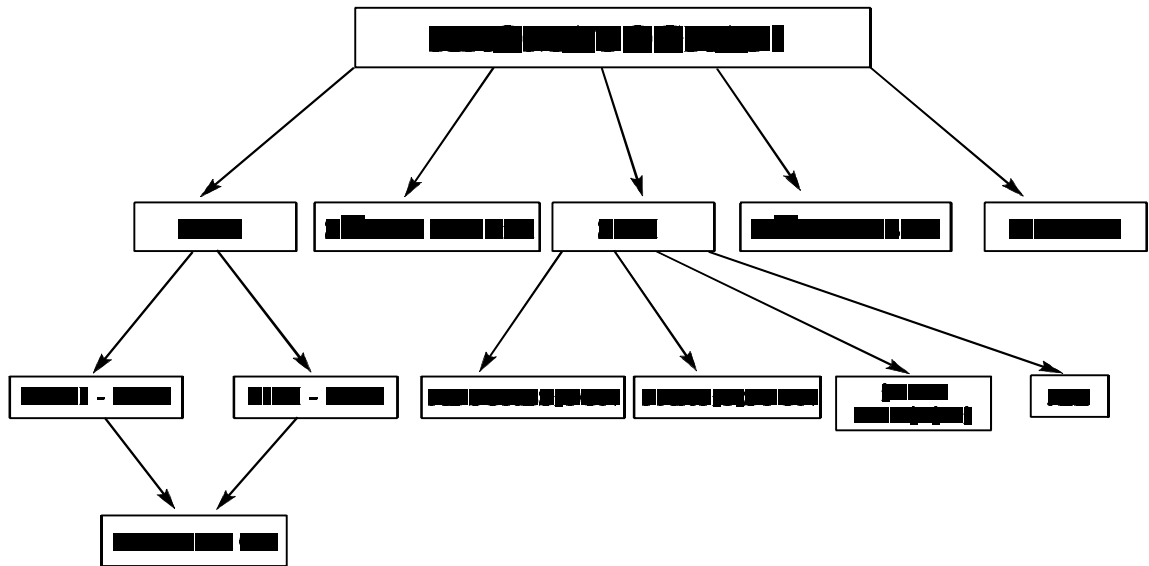
2.4. YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOGRAFI

2.4.1. Kromatografinin Tanımı

Kromatografik ayırmalar; poröz bir sabit faz üzerinden hareketli fazın hareketi ile bir karışım bileşenlerinin, bağıl göç hızlarına bağlı olarak taşınmaları prensibine dayanır. Kromatografik metotların tümünde bir durgun faz ve bir de hareketli faz vardır. Bir kolon veya düz bir yüzeyde tutturulmuş faza durgun faz; durgun faz üzerinden veya arasından geçen ve analiti içeren faza hareketli faz adı verilir (21).

2.4.2. Kromatografik Ayırmalar

Kromatografi farklı şekillerde uygulanabilir. Bunlar kolon, ince tabaka kromatografisi (TLC), gaz, katı-sıvı, sıvı-sıvı, katı-gaz kromatografisi olarak sıralanabilir. Kromatografik ayırmada maddeler birbiriyle karışmayan iki faz arasında dağılırlar. Fazlardan birine hareketli (mobil) faz diğeri ise durgun faz denir. Karışımdaki her maddenin hareket hızı (R_t); maddenin hareketli veya mobil faza olan ilgisine göre belirlenir. Hareketli faza daha çok ilgisi olan maddeler daha hızlı hareket ederken, sabit faza daha çok ilgisi olan maddeler daha yavaş hareket ederler. Kolondan çıkan her maddenin konsantrasyon profili pik olarak adlandırılır, piklerin oluşturduğu tabloya da kromotogram adı verilir (22). Kromatografi türleri ve tutunma mekanizmaları Şekil 2.6'da verilmiştir.



Şekil 2.6. Kromotografi türleri

Bir kantitatif analiz tekniği olan kromatografi de amaç, anlamlı bir süre içinde iyi bir ayırma yapmaktır. Ayırmayı etkileyen parametreler şu şekilde özetlenebilir:

Kolon ile ilgili olanlar: Türü, boyutları

Hareketli faz ile ilgili olanlar: Türü, bileşimi, akış hızı

Ölçüm ile ilgili olanlar: Dedektör türü, dalga boyu vb

Örnek ile ilgili olanlar: Örnek derişimi, örnek hacmi (23).

2.4.3. HPLC'nin Temel Prensipleri ve Bazı Temel Tanımlar

HPLC, kimyasal, farmasötik ve biyoteknoloji endüstrilerinde büyük önem taşıyan bir ayırma ve tayin tekniğidir. Klasik kromatografi'den temel farkları, hareketli fazın bir pompa yardımıyla belirli bir akış hızında gönderilmesi ve kromatografik sistemin sonuna bir dedektör eklenmesidir. Ayrıca, kolonda kullanılan sabit fazın partikül çapı klasik kromatografiden çok daha küçüktür. Hareketli fazın bu küçük boyutlu sabit faz üzerinden hareketi esnasında yüksek bir basınç oluşacağından HPLC'de kullanılan kolonlar genellikle plastik ya da metallere yapılır (23).

Hareketli fazın, tüm analiz boyunca bileşen oranına göre HPLC 2'ye ayrılır.

1. İzokratik elüsyon

2. Gradient elüsyon

Gradient elüsyonun gelişmesinden önce izokratik elüsyon kullanılmıştır. izokratik ayırmalar birçok uygulamada başarılı sonuçlar vermiştir. Fakat tek bir hareketli faz bileşimi olduğu için iyi bir ayırma sağlanamamıştır. Bu yüzden gradient elüsyon geliştirilmiştir.

Şekil 2.7'de izokratik ve gradient sistemle ayrılma ayırma sistemlerinin gücü görülmektedir. Şekilde de görüldüğü gibi izokratik sistemde (A ve B'de) tam olarak ayrılma olmazken, gradient elüsyonda (C ve D'de) ayrılma tamdır. Ayrıca D'de hareketli fazın bileşimi belirli oranlarda artırıldığı zaman çok kısa sürede ayrılma görülmüştür (24).

Aşağıda bazı temel kromatografik tanımlar verilmiştir.

Ölü zaman: Kolonda tutulamayan herhangi bir maddelerin pikin görüldüğü alıkonma zamanıdır (25).

Sabit faz: Hareketli faz içerisinde örneğe ait bileşenlerin etkileşime girdikleri ve belirli ölçüde alıkonuldukları fazdır.

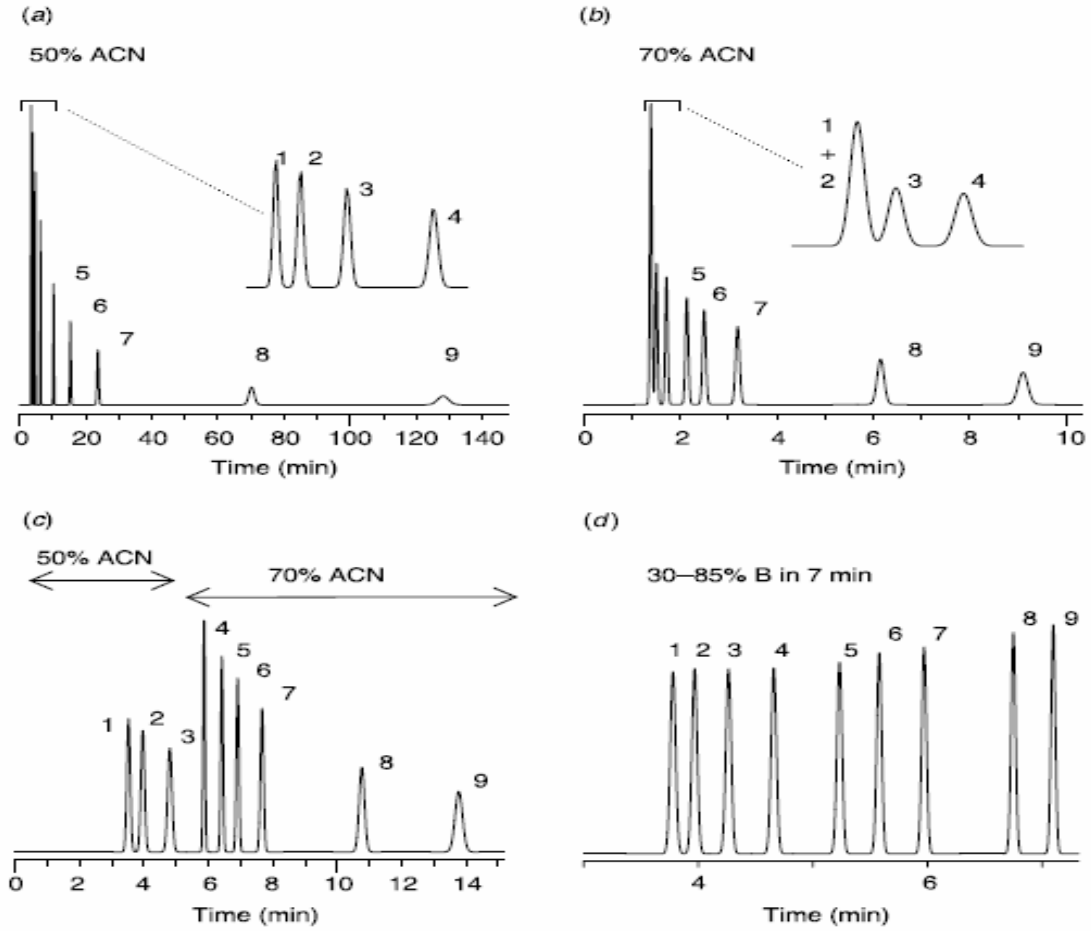
Hareketli faz: Sabit faz üzerinde hareket ederek numune bileşenlerinin hareketinin ve ayrılmasını sağlayan fazdır.

Alıkonma zamanı: Mobil faz içerisinde gelen, analizi yapılacak maddeye ait bileşenlerin sabit faz ile etkileşime girerek belirli oranda tutulması daha doğrusu yavaşlatılması ve böylece daha geç olarak sabit fazı terk etmesi olayıdır. Alıkonma zamanına göre tayin yapılır (21).

Kromatografide karşılaştırmalarda alıkonma zamanı yerine kapasite faktöründen(k) yararlanılır.

$$k = \frac{t_R - t_o}{t_o}$$

Burada t_R , bileşene, t_o , kolonda tutunmayan türe ait alıkonma zamanlarıdır (26) . k değerinin büyük oluşu, bileşenin sabit fazda iyi tutulduğu için kolon boyunca yavaş ilerlediğini; k değerinin küçük olması, bileşenin hareketli faza ilgisinin fazla olmasından dolayı kolon boyunca hızlı ilerlediğini gösterir. HPLC ayırmalarında k, mümkün olduğunca 1-10 arasında tutulmalıdır. k çok küçükse, bileşik, çözücü pikinden ayrılamaz; k çok büyükse ayırma işlemi çok zaman alır. k değerlerinin bu aralıkta olması, hareketli faz ve durgun faz bileşimlerinin değiştirilmesi ile sağlanır.



Şekil 2.7. (A) % 50 oranında ACN. (B) % 70 oranında ACN. (C) İlk 5 dk. % 50 5. dakikadan sonra % 70 ACN. (D) 7 dakika boyunca %30-85 aralığı oranında ACN kullanılmıştır (Gradient elüsyon).

İki pikin birbirinden ayrılması seçicilik faktörü, α ile verilir

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R2} - t_{R0}}{t_{R1} - t_{R0}}$$

α , 1,15 ise iki bileşiğin (%98) birbirinden ayrıldığı kabul edilir (27).

Pompa: Sıvı kromatografisinde, özellikle de HPLC donanımında temel bir bileşendir. HPLC uygulamalarında mobil fazı oluşturan çözücü karışımlarının, enjektör, kolon ve dedektör içerisinden belirli, sabit veya değişken bir hızda, belirli basınç altında geçmesini sağlar (25).

Dedektör: Kolonda ayrımı yapılan analiz edilecek maddeye ait bileşenlerin alıkonma zamanlarına göre sırayla içerisinden geçerken miktar tayinlerinin yapıldığı HPLC donanımdır. Işık enerjisini elektrik enerjisine dönüştüren cihazlardır. Sıvı kromatografi dedektörleri temel olarak iki tiptir. Birinci tip dedektörler, hareketli fazın kırma indisi,

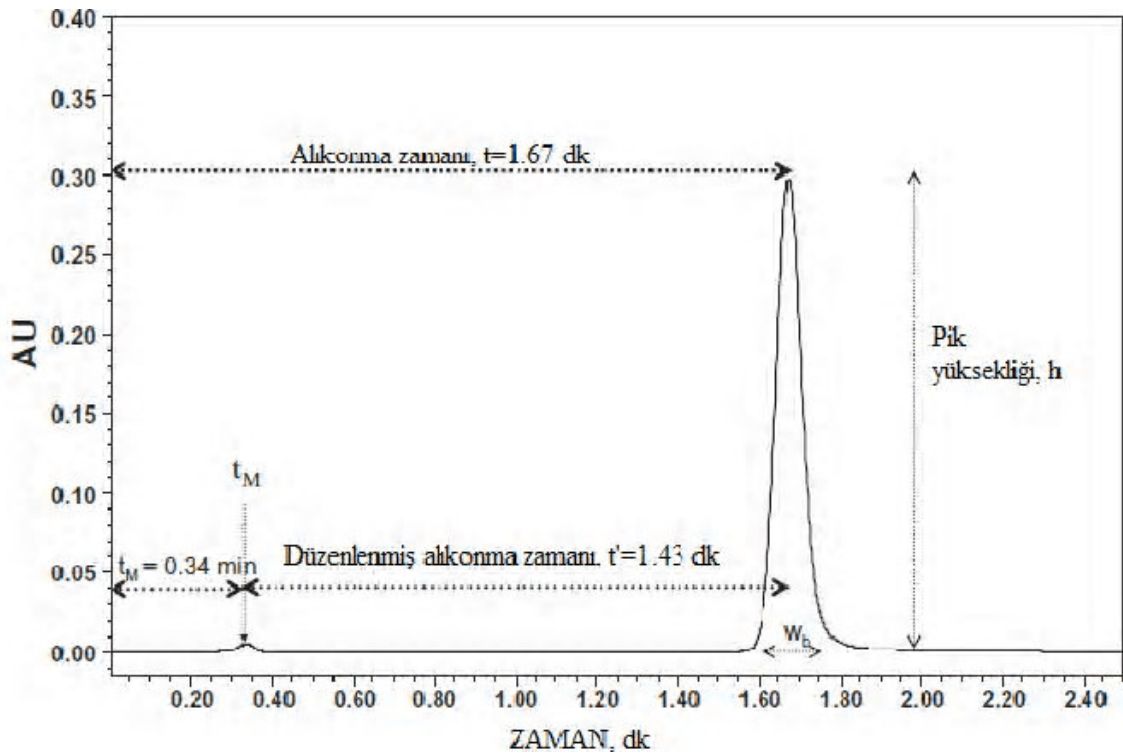
dielektrik sabiti veya yoğunluğu gibi, analit tarafından değiştirilebilen yığın özelliklerine göre cevap veren dedektörlerdir. İkinci tip dedektörler ise, analitin UV absorbansı, floresans şiddeti veya difüzyon akımı gibi hareketli fazın sahip olmadığı analit ile ilgili özelliklere cevap veren dedektörlerdir (28-30).

