



**HİDROKSİMETİLFURFURALIN BAL AROMALI
ŞURUPLARDA HPLC YÖNTEMİ İLE ANALİZİ**

Ünal SAVSAR

Eczacılık Analitik Kimya Ana Bilim Dalı

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Bilal YILMAZ**

Yüksek Lisans Tezi-2025



SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Graduate School of Health Sciences

HİDROKSİMETİLFURFURALIN BAL AROMALI ŞURUPLARDA HPLC YÖNTEMİ İLE ANALİZİ

Ünal SAVSAR

Eczacılık Analitik Kimya Ana Bilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Bilal YILMAZ

ERZURUM
2025

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
TEŞEKKÜR	IV
ÖZET	V
ABSTRACT	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLolar DİZİNİ	IX
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Hidroksimetilfurfural	4
2.2. HMF'nin Sağlık Üzerine Etkileri	6
2.3. HMF ile İlgili Yapılan Çalışmalar	9
2.4. Kromatografik Yöntemler.....	14
2.4.1. Kromatografik Yöntemlerinin Sınıflandırılması	15
2.4.2. Kromatografide Temel Olan Fiziksel ve Kimyasal Olaylar	16
2.4.2.1. Dağılma (Partisyon) Kromatografisi	16
2.4.2.2. Adsorpsiyon Kromatografisi.....	17
2.4.2.3. İyon Değişim Kromatografisi	17
2.4.2.4. Boyut Eleme (Jel Filtrasyon) Kromatografisi.....	18
2.5. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	19
2.5.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Cihazı	20
2.5.1.1. Kolonlar	21
2.5.1.2. Pompalar	22
2.5.1.3. Enjektörler	24

2.5.1.4. Dedektörler	25
2.6. Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)	27
2.6.1. Doğruluk ve Kesinlik.....	27
2.6.2. Örneklerin Kararlılığı (Stabilite)	28
2.6.3. Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi.....	28
2.6.4. Duyarlılık.....	28
2.6.5. Tayin Alt Sınırı (LOQ)	28
2.6.6. Gözlenebilme (Teşhis) Sınırı (LOD)	29
2.6.7. Geri Kazanım	29
3. MATERYAL VE METOT.....	30
3.1. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler	30
3.2. Kullanılan Cihazlar	30
3.3. HPLC Sistemi	30
3.4. Etik Kurul ve Kromatografik Yöntem Şartları	31
3.5. HMF için HPLC Deneyinin Yapılışı	31
3.6. Yöntemlerin Numunelere Uygulanması	31
4. BULGULAR.....	32
4.1. HPLC Yöntemi	32
4.1.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması	32
4.1.2. Yöntemin Geçerlilik Testi (Validasyonu).....	32
4.1.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi.....	32
4.1.2.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)	33
4.1.2.3. Doğruluk ve Kesinlik.....	34
4.1.2.4. Kararlılık (Stabilite).....	34
4.1.2.5. Geri Kazanım	35

4.1.3. Yöntemin Numunelere Uygulanması	36
5. TARTIŞMA.....	40
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	444
KAYNAKLAR	46
EKLER	51
EK-1. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU.....	51
EK-2. ETİK KURUL ONAYI.....	522



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimin planlanması, yürütülmesi ve hazırlanması sürecinde değerli bilgi, deneyim ve rehberliğiyle her zaman yanımda olan, akademik yolculuğum boyunca desteğini esirgemeyen danışmanım Sayın Prof. Dr. Bilal YILMAZ'a ve **TYL-2024-14871** proje numarası ile çalışmayı destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne en içten saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmam süresince bana her zaman inanan, güvenen ve hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen sevgili anneme en içten teşekkürlerimi sunarım. Geçtiğimiz aylarda kaybettiğimiz babamı ise rahmet ve minnetle anıyor, aziz hatırasını saygıyla yad ediyorum.

Ünal SAVSAR

ÖZET

Hidroksimetilfurfuralın Bal Aromalı Şuruplarda HPLC Yöntemi ile Analizi

Amaç: Bu çalışmanın temel amacı, hidroksimetilfurfural (HMF) adlı bileşiğin kantitatif olarak tayinine yönelik, uygulanabilirliği yüksek, güvenilir ve basit bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yönteminin geliştirilmesi ve uluslararası geçerlilik kriterlerine uygun şekilde valide edilmesidir.

Materyal ve Metot: HMF analizleri, ters faz HPLC sisteminde, partikül boyutu 5 µm olan ve 250×4.6 mm iç çapa sahip C₁₈ kolon kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Dedeksiyon 284 nm dalga boyuna ayarlanmış UV dedektör yardımıyla yapılmıştır. Mobil faz olarak, metanol ve asetonitrilden oluşan 10:90 (h/h) oranındaki karışım kullanılmış; akış hızı 1.0 mL dak⁻¹ olarak ayarlanmıştır. Bu koşullarda yapılan analizler, 10 dakikadan kısa sürede tamamlanmıştır. Yöntem validasyonu kapsamında; doğruluk, kesinlik (intra-day ve inter-day), doğruluk (bias), stabilite, tayin edilebilirlik sınırı (LOD) ve miktar tayin sınırı (LOQ) gibi analitik parametreler, ICH kılavuzu doğrultusunda değerlendirilmiştir.

Bulgular: Geliştirilen HPLC yönteminin kalibrasyon eğrisi, 0.10-100 µg mL⁻¹ derişim aralığında yüksek düzeyde doğrusal bulunmuştur (R²>0.999). HMF için hesaplanan günü içi ve günler arası kesinlik değerleri, %2.40'ın altında kalmış; doğruluk ise %0.88'den daha düşük bağıl hata değerleri ile ifade edilmiştir. Bal aromalı şuruplarda HMF'nin geri kazanım oranlarını belirlemek amacıyla GrinTuss, Biakaf ve Bisolnatur marka şuruplar üzerinde standart ekleme yöntemi kullanılmıştır.

Sonuç: Bu çalışma kapsamında geliştirilen ve başarıyla valide edilen HPLC yöntemi ile piyasada bulunan bal aromalı şuruplarda HMF'nin güvenilir şekilde analizinin gerçekleştirilebildiği gösterilmiştir. Analiz sonuçları, literatürde yer alan benzer çalışmalar ile karşılaştırılmış ve yöntem doğruluğu ile güvenilirliği teyit edilmiştir. Elde edilen veriler, HMF'nin bal aromalı ürünlerdeki varlığının izlenmesinde bu yöntemin etkin şekilde kullanılabileceğini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Geçerlilik testi, HMF, şurup, YBSK

ABSTRACT

Analysis of Hydroxymethylfurfural in Honey-Flavored Syrups by HPLC Method

Aim: The primary aim of this study was to develop a simple, reliable, and practical high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the quantitative determination of the compound hydroxymethylfurfural (HMF), and to validate the method in accordance with international regulatory standards.

Material and Method: HMF analyses were carried out using a reverse-phase HPLC system equipped with a C18 column (5 μm , 250 \times 4.6 mm i.d.). Detection was performed using a UV detector set at a wavelength of 284 nm. The mobile phase consisted of a mixture of methanol and acetonitrile in a 10:90 (v/v) ratio, with a flow rate set at 1.0 mL min⁻¹. Under these conditions, the analysis was completed in less than 10 minutes. Method validation was conducted in accordance with the ICH guideline, evaluating analytical parameters such as linearity, precision (intra-day and inter-day), accuracy (bias), stability, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ).

Results: The calibration curve of the developed HPLC method was found to be highly linear within the concentration range of 0.10-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($R^2 > 0.999$). The intra-day and inter-day precision values for HMF were below 2.40%, and the accuracy (expressed as relative error) was less than 0.88%. In order to determine the recovery rates of HMF in honey-flavored syrups, the standard addition method was applied to commercially available products including GrinTuss, Biakaf, and Bisolnatur.

Conclusion: The HPLC method developed and successfully validated in this study demonstrated the capability to reliably analyze HMF content in honey-flavored syrups available on the market. The analytical results were compared with previous studies reported in the literature, confirming the accuracy and reliability of the method. The findings indicate that this method can be effectively utilized for monitoring the presence of HMF in honey-flavored pharmaceutical and commercial syrup formulations.

Key Words: HMF, HPLC, syrup, validation test

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BH	: Bağlı hata
BSS	: Bağlı standart sapma
HMF	: Hidroksimetilfurfural
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
ICH	: International conference on harmonization
LOD	: Gözlenebilme sınırı
LOQ	: Tayin alt sınırı



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. HMF kimyasal yapısı	4
Şekil 2.2. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazının şematik görünüşü	20
Şekil 4.1. HPLC çalışmasında HMF çözeltilerinin kromatogramları	32
Şekil 4.2. HPLC yöntemi kalibrasyon eğrisi	33
Şekil 4.3. Eczaneden satın alınan bal aromalı şurupların (GrinTuss, Biakaf, Bisolnatur) HPLC kromatogramı (50 mg mL ⁻¹)	36
Şekil 4.4. Marketten satın alınan petek balın HPLC kromatogramı (50 mg mL ⁻¹)	37
Şekil 4.5. Marketten satın alınan süzme balın HPLC kromatogramı (50 mg mL ⁻¹).....	37
Şekil 4.6. Marketten satın alınan pekmezin HPLC kromatogramı (50 mg mL ⁻¹)	37
Şekil 4.7. Marketten satın alınan vişne reçelin HPLC kromatogramı (50 mg mL ⁻¹)	38
Şekil 4.8. Marketten satın alınan keçiboynuzunun HPLC kromatogramı (50 mg mL ⁻¹)	38
Şekil 4.9. Marketten satın alınan başka bir markadaki petek balın HPLC kromatogramı (50 mg mL ⁻¹)	38
Şekil 4.10. Marketten satın alınan başka bir markadaki reçelin HPLC kromatogramı (50 mg mL ⁻¹)	39

TABLULAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 4.1. HPLC çalışmasında HMF'ye ait kalibrasyon eğrileri ile ilgili istatistiki değerler	33
Tablo 4.2. HPLC yönteminin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri	34
Tablo 4.3. HMF'nin HPLC yöntemiyle belirlenen kararlılık (stabilite) değerleri	35
Tablo 4.4. HPLC yöntemiyle belirlenen bal aromalı şurupların günüçi ve günler arası geri kazanım değerleri.....	35
Tablo 4.5. HPLC çalışmasında farklı numunelere (50 mg mL ⁻¹) ait HMF miktarları ...	39

1. GİRİŞ

Bal, tarihsel süreçte hem gıda hem de geleneksel tedavi amacıyla kullanılan doğal bir üründür. İçeriğinde başlıca fruktoz ve glikoz olmak üzere çeşitli şekerler, enzimler, amino asitler, vitaminler ve fenolik bileşikler bulunur. Ancak bu değerli içeriğin korunabilmesi, balın üretiminden tüketime kadar geçen süreçte uygun koşullarda işlenmesi ve muhafaza edilmesiyle doğrudan ilişkilidir. Bu süreçte karşılaşılan en önemli kalite göstergelerinden biri, hidroksimetilfurfural (HMF) içeriğidir.

HMF, özellikle heksoz şekerlerinin (başta fruktoz olmak üzere) asidik ortamda ve ısı işlem altında parçalanması sonucu oluşan bir bileşiktir. Doğal olarak oluşan bu madde, balda ısı işleme ya da uzun süreli ve yüksek sıcaklıklarda muhafazaya maruz kalındığında belirgin şekilde artar. Bu nedenle, HMF düzeyi, balın işleme geçmişini ve depolama koşullarını değerlendirmede önemli bir parametre olarak kullanılmaktadır.

Taze ve kovandan yeni hasat edilmiş doğal ballarda HMF miktarı genellikle 1 mg/kg'ın altında iken, sıcaklık koşullarının 20 °C'nin üzerine çıkmasıyla bu miktar artmaya başlamaktadır. Özellikle yaz aylarında sıcaklığın 40 °C'yi geçtiği coğrafi bölgelerde üretim sırasında bile HMF birikimi gözlenebilmektedir. Bu nedenle, bu gibi iklim koşullarına sahip bölgelerde üretilen ballarda 10 mg/kg'a kadar olan HMF seviyeleri normal kabul edilmektedir. Bununla birlikte, Codex Alimentarius ve Türk Gıda Kodeksi gibi uluslararası ve ulusal standartlara göre, satışa sunulan ballarda HMF düzeyi 40 mg/kg'ı geçmemelidir.

HMF yalnızca balın ısı işlem geçmişi hakkında bilgi vermekle kalmayıp, aynı zamanda ürünün sahteciliği konusunda da geçmişte önemli bir gösterge olmuştur. 1900'lü yılların başlarında HMF, bala dışarıdan glikoz veya fruktoz bazlı invert şuruplar ilave edilip edilmediğini belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Bu yönüyle HMF analizi, gıda güvenliği ve tüketici sağlığı açısından büyük bir önem taşımaktadır. Özellikle çocuklar,

yaşlılar ve bağışıklık sistemi zayıf bireyler gibi hassas grupların bu tür ürünleri sıkça tüketmeleri, balın kimyasal kalitesinin ve saflığının analiz edilmesini daha da önemli hale getirmektedir.

Sadece bal değil, meyve suyu, süt, pekmez, reçel ve tahıl ürünleri gibi diğer gıdalarda da HMF, ürünün ısıya maruz kalıp kalmadığını ve uygun koşullarda muhafaza edilip edilmediğini anlamada kullanılan yaygın bir kimyasal gösterge olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle literatürde HMF tayinine yönelik çok sayıda analitik çalışmaya rastlanmaktadır. Ancak, Türkiye piyasasında satılan bal aromalı şuruplarda HMF miktarının tayinine yönelik yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) temelli herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu durum, bu alandaki akademik boşluğu ortaya koymakta ve yapılacak çalışmanın literatüre özgün katkı sağlayabileceğini göstermektedir.

Günümüzde HPLC, farmasötik preparatlardan biyolojik materyallere kadar birçok alanda güvenilirlik ve hassasiyet açısından yaygın olarak kullanılan bir analiz yöntemidir. Bununla birlikte, tampon sistemleri içeren mobil faz kompozisyonlarının günlük olarak hazırlanma zorunluluğu, kolon ömrünü kısaltmakta ve analiz sürecini hem zaman hem de maliyet açısından zorlaştırmaktadır. HPLC analizlerinde sistemin koşullandırılması, uygun parametrelerin optimize edilmesi ve yöntem validasyonu süreçleri zaman alıcı olmakla birlikte, elde edilen verilerin güvenilirliğini ve doğruluğunu doğrudan etkilemektedir.

Bu tez çalışmasında, eczanelerde ve piyasada satışa sunulan bal aromalı şuruplarda HMF içeriğinin belirlenmesine yönelik basit, uygulanabilir ve güvenilir bir HPLC analiz yönteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Geliştirilen yöntem, ICH kılavuzu doğrultusunda doğruluk, kesinlik, seçicilik, alt tayin sınırı (LOD), miktar tayin sınırı (LOQ), doğrusalık, stabilite ve geri kazanım gibi temel validasyon parametreleri

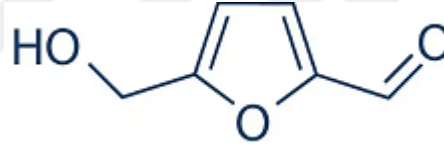
açısından değerlendirilmiştir. Ardından valide edilen bu yöntem, piyasada bulunan bal aromalı şurup örneklerine uygulanarak HMF analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma, hem bal aromalı şurupların kimyasal kalitesinin belirlenmesine katkı sağlamayı hem de gıda güvenliği açısından önemli bir kontrol mekanizmasının oluşturulmasına yardımcı olmayı hedeflemektedir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hidroksimetilfurfural

Hidroksimetilfurfural (HMF) (Şekil 2.1), karbonhidrat içeren gıdalarda ısıl işlem, asidik ortam ve uzun süreli depolama gibi faktörlerin etkisiyle meydana gelen önemli bir kimyasal bileşiktir. Özellikle heksozların asidik koşullarda dehidrasyonu veya Maillard reaksiyonu (enzimatik olmayan esmerleşme) sonucunda oluşan HMF, gıda ürünlerinde hem kalite hem de tazelik göstergesi olarak değerlendirilir (Fallico ve ark., 2004). HMF'nin oluşumu, özellikle fruktoz ve glukoz gibi indirgen şekerlerin yüksek sıcaklık ve düşük pH gibi uygun ortam koşullarında parçalanması ile ilişkilidir. Bu özelliği nedeniyle HMF, karbonhidrat içeriği yüksek olan gıdalarda ısıl işlemin ve depolama süresinin izlenebilirliğini sağlayan kimyasal bir indikatör olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır.



Şekil 2.1. HMF kimyasal yapısı

Asidik ortam ve yüksek sıcaklık koşullarında, asitlerin katalizör görevi gördüğü reaksiyonlar sonucunda monosakaritlerin su kaybetmesiyle pentozlardan furfural, heksozlardan ise HMF meydana gelir (Belitz ve Grosch, 1999). Bu reaksiyonlar özellikle ketopentoz ve heksozların dehidrasyonu ile gerçekleşmektedir (Teixidó ve ark., 2006). HMF oluşum süreci literatürde detaylı biçimde açıklanmış olup, bu reaksiyonun kimyasal mekanizması açıklanmıştır. Reaksiyonun hızı; ortam sıcaklığı, pH değeri, su aktivitesi, indirgen şeker ve amino asit içeriği gibi birçok faktörden etkilenmektedir (Burdurlu ve Karadeniz, 2002). Nitekim her 10 °C'lik sıcaklık artışının, HMF oluşum hızını dört katına çıkardığı belirtilmiştir ki bu durum, sıcaklığın bu reaksiyonda belirleyici bir faktör olduğunu ortaya koymaktadır.

Bal, doğası gereği yüksek miktarda şeker (özellikle fruktoz ve glukoz), düşük pH, hafif asidik yapı ve su aktivitesi gibi HMF oluşumu için uygun kimyasal özelliklere sahiptir. Bu nedenle balda HMF oluşumu, hem üretim hem de depolama aşamalarında dikkate alınması gereken önemli bir kalite unsurudur. Balın kimyasal özellikleri (şeker içeriği, toplam asidite, pH, mineral madde içeriği), işlenme şekli ve depolama süreci gibi etkenler, HMF oluşum miktarını doğrudan etkilemektedir (Tosi ve ark., 2002). Özellikle fermantasyonun önlenmesi ve kristalizasyonun geciktirilmesi amacıyla uygulanan ısı işlemleri, ticari bal üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu işlemler, taze ballarda neredeyse sifıra yakın olan HMF seviyelerinin artmasına neden olmaktadır. Yüksek sıcaklık ve uzun süreli ısıtma işlemleri sonucunda HMF miktarı hızla artmakta, bu da balın raf ömrünü ve kalitesini olumsuz etkilemektedir (Sanz ve ark., 2003; Morales ve ark., 2009).

HMF, bu özellikleriyle yalnızca balın değil, aynı zamanda işlenmiş diğer karbonhidrat içeren gıdaların da kalitesini belirlemede kullanılan güvenilir bir parametre haline gelmiştir. Bu kapsamda, Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (Anonim, 2012) çiçek ve salgı balları için HMF düzeyini maksimum 40 mg kg^{-1} olarak sınırlandırmıştır. Bu değer, balın uygun koşullarda üretildiğini ve saklandığını gösteren önemli bir kriter olarak kabul edilmektedir.

Gıda endüstrisinde ürünlerin raf ömrünü uzatmak, mikrobiyal güvenliğini sağlamak ve istenen duyu özellikleri kazandırmak amacıyla uygulanan ısı işlemler, çoğu zaman HMF oluşumunu da beraberinde getirmektedir. Isıl işlemler sonucunda HMF oluşumu kaçınılmaz hale gelmekte, bu durum da ürünün hem besin değerinde azalma, hem de istenmeyen kimyasal bileşiklerin birikimi gibi olumsuz etkiler doğurmaktadır (Rada-Mendoza ve ark., 2002). Gıdaların işleme ve saklama sürecinde meydana gelen bu tür kimyasal değişimlerin takibi, üretim koşullarının kontrolü açısından oldukça

önemlidir. Bu noktada HMF, gıda kalitesini etkileyen ısıtma işlemlerinin kontrolü için etkin bir gösterge olarak değerlendirilmektedir (Namaka ve ark., 1993).

Gıda üretimi sürecinde HMF oluşumu, yalnızca kaliteyi değil, aynı zamanda tüketici sağlığını ilgilendiren bir konudur. Yapılan araştırmalarda HMF'nin yüksek konsantrasyonlarda mutajenik, genotoksik ve sitotoksik etkilere sahip olabileceği rapor edilmiştir. Ayrıca HMF'nin bazı metabolik süreçlerde aktif türevler oluşturarak DNA'ya zarar verebileceği ve bu yolla kansere neden olabileceği düşünülmektedir (Rufián-Henares ve De La Cueva, 2007; Durling ve ark., 2009).

2.2. HMF'nin Sağlık Üzerine Etkileri

HMF, karbonhidratların yüksek sıcaklıkta işlenmesi sırasında Maillard reaksiyonu veya karamelizasyon gibi kimyasal süreçler sonucu oluşan bir bileşiktir. Bal, reçel, şurup, kurutulmuş meyveler, kahve ve fırın ürünleri gibi birçok ısıtma işlem görmüş gıdada doğal olarak oluşur. HMF, gıda endüstrisinde kalite göstergesi olarak kullanılsa da, son yıllarda toksikolojik etkileri nedeniyle dikkat çekmektedir (Janzowski ve ark., 2000).

Yapılan çalışmalar, HMF'nin yüksek dozlarda karaciğer ve böbrek gibi detoksifikasyon organlarında toksik etki oluşturabileceğini göstermektedir. Özellikle HMF'nin metabolitlerinden biri olan 5-sülfoksimetilfurfural (SMF), karaciğer hücrelerinde (hepatositlerde) yapısal bozulmalara, böbreklerde ise proksimal tübül hasarına yol açabilir (Bauer-Marinovic ve ark., 2019). Uzun süreli ve yüksek doz maruziyet durumlarında, karaciğerde hepatomegali ve hücre içi dejenerasyon gibi patolojik değişiklikler gözlemlenmiştir.

HMF'nin sinir sistemi üzerindeki etkileri de yapılan in vitro çalışmalarda ortaya konmuştur. Özellikle PC12 ve HT22 gibi nöronal hücre hatlarında yapılan çalışmalarda, HMF'nin hücre canlılığını azalttığı, kalsiyum iyonu salınımını artırdığı ve oksidatif stresi

tetiklediği belirtilmiştir (Zhang ve ark., 2020). Bu etkiler, sinaptik iletişimi bozarak nörodejeneratif hastalıklara zemin hazırlayabilecek bir potansiyele işaret etmektedir.

HMF'nin genetik materyal üzerinde potansiyel zararlı etkileri olduğu bazı çalışmalarla gösterilmiştir. Janzowski ve arkadaşlarının (2000) yaptığı kapsamlı bir değerlendirmede, HMF'nin DNA hasarına neden olabileceği ancak bu etkinin özellikle metabolit formu olan SMF aracılığıyla ortaya çıktığı belirtilmiştir. Bununla birlikte, yapılan birçok in vivo deneyde mutajenik etkinin dşuk olduğu veya gözlenmediği raporlanmıştır.

HMF'nin kanserojen olup olmadığı konusu bilimsel camiada tartışmalıdır. Uzun süreli hayvan çalışmaları, karaciğer adenomu gibi tümör benzeri oluşumlara işaret etmiştir; fakat bu sonuçların insanlar için doğrudan genellenmesi mümkün değildir (Bauer-Marinovic ve ark., 2019). HMF'nin potansiyel kanserojen etkileri, özellikle gıdalarda sürekli maruz kalınan dşuk dozların uzun vadeli etkileri açısından daha fazla araştırma gerektirmektedir.

Zhang ve arkadaşları (2020) tarafından yapılan çalışmada, HMF'nin mide mukozasında oksidatif stres oluşturarak hücre hasarına yol açtığı, apoptozu indüklediği ve sıkı bağlantı (tight junction) proteinlerinin ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir. Bu durum, gastrointestinal bariyer bütünlüğünün bozulmasına ve patojen geçişinin artmasına neden olabilir. Ayrıca bu etkiler, HMF'nin yüksek oranda bulunduğu bal aromalı şuruplar gibi ürünlerin uzun vadede mide sağlığı açısından dikkatle değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir.

Zhang ve arkadaşları (2019) tarafından yürütülen hayvan deneylerinde, HMF'ye maruz kalan dişi sıçanlarda estrus döngüsünde uzama, yumurtalık foliküllerinde atrofi ve hormonal düzensizlikler gözlenmiştir. Bu bulgular, HMF'nin endokrin sistemi etkileyebilecek bir çevresel toksik madde olabileceğini düşündürmektedir.

Günlük HMF alımı; diyetin içeriğine, tüketilen gıdaların türüne ve pişirme şekline göre değişmektedir. Yapılan çalışmalarda günlük 80-100 mg kg⁻¹ vücut ağırlığına kadar olan HMF alımlarının toksikolojik açıdan güvenli kabul edilebileceği belirtilmiştir (Bauer-Marinovic ve ark., 2019). Ancak aşırı ısı işlem görmüş veya uzun süre saklanmış ürünlerde bu sınırların aşılabildiği bilinmektedir. Bu nedenle, özellikle gıda ürünlerinin üretim ve saklama koşulları dikkatle izlenmelidir.

HMF, birçok gıdada doğal olarak bulunmasına rağmen, yüksek dozlarda potansiyel sağlık riskleri de taşıyan bir bileşiktir. Özellikle karaciğer, böbrek, sinir sistemi, sindirim sistemi ve endokrin sistem üzerindeki etkileri bilimsel olarak gösterilmiştir. Bununla birlikte, mevcut veriler çoğunlukla hayvan deneylerine dayalı olup, insanlar üzerindeki uzun vadeli etkiler konusunda daha fazla epidemiyolojik ve klinik araştırmaya ihtiyaç vardır. Gıda ürünlerindeki HMF miktarının izlenmesi ve maruziyetin kontrol altında tutulması, halk sağlığı açısından önem arz etmektedir.

Bu bağlamda, karbonhidrat içeriği yüksek olan ve özellikle çocuklar gibi hassas gruplarca tüketilen gıda ürünlerinin HMF içeriğinin kontrol edilmesi büyük bir önem arz etmektedir. Son yıllarda, bal içerikli ya da bal aromalı olarak piyasaya sürülen şurupların sayısında belirgin bir artış yaşanmıştır. Bu ürünler çoğu zaman "doğal" ya da "bitkisel" nitelikte pazarlansa da, içeriklerinde yüksek sıcaklık işlemlerine maruz kalmış olabileceği ve buna bağlı olarak HMF seviyelerinin yükselmiş olabileceği bilinmektedir.

Bu çalışmada, eczanelerde ve piyasada farklı firmalar tarafından satışa sunulan bal aromalı şuruplarda HMF düzeylerinin tespiti amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, hızlı, güvenilir ve pratik uygulanabilirliğe sahip bir yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen bu yöntem ile farklı satış noktalarından temin edilen bal aromalı şuruplarda HMF düzeyleri belirlenmiş; elde edilen bulgular, ürünlerin ısı işlem geçmişi ve kalitesi açısından değerlendirilmiştir. Böylece

piyasada yer alan bal aromalı şurupların HMF içerik düzeylerinin belirlenmesiyle, hem halk sağlığının korunması hem de kalite standartlarının denetlenmesine katkı sağlanması hedeflenmiştir.

2.3. HMF ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Gıda ürünlerinin işlenmesi ve muhafazası sırasında maruz kaldığı ısı işlemleri, özellikle şeker içeriği yüksek ürünlerde, bazı istenmeyen bileşiklerin oluşmasına neden olabilmektedir. Bu bileşiklerin başında gelen 5-hidroksimetilfurfural (HMF), karbonhidratların asidik ortamda ve ısı işlem altında parçalanması sonucu oluşur ve birçok gıdada kaliteyi etkileyen önemli bir indikatör olarak değerlendirilmektedir. Özellikle fruktoz ve glukoz gibi heksoz şekerlerinin yüksek sıcaklıklara maruz kalması sonucu meydana gelen HMF, sadece ürünün işleme derecesini değil, aynı zamanda raf ömrü süresince depolama koşullarının uygunluğunu da yansıtan kimyasal bir parametredir.