HPLC’de kullanılan dedektörler; UV-Vis. dedektör, diyod array dedektör, floresans dedektör, refraktif indeks dedektör, elektrokimyasal dedektör ve kütle spektroskopik dedektör şeklinde sıralayabiliriz.

Kromatogram: Kromatografik analiz sonucunda elde edilen grafiktir. Y-ekseni, kullanılan dedektörün ölçtüğü fiziksel özelliği (absorbans, fluorensans, iletkenlik, akım, kırılma indisi vb.), X-ekseni ise zamanı göstermektedir (Şekil 2.8).

Lineer akış hızı: U ile sembolize edilir, kolon uzunluğunun (L) kolon ölü zamanına (t_0) bölünmesiyle hesaplanıp birimi cm/saniye’dir.

Çözünürlük: R ile sembolize edilir. Birbirini takip eden 2 adet bileşene ait piklerin birbirinden ayırımlarının başarısını (oranını) gösterir (21,31).



Şekil 2.8. HPLC kromatogramı (25)

2.4.4. HPLC Cihazları

HPLC, 1970'lerin ilk yıllarında gıda maddelerinin analizi için geliştirilmiş ve ilk olarak 1973'de mikotoksin araştırmaları için uygulamalar başlamıştır (32).

Modern sıvı kromatografi sistemlerinde genel olarak kullanılan ve tanecik boyutu 2 ile 10 μm arasında olan dolgu maddeleri ile uygun sıvı akış hızları elde edebilmek için, yüzlerce atm'lik pompa basınçlarına gerek vardır. Bu yüksek basınçların bir sonucu olarak HPLC için gerekli donanım, diğer tip kromatografi sistemleri dikkate alındığında, daha ince işçilik gerektirir ve sonuçta daha pahalıdır. Şekil 2.9'da tipik bir yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazının çeşitli kısımları şematik olarak gösterilmiştir (23).

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi analitik ayırma teknikleri amacı ile en yaygın kullanılan cihazdır. Yaygın kullanılma sebepleri duyarlılığı, kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, uçucu olmayan veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen bileşiklerin ayrılmasına uygunluğudur (33).

En önemlisi ise sanayisinin birçok bilim dalının ve toplumun birinci derecede ilgilendiği maddelere geniş bir şekilde uygulanabilirliğidir. Bu tip bileşiklere örnek olarak amino asitler, proteinler, nükleik asitler, karbonhidratlar, ilaçlar ve pestisitler verilebilir (34).

HLPC Laboratuvarlarında Güvenlik: HPLC ile çalışmanın sağlık riski vardır. Bunlar: toksik olan solventler yüksek basınç akciğer tahribatına neden olarak gösterilir (35).



Şekil 2.9. HPLC cihazının şematik gösterimi

2.4.4.1. Hareketli Faz Hazneleri ve Çözücü Muamele Sistemleri

Modern bir HPLC cihazı, bir veya daha çok cam veya paslanmaz çelikten yapılmış hazne içermektedir. Sabit bileşimdeki tek bir çözücü kullanılarak yapılan bir ayırma izokratik elüsyon olarak adlandırılır. Analiz süresince hareketli fazın bileşiminin değiştirilebildiği ve polarlıkları birbirinden farklı iki (veya bazen daha fazla) çözücü sistemlerinin kullanıldığı tekniğe gradiyent elüsyon denir. Modern HPLC ekipmanları çoğu zaman, çözücülerin hacimsel oranı zamanla doğrusal olarak veya üstel olarak değiştirilebilecek şekilde, iki veya daha fazla hazneden aldığı çözücülerini bir karıştırma odasında sürekli olarak değişen hızlarda bir araya getiren sistemlerle donatılmıştır (23).

2.4.4.2. Pompalama Sistemleri

HPLC cihazları, diğer sıvı kromatografisi cihazlarından, kolon giriş ve çıkışı arasında oluşan yüksek basınç nedeni ile farklılık gösterir. Bu basınç farkı, kolon girişine bir pompa yoluyla uygulanan basınç ile sağlanır. Çözücü pompalama sistemi belki de HPLC sisteminin en önemli kısmıdır. Pompanın performansı, analitik sonuçlardaki tekrarlanabilirliği, nicel değeri, gözlenebilme sınırı vb. değerleri büyük ölçüde etkiler.

HPLC pompalama sistemleri çok kaliteli olmalıdır. Bu sistemler 400 atm'e kadar basınç üretimi, puls içermeyen basınç çıkışı, 0,1-10 mL/dakika aralığında akış hızları, % 0,5 veya daha iyi bir bağıl tekrarlanabilirlikle akış kontrolü, korozyona dayanıklı parçalar gibi özelliklere sahip olmalıdır.

HPLC cihazlarında kullanılan pompalama sistemleri:

a) Pistonlu (sabit akış) pompalar: Pistonlu pompalar iki modeldir. Birinde piston, pompalanan hareketli sıvı faz ile doğrudan temas halindedir. Diyafram pompaları olarak adlandırılan diğerinde ise, piston hareketi hidrolik sistem yoluyla esnek paslanmaz çelik membrana iletilir. Ticari olarak satılan HPLC sistemlerinin yaklaşık % 90'ında kullanılan pistonlu pompalar, genellikle motor kontrollü bir pistonun ileri ve geri hareketiyle çözücünün pompalandığı küçük bir silindirden meydana gelmiştir.

b) Sürgülü Pompalar: Sürgülü pompalar, bir kademeli motordan güç alan vidalı güdüm mekanizması ile kumanda edilen sızdırmaz bir sürgüsü olan, şırınga benzeri silindirik bir kaptan ibarettir.

c) Pnömatik (havalı) Pompalar: Pnömatik (havalı) pompalar da gaz basıncıyla çalışır. Gaz basıncı küçük alanlı bir pistonu iten büyük alanlı bir pistonu etki eder. Gaz basıncı böylece pistonların yüzey alanları oranında kuvvetlenir. Sabit basınçtaki sıvı sisteme dağıtılır (12,23,36).

2.4.4.3. Numune Enjeksiyon Sistemleri

Çoğu zaman, HPLC ölçmelerin kesinliğini belirleyici en önemli faktörlerden biridir. İdeal enjektör, örneği kolonun başına solvent akışına zarar vermeden verebilmelidir. Teorik olarak bunu gerçekleştirecek ideal metot, solvent akışını durdurmaksızın kromatografik materyal yatağının baş kısmına örneği verebilmelidir. Bu septum enjektörü kullanılarak başarılabılır, fakat yüksek basınç altında sızıntı problemi bu enjektörün kullanımını sınırlamaktadır. İlk ve en basit numune verme düzeneği, kendi kendine sızdırmazlık sağlayan elastomerik septumlardan şırınga ile enjeksiyon sistemidir. Bu amaçla 100 atm basınca kadar dayanıklı mikrosırıngalar kullanılır. Bu tekniğin avantajı basitliğidir. Şırınga ile enjeksiyonun tekrarlanabilirliği nadiren % 2-3'den daha iyidir ve çoğu zaman önemli ölçüde kötüdür. Valf enjektörler ve şırınga enjektörler olmak üzere iki tip enjeksiyon sistemi vardır. Yeni sistemler de, normal enjeksiyon ve oto enjeksiyon sistemleri bulunmaktadır (23).

2.4.4.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Kolonları

Modern HPLC donanımlarında kullanılan kolon, karmaşık örneklerde bileşenlerin birbirinden ayırımını sağlayan önemli kısımlardan birisidir. Kolonun ayırma gücü ve performansı, iç yüzeyine yapılan kaplamada kullanılan malzemenin kimyasal ve fiziksel özelliklerinden etkilenmektedir. Kullanılan bu tür kaplama malzemeleri çok çeşitli olup, kullanılacak mobil fazın ve uygulanacak HPLC metodunun özelliklerine ve analizi yapılacak örneğin bilinen kimyasal ve fiziksel özelliklerine göre seçilmelidir. Seçilecek kolonun HPLC uygulamasında kullanılacak akış hızı ve dolayısıyla oluşacak basınca dayanıklı olmasına dikkat edilmelidir.

Sıvı kromatografi kolonlarının büyük bir çoğunluğu 5 - 30 cm arasındadır. Sıvı kromatografi kolonlarının iç çapı genellikle 4 - 10 mm, yaygın olarak kullanılan birçok kolon dolgu maddesinin tanecik büyüklüğü 5 - 10 μ m arasındadır. Kolon iç çapı arttıkça akış hızı ve iç doldurma hacmi artmakta ama oluşacak piklerin çözünürlüğü dolayısıyla duyarlılık azalmaktadır. Kolon uzunluğu arttıkça örnek bileşenlerinin ayırımı daha iyi

olmakta fakat piklerde kuyruklanma olmakta ve analiz süresi uzadığı için daha fazla mobil faz harcanmaktadır. Kromatografik kolonda partikül büyüklüğü önemlidir. Şekil 2.10'da çeşitli kolon dolgu maddelerinin tipleri görülmektedir (23).

Koruyucu (guard) kolon, analit kolonun giriş kısmına takılarak çözücü gelebilecek toz ve kirlilikleri tutmak suretiyle kolonun ömrünü uzatırlar. Bunun yanında koruyucu kolonlar yardımıyla durgun faz, hareketli faz ile doyurularak sıvı-sıvı kromatografisinde durgun fazın sürüklenme ile kaybı minimuma indirilir.

Birçok uygulama için kolon sıcaklığının yakından kontrolü gerekli değildir ve kolonlar oda sıcaklığında kullanılırlar. Ancak, çoğu zaman, kolon sıcaklığı, derecenin onda birkaçı hata ile sabit tutulduğu zaman daha iyi kromatogramlar elde edilmektedir. Birçok modern ticari cihaz, kolon sıcaklığını oda sıcaklığından, 100°-150°C'a kadar her sıcaklıkta onda birkaç derece hata ile sabit tutabilen kolon ısıtıcıları ile donatılmıştır. İyi bir kolon dolgu maddesi kararlı olmalıdır ve hem hareketli faz çözücülerine hem de örnek çözeltilere karşı inert olmalıdır. Geniş yüzey alanına, düzgün olarak dağılmış ve hareketli faza kolay erişebilir açık yapısal yüzeye sahip olmalıdır. Yüksek basınç ve yüksek akış hızlarından etkilenmemelidir. Örneğin alıkonma hacmi ve tutulma kapasitesi dolgu maddesinin yüzey alanı ile orantılıdır. Gözenekli bir dolgu maddesinde örnek moleküllerinin tanecik merkezine ulaşması ve sonra geriye dönmesi için ($25\mu\text{m} + 25\mu\text{m} = 50\mu\text{m}$) ideal diffüzyon uzaklığı olmalıdır. Kolon dolgu maddeleri genellikle silika ve alümina esastır (21).

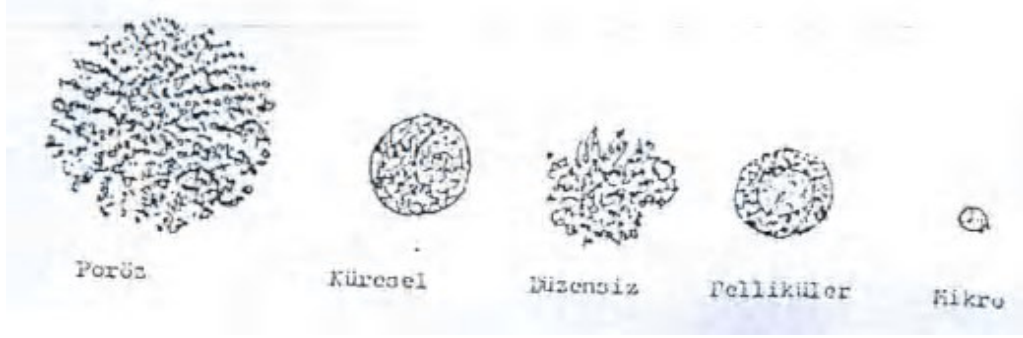
Dolgu materyalleri, partikül yapılarına bağlı olarak;

Büyük partiküllü ve tamamen gözenekli (poröz),

a) Pelikuler,

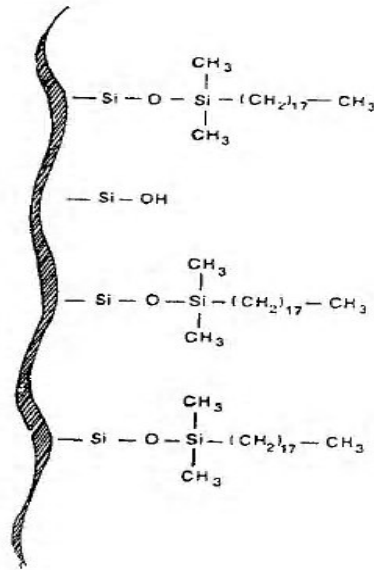
b) Mikropartiküllü ve tamamen gözenekli dolgular ,

olmak üzere üç grup altında toplanabilir (37).