HMF oluşumu; sıcaklık, pH, süre, şeker türü ve konsantrasyonu gibi birçok faktörden etkilenmektedir. Bu durum, gıda ürünlerinde HMF seviyelerinin sadece üretim sırasında değil, depolama süresince de artabileceğini göstermektedir. Özellikle ticari olarak üretilen reçel, marmelat, pekmez ve meyve suları gibi ürünlerde, işlem koşullarına ve depolama süresine bağlı olarak başlangıçta düşük olan HMF seviyeleri zamanla önemli ölçüde artabilmektedir. Rada-Mendoza ve arkadaşları (2004) tarafından yürütülen bir çalışmada, 38 reçel ve 18 meyve bazlı bebek gıdası örneğinde HMF miktarının 7.2 ila 71.7 mg kg⁻¹ arasında değiştiği rapor edilmiştir. Aynı çalışmada, 20 °C ve 35 °C'de 12 ay boyunca depolanan ürünlerde HMF seviyelerinin sıcaklık ve süreyle doğru orantılı olarak arttığı ve bu artışın ürün kalitesini olumsuz etkilediği gösterilmiştir.

Kus ve arkadaşları (2005) tarafından yürütülen daha kapsamlı bir analizde ise, farklı türdeki gıdalarda (örneğin kurutulmuş meyveler, bal, reçel, tahıl ürünleri, meyve

suları, sirke ve helva) HMF miktarının 0 ile 3500 ppm arasında değiştiği tespit edilmiştir. Bu geniş varyasyon, HMF oluşunun sadece ürün tipine değil, aynı zamanda işleme koşullarına ve saklama ortamına da bağlı olduğunu ortaya koymaktadır. HMF'nin oluşumunu sınırlandırmaya yönelik teknolojik uygulamalara dair bir başka çalışmada, Kaplan (2006) meyve sularının pastörizasyon sonrası hızla soğutulmasının HMF üretimini sınırlamada etkili olduğunu göstermiştir. Bu çalışmaya göre, pastörize edilip doğrudan soğutulmayan ürünlere HMF seviyesi, soğutulmuş ürünlere kıyasla %4.2 ila %21.4 oranında daha yüksek bulunmuştur.

Isıl işleme maruz bırakılan, şeker içeriği yüksek pek çok gıda (kurutulmuş meyveler, meyve suyu, marmelat, reçel, pekmez, salça, sirke, bisküvi, karamel ürünleri vb.) doğal olarak belirli miktarda HMF içermektedir. Bu bileşiğin gıda içerisindeki yüksek konsantrasyonları, ürünün renginde esmerleşme, tat ve koku profilinde değişiklik, besin değerinde azalma gibi kaliteyi doğrudan etkileyen sonuçlara yol açabilmektedir. Ayrıca HMF, yalnızca duyusal ve besinsel kaliteyi değil, aynı zamanda tüketici sağlığını da ilgilendiren bir bileşiktir. Janzowski ve arkadaşları (2000) tarafından yapılan alışmalar, HMF'nin yüksek düzeylerde toksik özellikler gösterebileceğini, bu durumun insan sağlığı açısından çeşitli endişelere yol açabileceğini ortaya koymuştur. Bu nedenle, bazı gıdalarda HMF miktarına ilişkin yasal sınırlamalar getirilmiştir.

Türkiye'de yürürlükte olan Türk Gıda Kodeksi, çeşitli ürünler için HMF sınır değerlerini açıkça belirtmiştir. Örneğin, 2012/58 sayılı Bal Tebliği kapsamında bal ürünlerinde HMF düzeyi en fazla 40 mg kg⁻¹ olarak belirlenmiştir. Yine 2007/27 sayılı Üzüm Pekmezi Tebliği, sıvı pekmezler için HMF sınırını 75 mg kg⁻¹, katı pekmezler için ise 100 mg kg⁻¹ olarak tanımlamıştır. Ancak süt ürünleri, meyveli toz içecekler, peynir altı suyu gibi diğer ısıll işlem görmüş gıdalarda HMF oluşumunun kontrolüne yönelik

uygulamaların yeterince sistematik olmadığı da bazı çalışmalarca dile getirilmiştir (Doğan ve ark., 2004).

Malezya'da yapılan bir çalışmada, dokuz farklı bal örneğinin hidroksimetilfurfural (HMF) içerikleri yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) yöntemiyle analiz edilmiştir. Araştırma sonuçları, balın depolama süresi ile HMF seviyesi arasında anlamlı bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur. Taze ballarda 3-6 ay içerisinde 2.80-24.87 mg kg⁻¹ arasında HMF tespit edilirken, 12-24 ay gibi uzun sürelerde depolanan örneklerde HMF seviyesinin 128.19-1131.76 mg kg⁻¹'a kadar yükseldiği saptanmıştır. Bu bulgular, balın en geç bir yıl içinde tüketilmesinin kalite açısından önemli olduğunu göstermektedir (Khalil ve ark., 2010).

İstanbul'da marketlerden temin edilen sekiz farklı ticari elma suyu örneği üzerinde yapılan bir çalışmada, HMF seviyeleri HPLC ile analiz edilmiştir. Bulgular, HMF içeriğinin 1.77-7.73 mg L⁻¹ aralığında değiştiğini göstermiştir. Bu çalışma, HPLC yönteminin elma suyu gibi ısı işlemine tabi gıdalarda kalite kontrol açısından kullanılabilirliğini ve etkinliğini vurgulamaktadır (Sahin ve Bilgin, 2020).

Farklı meyve suyu konsantreleri üzerinde yapılan bir çalışmada, HMF seviyeleri 0.4 ile 4.5 ppm arasında değişmiştir. Bu değerlerin, ürünlerin geçirdiği ısıl işlemler ve non-enzimatik esmerleşme reaksiyonlarıyla doğrudan ilişkili olduğu belirlenmiştir. HPLC yöntemiyle elde edilen veriler, konsantre ürünlerde HMF'nin ısıya bağlı oluşum mekanizmalarının anlaşılmasına katkı sağlamaktadır (Ramírez-Jiménez ve ark., 2000).

Unifloral ballar ve ticari bal karışımları üzerinde yapılan karşılaştırmalı çalışmada, HMF analizinde HPLC yöntemi ile spektrofotometrik yöntem karşılaştırılmıştır. HPLC yöntemi, 1-4 mg kg⁻¹ gibi düşük konsantrasyon aralıklarında daha yüksek doğruluk ve hassasiyet sunarak spektrofotometrik yöntemle göre daha üstün bulunmuştur (Smanalieva ve Senge, 2009). HMF'nin portakal suyu örneklerinde tayini amacıyla geliştirilmiş bir

HPLC yöntemi kullanılarak yapılan çalışmada, etil asetat ile ekstraksiyon sonrası ters faz HPLC uygulanmıştır. Yöntem, %96.1 ± 4.1 geri kazanım oranı ve 5.0 ppb dedeksiyon limiti ile oldukça güvenilir sonuçlar sunmuştur (Vallejo ve ark., 2003).

Nar suyu üzerine yapılan başka bir araştırmada, Sep-Pak C-18 kartuşları ile yapılan saflaştırma işlemi sonrası HPLC ile analiz gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem, HMF'nin nar suyundaki miktarının doğru biçimde belirlenmesini sağlarken, fenolik bileşiklerle olan potansiyel kimyasal etkileşimlerini de değerlendirmeye imkan tanımıştır (Taha ve ark., 2019).

HMF'nin toksikolojik özelliklerine odaklanan bir çalışmada, bu bileşiğin insan sağlığı üzerinde potansiyel kanserojen ve sitotoksik etkiler oluşturabileceği belirtilmiştir. HPLC ile yapılan ölçümlerde HMF düzeylerinin yüksek olduğu örneklerde özellikle DNA hasarı ve hücre toksisitesine dair risklerin arttığı gözlemlenmiştir (Kumar ve Sinha, 2021).

Malezya'da yapılan bir başka çalışmada, farklı yörelere ait bal örneklerinin fizikokimyasal özellikleriyle birlikte HMF içerikleri de HPLC yöntemiyle analiz edilmiştir. Çalışma, HMF düzeylerinin balın antioksidan kapasitesi ile ters orantılı olduğunu ve bu yöntemin kalite belirlemede etkin şekilde kullanılabileceğini ortaya koymuştur (Moniruzzaman ve ark., 2013).

Mısır'da gerçekleştirilen bir çalışmada, meyve suyu örneklerinde hem HMF hem de patulin miktarları HPLC yöntemiyle tespit edilmiştir. Sonuçlar, HMF seviyelerinin 0.53 ile 477 mg L⁻¹ arasında değiştiğini göstermiştir. Bu çalışma, HMF'nin kalite kontrolü açısından önemini bir kez daha vurgulamaktadır (El-Kalyoubi ve Mohamed, 2021).

Gıda ürünlerinde HMF'nin bir kalite belirteci olarak kullanılabilirliğine yönelik yapılan bir çalışmada, farklı gıda kategorilerindeki örneklerde HMF düzeyleri analiz edilmiştir. HPLC yöntemiyle yapılan bu analizler, üretim ve depolama koşullarının

izlenebilirliğinde HMF'nin etkin bir kimyasal gösterge olduğunu ortaya koymuştur (Mroczek ve Wójciak-Kosior, 2018).

HMF ve benzeri furan türevleri, özellikle uzun vadeli tüketimde sağlık açısından risk oluşturabilecek bileşikler olarak değerlendirilmektedir. HMF, pentozlardan furfural, heksozlardan ise asidik ortamda ve yüksek sıcaklıkta dönüşümle oluşmaktadır. Bu bileşiğin mutajenik ve genotoksik etkileri, çeşitli in vitro ve in vivo çalışmalarla desteklenmiştir. Miller (1994), HMF'nin hücre düzeyinde mutasyonlara neden olabileceğini, dolayısıyla potansiyel kanserojen bileşikler arasında değerlendirilebileceğini belirtmiştir. Teixidó ve arkadaşları (2006) tarafından yapılan hayvan deneylerinde, HMF'nin yüksek dozlarda üst solunum yolları, göz, deri ve mukozalarda tahrişe yol açtığı ve sitotoksik etkiler gösterdiği rapor edilmiştir. Ayrıca, HMF'nin sülfotransferaz enzimleri aracılığıyla biyolojik olarak aktif hale gelerek DNA'ya zarar verebildiği, Rufián-Henares ve De La Cueva (2007) ile Durling ve arkadaşları (2009) tarafından yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur. Teixidó ve arkadaşları (2006) tarafından yapılan toksikolojik değerlendirmelerde, farelerde oral yolla verilen HMF'nin letalite dozu (LD₅₀) yaklaşık 3.10 g kg⁻¹ vücut ağırlığı olarak belirlenmiştir.

Bu veriler, özellikle gıda bileşenlerinin kanser yapıcı potansiyeli ve dünya genelinde artan kanser prevalansı göz önünde bulundurulduğunda, gıda güvenliği açısından HMF'nin kontrol altına alınmasının gerekliliğini açıkça ortaya koymaktadır. Hem sağlık risklerinin önlenmesi hem de tüketiciye kaliteli ve güvenli gıdaların sunulabilmesi açısından, HMF gibi bileşiklerin üretim ve depolama süreçlerinde etkin şekilde izlenmesi ve yasal sınırlara uygunluğunun sağlanması büyük önem taşımaktadır.

Bu bağlamda, özellikle besin değeri yüksek, doğal ve yaygın olarak tüketilen bir ürün olan bal, üretiminden tüketiciye ulaşıncaya kadar kalite kontrol süreçlerinin titizlikle

yürütülmesi gereken önemli bir gıdadır. Bal, özellikle çocuklar, yaşlılar ve bağışıklık sistemi zayıf bireyler tarafından sıklıkla tercih edilmekte olup, bu durum balın kimyasal içeriğinin güvenli olması gerekliliğini artırmaktadır. Üretim sırasında uygulanan ısı işlemleri ve sonrasında gerçekleşen depolama koşulları, balda HMF oluşumunu doğrudan etkileyen unsurlar arasında yer almaktadır. Bu nedenle, bal ve bal aromalı ürünlerde HMF düzeyinin izlenmesi, ürünün hem kalite hem de sağlık açısından uygunluğunu değerlendirmede kritik bir rol oynamaktadır.

2.4. Kromatografik Yöntemler

Kromatografi, kompleks karışımlarda yer alan ve fizikokimyasal özellikleri birbirine oldukça yakın olan bileşenlerin ayrılması, tanımlanması ve kantitatif ya da kalitatif olarak tayin edilmesi amacıyla yaygın şekilde kullanılan çok yönlü ve güçlü bir analitik ayırma yöntemidir. Kromatografik teknikler, yüksek duyarlılık ve seçicilik sağlamaları, çok sayıda bileşenin aynı anda analizine olanak tanımları ve geniş uygulama yelpazeleri nedeniyle, modern analitik kimyada vazgeçilmez bir yere sahiptir. Bu yönüyle, özellikle kimya, biyokimya, çevre bilimleri, ilaç endüstrisi, gıda analizi ve klinik tanı gibi birçok alanda yoğun olarak kullanılmaktadır.

Kromatografinin bilimsel temelleri, 20. yüzyılın başlarında Rus botanikçi Mikhail Tswett tarafından atılmıştır. Tswett, bitkilerdeki pigmentleri ayırmak amacıyla, toz halindeki kalsiyum karbonat ile doldurulmuş bir cam kolondan klorofil ve ksantofil içeren bitki özütlerini geçirerek bu pigmentleri birbirinden başarılı bir şekilde ayırmıştır. Pigmentlerin kolon içerisinde farklı yüksekliklerde renkli bantlar oluşturması, bu yöntemin “renk yazımı” anlamına gelen Yunanca kökenli *kromatografi* terimiyle adlandırılmasına neden olmuştur.

Kromatografik ayırma işlemleri genel olarak iki temel fazın etkileşimine dayanır: hareketli faz (mobil faz) ve sabit faz (stasyoner faz). Numune, gaz, sıvı veya süperkritik

akışkan formundaki hareketli faz ile birlikte sabit faz üzerinden geçirilir. Bu süreçte, karışımdaki her bir bileşenin sabit faz ile olan etkileşim derecesi farklı olduğundan, bileşenler kolonda farklı hızlarda ilerler ve böylece birbirlerinden ayrılır. Ayrım mekanizması, adsorpsiyon, dağılım (partisyon), iyon değişimi ya da moleküler boyut farkı gibi fiziksel ve kimyasal prensiplere dayanabilir. Bu nedenle, kromatografi genel anlamda; sabit bir ortama uygulanan karışımdaki bileşenlerin, seçilen hareketli faz yardımıyla farklı taşıma hızlarına ve etkileşim kuvvetlerine bağlı olarak ayrılmasına dayanan ayırma yöntemlerinin tümünü kapsayan bir terimdir.