Şekil 2.10. Kolon dolgu maddelerinin tipleri

HPLC de sıklıkla kullanılan durgun fazlar, C8, C18 düz zincirli alkil gruplu silika yapısındadır (Şekil 2.11.). Bunlar 1-8 pH aralığında kullanılırlar. Oktadesil silika kolonlarda silanol gruplarının tamamı kapatılamamıştır (12,28,37).



Şekil 2.11. Kolon dolgu maddesi

Başarılı bir kromatografinin amacı verimli bir ayırım ve dar bir kromatografik bant elde etmektir. Kromatografik kolon verimliliklerinin kantitatif ölçümünde birbiriyle bağıntılı olan iki terim sıkça kullanılır:

1. Tabaka yüksekliği, H , (Plate Height)
2. Teorik tabaka sayısı, N , (Number of Theoretical Plate)

Bu iki terim arasındaki bağıntı aşağıdaki eşitlikle ifade edilebilir;

$$N = L / H$$

L: Kolon dolgusunun uzunluğu (cm)

Bir kolonda tabaka yüksekliğinin azalması ve teorik tabaka sayısının artmasıyla kolon verimliliği artar. Hareketli ve durgun fazların bileşimi, kolon dolgu maddesinin tanecik büyüklüğü ve kolon çapına bağlı olarak kolonun tipi kolon verimliliğine etki etmektedir. Kolon dolgu maddesinin tanecik çapı küçüldükçe kolon tabaka sayısı artmakta bu da kolon verimliliğini artırmaktadır.

Martin ve Synge ayrı fakat bitişik dar tabakalardan meydana gelen kromatografik bir kolon düşündükleri teorik çalışmalarıyla tabaka yüksekliği ve teorik tabaka sayısı terimlerinin ortaya çıkışına öncülük etmişlerdir. Her tabakada maddenin hareketli ve durgun faz arasında kurduğu dengenin, yeniden meydana geldiği kabul edilmiştir. Analitin kolon içerisinde hareketi, dengedeki mobil fazın bir tabakadan diğerine geçişi olarak kabul edilmiştir. Teorik tabaka sayısı şu şekilde hesaplanır;

$$N = 16 (t_R / W)^2 \text{ veya } N = 54,4 (t_R / W_{1/2})^2$$

W : Pik taban genişliği

Teorik tabaka sayısı *N* ve tabaka yüksekliği *H*, literatürlerde ve kromatografik cihaz üreticileri tarafından, kolon performansının bir ölçümü olarak kullanılır (22).

2.4.4.5. Dedektörler

Detektör yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde, aletin en önemli kısımlarından birini oluşturur. Kolondan çıkan maddelerin derişimi kolon çıkışına yerleştirilen uygun bir detektör ile ölçülür. Dedektör seçimi doğru ve hassas bir analiz yapabilmek için son derece önemlidir. Genellikle tek dedektör sistemi kullanılmakla beraber, birden fazla dedektör sisteminin yer aldığı cihazlar da mevcuttur. Duyarlılık, doğrusallık, üniversal ve seçici cevap, doğru cevap, koşulların değişiminden etkilenmeme, numuneyi tahrip etmeme, ucuzluk ve kolay kullanım; bir detektörde bulunması gerekli önemli özelliklerdir. HPLC dedektörlerinin iki tipine rastlamak mümkündür. Genel dedektörler, hareketli faz ve örnek çözeltisinin özelliklerindeki değişimi ölçer. Seçici dedektörler ise yalnız örnek çözeltisi için duyarlılık ve seçicilik gösterir. Genel özellikli dedektörlere örnek olarak kırılma indisi ölçen dedektörler ve kütle spektrofotometreleri verilebilir. Seçici dedektörlere örnek olarak

da UV, FT-IR, floresans, elektrokimyasal, radyokimyasal, iletkenlik dedektörleri verilebilir. Dedektörler, örnek bileşenlerini tayin ederken ölçtükleri fiziksel özelliklere göre farklılandırılabilir. 365 tane basılmış makalede yapılan inceleme, çalışmaların % 71 UV absorpsiyonun belirlenmesiyle, % 15 floresansla, % 5,4 kırma indisyle, % 4,3 elektrokimyasal ölçmelerle, % 4,3 diğer yöntemlerle yapıldığını ortaya koymaktadır. UV absorpsiyon dedektörleri ile yapılan çalışmaların % 39 ışın kaynağı olarak cıvanın bir emisyon çizgisi, % 13 döteryum lambasından çıkan ışınların süzülmesi ile elde edilen ışın % 48 optik ağ monokromatörden yayılan ışın kullanılmıştır (23).

HPLC’de kullanılan dedektörler:

a) Ultraviyole-görünür bölge dedektörü(Ultraviolet / Visible dedector - UV/VIS): Absorbans ölçen dedektörler olup HPLC’de kullanılan dedektörlerin yaklaşık % 80-90’ını oluşturmaktadırlar. Lambert-Beer yasası geçerlidir. Spektrum taraması yapmak, farklı dalga boyunda çalışmak veya dalga boyunu zamana karşı programlamak mümkündür. UV dedektörün karakteristikleri şunlardır:

- Örneklerin UV- görünür bölgede absorpsiyon yapması gerekir.
- Hareketli faz akış hızı ve sıcaklık değişimlerinden etkilenmez.
- Band genişletme etkisi küçüktür.
- Çok güvenilirdir, operasyonu kolaydır.
- Örnek çözeltiyi bozmaz.

b) Foto Diode Array Dedektör: Prensip olarak UV ve görünür bölgede çalışan dedektör sistemidir. Işın kaynağı olarak UV ve görünür bölge lambalar kullanılır. Ancak birçok dalga boyunda eşzamanlı analiz yapılabilir.

c) Floresans Detektörler: HPLC için floresans dedektörler, florimetre ve spektrofiorimetrelere benzer şekilde tasarımılanmışlardır. Bunların çoğunda floresans, uyarıcı ışına 90 derecede yerleştirilmiş bir fotoelektrik dedektör yardımıyla gözlenmektedir. Floresans dedektörün en önemli avantajı hassasiyetidir. 1 ppb den daha düşük konsantrasyondaki maddelere cevap verebilmektedir

d) Elektrokimyasal dedektör: Bu dedektörlerle elektroaktif maddeler analiz edilebilir. Belirli potansiyel değerlerinde yükseltgenebilir veya indirgenebilir maddelerin tayinleri mümkün olabilmektedir.

e) İletkenlik Dedektörü: Bu tür dedektörlerle iletkenlik ölçülür. Daha çok anyon ve katyonların analizlerinde kullanılır.

f) Kırma İndisi Dedektörü: Her bir bileşenin miktarını ölçebilen, yani seçimli olmayan bir dedektör türüdür. Bu sistemde herhangi şekilde ışığın absorpsiyonlanması olmadan sadece ışığın kırılması prensibine göre çalışan bir dedektör sistemidir.

g) Buharlaştırılabilir Işık Dedektörleri (ELSD): Son yıllarda, HPLC için yeni bir genel dedektör tipi, buharlaştırılabilir ışık saçma dedektörleri (ELSD), ticari olarak piyasaya çıkmıştır.

ı) Kütle Spektrometrik Dedektörler: Sıvı kromatografi ile kütle spektrometriyi birbirine bağlamadaki temel problem, sıvı kromatografinin bağıl olarak çok çözücü hacimleri ile çalışması ve kütle spektrometrinin vakum gerektirmesidir. Bu problemi çözmek amacıyla çeşitli ara bağlantılar geliştirilmiştir. Kütle spektrometrisi dedektörü sıvı kromatografi piklerinin online kalitatif analizi için en iyi araçtır (23).

Tablo 2. 1 'de HPLC'de sık kullanılan dedektörlerin karşılaştırılması görülmektedir.

Tablo 2.1. HPLC dedektörlerinin başlıca özelliklerinin karşılaştırılması (26)

	UV-Görünür	Fluoresans	Elektrokimyasal	İletken	RI
Cevap	Seçimli	Seçimli	Seçimli	Seçimli	Üniversal
Duyarlık (mg/ml)	ng mL ⁻¹	pg	pg	pg	µg
Tayin limiti (g/mL)	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻⁷
Sıcaklık duyarlılığı	-	+	+	+	+

2.4.5. HPLC Cihazının Diğer Sıvı Kromatografi Türlerine Göre Üstünlükleri

HPLC cihazının diğer kromatografik tekniklere göre bazı üstünlükleri vardır. Bu üstünlükler aşağıda sıralandırılmıştır.

1. HPLC kolonu, rejenerasyon olmaksızın pek çok kez kullanılabilir.
2. Kolonlarda gerçekleştirilen ayırma, öteki yöntemlerle elde edilenden çok daha çeşitlidir.

3. Bu teknik kullanıcının becerisine daha az bağımlıdır ve tekrarlanabilirliği daha yüksektir.
4. Nicel analiz için de kullanılabilir.
5. Analiz süresi çok kısadır.
6. Duyarlılığı çok yüksektir, 10 µg'lık bir örnek bile, floresans veya elektron yakalama dedektörleri kullanılarak tayin edilebilir (38, 39).

2.5. HPLC'DE AYIRMA TEKNİKLERİ

HPLC normal sıcaklık da uçucu olamayan ve yüksek polariteye sahip maddelerin analizinde kullanılır. HPLC sistemi bir çözücüde çözülebilen bütün maddelere uygundur. Maddeler kolon içinden geçirilirken maddelerin kolon dolgu maddesi ile farklı etkileşimlerinden dolayı kolon içersinde al konma zamanlar farklı olur ve detektöre farklı zamanlarda gelirler. Ayrılan maddeler dedektöre farklı zamanlarda geldiği için maddenin konsantrasyonuna bağlı olarak pik oluşur. Kaydedici sistemler bilgisayarlı bir software yada Chromatopac denilen özel yazıcı sistemlerdir. Sistemde kullanılan kolonların çapı 20 µm den küçük dar kolonlardır. HPLC sisteminde kullanılan farklı ayırma teknikleri kullanılır, bunlar için uygun kolon sistemi seçilmesi gerekmektedir.

2.5.1. Yüksek Performanslı Dağılma Kromatografisi

Dağılma kromatografisi, dört ayrı tip sıvı kromatografisi içinde, en yaygın kullanılanıdır. Dağılma kromatografisi sıvı - sıvı kromatografisi ve sıvı bağlı faz kromatografisi olmak üzere iki alt sınıfa ayrılabilir. İki teknik arasındaki fark katı parçacıklar yüzeyine durgun fazın tutturulmasındaki metod farkından kaynaklanır. Sıvı-sıvı tekniğinde durgun faz katı yüzeyine fiziksel adsorpsiyonla; bağlı faz tekniğinde ise kovalent bağlarla tutturulur. Dağılma kromatografisi, hareketli ve durgun fazlarının bağıl polarlığına bağlı olarak iki kısma ayrılabilir (23).

Sabit fazın mobil fazdan daha polar olduğu kromatografisi şekline normal faz kromatografisi, mobil fazın sabit fazdan daha polar olduğu kromatografisi şekline ise ters faz kromatografisi denir (40). Tablo 2. 2'de normal faz ve ters faz HPLC'nin özellikleri verilmiştir.

2.5.1.1. Normal-faz Kromatografi

Normal-faz kromatografide en düşük polaritedeki bileşenler hareketli fazda nispeten çok çözündükleri için en önde elue edilirler, hareketli fazın polaritesindeki artış, elüsyon zamanının azalması ile sonuçlanır. Kolon olarak; Silika, Siyano, (CN) Amino, (NH₂) Diol, (OH) Nitro, (NO₂) kolon sistemleri kullanılır. Bu kullanılan teknik de mobil faz olarak diklorametan yada hekzan gibi apolar çözücüler kullanılır (36,41).

2.5.1.2. Ters-faz Kromatografi

İlk geliştirilen tekniğin yetersiz olduğu için daha sonra kolon ve çözücü sistemindeki polar ve apolar sistemi yer değiştirilerek ters faz sistemi geliştirilmiştir. Bu sistem en çok kullanılan kromatografi tekniğidir. Ters-faz kromatografide durgun faz apolardır ve çoğu zaman bir hidrokarbondur. Ters-faz kromatografide en polar bileşenler, en önde yürür ve hareketli fazın polaritesindeki artış, elüsyon zamanını artırır. Bu sistemde kolon apolar ve çoğu zaman bir hidrokarbondur, mobil faz ise metanol, asetonytril ve su gibi polar çözücüler kullanılır. Bu sistem en çok kullanılan kromatografi tekniğidir. C18, (ODS), C8, C4, C2, PHenyl, CN, (RP) NH₂ (RP) kullanılan kolon çeşitleridir. Ters-faz kromatografi hplc de en popüler ve % 70 oranla en çok kullanılan bir kromatografi türüdür (25,30,36,43).

HPLC ters- faz yöntemi ile A ve E vitaminleri, retinol asetat, α -, β - ve γ -tokoferol, α -tekoferol asetat gibi maddelerin tayini yapılabilir (37).

Tablo 2.2. Normal ve ters faz kromatografisi özellikleri

Faz	Normal Faz	Ters Faz
Sabit faz	Polar (Silika)	Nonpolar (Kaplanmış silika hidrofobik)
		C ₂ (dimetil), C ₆ (hekzil)
		C ₈ (oktil), C ₁₈ (oktadesil)
Mobil Faz	Nonpolar (Hekzan, kloroform)	Polar metanol, asetonytril, THE, su, pH ayarlama

2.5.1.2.1. İyon çifti kromatografi: İyon-çifti (veya eşleşmiş iyon) kromatografi, iyonik türlerin ayrılması ve tayini için kullanılan bir tür ters-faz dağılma kromatografidir. İyonik bileşiklerin ters faz (RP) sistemde alıkonma derecesi molekülün yüküyle orantılıdır (23,37).