Kromatografi teknikleri, kullanılan fazların türüne, ayırma mekanizmasına, uygulama amacına ve analiz edilen numunenin yapısal özelliklerine göre farklı kategorilere ayrılmaktadır. Başlıca kromatografik yöntemler arasında gaz kromatografisi (GC), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), ince tabaka kromatografisi (TLC), iyon değişim kromatografisi, jel filtrasyon kromatografisi (GFC) ve afinite kromatografisi gibi teknikler yer almaktadır. Her bir yöntem, özgül uygulama alanlarına göre optimize edilerek hem kalitatif hem de kantitatif analizlerde etkin olarak kullanılmaktadır. Sonuç olarak kromatografi, modern analitik bilimlerde bileşenlerin özelliklerine göre yüksek doğruluk ve duyarlılıkla ayrılmasını sağlayan, geniş uygulama alanına sahip, çok yönlü bir ayırma teknolojisidir.

2.4.1. Kromatografik Yöntemlerinin Sınıflandırılması

Kolon kromatografisinde, sabit faz silindirik ve dar bir kolona doldurularak yerleştirilir; hareketli faz ise bu sabit faz içerisinden dışarıdan uygulanan basınç yardımıyla geçirilir. Bu sayede karışımı oluşturan bileşenler, sabit faz ile etkileşimlerine bağlı olarak farklı hızlarda ilerleyerek birbirlerinden ayrılır.

Düzlemsel kromatografi yöntemlerinde ise sabit faz, düz bir plaka (örneğin cam, alüminyum ya da plastik) üzerine ince bir tabaka halinde sabitlenir. Hareketli faz, bu

düzlem boyunca kapiler etki ve yer çekiminin yardımıyla ilerler. Bu yöntem, genellikle daha basit ve hızlı ön analizler için tercih edilir.

Bunların dışında kromatografik teknikler, yalnızca sabit fazın fiziksel yerleşimine göre değil; aynı zamanda ayırma mekanizmalarına, kullanılan fazların fiziksel hâline ve bileşenlerin sabit fazla etkileşim türlerine göre de çok çeşitli şekillerde sınıflandırılabilmektedir.

2.4.2. Kromatografide Temel Olan Fiziksel ve Kimyasal Olaylar

Kromatografik ayırma yöntemlerinin temelinde, karışımı oluşturan bileşenlerin sabit ve hareketli fazlarla olan fiziksel ve kimyasal etkileşim farklılıklarına dayalı dört ana ayırma mekanizması yer almaktadır. Bu mekanizmalar; dağılma (partisyon), adsorpsiyon, iyon değişimi ve moleküler boyut eleme (jel filtrasyon) temellidir. Her bir mekanizma, kendine özgü faz kombinasyonları, analit özellikleri ve uygulama alanları doğrultusunda geliştirilmiş çeşitli kromatografik tekniklerin temelini oluşturmaktadır.

2.6.2.1. Dağılma (Partisyon) Kromatografisi

Dağılma kromatografisi, özellikle sıvı kromatografi teknikleri arasında en yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir. Bu yöntemin temel prensibi, analit moleküllerinin, birbirleriyle karışmayan iki sıvı faz (sabit faz ve hareketli faz) arasında farklı dağılım dengeleri kurmasıdır. Sabit faz genellikle bir destek yüzey üzerine adsorbe edilmiş ya da kimyasal olarak bağlanmış sıvı fazdır. Hareketli faz ise tek bir çözücünden veya uygun oranlarda karıştırılmış çözücü sistemlerinden oluşabilir.

Dağılma kromatografisi, kullanılan fazların bağıl (görelî) polaritelerine göre iki ana alt türe ayrılır:

Normal-Faz Kromatografisi (NP-HPLC): Sabit fazın polar, hareketli fazın ise apolar olduğu sistemlerdir. Bu yöntemde polar bileşikler sabit fazla daha güçlü etkileşim gösterdiğinden, kolonda daha uzun süre tutulurlar.

Ters-Faz Kromatografisi (RP-HPLC): En yaygın kullanılan dağılma kromatografisi tekniğidir. Sabit faz apolar (genellikle C18 gibi hidrokarbon zincirleriyle modifiye edilmiş silika), hareketli faz ise polar (su, metanol, asetonitril gibi) özellik taşır. Apolar bileşikler sabit faza daha çok tutunur ve daha geç elüe olurken, polar bileşikler daha hızlı kolonu terk eder. Bu yöntem, ilaç etkin maddeleri, biyomoleküller, çevresel analizler ve kompleks karışımların ayrılması gibi çok geniş bir uygulama alanına sahiptir.

2.4.2.2. Adsorpsiyon Kromatografisi

Adsorpsiyon kromatografisi, kromatografik teknikler arasında tarihsel olarak ilk geliştirilmiş olan yöntemdir. Bu yöntemin temelinde, karışımdaki bileşenlerin sabit faz olarak kullanılan katı yüzeylere (örneğin silika jel veya alümina gibi adsorbanlara) olan farklı adsorpsiyon kuvvetleri yatmaktadır. Hareketli faz genellikle sıvı hâlde olup, bileşenlerin sabit faza tutunma eğilimleri ile taşınma eğilimleri arasındaki denge üzerine kuruludur.

Bileşenlerin sabit fazla olan etkileşim kuvvetleri (örneğin van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağları ya da dipol-dipol etkileşimleri) farklılık gösterdiği için, her bir bileşenin kolondan geçiş süresi farklı olur ve böylece ayırım gerçekleşir. Bu yöntem, özellikle düşük moleküler ağırlıklı organik bileşiklerin ayrılmasında etkilidir.

2.4.2.3. İyon Değişim Kromatografisi

İyon değişim kromatografisi, iyonik bileşiklerin sabit faz üzerinde bulunan karşıt yüklü iyonlarla yer değiştirme prensibine dayanmaktadır. Sabit faz olarak kullanılan iyon değiştirici maddeler, çözünmeyen, yüksek molekül ağırlıklı ve genellikle polimerik yapıya sahip materyallerdir. Bu maddeler, yapılarına bağlı olarak katyon veya anyon değiştirici olarak sınıflandırılabilir.

Organik iyon değiştiriciler, genellikle reçine adı verilen polimerik malzemelerdir. Bu maddeler suda ve çoğu organik çözücüde çözünmezler ve

yüzeylerinde yüksek yoğunlukta fonksiyonel gruplar (örneğin $-SO_3^-$ veya $-NH_3^+$) bulundurlar. Bu sayede selektif olarak anyon veya katyonlarla etkileşime girerek ayırım yapabilirler.

İnorganik iyon değiştiriciler, en yaygın olarak zeolit gibi kristal yapıdaki aluminosilikatlar olup, iyon değişim kapasitesi oldukça yüksek olan malzemelerdir. Zeolitler genellikle $Na_2Al_2Si_4O_{12}$ genel formülü ile temsil edilir.

Bu yöntem, özellikle farmasötik bileşiklerin (ilaçlar ve metabolitleri), biyolojik sıvıların (serum, plazma), gıda katkı maddelerinin, vitamin karışımlarının ve şekerlerin analizi gibi çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadır.

2.4.2.4. Boyut Eleme (Jel Filtrasyon) Kromatografisi

Boyut eleme kromatografisi, jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) veya jel süzme kromatografisi (GFC) olarak da adlandırılır. Bu yöntemde ayırma işlemi, moleküllerin fiziksel büyüklüklerine (hidrodinamik hacimlerine) göre gerçekteşir. Sabit faz, belirli bir gözenek çapına sahip silika ya da polimer esaslı jel taneciklerinden oluşur.

Bu teknikte, küçük moleküller sabit fazdaki gözeneklerin içine difüze olur ve bu nedenle kolonda daha uzun süre kalırlar. Buna karşın, büyük moleküller gözeneklere giremediklerinden sabit fazla daha az etkileşime girer ve hareketli fazla birlikte kolonu daha hızlı terk ederler. Böylece, büyük moleküller önce, küçük moleküller ise daha sonra elüe edilir.

Boyut eleme kromatografisi, özellikle polimerlerin moleküler ağırlık dağılımlarının belirlenmesinde, proteinlerin saflaştırılmasında ve biyolojik makromoleküllerin ayrılmasında sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Ayrıca non-denatüratif (yapı bozulmadan) analiz yapabilme avantajı nedeniyle biyoteknoloji ve farmasötik uygulamalarda da önemli bir yer tutmaktadır.

2.5. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Klasik sıvı kromatografisi, karışım bileşenlerinin bir çözücü (hareketli faz) aracılığıyla sabit faz içeren bir kolondan geçirilmesi ve bu süreçte bileşenlerin kolon boyunca farklı hızlarla ilerleyerek bantlar (zonlar) halinde ayrılması esasına dayanır. Numunedeki bileşenlerin daha net ve etkin şekilde ayrılabilmesi için, başlangıçta daha uzun kolonlar tercih edilmiştir. Ancak bu tür sistemlerde, bileşenlerin tamamen ayrılması saatler sürebildiğinden, analiz süresi ciddi ölçüde uzamıştır.

Alternatif olarak, ayırma etkinliğini artırmak amacıyla kolon içerisinde kullanılan sabit faz partiküllerinin boyutları küçültülmüş, bu da çözünürlüğü artırsa da hareketli fazın kolondan geçiş süresini ciddi biçimde artırarak yine uzun analiz sürelerini zorunlu kılmıştır.

Bu problemlere çözüm getirmek amacıyla araştırmacılar, kolondaki partikül boyutunu küçültmekle birlikte kolon çap ve uzunluklarını da azaltmış, böylece sistemin genel hacmini düşürmüşlerdir. Ancak küçük partiküllerle doldurulan kolonlarda, hareketli fazın akış direnci arttığı için, bu fazın kolondan etkin biçimde geçirilebilmesi amacıyla dışardan basınç uygulanmaya başlanmıştır. Bu yaklaşımın sonucunda, Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (High Pressure Liquid Chromatography-HPLC) tekniği geliştirilmiştir.

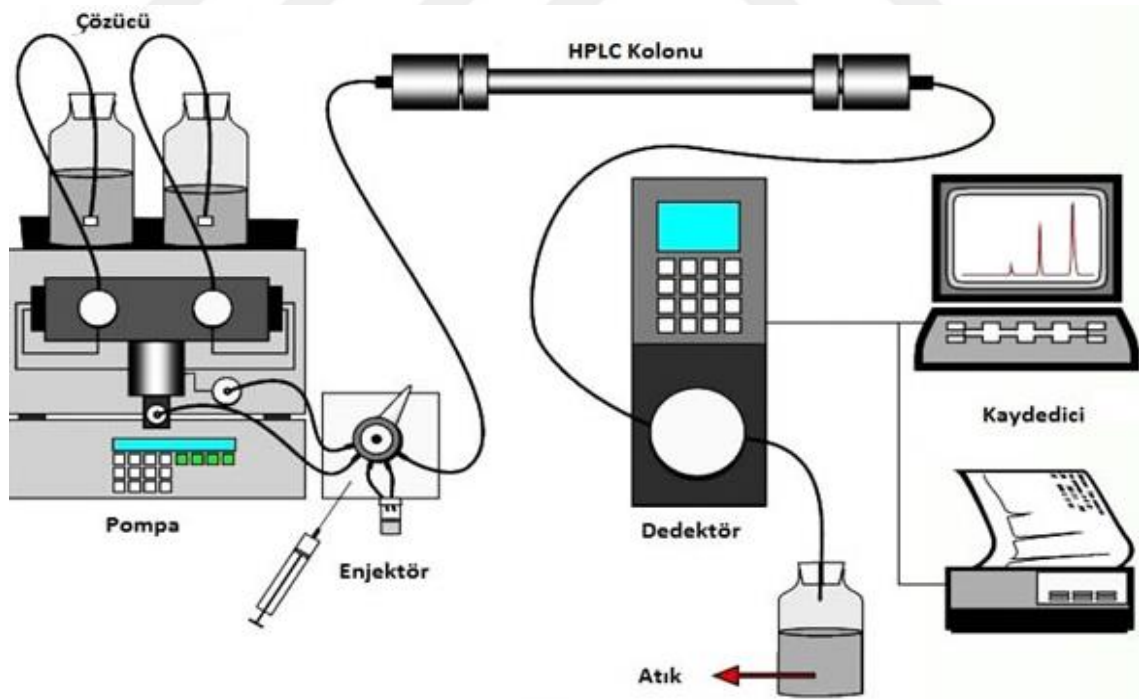
1970'li yılların ortalarında ortaya çıkan HPLC, kolon dolgu malzemelerindeki ilerlemeler, düşük hacimli sistem tasarımları ve dedektörlerin cihaza entegre edilmesiyle hızlı bir gelişim göstermiştir. 1980'li yıllardan itibaren, bu teknik kimyasal bileşiklerin ayırımı ve analizi alanında yaygın bir biçimde kullanılmaya başlanmıştır. Zamanla teknik donanımın ve uygulama protokollerinin iyileştirilmesiyle birlikte, bu yöntem daha hassas, daha hızlı ve daha güvenilir hale getirilmiştir. Günümüzde, yöntemin modern hali Yüksek

Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography) olarak adlandırılmaktadır.

HPLC'nin bu denli yaygınlaşmasının temel nedenleri arasında; yüksek duyarlılık düzeyi, doğru ve tekrarlanabilir kantitatif sonuçlar elde edebilme kabiliyeti, uçucu olmayan ya da ısıya duyarlı bileşiklerin analizine olan uygunluğu ve geniş uygulama alanına sahip olması yer almaktadır. Özellikle farmasötik endüstri, çevre kimyası, biyokimya, gıda analizi ve klinik tanı gibi halk sağlığı ve sanayinin pek çok alanını doğrudan ilgilendiren sektörlerde, HPLC önemli bir analitik araç hâline gelmiştir.

2.5.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Cihazı

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazı, çözücü tankı, pompa, enjektör, kolon, dedektör ve kaydedici olmak üzere altı ana bölümden oluşan bir sistemdir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazının şematik görünüşü

2.5.1.1. Kolonlar

HPLC sistemlerinde kolonlar, analiz başarısını doğrudan etkileyen en kritik bileşenlerden biri olarak kabul edilmektedir. Bu kolonlar, genellikle yüksek basınca dayanıklı olacak şekilde tasarlanmış, düzgün iç yüzeye sahip paslanmaz çelik borulardan imal edilmektedir. Bununla birlikte, bazı özel uygulamalarda, özellikle görünürlük gerektiren durumlarda kalın cidarlı cam kolonlar da tercih edilebilmektedir.

Standart bir analitik HPLC kolonu tipik olarak 3-4 mm iç çapa ve 10-40 cm uzunluğa sahiptir. Kolon içerisinde yer alan sabit faz materyali ise çoğunlukla 5-10 mikrometre (μm) çapında silikajel (silika bazlı) parçacıklardan oluşmaktadır. Günümüzde en yaygın kullanılan analitik kolonlar, 25 cm uzunluğunda, 4.6 mm iç çapında ve 5 μm partikül boyutuna sahip dolgu malzemesi ile doldurulmuş olanlardır. Bu tür kolonlar, yüksek verimlilik sunmakta olup, 1 metre uzunluğunda yaklaşık 40.000-50.000 teorik tabaka içerebilmektedir. Teorik tabaka sayısı, bir kolonun ayırma gücünün önemli bir göstergesidir.

Son yıllarda, daha küçük hacimli örneklerin daha hızlı ve daha az çözücü kullanılarak analiz edilmesini sağlamak amacıyla mikro kolon teknolojileri geliştirilmiştir. Bu yüksek performanslı mikro kolonlar, genellikle 1-4.6 mm iç çapa ve 3-7.5 cm uzunluğa sahip olup, içerdikleri dolgu maddelerinin parçacık boyutları 3-5 μm aralığındadır. Bu kolonlar, kompakt yapıları sayesinde daha kısa sürede ve daha düşük çözücü tüketimi ile yüksek çözünürlüklü ayırımlar gerçekleştirebilmektedir. Ayrıca, bu mikro kolonlarla ulaşılan teorik tabaka sayısı 100.000'e kadar çıkabilmektedir.

Kolonların performansını sürdürürebilmek ve kullanım ömrünü uzatmak amacıyla, çoğu sistemde asıl analitik kolonun önüne bir koruyucu kolon (guard veya pre-column) yerleştirilir. Bu ön kolonlar, hareketli faz içerisinde ya da numune matrisinde bulunabilecek partikül, tortu ve diğer kontaminantların analitik kolona ulaşmasını

engelleyerek sistemin verimliliğini korur. Göreli olarak daha düşük maliyetli olan bu kolonlar, kolaylıkla değiştirilebilir yapıdadır. Ancak dikkat edilmesi gereken önemli bir husus, koruyucu kolon dolgu malzemesinin bileşim ve partikül boyutu bakımından analitik kolona uygun ve uyumlu olmasıdır. Bu sayede sistemin genel kromatografik performansında herhangi bir kayıp yaşanmadan uzun süreli ve güvenilir analizler gerçekleştirilebilir.

2.5.1.2. Pompalar

HPLC sistemlerinin temel bileşenlerinden biri olan pompalar, sıkı bir şekilde doldurulmuş kolon içerisinden hareketli fazın sabit ve kontrollü bir hızla geçirilmesini sağlayan mekanik cihazlardır. Pompa performansı, sistemin genel analiz süresi, tekrarlanabilirliği ve ayırma verimliliği açısından büyük önem taşımaktadır. HPLC sistemlerinde yaygın olarak kullanılan üç ana pompa türü bulunmaktadır. Bu pompa türlerinin her biri, kendine özgü avantajlara ve sınırlılıklara sahiptir.

1. Pistonlu Pompalar

Pistonlu pompalar, günümüzde ticari HPLC sistemlerinin yaklaşık %90'ında kullanılmakta olan en yaygın pompa türüdür. Bu sistemlerde, motorla kontrol edilen bir pistonun ileri-geri hareketiyle, çözücü küçük hacimli bir silindir içerisine alınır ve yüksek basınçla dışarı pompalanır.

Avantajları:

- Kompakt iç hacim yapısına sahiptir.
- Yüksek çıkış basınçları (400 bar ve üzeri) sağlayabilir.
- Gradyan elüsyon sistemlerine entegre edilmeye uygundur.
- Çözücü viskozitesi ve kolon geri basıncından büyük ölçüde bağımsız, kararlı akış hızı üretir.

Dezavantajı:

- Akış, piston hareketi nedeniyle pulslu (titreşimli) karakterdedir; bu durum analiz hassasiyetini olumsuz etkileyebilir ve özellikle hassas dedeksiyon sistemlerinde sinyal kararlılığını bozabilir.

2. Sürgülü (Dişli Tahrikli) Pompalar

Sürgülü pompalar, bir vida mekanizması ile çalışan, kademeli motor kontrollü sistemlerdir. Bu mekanizma, hareketli fazın kolon içerisine sabit bir şekilde itilmesini sağlar.

Avantajları:

- Pulsuz (titreşimsiz) ve sabit akış hızı sağlar.
- Viskozitesi yüksek çözücülerde dahi sabit akış performansı gösterir.
- Geri basınçtan etkilenmez.

Dezavantajları:

- Sınırlı çözücü hacmi nedeniyle uzun süreli analizlerde yetersiz kalabilir.
- Çözücü değiştirme işlemi zahmetli ve zaman alıcıdır, bu da sistem esnekliğini azaltır.

3. Pnömatik Pompalar

Pnömatik pompalar, basınçlı hava veya gaz kullanılarak çalışan en basit pompa sistemleridir. Bu sistemlerde gaz basıncı, çözücünün bir haznedan itilerek kolona doğru ilerlemesini sağlar.

Avantajları:

- Pulsuz akış sağlar; bu da dedeksiyon sistemlerinde daha stabil sinyaller elde edilmesini kolaylaştırır.

Dezavantajları:

- Düşük çıkış basıncına sahiptir, bu nedenle yüksek basınç gerektiren uygulamalarda yetersiz kalabilir.
- Çözücü kapasitesi sınırlıdır ve akış hızı kontrolü daha zordur.

Her bir pompa türü, kullanım amacı, analiz süresi, çözücü özellikleri ve sistem bileşenleri göz önünde bulundurularak seçilmelidir. Günümüzde çoğu HPLC sisteminde pistonlu pompa teknolojisi, sunduğu yüksek basınç kapasitesi ve gradyan sistemlere uyumluluğu nedeniyle tercih edilmektedir. Ancak spesifik uygulamalarda pulsuz akış gereksinimi veya çözücü türü gibi etkenlere bağlı olarak diğer pompa türleri de kullanılabilir.

2.5.1.3. Enjektörler

HPLC sistemlerinin ilk dönemlerinde, numune enjeksiyonu genellikle manuel enjeksiyon yöntemiyle gerçekleştirilmekteydi. Bu yöntemde, yüksek basınca dayanıklı özel mikro şırıngalar kullanılarak numune doğrudan kolona enjekte edilmekteydi. Genellikle 100 atm (yaklaşık 10 MPa) basınca kadar dayanabilen bu mikro şırıngalar, yapısal olarak dayanıklı olmalarına rağmen bazı sınırlamalara sahiptir.

Bu yöntemin temel avantajı basitlik ve ekipman maliyetinin düşük olmasıdır. Ancak enjekte edilen numune hacminin tekrarlanabilirliği açısından ciddi kısıtlar barındırmaktadır. Şırınga ile yapılan enjeksiyonlarda hacimsel tekrarlanabilirlik genellikle %2-3 düzeyinde kalmakta, birçok durumda ise bu oran daha da düşmektedir. Bu durum, kantitatif analizlerde sonuç güvenilirliğini sınırlayan önemli bir faktör olarak değerlendirilmektedir.

Günümüzde ise manuel enjeksiyonun yerini, otomatik numune enjeksiyon sistemleri almıştır. Bu sistemler, örnek sarımı esasına dayanmakta olup, hassas ve tekrarlanabilir numune girişine olanak tanımaktadır. Otomatik enjeksiyon sistemleri,

modern HPLC cihazlarının entegre bileşeni hâline gelmiş ve manuel enjeksiyona göre hem tekrarlanabilirlik hem de iş gücü verimliliği açısından önemli avantajlar sağlamıştır.

Bu sistemlerde kullanılan enjeksiyon döngüleri (loops) genellikle değiştirilebilir yapıdadır ve 5 µL ile 500 µL arasında farklı numune hacimlerinin hassas biçimde kolona verilmesine olanak tanır. Ayrıca otomasyon ile birlikte, numune sıralaması, taşıyıcı çözücü uyumu ve çoklu numune analizi gibi işlemler de yüksek hassasiyetle gerçekleştirilebilmektedir. Bu sayede hem analiz süresi kısaltmakta hem de insan kaynaklı hataların önüne geçilebilmektedir.

2.5.1.4. Dedektörler

HPLC sistemlerinde, numunelerin kolon çıkışına ulaştıktan sonra tanımlanması ve miktarlarının belirlenmesi için dedektörler kullanılır. Bu dedektörler, numunelerin ışık enerjisini elektrik enerjisine dönüştürerek, analiz edilen bileşiklerin tespiti ve nitelendirilmesi sürecini sağlar.

Sıvı kromatografisinde kullanılan dedektörler temelde iki ana grupta sınıflandırılabilir:

- 1. Birinci Tip Dedektörler:** Bu dedektörler, hareketli fazın bazı temel fiziksel özelliklerinin değişimlerini ölçer. Analitlerin kolon boyunca hareket ederken, örneğin kırılma indisi, dielektrik sabiti veya yoğunluk gibi yığın özellikleri üzerinde yarattığı değişiklikler, dedektör tarafından algılanır. Bu tip dedektörler, analitlerin varlığını dolaylı olarak yığın özellikleri üzerindeki etkileriyle tespit eder.
- 2. İkinci Tip Dedektörler:** Bu dedektörler ise analitin kendine özgü özelliklerine yanıt verir. Bu özellikler arasında UV-Görünür bölge absorbanansı, floresans şiddeti veya difüzyon akımı gibi parametreler yer alır. Bu tür dedektörler, hareketli fazın doğal olarak sahip olmadığı, yalnızca analitlerin gösterdiği

özelliklere tepki vererek, bileşiklerin daha belirgin ve hassas bir şekilde tespit edilmesine olanak tanır.

Bu iki dedektör türü, HPLC analizlerinin doğruluğunu ve hassasiyetini arttırmak için kullanılır ve farklı analiz hedeflerine göre seçilebilir.

UV-Görünür Bölge Dedektörler

UV-Görünür Bölge dedektörleri, analitlerin belirli bir dalga boyunda ışık absorplama özelliklerini kullanarak tespit edilen dedektörlerdir. Bu dedektörlerde, dedektöre gelen maddeye belirli bir dalga boyunda ışık gönderilir ve bu ışık, maddenin absorplaması sonrasında çıkan ışığın şiddeti ölçülerek analiz yapılır. UV-Görünür Bölge dedektörleri, genellikle iki ana tipe ayrılır:

1. Filtreli Ultraviyole Absorbans Dedektörleri: Bu dedektörler, sabit dalga boyunda çalışan ve basit yapıda olan cihazlardır. Dalga boyu seçimi, interferanslı filtreler kullanılarak yapılır. Bu dedektörlerde genellikle civa lambası UV ışık kaynağı olarak tercih edilir. En yaygın kullanılan dalga boyu ise 254 nm'dir; bu dalga boyundaki ışın, interferanslı filtre aracılığıyla ayrıştırılarak kullanılmaktadır. Bunun dışında, alternatif ışık kaynakları kullanılarak farklı dalga boylarında da ölçüm yapılabilmesi mümkündür.

2. Monokromatörlü Ultraviyole Absorbans Dedektörleri: Bu tip dedektörler, değişken dalga boylarına sahip olup, bir monokromatör aracılığıyla çalışma dalga boyu seçilebilir. 108-400 nm arasındaki dalga boyları için döteryum lambası, 400-800 nm arasındaki dalga boyları için ise tungsten lambası kullanılır. Bu dedektörler, analitlerin maksimum absorpsiyon dalga boyunda çalışabilme avantajı sunar. Ayrıca, daha hassas ölçümler yapılmasına olanak tanır ve düşük dalga boylarında çalışabilmesi nedeniyle son derece kullanışlıdır. Bu dedektörler, özellikle analitlerin UV-Görünür bölgedeki ışık emilim özelliklerini hassas şekilde ölçmek için yaygın olarak kullanılır ve oldukça çeşitli uygulama alanlarına sahiptir.

2.6. Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)

Geçerlilik Testi (Validasyon), kalitatif veya kantitatif analizlerin doğruluğunu belirlemek amacıyla yapılan testlerin tamamını ifade eder. Bu testler, analiz edilen örneğin doğru sonuçlar verdiğini doğrulamak için gerçekleştirilir.

Yöntem geçerliliği testi için kullanılan temel parametreler aşağıda sıralanmıştır:

1. Doğruluk
2. Kesinlik
3. Örneklerin Kararlılığı (Stabilite)
4. Doğrusallık
5. Seçicilik
6. Duyarlılık
7. Geri Kazanım

Biyolojik ortamlarda ve farmasötik preparatlarda etkin maddelerin miktarının belirlenmesinde geliştirilen yöntemlerin geçerlilik testlerinin yapılması gerekmektedir. Bu testlerin nasıl gerçekleştirileceği aşağıda özetlenmiştir.

2.6.1. Doğruluk ve Kesinlik

Doğruluk, bir analitik yöntemde elde edilen sonuçların gerçek değere veya kabul edilen gerçek değere ne kadar yakın olduğunu belirtir ve genellikle bağıl ya da mutlak hata ile ifade edilir. Kesinlik ise, analitik bir işlemde önceden belirlenmiş koşullar altında aynı homojen örnekten alınan birçok örneğin, her birinden elde edilen ölçüm sonuçlarının birbirine ne kadar yakın olduğunu gösterir ve genellikle % BSS (bağıl standart sapma) ile ölçülür.

- **Günlük Kesinlik:** Aynı gün içinde birbirinden bağımsız olarak hazırlanmış numunelerden yapılan analizlerin sonuçlarının birbirine yakınlığını ifade eder. Bu, n=6 örnek için yapılan ölçümlerle % BSS olarak belirtilir.