2.5.1.2.2. Kiral Durgun Fazlı Kromatografi: 1960'lı yılların ortalarında, optikçe aktif izomerleri (enantiyometreleri) gaz ve sıvı kromatografisinin her ikisiyle de birbirinden ayırmak amacıyla, kimyacılar kiral durgun fazlar (CSP) kullanmaya başladılar. Bu teknik, gaz kromatografide kullanılsa da, kolon ve düzlemsel yüksek-performanslı kromatografiye daha uygun görülmektedir. Çünkü gaz kromatografik kolonlardaki yüksek sıcaklıklarda diastomerlerin dağılma katsayılarındaki fark gittikçe azalmaktadır. Ayrıca yüksek kolon sıcaklıkları çoğu zaman kiral durgun fazların rasemleşmesine sebep olmaktadır (12,23,37)

2.5.2. Adsorpsiyon Kromatografisi

Bu yöntemde durgun faz, çok ince toz haline getirilmiş polar katı yüzeyidir. Bu tür dolgularda analit, dolgu maddesinin yüzeyinde hareketli faz ile adsorpsiyon yarışına girer. Kolondaki tutulma zamanı, analitin yüzeydeki adsorpsiyon kuvvetlerine bağlıdır. Bileşenler birbirlerinden katı yüzeye olan farklı derecede ilgileri nedeniyle ayrılırlar. Adsorpsiyon denge sabiti büyük olan bileşen yüzeyde daha uzun kalırken, küçük olan daha kısa sürede kalmakta, hiç adsorplanmayan bileşen ise kolonda hiç geciktirilmeden hareketli faz ile taşınarak dışarı çıkmaktadır. Yüzeye adsorplanan bileşenler ise yüzeyle etkileşmelerine bağlı olarak farklı kalma sürelerinde kolonu terk etmektedir.

Sıvı-katı HPLC için kullanılan durgun fazlar, sadece silis ve alüminadır. Adsorpsiyon kromatografide, çözücü sistemindeki farklılıklar, ayırma gücü ve alıkonma zamanlarında büyük farklılıkları beraberinde getirir ve uygun hareketli fazların bulunmadığı durumlarla nadir olarak karşılaşılır. Adsorpsiyon kromatografide, çözücü seçimi için uygun bir teknik, dağılma kromatografide tarif edilen tekniğe benzemektedir. Bu teknikte, bir tanesi çok kuvvetli ve diğeri çok zayıf olmak üzere birbiri ile uyumlu iki çözücü seçilir. Daha sonra iki çözücünün karışımındaki hacim oranları değiştirilerek istenen karışım elde edilir. Sıvı-katı kromatografi genellikle polar olmayan çözücülerde çözülebilen ve ters-faz dağılma kromatografide kullanılan sulu çözücülerde sınırlı çözünürlüğü olan numuneler için en uygun yöntemdir.

2.5.3. İyon Değiştirme Kromatografisi

İyon değiştirme kromatografisi, net yükteki farklılıklara dayalı olarak iyonik bileşikleri ayırmak için kullanılır. İyon-değiştirme kromatografisi için ilk önce lazım olan, eğer bir ayırma söz konusu olacaksa, sabit fazın ilgilenilen bileşiklerinkine zıt bir yük taşımasıdır. İyon değiştirici reçinelerini kullanımına dayanan iyonların ayrılması ve tayini için modern ve etkili bir yöntemdir. Ayrılacak bileşiklerin yüküne bağlı olarak iki tip iyon değiştirici vardır. Bileşiklerin negatif yüklü oldukları anyon değiştiriciler ki, bunda iyon değiştirme materyali pozitif bir yük taşıyacaktır. Pozitif yüklü bileşiklerin analizi için ise, negatif yük taşıyan katyon değiştiriciler. İyon kromatografisi, birbiriyle çok benzer olan nadir toprak katyonlarının katyon değiştirici reçinelerle ayrılması için geliştirilen Manhattan projesi sırasında ortaya çıkan iyon-değiştirme kromatografisinin gelişmişidir. Modern HPLC'nin gelişmesi 1960'lı yılların sonunda başladı, ancak bu yöntemlerin iyonik türlere uygulanmaları, alkali katyonlar, toprak alkali katyonlar, halojenürler, asetat, nitrat gibi iyonik türlerin eluatlarının belirlenmesi için genel bir yöntemin eksikliği sebebiyle gecikti. Bu duruma, 1975 yılında, Dow Kimya Sanayi çalışanları tarafından, iyonların kondüktometrik belirlenmesini mümkün kılan bir "çözücü sinyali baskılama" tekniği ile çözüm bulunmuştur (23).

2.5.3.1. İyon Değiştirici Reçineler

İyon değiştirici reçinelerin kullanılması durumunda örnekte iyon halinde bulunan türlerin birbirinden ayrılması sağlanabilir. Kullanılan iyon değiştirici reçineler doğrudan kolona doldurulabilen katı reçineler olabileceği gibi, bir katı yüzeyine kaplanmış sıvı reçineler de olabilir. İyonların bu reçinelere olan ilgilerine etki eden birçok faktör vardır. Bunlar; iyonların yükü ve büyüklüğü, pH, iyon şiddeti, kullanılan reçinenin gözenekliliği, çözücü cinsi, çözücü derişimi ve sıcaklıktır (23).

2.5.3.1.1. Mikrogözenekli veya Jel Yapısındaki Reçineler

Bu reçineler mikro gözenekler içeren, çapraz bağlı yapısal bir ağdan oluşmaktadır. Çok küçük gözeneklere sahip olduğundan polar olmayan çözücü sistemlerinde, şişme çok düşüktür. Büyük hacimlerdeki iyonların tutunması yavaştır ve çoğu kez tersinmezdir (23).

2.5.3.1.2. Makrogözenekli Reçineler

Bu reçineler mikrogözenekli reçinelere ek olarak, geniş büyüklükte gözenekler de içerir. Bunlar büyük iç yüzey alanlarına ve yüksek gözenekliliğe sahiptir. Büyük gözenekler,

farklı büyüklükteki iyonların iyon değiştirici fonksiyonel gruplara kolayca ulaşmasını sağlayan kanallar içerir (23).

2.5.3.1.3. Pelikular Reçineler

Bu reçineler, cam boncuklardan oluşmuş iç kısma, iyon değiştirici ince bir reçine filminin kaplanmasıyla hazırlanır. İç kısmın çapı çok küçüktür ve bu yüzden çözücülerin çok küçük miktarları için uygundur (23).

2.5.3.1.4. Yüzeysel Gözenekli Reçineler

Cam boncuklardan oluşmuş katı iç kısım, üzerine iyon değiştiricinin bağlandığı silika mikroküreciklerinin ince tabakasıyla çevrilir.

HPLC destek maddeleri hem silika temelindeki maddeleri hem de türevlendirilmiş hidrofilik veya hidrofobik polimerleri kapsar. Polimer temelindeki iyon değiştirici reçinelerin polimerik iskeleti polistirene çapraz bağlanmış divinilbenzenden sentezlenir. Bu destek maddelerinin avantajı, pH 2 - pH 12 arasındaki pH aralığında kararlı olmalarıdır. Silika temelinde iyon değiştiren matriksler hidrofiliktir ve polimerik tabaka oluşması için kullanılan çapraz bağlayıcılar yüzünden düşük hidrofobik tutunma gösterirler. Küçük parçacık büyüklükleri ve sık dağılımları yüksek kaliteli bir ayırma sağlar. Gözenekli yüzeylerinden dolayı, hareketli faza önemli bir temas yüzeyi sağlarlar. Kimyasal ve mekanik olarak kararlı olan silika matriksleri, yüksek akış hızı gerektiren yüksek basınca karşı iyi direnç gösterirler.

İyon-değiştirme olayları, çözeltideki iyonlar ve çözünmeyen, yüksek molekül ağırlıklı bir katının yüzeyindeki benzer yüklü iyonlar arasındaki değiştirme dengesi temeline dayanmaktadır. İyon kromatografisinde analit iyonları, uygun bir iyon değiştirici reçine ile doldurulmuş kolonun üstünden ilave edilir. Sonra, reçine yüzeyindeki yüklü gruplara bağlanmak için analit iyonları ile yarışan bir iyon içeren çözelti ile elüsyon yapılır. Bu ayırma işleminde kolonun üst kısmına önce numune konur. Kolonda anyonlar, reçine tarafından aşağıdaki reaksiyona göre tutulurlar. Daha sonra bir seyreltik baz çözeltisi ile elüsyon işlemi yapılarak yukarıdaki reaksiyonun ters yönde yürütmesi sağlanır ve böylelikle anyonlar serbest hale getirilir. Her anyonun dağılma oranı bir diğerinden farklı olduğu için elüsyon esnasında iyonlar birbirinden ayrılır.

İyon kromatografisinin çekici yönlerinden biri, iletkenlik ölçümlerinin, elüsyon ile ayrılan türlerin tanınma ve konsantrasyonlarının tayininde hemen hemen bütün iyonlara

uygulanabilen genel bir metod olmasıdır. İyon değiştirme kromatografisi, Eluent Baskılayıcı Kolonlu İyon-Değiştirme Kromatografi ve Tek-Kolonlu İyon Kromatografi olarak uygulanabilmektedir. Eluent Baskılayıcı Kolonlu İyon-Değiştirme Kromatografisinde, baskılayıcı kolon, analit iyonlarını etkilemeyen, çözücü içindeki iyonları ise iyonlaşması sınırlı olan moleküler türlere etkin bir şekilde dönüştüren, ikinci bir iyon değiştirici reçine ile doldurulmuştur. Katyonlar ayrılacak ve tayin edilecekse, elue edici reaktif olarak çoğu zaman hidroklorik asit seçilir ve baskılayıcı kolon hidroksit formundaki bir anyon-değiştirici reğinedir. Anyon ayrırmaları için baskılayıcı dolgusu, asit formundaki katyon-değiştirici reğinedir. Orijinal baskılayıcı kolonlarda karşılaşılan bir zorluk, dolgu maddelerini orijinal asit ve baz formlarına dönüştürmek için periyodik olarak (tipik olarak her 8 - 10 saatte bir) rejenere etme gereğidir. Yöntem çok hızlıdır. Tek-Kolonlu İyon Kromatografisi, elue edilmiş numune iyonları ve kullanılan elue edici iyonlar arasındaki küçük iletkenlik farklarına dayanmaktadır. Bu farkları büyötmek amacıyla, düşük eşdeğer iletkenliği bulunan türlerle elüsyonu mümkün hale getiren, düşük kapasiteli iyon değiştiriciler kullanılır. Tek-kolonlu kromatografi, baskılayıcı kolonlu iyon kromatografije göre daha az duyarlıdır ve kullanım aralığı daha dardır (23).

2.5.3.2. İyon-Eleme Kromatografisi

İyon-eleme kromatografisi, iyonlardan çok nötral türlerin ayrılmasından dolayı iyon kromatografisinin bir formu değildir. Buna rağmen, iyon-eleme kromatografide, ayrırmalar için iyon kromatografisi gibi iyon-değiştirici kolonlar kullanılır. Burada, durgun faz, asidik yapıdaki bir katyon değiştirici reğinedir ve elüsyon işlemi seyreltik hidroklorik asit çözeltilisi ile geręekleřtirilir. Analitik kolonu baskılayıcı kolon takip etmektedir ve bu kolon içine gümüş formunda katyon değiştirici reçine doldurulmuştur. Eluent içindeki hidrojen iyonları, gümüş iyonları ile yer değiştirir ve bu, daha sonra klorür ile çöker. Böylece eluentten gelen bozucu iyonlar uzaklaşmış olur. İyonlaşmamış haldeki analit asitler kolondaki hareketli faz ve dolgu maddesinin gözeneklerinde tutulan hareketsiz sıvı arasında dağılmaya uğrar. Gerçi bu iki faz arasında farklı türlerin dağılımına diğer faktörler de etki eder, ama farklı asitler için dağılma katsayısı, öncelikle bunların iyonlaşma sabitleri ile ters orantılıdır (23).

2.5.4. Yüksek Performanslı Boyut Ayırıcı Kromatografi

Bu metod kolon dolgu materyali üzerinde bir örneğin alıkonmasını içermemesiyle daha önce açıklananlardan farklılık gösterir. Ayırma mekanizması, değişik moleküllerin poröz bir ortam (matrix) içinden geçerken farklı difüzyon veya permeasyon hızlarına dayanır. Jel-geçirgenlik veya jel-süzme kromatografi adı verilen boyut-eleme kromatografi, özellikle yüksek mol kütleli türlere uygulanabilen güçlü bir tekniktir. Boyut-eleme kromatografi için dolgu maddeleri, çözünen madde ve çözücü moleküllerinin içine difüzlenebileceği düzgün bir gözenek ağı içeren küçük boyutlu ($\approx 10\text{-}\mu\text{m}$) silis veya polimer partiküllerden meydana gelmiştir. Bu gözeneklerde moleküller, hareketli fazın akışı esnasında etkin bir şekilde tutulur ve sonra bırakılır. Ortalama gözenek büyüklüğünden önemli ölçüde daha büyük moleküller, dolgu maddesi tarafından tutulmazlar ve bu moleküller için tutulma süresinden bahsedilemez. Böylece bu moleküller kolondan hareketli fazla aynı hızda geçerler. Ortama gözenek büyüklüğünden önemli ölçüde daha küçük moleküller ise, dolgu maddesinin gözeneklerine girerek en uzun bir süre için alıkonulur; bunlar en son elue edilirler (23).

Piyasada çok sayıda boyut-ayırıcı dolgu maddesi bulunmaktadır. Bunların bazıları hidrofiliktir ve sulu hareketli fazlarla kullanılabilir. Hidrofobik olanları ise apolar organik çözücülerle kullanılır. Hidrofilik dolgu maddelerinin kullanıldığı kromatografiye jel süzme kromatografisi, hidrofobiklerin kullanıldığı kromatografiye ise jel geçirgenlik kromatografisi olarak adlandırılmaktadır. Boyut-eleme kromatografi için iki tip kolon dolgusundan bahsedilir. Bu iki tür kolon dolgu maddesinin her ikisinde de gözenek çapı 5-10 μm olan dolgu maddeleri kullanılır. Bu dolgu maddeleri, polimer ve silis esaslı partiküllerden oluşur. Silis esaslı partiküllerin avantajları, kolay doldurma ve yüksek basınçlarda çalışmaya uygunluk sağlayan nispeten yüksek sağlamlık, su dahil, geniş bir çözücü aralığında kullanıma izin veren daha büyük kararlılık yeni çözücülerle çok daha hızlı dengeye erişme ve yüksek sıcaklıklardaki kararlılıktır. Silis esaslı partiküllerin sakıncası, çözünen maddeleri adsorpsiyonla alıkoymasına meyilli ve çözünen madde moleküllerinin bozunmalarını katalizlemesidir.

Boyut-eleme yöntemleri, jel süzme kromatografi ve jel geçirgenlik kromatografidir. Jel süzme kromatografide, sulu çözücüler ve hidrofilik dolgu maddeleri kullanılır. Genellikle suda çözünen maddelere uygulanabilir. Jel geçirgenlik kromatografide polar olmayan organik çözücüler ve hidrofobik dolgu maddeleri kullanılır ve daha az polar olan organik

çözücülerde çözünen numunelere uygulanır. Boyut-eleme kromatografinin diğer bir uygulaması, yüksek mol kütleli doğal ürün moleküllerinin, düşük mol kütleli türlerden ve tuzlardan ayrılmasıdır.

Kısa ve belirli ayırma zamanları, iyi bir duyarlılık sağlayan dar pikler, çözünen maddelerin durgun fazla etkileşmemeleri sebebiyle numune kaybı olmaması, çözünen madde ve dolgu maddesinin etkileşmesine bağlı kolon deaktivasyonunun olmayışı bu kromatografik yöntemin avantajları ve kromatogramların zaman skalası kısa olduğundan dolayı, sadece sınırlı sayıda pik elde edilebilmesi ve izomerler gibi benzer büyüklükteki numunelere bu yöntem uygulanamaması, genellikle uygun ayırmalar için mol kütleleri arasında % 10 farka ihtiyaç olması dezavantajlarıdır (21).

2.6. HPLC KULLANIRKEN ALINMASI GEREKEN ÖNLEMLER

2.6.1. Hareketli Faz Çözücülerini İçin Önlemler

Farklı dolgulu kolonlar için çözücü sınırlaması: Silika dolgulu bir kolon kullanıldığında, kullanılan hareketli fazın pH'ına dikkat edilmelidir. Uygun pH aralığı 2 - 7.5 arasındadır. Gözenekli polimere sahip bir kolonun çözücüsünü değiştirirken, kolon maddesinde şişme veya büzülme olup olmadığına dikkat edilmelidir. Dolgu maddesinin şişmesi, su yüzdesiyle artar. Asit, baz, tuz veya iyon çifti reaktifi kullanıldıktan sonra kolon, metanol/su karışımı ile temizlenmelidir.

Çözücünün saflığı: HPLC'de kullanım için mümkün olan en yüksek saflıktaki çözücüler kullanılmaktadır.

Çözücünün degaze edilmesi: HPLC'de hareketli fazda yüksek basınç altında hava çözünürse, pompa başında veya dedektör hücresinde doğru analize imkân vermeyen hava kabarcıkları oluşur. Ayrıca bu hava dedektörde yanlış ölçüme neden olabilir. Bu yüzden mobil faz olarak kullanılan çözücü tamamen degaze edilmelidir. Degaze işlemi özellikle, gazların kolayca çözündüğü su, alkol ve asetronitril veya bunların karışımı için mutlaka gereklidir.

Çözücünün süzülmesi: HPLC çözeltileri, kullanılmadan önce daima süzülmalıdır. Eğer süzülmeden kullanılırlarsa, kolon filtresi ve kolon başı tıkanabilir. Bunun sonucunda duyarlılığın azalması, basıncın artması ve kolon ömrünün azalması gibi değişik problemler ortaya çıkabilir. Sulu ortamda süzme genellikle selüloz ester karışımı 0.22

μm gözenek büyüklüğüne sahip filtrelerle, organik ortamda süzme ise 0.20 μm gözenek büyüklüğündeki politetrafloroetilen filtrelerle yapılır veya HPLC çözücüsü için özel süzme aleti kullanılabilir.

Çözücülerin değişimi: Eğer çözücü değiştirilecek olursa, diğer çözelti ilkiyle iyi karışabilir olmalıdır. Bu durum yalnızca pompanın düzensiz çalışmasına yol açmaz, aynı zamanda kolon ve dedektörü de kararsız hale getirir. Bir tampon kullanıldıktan hemen sonra organik bir çözücü kullanılırsa, HPLC sistemi tuzların çökmesi yüzünden çalışamaz hale gelir. Bu kolonun ömrünü de etkileyebildiğinden, organik çözücü kullanılmadan önce sistem su veya ara polaritede bir çözücü ile temizlenmelidir (21).

2.6.2. Kolon Kullanımı İçin Önlemler

Kolon seçimi: Örneğin molekül kütlesi, solvent sisteminin çözünürlüğü, ayırma modu gibi bilgiler performanslı bir ayırmadan önce kolon seçimine yardım eder. Üreticiler kolon dolgu maddelerini, ayırdıkları bileşikler, örnek kapasiteleri vb. şekilde sınıflandıran bir literatür vermektedir.

Ön-kolon kullanımı: Hareketli faz, pompa çıkışından sonra, ayırmayı sağlayan kolon ile aynı sabit fazı içeren bir ön-kolondan geçirilir. Bu uygulamanın amacı, hareketli fazdaki safsızlıkları toplamak ve hareketli fazı sabit faz ile doygunluğa getirmektir. Ön-kolon kullanmanın bir diğer avantajı ise fiyatları bir hayli yüksek olan ayırıcı kolonların ömrünü uzatmasıdır. Ancak burada ayırma olmamasına dikkat edilmelidir.

Kolon tabakasının bozulması: HPLC sistemi yeni çalıştırılınca akış hızı yavaş yavaş artırılmalıdır. Aynı uygulama sistem kapatılırken de izlenmelidir. Böylece kolon tabakasının bozulmaksızın kolon basıncının artması sağlanır.

Kolonun korunması: Kolonlar rutubetli ve çok yüksek veya çok düşük sıcaklıkların olduğu yerlerde saklanmamalıdır. Kolonların özel bir çözücü ile saklanması, kirlenmeyi azaltır ve kolon ömrünü artırır. Bazı tamponlar (özellikle halojen tuzlarını içeren tamponlar) kolonun paslanmaz çelik duvarını aşındırır. Bu nedenle kolon saklanmadan önce uygun bir çözücüyle temizlenmelidir.

Kolonun rejenerasyonu (yenilenmesi): Kolon performansı azaldığında en iyisi kolonu rejenere etmektir. Normal faz kolonları kullanıldığında, kolon önce çok az polarlıkta bir çözücü geçirilerek yenilenebilir ve sonra tekrar hareketli fazla dengeye getirilir. Ters faz kolonları metanol, THF, CH_2Cl_2 gibi çözücülerle yenilenebilir (21).

2.6.3. Örnek Hazırlanması

2.6.3.1. Katı Örnekler

Bir örneği HPLC sistemine vermek için, bu örneğin, hareketli faz olarak kullanılan çözücüde çözünmesi gerekir. Örneğin, metanol/su karışımı bir hareketli fazla ile analiz yapılacaksa, örnek metanolde, suda veya metanol/su karışımında çözülmalıdır. Eğer örnek böyle bir çözücüde çözünmüyorsa, diğer bir çözücüde çözünmeli, fakat bu durumda kullanılan çözücü kesinlikle hareketli fazla karışabilir olmalıdır. Örnek bileşenlerinin, mobil faz çözücüsünde çökmemesine de dikkat edilmelidir.

2.6.3.2. Sıvı Örnekler

Sıvı örneklerde çözücü, sistem ile uyumluysa, doğrudan enjekte edilebilir. Eğer örnekler istenen çözücüde değilse veya enjekte edilecek kadar derişik değilse, kurutulmalıdır veya deriştirilmelidir. Daha sonra hareketli fazda tekrar çözünmelidir.

2.6.3.3. Örneklerin Süzülmesi

Hareketli faz akışında azalmaya, geri basıncında artmaya, kolon veriminde azalmaya ve istenmeyen piklere neden olabilecek çözünmeyen maddelerin kolona girmesini önlemek için, örneğin enjeksiyondan önce süzülmesi tavsiye edilir (21).

2.7. YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOGRAFİDE YÖNTEM GELİŞTİRME

Sıvı kromatografik bir yöntemin geliştirilmesinde üzerinde durulacak en önemli husus, yeterli ayırmaya ulaşıldığının belirlenmesidir. Bu yöntemler, genellikle mobil fazın bileşiminin (su-organik faz oranı) optimize edilmesinde kullanılır. Yüksek performanslı sıvı kromatografide ayırmanın optimizasyonu, seçiciliğin maksimum hale getirilmesini gerektirir.

Kromatografik sistemin seçiciliği, kromatografik sistemde çözünen, mobil faz bileşenleri ve durgun faz arasındaki bütün etkileşimleri yansıtır. Bu etkileşimler, sıcaklık, mobil fazın yapısı gibi deneysel koşulların deriştirilmesiyle yönetilebilir. Seçicilik, çözünenlerin dağılma katsayıları ile ilgilidir ve çözünenlerin kapasite faktörlerinin bir fonksiyonudur. Bu nedenle çözünenlerin alıkonma davranışlarını ve onların deneysel koşullara bağımlılığını anlamak, seçiciliğin ve devamında ayırmanın optimizasyonu için gereklidir.

Çözünenlerin alıkonma davranışını kontrol eden önemli deneysel parametreler, sıcaklık, mobil faz bileşimi ve mobil faz pH'sıdır. Birçok durumda sıcaklık, mobil faz organik modifiyer derişimi ve pH değerlerinin kapasite faktörü üzerindeki etkileri incelenerek, deneysel parametreler arasındaki bağıntılar anlaşılmaya çalışılır. Bu çalışmalarda, pH ve organik modifiyerin sabit olması sağlanarak sıcaklık değişiminin etkisi; pH ve sıcaklığın sabit olması sağlanarak organik modifiyerin etkisi ve organik modifiyer ve sıcaklığın sabit olması sağlanarak pH değişiminin etkisi incelenir (41).

2.8. HPLC'NİN UYGULAMA ALANLARI

HPLC, yapıları benzer kimyasal türlerin ayrılması ve saflaştırılması işlemlerinde güçlü ve kullanışlı bir araçtır. Buna ek olarak ayrılan türlerin kalitatif ve kantitatif analizlerinde de kullanılan bir yöntemdir (37).

HPLC günümüzde başlıca kullanım alanları; kimya, biyokimya, biyoteknoloji, farmakoloji, tıp kimyası, bitki kimyası, tarım ve kimya mühendisliğini içeren alanlarda ayırma ve analiz için vazgeçilmez bir araçtır. Bunlar yanında organik, inorganik ve biyolojik bileşenler, polimerler, kiral bileşenler, küçük iyonlar ve makromoleküllerin ayrılması, safsızlık tayini, buharlaşabilen ve buharlaşmayan yapıların tayini, nötral, iyonik ve çift iyonik türlerin tayini ve bileşen izolasyonu ve saflaştırılmasıdır.

Kimyasal ayırma, ilaçların önemli kimyasalların saflaştırılmasında, kimyasal sentezlerde, kullanılan bir yöntemdir. Kromatografi karışımların ayrılması için mükemmel bir teknik olmasına karşın ayrılmış bileşiklerin kesin teşhisi için gerekli detayları sağlayamaz.

HPLC'nin yaygın uygulamaları;

1. Fizyolojik örneklerdeki bazı aminoasit, nükleik asit ve protein miktarlarının tayini
2. İlaç aktif maddelerinin, sentetik biyoürünlerin ya da farmasötik ilaçlardaki bozunma ürünlerinin tayini
3. Pestisit ve insektisit ve diğer çevresel örneklerin tayini
4. Karışımlardaki bileşenlerin ayrılması
5. Kalite kontrolü
6. Bir karışımdaki polimerlerin moleküler ağırlık dağılımının belirlenmesidir.

HPLC tekniği ne kadar gelişmiş ve yaygın bir teknik olsa da bazı sınırlamaları vardır:

1. Bileşenlerin tanımlanması, bazı durumlarda kütle spektrometresi ile kombine edilmemiş olan HPLC kullanıldığında yeterli olmayabilmektedir.
2. Karmaşık örneklerde iyi çözünürlük sağlamak zor olabilmektedir
3. Aynı anda sadece bir örnek analiz edilebilmektedir (21).

2.9. pH ÖLÇÜMÜ

pH ölçümü, gıda ürünlerinin kalite kontrolünde yer alan en önemli parametrelerden biridir. pH, örneğin turunçgil meyveleri, meyvesuları ve süt ürünleri gibi doğal ürünlerin kalitesi hakkında bilgi elde edilmesini sağlar. pH aynı zamanda, asidite regülatörleri ve koruyucuların kullanımı açısından da önemli bir parametredir.

Ölçüm için kullanılacak olan pH elektrodunun gereksinimleri, analizleri gerçekleştirilecek gıdalar kadar çeşitlilik göstermektedir. Örnek için uygun bir diyaframın seçilmesi özellikle önemlidir, çünkü aksi taktirde elektrolit köprüsü örneğin kendisi nedeni ile hızlatılabilmekte ve hatalı ölçümlere yol açabilmektedir (22).

Bizim çalışmamızda Batu A., Karagöz D.D., Kaya C., ve Yıldız M.,'nin kullandığı metot ile pH tayini yapıldı (6).