- **Günler Arası Kesinlik:** Farklı günlerde (en az altı gün boyunca) birbirinden bağımsız olarak hazırlanmış numunelerden yapılan analizlerin sonuçlarının birbirine yakınlık derecesini ifade eder. Bu çalışma, aynı zamanda yöntem uygulanabilirliğinin de bir ölçüsüdür.

2.6.2. Örneklerin Kararlılığı (Stabilite)

Analiz süresince saklanan örneklerin bozunmadan ve sabit kalabilmesini sağlamak amacıyla yapılan testler kararlılık (stabilite) testlerini oluşturur. Etkin madde içeren örneklerin, laboratuvar koşullarında nem, sıcaklık, hava, dondurma-çözme gibi etkilere maruz kaldığında etkin maddenin ne kadar süre sabit kaldığı belirlenmeli ve bu süre literatürle de karşılaştırılmalıdır.

2.6.3. Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi

Bir analiz yönteminde çözeltiler, en düşük derişimden en yüksek derişime kadar hazırlanır ve analiz yapılır. Elde edilen cihaz cevabı (örneğin absorbans, akım, alan, yükseklik vb.) çözeltilerin derişimine karşı grafiksel olarak çizilir ve bu grafikte kalibrasyon eğrisi oluşturulur. Kalibrasyon eğrisinden regresyon denklemi ve korelasyon katsayısı hesaplanır.

2.6.4. Duyarlılık

Duyarlılık, analitik yöntemin en düşük derişimdeki analitleri tespit edebilme kapasitesinin bir ölçüsüdür.

2.6.5. Tayin Alt Sınırı (LOQ)

Tayin alt sınırı (LOQ), belirlenen deney koşulları altında analitik yöntemin, numune içindeki analiti uygun doğruluk ve kesinlikle tespit edebildiği en düşük derişimdir. Kromatografik analizlerde LOQ değeri, pik yüksekliğinin gürültü yüksekliğine oranı 10 olan derişim olarak tanımlanır.

2.6.6. Gözlenebilme (Teşhis) Sınırı (LOD)

Bir analitik yöntemin gözlenebilme (teşhis) sınırı, bir örnekteki incelenen bileşiğin belirlenebilen en düşük miktarıdır. Gözlenebilme sınırı, kantitatif tayin için doğruluk ve kesinlik ifade etmese de yalnızca bir sınır değeri sunar. Kromatografik çalışmalarda gözlenebilme sınırı, pik yüksekliğinin gürültü yüksekliğine oranı 3 olan derişim olarak kabul edilir.

2.6.7. Geri Kazanım

Geri kazanım, analiz sonucu bulunan değerin gerçek değere oranı olarak tanımlanır. Bu parametre, analiz edilen örnekteki bileşiğin geri kazanılabilirliğini ve doğruluğunu değerlendirmek için kullanılır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

- 5-Hidroksimetilfurfural
- GrinTuss
- Biakaf
- Bisolnatur
- Bal
- Üzüm pekmezi
- Keçiboynuzu pekmezi
- Reçel
- Fosforik asit
- Asetonitril
- Metanol
- Deiyonize su

3.2. Kullanılan Cihazlar

- Etüv
- Ultrasonik banyo
- Terazî
- Karıştırıcı

3.3. HPLC Sistemi

- Agilent 1260 Infinity II HPLC sistemi
- Ace C₁₈ (250x4.6 mm, 5 µm)
- UV dedektörü

3.4. Etik Kurul ve Kromatografik Yöntem Şartları

Bu çalışma, in vitro koşullarda gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda, 24.09.2024 tarihinde Eczacılık Fakültesi Etik Alt Kurulu'ndan 2200310117 numaralı karar ile tez çalışması için gerekli izin alınmıştır. HPLC analizlerinde UV dedektörlü Agilent 1260 Infinity II HPLC sistemi kullanılmıştır. Analizlerde Ace C18 ters faz kolonu tercih edilmiş ve dedeksiyon dalga boyu olarak 284 nm'dir. Mobil faz olarak metanol-asetonitril (10:90, h/h) karışımı kullanılmış ve akış hızı 0.5 mL dak⁻¹ olarak ayarlanmıştır. Kromatogramda HMF bileşiğine ait pikin alıkonma zamanı 5.6 dakikadadır.

3.5. HMF için HPLC Deneyinin Yapılışı

HPLC için optimum çalışma koşulları belirlendikten sonra, HMF çözeltileri hazırlanarak kromatogramları alınmıştır. Kromatogram alanları dikkate alınarak yöntem geçerlilik testi parametreleri hesaplanmıştır. HMF, polar özellikte bir bileşik olduğundan, analizlerde apolar bir sabit faz ile polar mobil fazların kullanılması tercih edilmiştir.

3.6. Yöntemlerin Numunelere Uygulanması

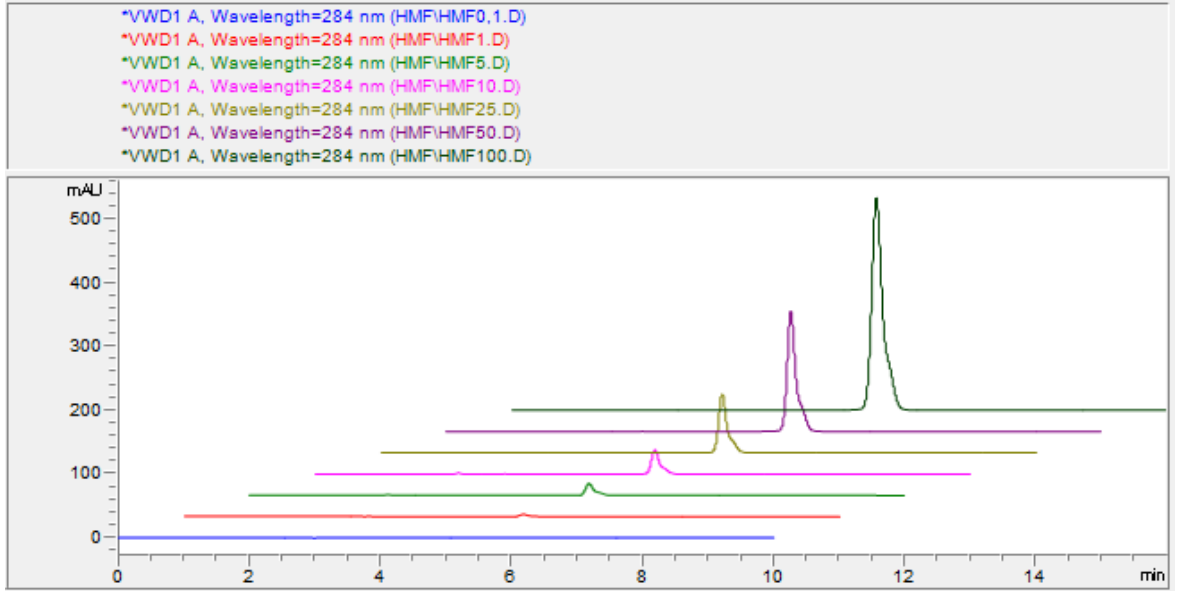
Geliştirilen ve validasyonu tamamlanan yöntemin uygulanabilirliğini değerlendirmek amacıyla, HMF içerebileceği düşünülen bal aromalı şuruplar (GrinTuss, Biakaf, Bisolnatur) ile marketten temin edilen bazı gıda ürünlerinde (bal, üzüm pekmezi, keçiyoynuzu pekmezi ve reçel) HMF miktar tayini HPLC yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma için eczaneden temin edilen bal aromalı şurup (GrinTuss, Biakaf, Bisolnatur) ve marketten alınan gıda ürünlerindeki (bal, üzüm pekmezi, keçiyoynuzu pekmezi ve reçel) numunelerden 0.5 gram tartıldı. 10 mL metanol içinde çözülmeye bırakıldı. 1 dakika vorteks yapıldıktan sonra süzülerek numune çözeltilerinin HPLC kromatogramları alınıp pik alanları okundu. Örneklerin kromatogram alanları standart kalibrasyon eğrisinde yerine konularak derişimleri hesaplanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. HPLC Yöntemi

4.1.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

HMF için, metanol içerisinde $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ derişiminde stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözeltilerden belirli hacimlerde alınarak metanol ile seyreltilmek suretiyle 0.1, 1.0, 5.0, 10, 25, 50 ve $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ derişimlerinde HMF standart çalışma çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltilerle yapılan HPLC analizlerinde UV dedektör kullanılarak HPLC kromatogramları elde edildi (Şekil 4.1).

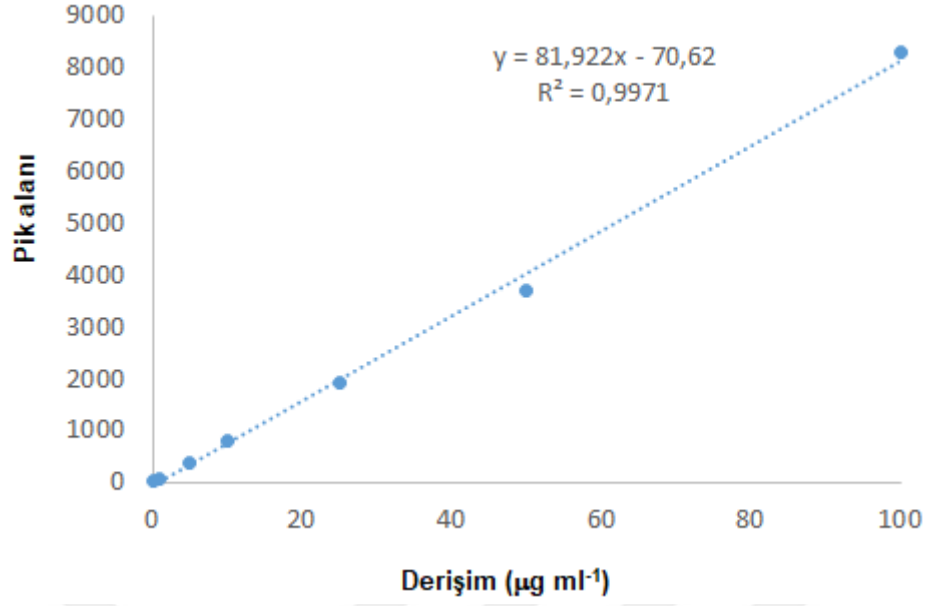


Şekil 4.1. HPLC çalışmasında HMF çözeltilerinin kromatogramları ($0.1, 1.0, 5.0, 10, 25, 50$ ve $100 \mu\text{g mL}^{-1}$)

4.1.2. Yöntemin Geçerlilik Testi (Validasyonu)

4.1.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi

$0.1-100 \mu\text{g mL}^{-1}$ derişim aralığında hazırlanan HMF çözeltilerine ait pik alanı değerleri derişimlerine karşı grafiğe aktarılmış ve bu sayede kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. HPLC yöntemi kalibrasyon eğrisi

HPLC yöntemiyle elde edilen kalibrasyon eğrilerine ait regresyon denklemlerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.1'de sunulmuştur.

Tablo 4.1. HPLC çalışmasında HMF'ye ait kalibrasyon eğrileri ile ilgili istatistikî değerler

Parametre	HMF
Doğrusal aralık (µg mL ⁻¹)	0.1-100
Regresyon doğrusu denklemi	y=81.922x-70.62
Korelasyon katsayısı (r)	0.9971

4.1.2.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)

HMF için kalibrasyon eğrisinin en düşük derişiminden daha düşük konsantrasyonlarda bir dizi çözeltisi hazırlanarak kromatogramları elde edildi. Kromatogramlarda sinyal/gürültü oranı 3 olan derişim gözlenebilme sınırı, oranı 10 olan derişim ise tayin alt sınırı olarak kabul edildi. Bu doğrultuda, HPLC yöntemiyle belirlenen gözlenebilme sınırı 0.030 µg mL⁻¹, tayin alt sınırı ise 0.10 µg mL⁻¹ olarak tespit edildi.

4.1.2.3. Doğruluk ve Kesinlik

Yöntemin doğruluk ve kesinliği, günü içi ve günler arası varyasyonlar dikkate alınarak değerlendirildi. HMF'nin kalibrasyon eğrisi aralığında yer alan üç farklı derişimde hazırlanan çözeltilerin, aynı gün içinde ve farklı günlerde (en fazla 3 gün içerisinde) kromatogramları elde edildi ve her birinin pik alanı üç kez ölçüldü. Elde edilen değerlerin ortalamaları ile standart sapmaları hesaplandı. Yöntemin kesinliği, yüzde bağıl standart sapma (%BSS) ile; doğruluğu ise bağıl hata değeriyle ifade edilerek Tablo 4.2'de sunuldu.

Tablo 4.2. HPLC yönteminin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri

Günüçi				Günler arası		
Eklene ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Bulunan \pm std. sapma	% bağıl hata	% BSS	Bulunan \pm std. sapma	% bağıl hata	% BSS
2.50	2.49 \pm 0.021	-0.40	0.84	2.48 \pm 0.035	-0.80	1.41
37.5	37.83 \pm 0.763	0.88	2.02	37.77 \pm 0.907	0.72	2.40
75	75.57 \pm 0.586	0.76	0.78	75.46 \pm 1.692	0.61	2.24

4.1.2.4. Kararlılık (Stabilite)

HMF'nin stok ve standart çözeltilerinin analiz süresince stabilitesini değerlendirmek amacıyla kararlılık çalışması yapıldı. Bu amaçla, üç farklı derişimde hazırlanan HMF çözeltileri oda sıcaklığında, 4 °C ve -20 °C'de 24 ve 48 saat süreyle bekletildi. Belirtilen sürelerin sonunda çözeltilerin kromatogramları alınarak pik alanları ölçüldü. Elde edilen sonuçlar, çözeltilerin taze olarak hazırlandığında elde edilen pik alanları ile karşılaştırıldı ve kararlılık değerlendirmesi yüzde geri kazanım hesaplanarak Tablo 4.3'te sunuldu.