2.10. TOPLAM ASİTLİK

Meyvelerin tadı, yapılarında bulunan asit/seker oranına bağlıdır ve meyve türüne, çeşidine bağlı olarak değişebilmektedir. Sıvı pekmezlerde zamanla sekerin bir kısmı dibe çökmekte ve üst kısımda seker miktarı azaldığından ekşime ve şaraplaşma meydana gelmektedir ve böylece asitlik artmaktadır. Çalışmamızda Güngör N.'ün kullandığı asitlik tayin metodu uygulanmıştır (42).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 MATERYAL

Bu çalışmada materyal olarak kullanılan pekmez örnekleri kayseri yöresinden toplanan farklı kazan pekmezleridir. Toplanan örnekler +4 °C'de analize kadar muhafaza edilmiştir. Örnek hazırlama işlemlerinin yapıldığı gün, analizler tamamlanmıştır.

3.2. KULLANILAN CİHAZLAR

Tezin çalışılması sırasında kullanılan cihazlar aşağıda belirtilmiştir.

HPLC: HMF analizlerinin yapılmasında AGILENT marka 1100 seri HPLC cihaz kullanılmıştır. Ayırmalarda 5 µm partikül boyutlu, 4,6 mm iç çapa sahip, 150 mm uzunluğundaki C18 kolon (Eclipse XDB-C18, USA) kullanılmıştır.

Kombine cam elektrotlu pH metre: Pekmez örneklerinin pH'larını kombine cam elektrotlu WTW 340I model sıcaklık kontrollü pH metre ile yapılmıştır. pH metre'nin kalibrasyonu cihazın üretici firması tarafından verilen sertifikalı pH 4,01 (Model:stp4,order no:108705), 7,00 (Model:stp8,order no:108706) ve 10,01 (Model:stp10,order no:108722) teknik tamponları kullanılarak yapılmıştır.

Deiyonize Su Cihazı: Tüm çözme ve seyreltmelerde kullanılan deiyonize su, UV lambalı Millipore marka Elix 5® model deiyonize ters osmos cihazından temin edilmiştir. Cihazdan elde edilen saf su 14 MΩ cm⁻¹ direncindedir. Elde edilen su CO₂ adsorplanmasını engellemek için ağzı kapalı kaplarda muhafaza edilmiştir.

Analitik Terazî: Pekmez örneklerinin ve diğer kimyasal maddelerin tartımı 0,0001 g duyarlıklı, maksimum 210 g'a kadar tartabilen Ohaus marka EP214C model analitik terazide yapılmıştır.

Karıştırıcı: Seyrelme sonrası homojenliği sağlamada Heidolph marka 3001 K model manyetik karıştırıcı kullanılmıştır.

Etüv: Temizlenen malzemelerin kurutulmasında Nüve marka FN 120 model etüv kullanılmıştır.

Buzdolabı: Pekmez örnekleri ve standart HMF Profilo marka BD4602 model buzdolabında saklanmıştır.

3.3 KULLANILAN KİMYASAL MALZEMELER

Çalışmada kullanılan kimyasallar analitik saflıkta olup aşağıda belirtilmiştir.

Metanol, (%99,8; $d=1.032 \text{ g mL}^{-1}$) Merck (Darmstadt, Germany) firması tarafından üretilmiştir.

Asetik asit, (%99,7; $d=1.266 \text{ g mL}^{-1}$) Merck (Darmstadt, Germany) firması tarafından üretilmiştir.

HMF standartları SAFC firması tarafından üretilen $1,243 \text{ g mL}^{-1}$ yoğunluğundaki, en az % 99 saflıkta (Cas No: 67-47-0) olan standarttan hazırlanmıştır.

Titrisol NaOH :0,1 M NaOH Merk firması tarafından üretilmiştir.

Örneklerin Toplanması ve Saklanması

Kayseri ve yöresinden toplam 100 üzüm pekmezi örneği 100 g'lık polietilen kaplara alınmıştır. Toplanan örnekler aynı gün laboratuara getirilerek analize kadar +4 °C'de buzdolabında saklanmıştır.

3.4. YÖNTEM

3.4.1. HMF Analizi

3.4.1.1. Örneklerin Hazırlanması

Yaklaşık 2 g pekmez örneği (0,0001 g duyarlıkla) bir beherde tartılıp, yaklaşık 10 mL deiyonize su ile sallamalı karıştırıcı karıştırılarak çözüldü. Çözülen örnek 25 mL'lik bir balon jojeye aktarıldı. Beherde kalan kalıntı deiyonize su ile yıkanarak balon jojeye eklendi. 25 mL'ye deiyonize su ile tamamlandı. Hazırlanan bu çözelti 0.20 μm gözenek

çaplı tek kullanımlık filtrelerden süzüldü. Süzüntüden alınan örnek HPLC'ye (20 µL) enjekte edildi. Her örnek iki paralel enjekte edilmiştir.

3.4.1.2. HPLC Metodunun Oluşturulması

HPLC için metot Zappala ve arkadaşları tarafından yayımlanan makalenin hareketli faz akış hızı değiştirilerek uygulandı (44). Sabit faz olarak 4,6x150 mm'lik C18 kolon, mobil faz olarak % 1'lik asetik asit- metanol (9:1 oranında) karışımı kullanıldı. Tayin DAD dedektör ile 285,0 nm dalga boyunda yapıldı. Hareketli fazın akış hızlarının metoda etkisi 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1 ve 1,2 mLdak⁻¹ akış hızları denenerek kontrol edildi. Optimum akış hızı 1,0 mL dak⁻¹ olarak seçildi.

3.4.1.3. HPLC Metodunun Doğruluğunun Belirlenmesi

Pekmez örneklerindeki HMF miktarının tayininin doğruluğunu belirlemek için bir pekmez örneğine örnek hazırlama işleminden önce, son hacimde 1,0, 2,0, 6,0 µg mL⁻¹ olacak şekilde HMF ilave edilmiştir. Hiç ilave yapılmamış örnek ve HMF ilave edilen örnekler ayrı ayrı Bölüm 3.4.1.1'de anlatılan örnek hazırlama işlemine tabi tutulmuştur. Bu şekilde hazırlanan örneklerin analizleri Bölüm 3.4.1.2'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Örneklerdeki HMF miktarı, HMF standartları kullanılarak hazırlanan kalibrasyon doğruları kullanılarak tayin edilmiştir.

3. 4.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması ve Kalibrasyon Doğrusunun Çizilmesi

Öncelikle standart HMF'den 100 µgmL⁻¹'lik stok HMF çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltiden belirli hacimlerde alınıp seyreltilerek 0,25, 0,50, 1,00, 2,00 ve 5,00 µgmL⁻¹ derişimlerinde standart çalışma çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltiler kullanılarak Bölüm 3.4.1.2.'de anlatılan kromatagrafik şartlarda kalibrasyon doğruları çizildi.

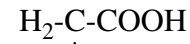
3.4.2 pH Tayini

pH cihazı ölçümden önce pH tamponları (pH 4,01, 7,00 ve 10,01) ile kalibre edildi. Örnekler bir beher içinde bire bir oranında deiyonize su (pH'sı yaklaşık 7 olan) ile seyreltildi. Beher karıştırıcı üzerine konulup homojenliği sağlandı. pH cihazının probu homojen haldeki örnek içine daldırılarak değerler kaydedildi. Her ölçüm sonrasında deiyonize su ile probu temizlendi ve kurulandı.

3.4.3. Asitlik Tayini:

Yaklaşık 2 g (0,0001 duyarlıklı) pekmez örneği tartıldı ve son hacim 25 mL ye deiyonize su ile tamamlandı. Örnekler titre edilerek harcanan NaOH miktarları kaydedildi. Kör analiz için, 25 mL deiyonize su 0.1 mol L⁻¹ NaOH ile titre edildi. Toplam asitlik miktarı sitrik asit cinsinden aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$$X \left(\frac{V_{\text{harcanan}} - V_{\text{kor}}}{g_{\text{örnek}}} \right)$$



Sitrik asit

$$\text{Ma} = 240,0 \text{ g mol}^{-1} \quad \text{Meg} = 0,2101/3 = 0,0700 \text{ g}$$

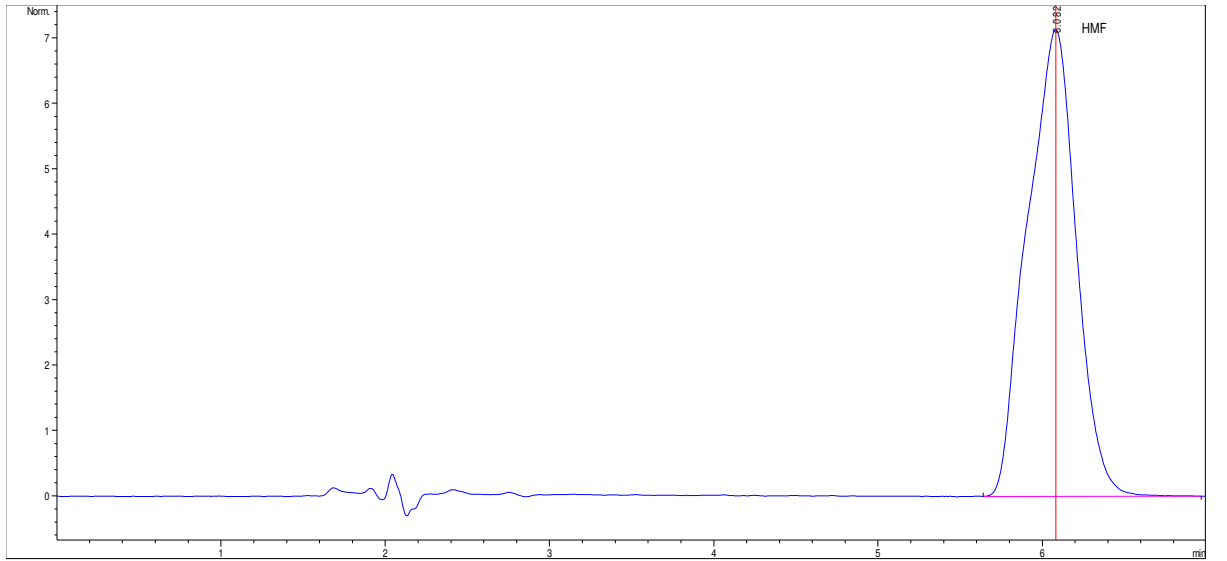
X: Sitrik asitin milieşdeğer ağırlığı = 0,07 g

V: Harcanan NaOH hacmi

4. BULGULAR

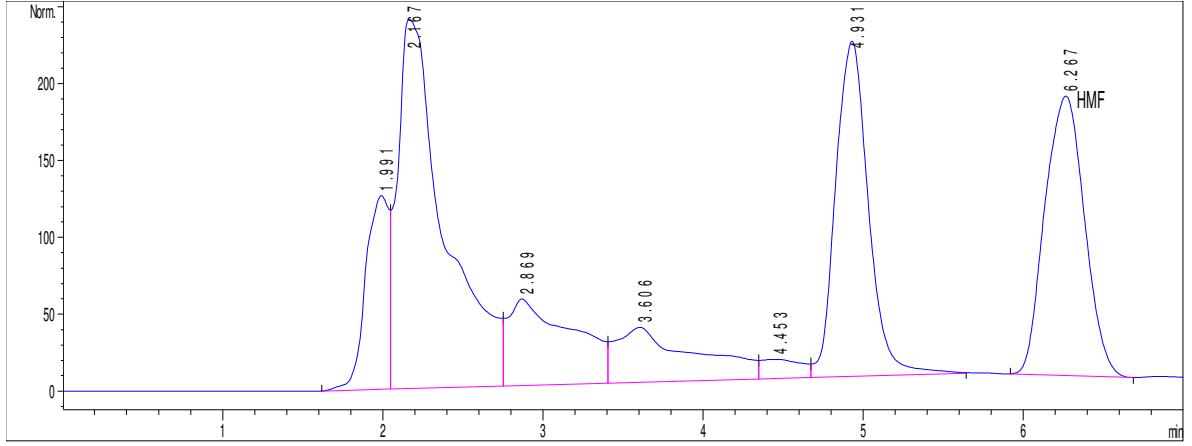
4.1. KROMATOĞRAFİK ŞARTLAR

HPLC şartları Zappala ve arkadaşları tarafından yayımlanan makalenin akış hızı artırılarak uygulanmıştır. En uygun akış hızı $1,0 \text{ mL dk}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Dalga boyu ölçümleri DAD ile $285,0 \text{ nm}$ 'de kaydedilmiştir. HMF pikinin çıkış süresi $6,15 \pm 0,1 \text{ dak. (N:21)}$ olarak tesbit edilmiştir. $0,75 \mu\text{g mL}^{-1}$ derişimindeki HMF standardının kromatogramı Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. HMF standart görüntüsü

Pekmez örneğinin kromatogramı ise Şekil 4.2’de görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi pekmez örneğinde de iyi bir ayrılma görülmüştür. Hazırlanan çalışma çözeltilerinin sinyalleri Diyod Array Dedektör ile kaydedildi.