Tablo 4.3. HMF'nin HPLC yöntemiyle belirlenen kararlılık (stabilite) değerleri

Eklenen ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Oda sıcaklığı		4 °C		-20 °C	
	24 saat	48 saat	24 saat	48 saat	24 saat	48 saat
15	99.3±2.05	99.4±2.05	99.6±2.04	99.3±2.61	100.2±3.07	99.3±1.57
50	101.2±3.54	98.7±3.03	99.3±1.68	99.7±2.49	101.3±1.46	98.6±3.06
80	99.4±2.09	101.3±2.75	99.4±2.15	99.7±1.76	99.6±2.13	99.7±3.28

4.1.2.5. Geri Kazanım

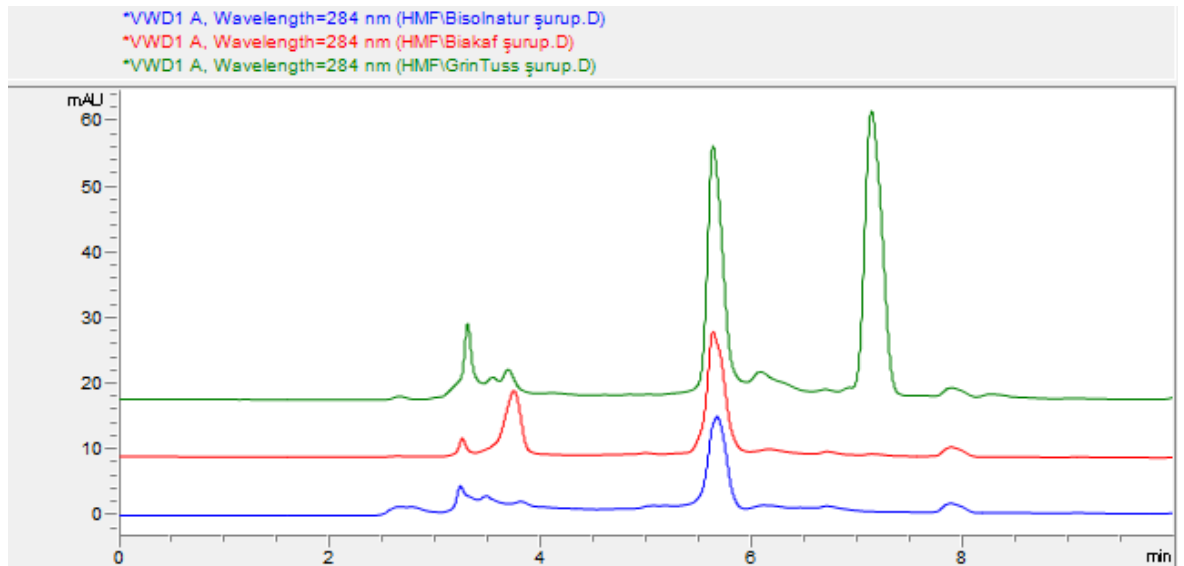
Bal aromalı şuruplarda geri kazanım çalışmaları, standart ekleme yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. GrinTuss, Biakaf ve Bisolnatur şuruplarından $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ derişiminde çözeltiler hazırlanarak pik alanları ölçüldü. Ardından bu çözeltilere, HMF'nin üç farklı derişimdeki standart çözeltileri ilave edildi ve hem günü içi hem de günler arası pik alanları kaydedildi. Elde edilen pik alanları, aynı derişimlerdeki saf standart çözeltilerden elde edilen değerlerle karşılaştırılarak yüzde geri kazanım hesaplandı ve sonuçlar Tablo 4.4'te sunuldu.

Tablo 4.4. HPLC yöntemiyle belirlenen bal aromalı şurupların günüçi ve günler arası geri kazanım değerleri

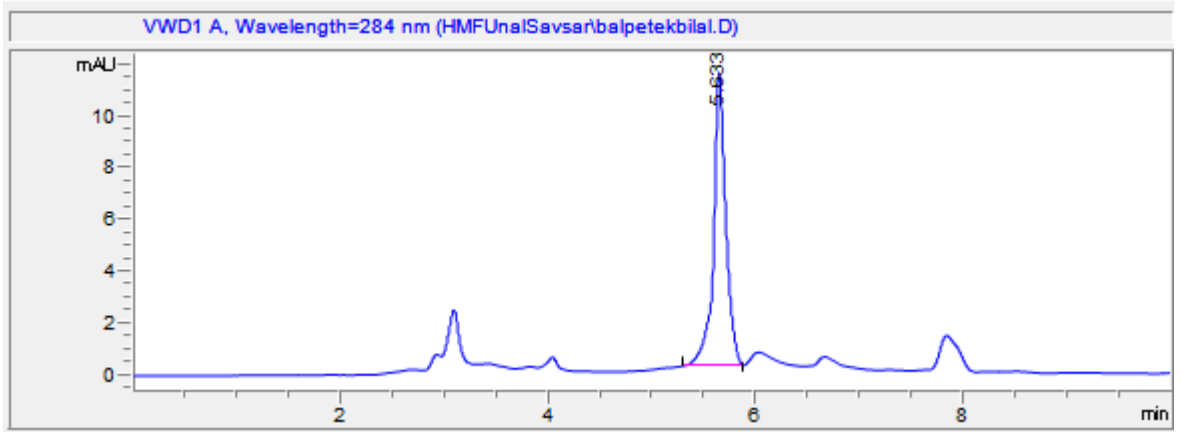
Preparat	Günüçi				Günler arası		
	Eklenen ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Bulunan \pm std. sapma	Geri kazanım	% BSS	Bulunan \pm std. sapma	Geri kazanım	% BSS
GrinTuss ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$)	15	14.81 \pm 0.24	98.7	1.62	14.81 \pm 0.24	98.0	4.29
	40	40.41 \pm 0.133	101.0	0.33	40.33 \pm 0.152	100.8	0.38
	90	90.52 \pm 0.188	100.6	0.21	91.07 \pm 0.369	101.2	0.41
Biakaf ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$)	15	15.24 \pm 0.423	101.6	2.77	14.89 \pm 0.434	98.0	2.91
	40	41.02 \pm 1.063	102.5	2.59	41.07 \pm 1.096	102.7	2.67
	90	90.56 \pm 1.807	100.6	1.99	89.46 \pm 1.786	99.4	1.99
Bisolnatur ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$)	15	15.08 \pm 0.389	100.5	2.58	14.78 \pm 0.497	98.5	3.36
	40	40.09 \pm 1.336	100.2	3.21	41.07 \pm 1.402	102.7	3.41
	90	89.67 \pm 1.782	99.6	1.81	90.76 \pm 1.927	100.8	2.12

4.1.3. Yöntemin Numunelere Uygulanması

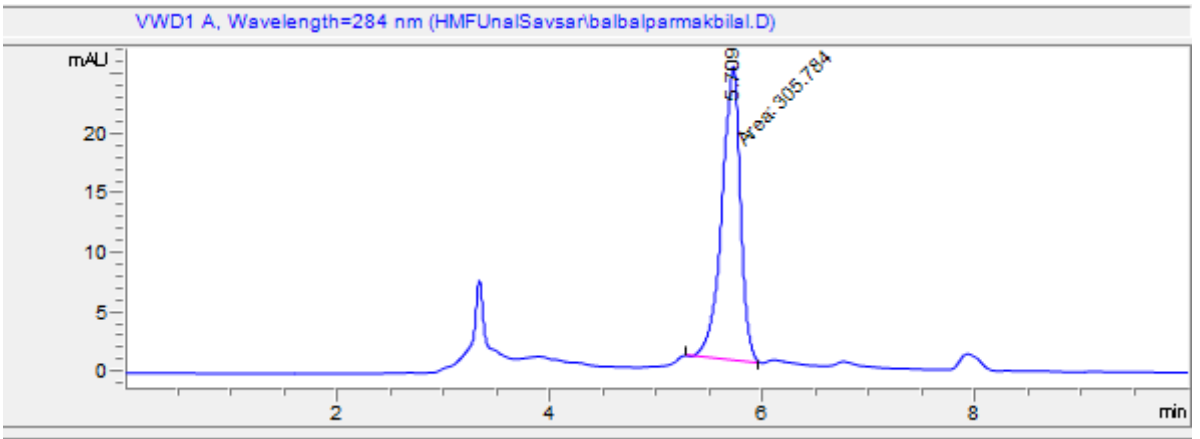
Bu çalışma için bal aromalı şurup ve gıda ürünlerinden 0.5 gram tartılarak 10 mL metanol içinde 50 mg mL^{-1} derişimde numune örnekleri hazırlandı. Numune örnekleri $0.45 \text{ }\mu\text{m}$ filtreden süzöldükten sonra hemen HPLC kromatogramları alınıp pik alanları okundu. Bal aromalı şuruplarda ve marketten alınan gıda ürünlerinden elde edilen kromatogram Şekil 4.3-10'da verildi. Geliştirilen ve validasyonu tamamlanan yöntemin uygulanabilirliğini değerlendirmek amacıyla, bal aromalı şuruplar (GrinTuss, Biakaf, Bisolnatur) ile marketten temin edilen gıda ürünlerinde (petek bal, süzme bal, üzüm pekmezi, keçiyoynuzu pekmezi ve reçel) HPLC yöntemi kullanılarak HMF miktar tayini yapıldı. Bu çalışma kapsamında, bal aromalı şurup ve gıda örneklerinden 0.5 gram tartılarak 10 mL metanol içerisinde 50 mg mL^{-1} derişiminde numune çözeltileri hazırlandı. Numuneler $0.45 \text{ }\mu\text{m}$ filtre ile süzöldükten hemen sonra HPLC analizine tabi tutuldu ve pik alanları kaydedildi. Bal aromalı şuruplar ile marketten alınan gıda ürünlerine ait kromatogramlar Şekil 4.3-4.10 arasında sunulmuştur.



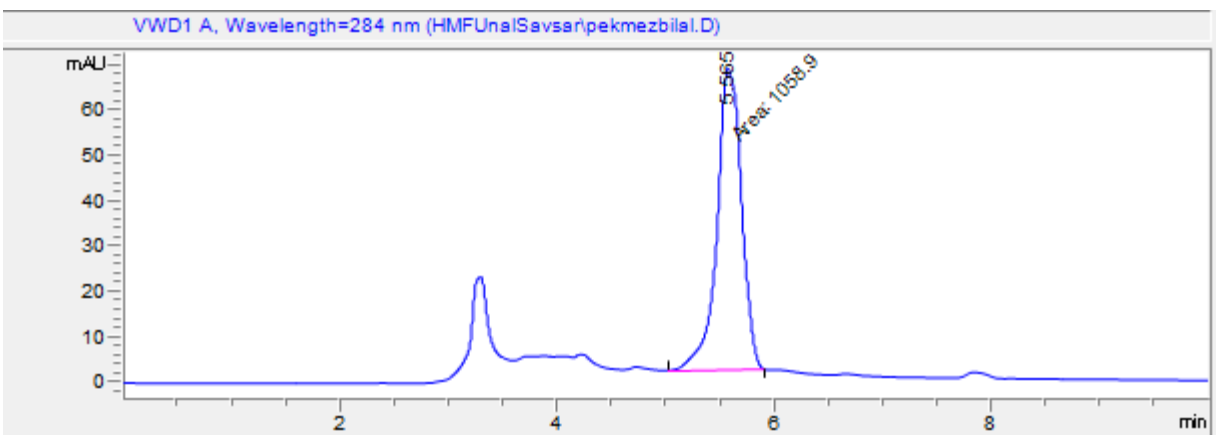
Şekil 4.3. Eczaneden satın alınan bal aromalı şurupların (GrinTuss, Biakaf, Bisolnatur) HPLC kromatogramı (50 mg mL^{-1})



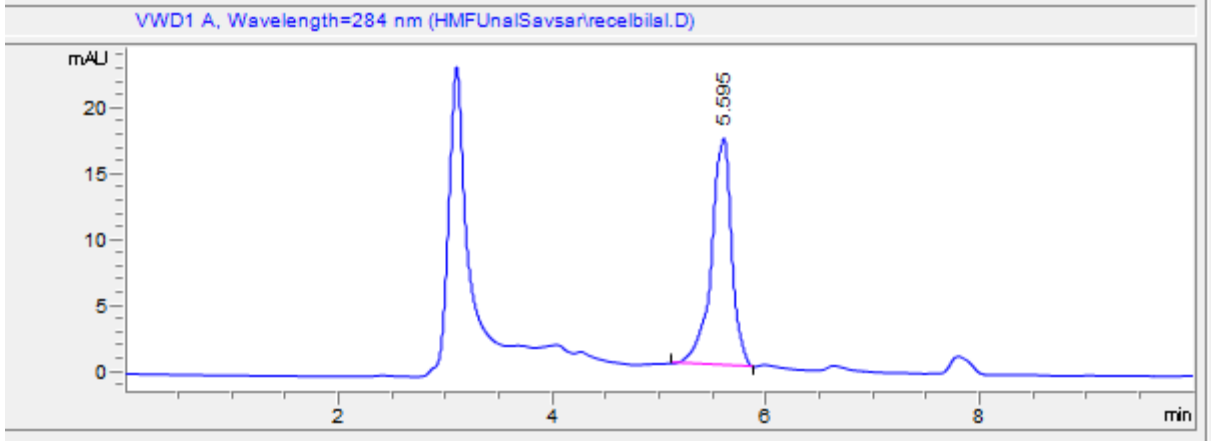
Şekil 4.4. Marketten satın alınan petek balın HPLC kromatogramı (50 mg mL⁻¹)



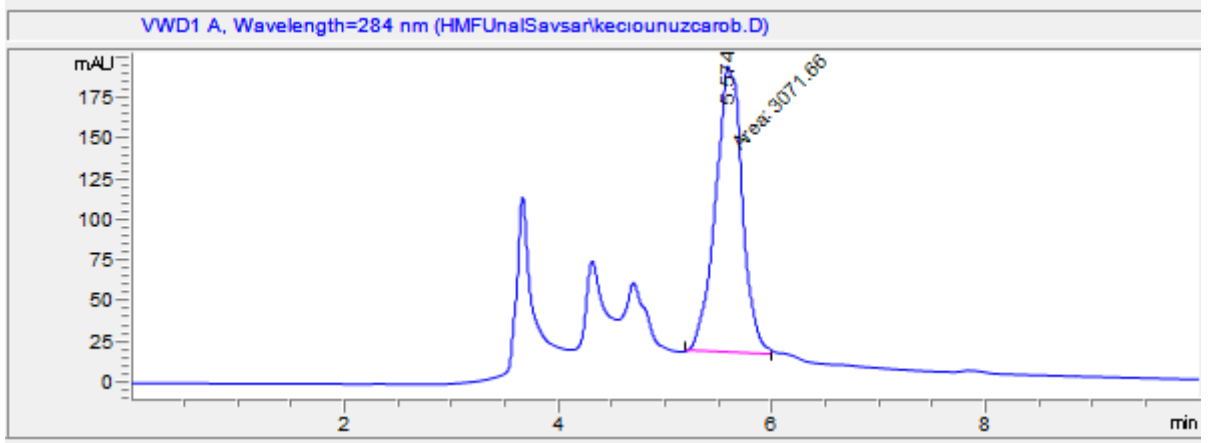
Şekil 4.5. Marketten satın alınan süzme balın HPLC kromatogramı (50 mg mL⁻¹)