Şekil 4.2. Pekmez örnek kromatogramı

4.1 YÖNTEMİN DOĞRULUĞU VE KALİBRASYON EĞRİSİ

Yöntemin doğruluğu bir pekmez örneğine bilinen miktarlarda HMF eklenerek doğrulandı. Geri kazanma değerleri aşağıdaki formül ile hesaplandı.

$$\% \text{ Geri Kazanma} = \frac{\text{Bulunan HMF miktarı} - \text{Pekmezdeki HMF Miktarı}}{\text{Eklenen HMF Miktarı}} \times 100$$

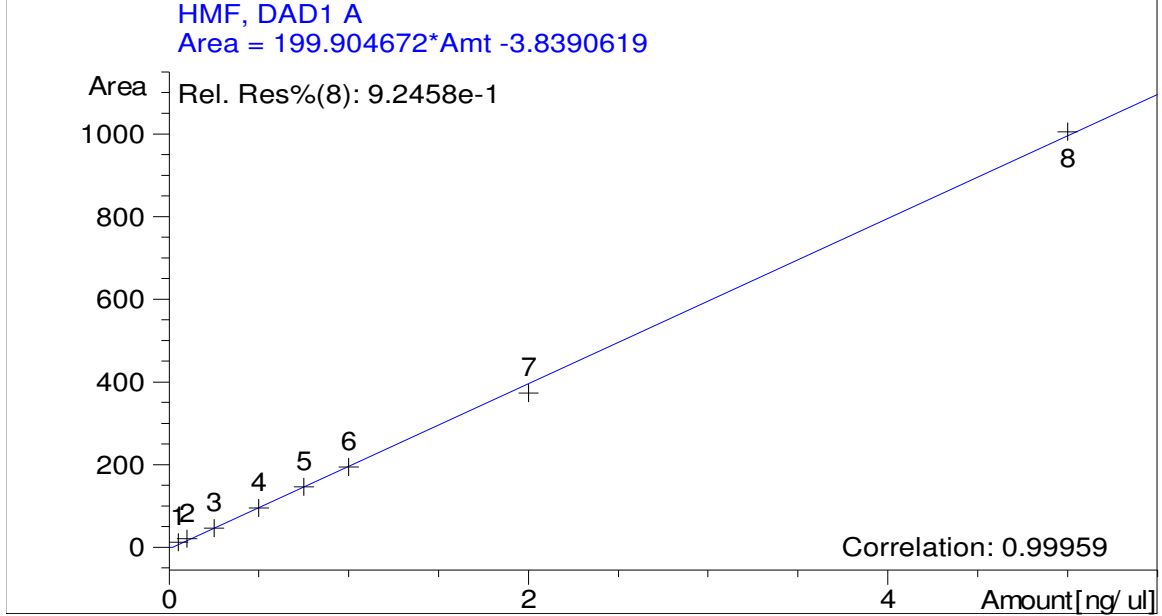
Elde edilen sonuçlar Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1: Pekmez örneğine HMF ilavesi ve geri kazanım değerleri

Eklenen HMF, $\mu\text{g mL}^{-1}$	Bulunan HMF, $\mu\text{g mL}^{-1}$	% Geri Kazanma
0,0	4,4 $\pm$ 0,3	-
1,0	5,4 $\pm$ 0,3	100
2,0	6,2 $\pm$ 0,1	90
6,0	10,6 $\pm$ 0,1	103

4.2. KALİBRASYON DOĞRUSUNUN ÇİZİLMESİ

HMF analizlerinin yapılabilmesi için 0,25- 5,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ aralığındaki standart HMF çözeltileri kullanılarak kalibrasyon doğruları türetilmiştir. Elde edilen kalibrasyon doğrusu Şekil 4.3’de verilmiştir. Kalibrasyon doğrusunun korelasyon katsayısı en az 0,99’dur.



Şekil 4.3. Kalibrasyon doğrusu

4.3. PEKMEZ ÖRNEKLERİNİN HMF, PH VE TOPLAM ASİTLİK

Toplanan pekmez örnekleri ile ilgili elde edilen sonuçlar aşağıdaki tabloda verilmiştir. Mevcut örneklerin pH, toplam asitlik (sitrik asit cinsinden) standart sapmaları ile birlikte HMF değerleri Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.2. Pekmez örnekleri ile ilgili elde edilen sonuçlar (n:2)

Örneğin Alındığı Yer	HMF Miktarı ($\mu\text{g g}^{-1}$)	pH	Sitrik asit cinsinden toplam asitlik ($\mu\text{g g}^{-1}$)
1. Yeşilhisar	141.6 $\pm$ 1.6	4.56	77.0
2. Yeşilhisar	32.9 $\pm$ 0.0	5.03	59.5
3. Yeşilhisar	53.6 $\pm$ 0.9	5.04	56.0
4. Yeşilhisar	6.9 $\pm$ 0.9	5.57	49.0
5. Yeşilhisar	5.0 $\pm$ 0.0	5.06	56.0
6. Yeşilhisar	31.0 $\pm$ 1.8	5.57	49.0
7. Yeşilhisar	20.0 $\pm$ 2.6	5.20	59.5
8. Yeşilhisar	16.2 $\pm$ 0.0	5.01	63.0
9. Yeşilhisar	13.7 $\pm$ 0.0	5.18	49.0
10. Yeşilhisar	68.7 $\pm$ 0.9	4.30	94.5
11. Yeşilhisar	37.2 $\pm$ 0.0	4.23	98.0
12. Yeşilhisar	120.4 $\pm$ 0.8	5.30	56.0
13. Yeşilhisar	20.6 $\pm$ 2.6	5.20	59.5
14. Yeşilhisar	10.1 $\pm$ 0.1	5.30	56.0
15. Hacılar	70.8 $\pm$ 0.0	5.09	52.5
16. Hacılar	87.1 $\pm$ 0.0	5.15	49.0
17. Hacılar	35.7 $\pm$ 0.9	5.13	49.0
18. Hacılar	46.0 $\pm$ 0.9	4.95	80.5
19. Hacılar	25.5 $\pm$ 0.9	5.52	49.0
20. Hacılar	172.9 $\pm$ 0.9	4.56	91.0
21. Hacılar	75.0 $\pm$ 0.9	5.14	45.5
22. Hacılar	70.3 $\pm$ 0.9	5.00	56.0
23. Hacılar	103.5 $\pm$ 1.8	5.10	52.5
24. Kayseri (Işık Meydanı)	87.0 $\pm$ 0.0	5.10	52.5
25. Kayseri(İncelik Bağı)	62.2 $\pm$ 0.9	5.64	45.5
26. Kayseri (Gömeç)	74.8 $\pm$ 0.9	5.04	56.0
27. Kayseri (Sakarbeğendikbağları)	49.0 $\pm$ 0.9	5.50	49.0
28. Erkilet	73.1 $\pm$ 0.8	5.21	52.5
29. Erkilet	52.3 $\pm$ 6.1	4.90	84.0
30. Erkilet(Ebiç Köyü)	24.8 $\pm$ 0.0	5.50	49.0
31. Erkilet	69.9 $\pm$ 0.0	5.63	45.5
32. Erkilet	11.3 $\pm$ 0.8	5.16	52.5
33. Erkilet	12.1 $\pm$ 0.0	5.17	56.0
34. Erkilet	30.3 $\pm$ 0.9	5.17	56.0
35. İncesu(Garipçe)	20.6 $\pm$ 0.9	5.14	56.0

Tablo 4.2. Pekmez örnekleri ile ilgili elde edilen sonuçlar (n:2) (devamı)

Örneğin Alındığı Yer	HMF Miktarı ($\mu\text{g g}^{-1}$)	pH	Sitrik asit cinsinden toplam asitlik ($\mu\text{g g}^{-1}$)
36. İncesu(Saraycık)	31.7 $\pm$ 3.4	5.19	56.0
37. İncesu	94.4 $\pm$ 0.0	4.94	80.5
38. İncesu(Saraycık)	61.4 $\pm$ 0.9	4.85	80.5
39. İncesu	25.0 $\pm$ 0.0	5.30	52.5
40. İncesu	71.8 $\pm$ 0.0	4.96	80.5
41. İncesu	53.1 $\pm$ 0.8	4.78	84.0
42. İncesu(Garipçe)	144.2 $\pm$ 0.9	4.84	84.0
43. İncesu	60.1 $\pm$ 0.8	4.75	87.5
44. İncesu	50.6 $\pm$ 0.9	5.07	56.0
45. İncesu(Subaşı)	49.8 $\pm$ 0.8	5.27	52.5
46. İncesu (Karahöyük)	52.6 $\pm$ 0.0	5.17	56.0
47. İncesu(Hamurlu)	25.5 $\pm$ 0.0	4.78	77.0
48. İncesu	33.6 $\pm$ 0.9	5.10	56.0
49. Pınarbaşı	64.6 $\pm$ 3.5	4.84	73.5
50. Pınarbaşı(Pazarören)	59.6 $\pm$ 0.0	5.09	59.5
51. Pınarbaşı	101.9 $\pm$ 0.8	4.92	80.5
52. Pazarören	27.2 $\pm$ 0.9	5.09	59.5
53. Pazarören Köyü	20.1 $\pm$ 0.9	5.13	56.0
54. Yahyalı	22.8 $\pm$ 0.9	5.03	56.0
55. Yahyalı	60.9 $\pm$ 0.0	5.04	56.0
56. Yahyalı	33.8 $\pm$ 0.0	5.28	52.5
57. Yahyalı	70.2 $\pm$ 1.7	5.18	56.0
58. Yahyalı	3.0 $\pm$ 0.0	5.18	56.0
59. Sarioğlan(Muratlı)	183.8 $\pm$ 1.8	5.31	52.5
60. Sarioğlan	35.0 $\pm$ 0.0	5.20	56.0
61. Sarioğlan	32.8 $\pm$ 1.7	5.02	56.0
62. Sarioğlan	37.2 $\pm$ 4.3	5.04	56.0
63. Sarioğlan	140.6 $\pm$ 1.7	4.70	77.0
64. Gesi	54.0 $\pm$ 1.7	5.15	56.0
65. Gesi	174.1 $\pm$ 1.7	4.87	73.5
66. Bünyan	47.6 $\pm$ 3.4	5.04	56.0
67. Emmiler Köyü	35.6 $\pm$ 1.7	5.08	56.0
68. Özvatan	73.5 $\pm$ 0.0	4.87	73.5
69. Akkışla	19.4 $\pm$ 1.7	5.27	52.5
70. Bayramhacıköyü	43.5 $\pm$ 0.9	5.05	56.0
71. Himmetdede	3.2 $\pm$ 1.6	5.20	52.5

Tablo 4.2. Pekmez örnekleri ile ilgili elde edilen sonuçlar (n:2) (devamı)

Örneğin Alındığı Yer	HMF Miktarı ($\mu\text{g g}^{-1}$)	pH	Sitrik asit cinsinden toplam asitlik ($\mu\text{g g}^{-1}$)
72. Himmetdede	79.2 $\pm$ 8.8	5.03	56.0
73. Talas	60.1 $\pm$ 0.9	4.90	80.5
74. Sarız	56.1 $\pm$ 1.7	5.10	56.0
75. Sarız	50.3 $\pm$ 0.8	4.70	84.0
76. Sarız	47.8 $\pm$ 0.0	5.30	52.5
77. Sarız	50.3 $\pm$ 0.8	4.70	77.0
78. Sarız	4.3 $\pm$ 0.1	4.70	77.0
79. Felahiye	36.5 $\pm$ 0.0	5.10	56.0
80. Felahiye(Alabeş)	38.1 $\pm$ 1.7	5.27	52.5
81. Felahiye	3.2 $\pm$ 0.6	5.23	52.5
82. Felahiye (Hasancı)	30.0 $\pm$ 0.9	5.19	52.5
83. Tomarza	134.9 $\pm$ 0.0	4.94	66.5
84. Güneşli Köyü	146.2 $\pm$ 0.9	5.10	59.5
85. Güneşli Köyü	25.1 $\pm$ 0.9	4.83	77.0
86. Saraycık	76.2 $\pm$ 0.9	5.41	38.5
87. Kayseri Süksün	44.7 $\pm$ 1.8	4.99	49.0
88. Yuvalı Köyü	59.0 $\pm$ 0.9	4.96	56.0
89. Molu Köyü	90.3 $\pm$ 0.9	5.55	42.0
90. Develi	53.2 $\pm$ 1.7	5.05	45.5
91. Develi	50.4 $\pm$ 0.9	5.30	56.0
92. Akkışla	19.3 $\pm$ 0.9	5.01	56.0
93. Yamula	64.6 $\pm$ 0.0	5.22	59.5
94. Yamula	59.1 $\pm$ 0.9	5.14	56.0
95. Yamula	68.3 $\pm$ 0.9	5.00	56.0
96. Elmalı Köyü	94.6 $\pm$ 1.8	5.17	52.5
97. Höbek Köyü	1.6 $\pm$ 0.2	4.14	105.0
98. Kermelik Köyü	71,7 $\pm$ 0,0	5,07	59.5
99. Kermelik Köyü	6.0 $\pm$ 0.0	5.07	59.5
100.Develi	21,5 $\pm$ 0,9	5,05	56.0

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yapılan çalışmada, Kayseri ve yöresinden toplanan geleneksel yollarla üretilmiş 100 üzüm pekmezi örneğinin HMF, pH ve toplam asitlik miktarları tayin edilmiştir. Analizleri yapılan üzüm pekmezi örneklerindeki HMF miktarları 1.6 ile 183.8 mg kg⁻¹ aralığında değişmektedir. Örneklerin ortalama HMF düzeyi 57.4±40.9 mg kg⁻¹ olarak hesaplanmıştır. Örneklerin 18 tanesinde HMF miktarı “Türk Gıda Kodeksi Tebliği’nde” üzüm pekmezi örneklerinde müsaade edilen en yüksek HMF miktarı olan 75 mg kg⁻¹ düzeyinin üzerinde olduğu belirlenmiştir.

Pekmezlerin pH değerleri 4.14 ile 5.64 arasında değişmektedir. “Türk Gıda Kodeksi Tebliği’ne” göre tatlı üzüm pekmezinin pH değeri 5.0-6.0 aralığında olması gerektiği bildirilmektedir. Toplanan üzüm pekmezi örneklerinin 27 tanesinde pH değerinin “Türk Gıda Kodeksi Tebliği’nde” verilen alt sınır değeri 5.0 değerinden düşük olduğu belirlenmiştir. Titre edilebilir asitlik miktarı ise sitrik asit cinsinden 38.5-105.0 mg kg⁻¹ aralığında değişmektedir.

Töker ve Hayoğlu 2004 yılında yaptıkları bir çalışmada Şanlıurfa yöresinin geleneksel bir ürünü olan gün pekmezini kendileri üreterek kimyasal analizlerini yapmışlardır. Elde ettikleri 11 üzüm pekmezi örneğinin HMF derişiminin 0.15 ile 1.20 mg kg⁻¹ aralığında olduğu belirlenmiştir. Pekmezlerin pH değeri ise 5.09 ile 6.49 aralığında değişmektedir. Toplam asitlik ise miktarı (tartarik asit cinsinde) 80-1180 mg kg⁻¹ aralığında değiştiği bildirilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar burada elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında toplanan örneklerdeki HMF miktarının bu çalışmada bulunan değerlerin çok daha

üzerinde olduğu görülmektedir. pH değeri ise topladığımız örneklerde daha düşük değerlerdedir. Buna rağmen toplanan örneklerdeki toplam asitlik miktarı Töker ve Hayoğlu tarafından yapılan çalışmada elde edilen değerlerden çok daha düşüktür (45).

Akbulut ve Özcan 2008 yılında yayımladıkları bir çalışmada Selçuk Üniversitesi'nde pilot olarak ürettikleri Sorgum pekmezinin kimyasal analizlerini yapmıştır. HMF düzeyini $15.1 \pm 1.0 \text{ mg kg}^{-1}$, pH değeri 5.9 ve titre edilebilir asitlik 6800 mgkg^{-1} olduğunu belirtmiştir. Çalışmamızda elde edilen sonuçlarla bu sonuçlar karşılaştırıldığı zaman HMF değerinin bizim ortalama değerlerimizden yaklaşık 1/3 kadardır. pH değeri topladığımız örneklerin pH değeri daha düşüktür. Toplam asitlik ise daha yüksektir (46).

Bilgiçli ve Akbulut 2009 yılında yayımladıkları bir çalışmada Türkiye'nin farklı yerlerinden toplanan dut, kayısı, andızotu, üzüm ve karpuz pekmezi örneklerinin kimyasal analizlerini yapmışlardır. Üzüm pekmezi öreğinin HMF düzeyi 34.1 mg L^{-1} ve pH değeri 4.58 olarak verilmiştir. Çalışmamızda elde edilen ortalama HMF değeri ve pH değeri bu çalışmada elde edilen değerden daha yüksektir (47).

Bozkurt, Göğüş ve Eren, 1998 yılında yayımladıkları bir çalışmada pekmezde saklama sırasında ortaya çıkan maillard reaksiyonu üzerine pH, sıcaklık ve çözünebilir kuru madde miktarının etkilerini incelemişlerdir. Reaksiyonun bir ara ürünü olan 5-hidroksimetil furfural birikimi referans alarak takip etmişlerdir. Pekmezde de üretim esnasında uygulanan yüksek sıcaklığın 5-HMF oluşumuna neden olduğu ve saklama sırasında konsantrasyonunun arttığı ve buna bağlı olarak da pekmez kalitesinin düştüğü gözlenmiştir (48). Yaptığımız çalışmada bazı üzüm pekmezi örneklerinde HMF değerlerinin yüksek olmasının ısı işlemin fazla uygulanması sonucu olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak geleneksel yollarla üretimi yapılan pekmezlerde bilinçsiz yapılan aşırı ısı işlemler sonucu kolon kanseri başta olmak üzere tümörojenik etkiye neden olan HMF artmakta ve insan sağlığını çok ciddi tehlikelere maruz bırakmaktadır.

Bunun için insanlarımızın bilinçlendirilmesi büyük önem arz etmektedir. Özellikle kırsal kesimlerde çokça üretimi yapıldığı için bilhassa köylü üreticilerimizin bilgilendirilmesi ve almaları gereken önlemlerin anlaşılır şekilde izah edilmesi gerekmektedir.

HMF oluşumuna, yüksek ısı işlem uygulanmasının ve bu ısı işlem süresinin uzamasının etkisinin olduğu bilinmektedir. Ancak HMF oluşumunda hangi gıda için hangi sıcaklığın ne etkisinin olduğu ve ısı işlem süresinin ne kadarla sınırlandırılması gerektiği ile ilgili literatür bilgisine rastlanmamıştır. Özellikle şekerli gıda ürünleri için, farklı sıcaklık ve farklı ısı işlem sürelerinin HMF oluşumuna etkilerin nasıl olduğunun araştırılması gerektiği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Oral R. A, Bazı Gıdalarda HMF İçeriğinin Saptanması, Depolanması Esnasındaki Değışimi Ve Biyolojik Yöntemle Azaltılması, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri, 2006: 69
2. Üzüm Pekmezi Tebliğı, T.C. Resmi Gazete, 15 Haziran 2007, sayı: 26553
3. Aslanova D., Reçel Üretimi Ve Depolanması Sürecinde HMF Oluşum Kinetiğı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2005:50
4. oklar H, Aktif Kömür Uygulamasının Ticari Elma Suyu Konsantresindeki Hidroksi Metil Furfural (HMF) Ve Toplam Fenolik Madde Düzeyi Üzerine Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya 2007:62
5. Karhan M, Turhan İ, Tetik N, Keçiboynuzu Pekmezinin Bileşimi Ve Üretim Aşamaları, Gıda Teknolojileri Dergisi, 2007; 2: 39-44
6. Batu A, Karagöz DD, Kaya C, Yıldız M, Dut Ve Harnut Pekmezlerinin Depolanması Süresince Bazı Kalite Değerlerinde Oluşan Değışmeler, Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, 2007; 2: 4-16
7. Batu A, Gök V, Pekmez Üretiminde HACCP Uygulaması, Teknolojik Araştırmalar, http://www.teknolojikarastirmalar.com/pdf/tr/02_020207_8_akbulut_tr.pdf, (2006).
8. Kaya C, Yıldız M, Hayoğlu İ, Kola O, Pekmez Üretim Teknikleri, Gap: IV. Tarım Kongresi, 1482-1490, Harran Üniversitesi, Şanlıurfa, 21-23 Eylül 2005
9. S, Z, A, Makawi, M, I, Taha, B, A, Zakaria, B, Siddig, H. Mahmod, A, R, M, Elhussein, E, A, G, Kariem, Identification And Quantification Of 5-Hydroxymethyl Furfural (HMF) In Some Sugar-Containing Food Products By HPLC, Pakistan Journal Of Nutrition, 2009; 8: 9: 1391-1396

10. Aziz G, Şahinler N, Balın Yapısına Ve Kalitesine Etki Eden Faktörler, 4. Ulusal Zootečni Bilim Kongresi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, 58-62, 1-4 Eylül 2004.
11. Cizkova H, Sevcik R, Rajchl A, And Voldurich M, Nutritional Quality Of Commercial Fruit Baby Food, Department Of Food Preservation And Meat Technology, Institute Of Chemical Technology, 2009; 27: 134-137
12. Katanalp F, Antitiroid Bir İlaç Olan Metimazol'ün Farmasötik Preparatlarda Ve Plazmada Miktar Analizi, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 2006: 91
13. Alais C, Linden G, Non-enzymatic browning—the Maillard reaction In: Food Biochemistry, Ellis Horwood Limited, England, 1991: 86-89
14. Amr E, Edris, A, Michael Murkovic B, Barbara S ,Application Of Headspace- Solid-Phase Microextraction And HPLC For The Analysis Of The Aroma Volatile Components Of Treacle And Determination Of Its Content Of 5-Hydroxymethylfurfural (HMF), Food Chemistry, 2007; 104: 1310-1314
15. V, Pereira, F, M, Albuquerque ,A,C., Ferreira,J. ,Cacho , J, C., Marques, Evolution Of 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) And Furfural (F) In Fortified Wines Submitted To Overheating Conditions, Food Research International, 2011; 44:1: 71-76
16. Ünal, N, Bal, Katalizör Popüler Kimya Dergisi, 2008; 1: 33-37
17. Manzocco L, Calligaris S, Mastrocola, D, Nicolì, M.C. Andlerici, C.R, Review Of Nonenzymatic Browning And Antioxidant Capacity In Processed Foods, Trends In Food Science And Technology, 2001; 11: 340-346
18. Bressa, F, Tesson N, Rosa M, D, Sensidoni, A, Tubaro ,F. ,Antioxidant Effect Of Maillard Reakction Products: Application Yo A Butter Cookie Of A Competition Kinetics Analysis, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996; 44: 692-695.
19. Sağlam, H, Farklı Kavurma Sıcaklık Ve Sürelerinin Leblebilerin Kalitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, 2006: 80
20. Mistry, V, V, Pulgar J, B, Physical And Storage Properties of High Milk Protein powder, International Dairy Journal, 1996; 6: 195-203
21. Lobrutto R, Kazakevich YV, Types of HPLC In: HPLC For Pharmaceutical Scientists (1 St Ed), John Wiley And Sons, New Jersey, 2007: 3-65

22. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA, Enstrümantal Analiz İlkeleri. (Çev. Kılıç E, Köseoğlu F, Yılmaz H), Bilim Yayıncılık, Ankara, 1998: 299-347, 674-766
23. Hanai T, HPLC A Practical Guide, The Royal Society Of Chemistry, Cambridge, 1999: 11-90
24. Snyder LR, Dolan JW, Gant JR, Gradient Elution İn High-Performance Liquid Chromatography : I. Theoretical Basis For Reversed-Phase Systems, J Chromatogr A, 1979; 165: 3-30
25. Dong WM, Modern HPLC For Practicing Scientists, John Wiley And Sons, New Jersey, 2006: 306
26. Poole CF, Poole SK. Chromatography Today (5 Th Ed), Elsevier Science, Amsterdam, 1991: 1026
27. Yılmaz M, Meyve Sularında Patulinin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi İle Tayini, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta 2002: 57
28. Çubuk, E, Aspartam Ve Bozunma Ürünlerinin Ters Faz Yüksek Performans Sıvı Kromatografik Ayrımı, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, 2002: 99
29. Brooijmans N And Kuntz ID, Molecular Recognition And Docking Algorithms, Annual. Review of Biophysics and. Biomolecular. Structure, 2003; 32: 335-373
30. Dong WM, Modern HPLC For Practicing Scientists, John Wiley And Sons, New Jersey, 2006: 250
31. Lobrutto R, Kazakevich YV, General Separation Process İn: HPLC For Pharmaceutical Scientists (1 St Ed), John Wiley And Sons, New Jersey, 2007: 8-9
32. Erkahveci A, Kırmızı Toz Biberlerde Aflatoksin Miktar Tayininde Kullanılabilecek Üç Farklı Analiz Metodunun Karşılaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 1996: 76
33. Ettre S.L, Chapters İn The Evolution Of Chromatography, Imperial College Press, London, 2008: 473
34. Atienza J, Jimenez J J, Bernal J L. et al. Supercritical Fluid Extraction Of Fluvalinate Residues İn Honey. Determination By High-Performance Liquid Chromatography, J Chromatogr A, 1993; 26: 95-99

35. Meyer V.R, Practical High-Performance Liquid Chromatography (4th ed), John Wiley & Sons, New York, 2004: 357
36. Snyder LR, Kirkland JJ, Introduction To Modern Liquid Chromatography, John Wiley And Sons , Canada, 1979: 863
37. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA, Enstrümantal Analiz İlkeleri (5 Th Ed). (Çev. Kılıç E, Köseoğlu F, Yılmaz H), Bilim Yayıncılık, Ankara, 2000: 960
38. Şeker ME, Türkiye’de Bulunan Bazı Üzüm Türlerinin Çekirdeklerindeki E-Vitamini Miktarının HPLC İle Tayini, Yüksek Lisans Tezi, Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa, 2006:94
39. Kimya evi, <http://www.kimyaevi.Org> (19.04.2011)
40. Hışıl Y, Enstrümantal Gıda Analizleri-I, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Ders Kitapları, İzmir, 1994: 119-126
41. Schoenmakers PJ, Molle SV, Hayes C, Et al. Effects Of Ph İn Reversed-Phase Liquid Chromatography, Anal Chim Acta, 1991; 250: 1-19
42. Güngör N, Dut Pekmezinin Bazı Kimyasal Ve Fiziksel Özellikleri İle Antioksidan Aktivitesi Üzerine Depolamanın Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 2007: 91
43. Sadek CP, The HPLC Solvent Guide (2 nd ed) , John Wiley And Sons, Newyork, 2002: 643
44. Zappala M, Fallico B, Arena E, Verzera A, Methods For The Determination of HMF In Honey: A Comparison, Food Control, 2005; 16: 273–277
45. Toker A, Hayoğlu İ, Şanlıurfa Yöresi Gün Pekmezlerinin Üretim Tekniği Ve Bazı Fiziksel-Kimyasal Özellikleri, Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 2004; 8: 67-73
46. Akbulut, M, Özcan MM, Some Physical, Chemical And Rheological Properties Of Sweet Sorghum (Sorghum Bicolor (L) Moench) Pekmez (Molasses), International Journal Of Food Properties, 2008; 11: 79-91
47. Bilgiçli N, Akbulut M, Effects Of Different Fruit Molases Types On Chemical, Nutritional Contentand Storage Stability Of Cake, Journal Of Food Quality, 2008; 32: 95-106
48. Bozkurt H, Göğüş F, Eren S, Pekmezde Maillard Esmerleşme Reaksiyonlarının Kinetik Modellenmesi, Turkish Journal of Engineering and Environmental Sciences, 1998; 22: 455-460.

ÖZ GEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı : Ayla AKÖZLÜ
Uyruğu : Türkiye (TC)
Doğum Tarihi ve Yeri : 5 Mayıs 1982, Kayseri
Medeni Durumu : Bekâr
Email : aylaakozlu@gmail.com
Tel : 0352 4374901-20208
Yazışma Adresi : Erciyes Üniversitesi Merkez Metabolizma Laboratuvarı 38050
Talas/KAYSERİ

EĞİTİM

Derece Kurum Mezuniyet Tarihi

Lisans	EÜ F.E.F	Kimya	2005
Lise	Lise Atatürk Lisesi,	Kayseri	2000

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl Kurum Görev

2006- Halen Erciyes Üniversitesi Merkez Metabolizma Laboratuvarı, Kimyager

YABANCI DİL

İngilizce