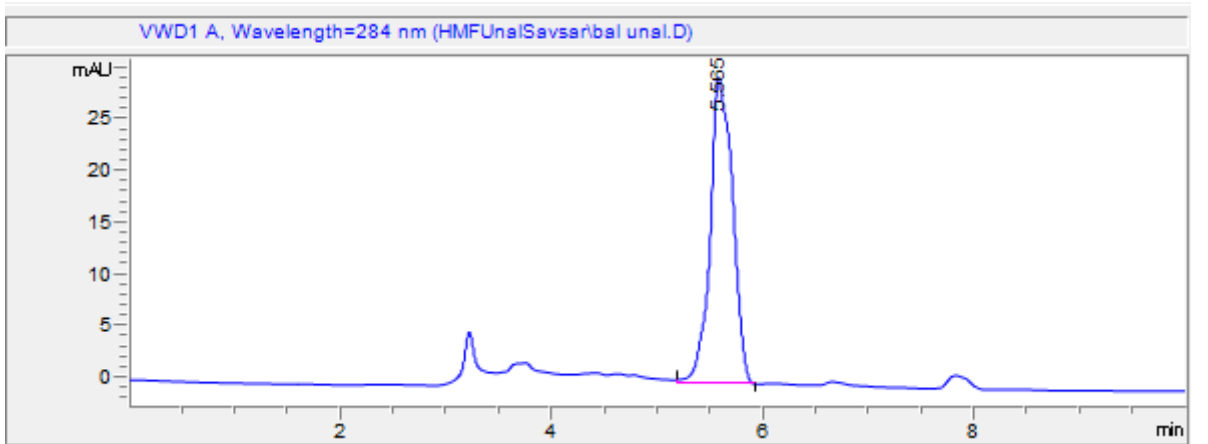
Şekil 4.6. Marketten satın alınan üzüm pekmezinin HPLC kromatogramı (50 mg mL⁻¹)



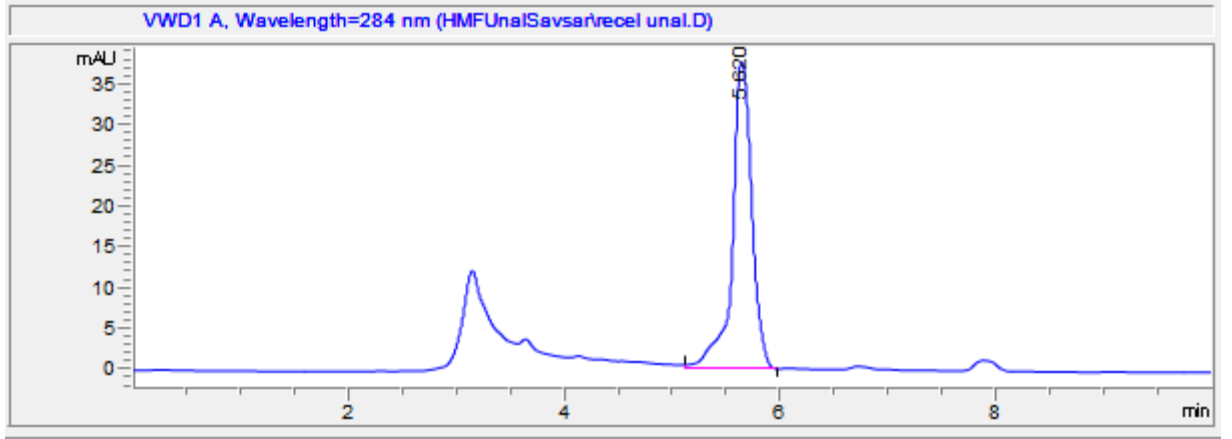
Şekil 4.7. Marketten satın alınan vişne reçelin HPLC kromatogramı (50 mg mL⁻¹)



Şekil 4.8. Marketten satın alınan keçiyoynuzu pekmezinin HPLC kromatogramı (50 mg mL⁻¹)



Şekil 4.9. Marketten satın alınan başka bir markadaki petek balın HPLC kromatogramı (50 mg mL⁻¹)



Şekil 4.10. Marketten satın alınan başka bir markadaki reçelin HPLC kromatogramı (50 mg mL⁻¹)

Örneklerin kromatogramlarından elde edilen pik alanları standart kalibrasyon eğrisinde yerine konularak HMF derişimleri hesaplanmıştır. Şuruplarda (GrinTuss, Biakaf, Bisolnatur) ve marketten satın alınan gıda ürünlerinde (petek bal, süzme bal, üzüm pekmezi, keçiyoynuzu pekmezi ve reçel) HPLC yöntemi ile bulunan HMF miktarları Tablo 4.5’de verildi.

Tablo 4.5. HPLC çalışmasında farklı numunelere (50 mg mL⁻¹) ait HMF miktarları (n=3)

Numune	HMF miktarı (µg mL ⁻¹)	% BSS
GrinTuss şurup	6.023 ± 0.025	0.42
Biakaf şurup	3.679 ± 0.037	1.00
Bisolnatur şurup	3.113 ± 0.035	1.12
Petek bal	2.030 ± 0.019	0.94
Süzme bal X marka	4.859 ± 0.036	0.74
Süzme bal Y marka	6.345 ± 0.062	0.98
Üzüm pekmezi X marka	14.232 ± 0.145	1.02
Üzüm pekmezi Y marka	30.174 ± 0.359	1.19
Vişne reçeli X marka	3.718 ± 0.028	0.75
Vişne reçeli Y marka	6.677 ± 0.055	0.82
Keçiyoynuzu pekmezi X marka	31.104 ± 0.292	0.94
Keçiyoynuzu pekmezi Y marka	38.631 ± 0.479	1.24

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada HMF'nin kantitatif olarak tayinine yönelik, uygulanabilirliği yüksek, güvenilir ve basit bir yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) yöntemi geliştirilmiş ve uluslararası geçerlilik kriterlerine uygun şekilde valide edilmiştir.

HPLC yöntemi, kromatografik bir teknik olup gıda analizlerinde özellikle miktar tayinlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Kromatografi, karmaşık karışımlardaki kimyasal bileşenlerin ayrılması, tanımlanması ve miktarının belirlenmesinde sık başvurulan yöntemler grubunu oluşturur. Bu grup içerisindeki HPLC yöntemi, doğruluk, kesinlik, tekrarlanabilirlik, seçicilik, duyarlılık ve hızlı sonuç alma gibi özellikleri sayesinde diğer yöntemlere kıyasla birçok avantaja sahiptir.

Çalışmada kullanılan HPLC yönteminin temel parametreleri şöyle özetlenebilir: Ace C18 ters faz kolonu ve 284 nm dedeksiyon dalga boyu seçilmiştir. Mobil faz olarak metanol-asetonitril (10:90, h/h) kullanılmış, akış hızı 0.5 mL dak⁻¹ ve enjeksiyon hacmi 20 µL olarak belirlenmiştir. HPLC analizinde HMF'nin alıkonma zamanı 5.6 dakika olarak saptanmıştır.

Elde edilen HPLC sonuçlarının özeti aşağıda verilmiştir: HPLC-UV yöntemi ile, 0.10-100 µg mL⁻¹ derişim aralığında HMF standart çözeltilerine ait pik alanları grafik üzerinde derişime karşı plot edilerek kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrisinin regresyon denklemi $y = 81.922x - 70.62$ (y: pik alanı, x: derişim) ve korelasyon katsayısı (r) 0.9971 olarak bulunmuştur. Yöntemin gözlenebilme sınırı (LOD) 0.03 µg mL⁻¹, tayin alt sınırı (LOQ) ise 0.10 µg mL⁻¹ olarak belirlenmiştir. Günü içi ve günler arası kesinlik değerlendirmesinde yüzde bağıl standart sapma (%BSS) ve doğruluk değerlendirmesinde bağıl hata değerleri sırasıyla %2.40 ve %0.88'in altında tespit edilmiştir.

Ayrıca, çalışmada geliştirilen yöntem ile Erzurum'da eczanede satılan bal aromalı 3 farklı şurupta ve çeşitli marketlerden temin edilen 1 adet petekli bal, 2 adet süzme sıvı bal, 2 adet üzüm pekmezi, 2 adet reçel ve 2 adet keçiyoynuzu pekmezi numunesi örneklerinde hidroksimetilfurfural (HMF) miktarları belirlenmiş ve sonuçları incelenmiştir.

HMF, şekerli gıdaların ısıtılma ve depolama sırasında oluşan bir bileşik olup, gıda kalitesinin ve güvenliğinin değerlendirilmesinde önemli bir parametre olarak kabul edilmektedir. Çalışmada, eczaneden temin edilen bal aromalı 3 şurup numunesi 50 mg mL^{-1} konsantrasyonda hazırlanmış ve analiz sonucu numune içerisinde $3.113\text{-}6.023 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ aralığında HMF miktarları bulunmuştur.

Bal aromalı şuruplarda HMF içeriği, ürünün kalitesini ve güvenliğini belirleyen önemli bir parametredir. HMF, şekerlerin ısıtılma ve uzun süreli depolama sırasında bozunmasıyla oluşan bir bileşiktir ve yüksek seviyeleri, ürünün aşırı ısıtılma tabii tutulduğunu veya uygun olmayan koşullarda saklandığını gösterebilir.

HMF içeriği için uluslararası standartlar açısından uluslararası düzeyde, bal ve bal aromalı ürünlerin HMF içeriği için belirli sınırlar bulunmaktadır. Uluslararası Bal Komitesi (International Honey Commission)'ne göre işlenmiş ve/veya karıştırılmış ballarda HMF içeriği 40 mg kg^{-1} 'i geçmemelidir. Tropikal iklimlerden gelen ballar ve bu ballardan yapılan karışımlar için bu sınır 80 mg kg^{-1} olarak belirlenmiştir. Avrupa Birliği (AB) Direktifi (2001/110/EC) açısından balın HMF içeriği, tropikal iklimlerden gelen ballar için 80 mg kg^{-1} 'i geçmemelidir. Türkiye Gıda Kodeksi açısından Türkiye'de, bal aromalı şuruplar için HMF içeriği, Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği'nde belirtilen sınırlar içinde olmalıdır. Bal aromalı şuruplarda HMF içeriği, ürünün kalitesi ve güvenliği açısından kritik öneme sahiptir (Bilgen, 2010). Uluslararası ve ulusal standartlara uygunluk, tüketicilerin sağlığını korumak için gereklidir. Üreticilerin, HMF içeriğini

minimize etmek için uygun üretim ve depolama koşullarına dikkat etmeleri önemlidir.

Bal aromalı şuruplarda HMF içeriği, ürünün kalitesini ve güvenliğini belirleyen önemli bir parametredir. Uluslararası ve ulusal standartlara uygunluk, tüketicilerin sağlığını korumak için gereklidir. Üreticilerin, HMF içeriğini minimize etmek için uygun üretim ve depolama koşullarına dikkat etmeleri önemlidir. Bal aromalı şuruplarda HMF içeriğini kontrol altında tutmak için aşağıdaki önlemler önerilmektedir (Kopjar ve ark., 2010).

Isıl İşlemden Kaçınma: Balın ısıtılmasına tabi tutulması, HMF oluşumunu artırabilir. Bu nedenle, ısıtılmanın minimumda tutulması veya hiç uygulanmaması tercih edilmelidir.

Uygun Depolama Koşulları: Balın nem oranı, pH değeri ve depolama sıcaklığı gibi faktörler HMF oluşumunu etkiler. Bu nedenle, balın serin ve kuru ortamlarda, doğrudan güneş ışığından uzak şekilde saklanması önerilir.

Taze ve Saf Bal Kullanımı: Taze ve saf bal kullanımı, HMF içeriğinin düşük olmasını sağlar. Ayrıca, şüpheli HMF seviyeleri, ürünün saflığı konusunda da ipuçları verebilir.

Ayrıca, Erzurum'da çeşitli marketlerden temin edilen 1 adet petekli bal ve 2 adet farklı marka süzme sıvı bal numunesi 50 mg mL^{-1} konsantrasyonda hazırlanmış ve analiz sonucu numune içerisinde petek bal için $2.030 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonda, 2 adet farklı marka süzme sıvı bal numunesinde de $4.859 - 6.345 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyon aralığında HMF miktarları bulunmuştur.

Erzurum'da çeşitli marketlerden temin edilen 2 adet farklı marka üzüm pekmezi numunesi 50 mg mL^{-1} konsantrasyonda hazırlanmış ve analiz sonucu 2 adet farklı marka üzüm pekmezi numunesinde $14.232 - 30.174 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyon aralığında HMF miktarları bulunmuştur.

Erzurum'da çeşitli marketlerden temin edilen 2 adet farklı marka vişne reçeli numunesi 50 mg mL⁻¹ konsantrasyonda hazırlanmış ve analiz sonucu 2 adet farklı vişne reçeli numunesinde 3.718 - 6.677 µg mL⁻¹ konsantrasyon aralığında HMF miktarları bulunmuştur.

Erzurum'da çeşitli marketlerden temin edilen 2 adet farklı marka keçiyoynuzu pekmezi numunesi 50 mg ml⁻¹ konsantrasyonda hazırlanmış ve analiz sonucu 2 adet farklı keçiyoynuzu pekmezi numunesinde 31.104 - 38.631 µg mL⁻¹ konsantrasyon aralığında HMF miktarları bulunmuştur.

HMF, karbonhidrat içeren gıdaların ısıtılma işlem görmesi ve/veya uzun süreli depolanması sonucunda oluşan, Maillard reaksiyonu ve şekerlerin asidik ortamda parçalanmasıyla ortaya çıkan önemli bir kalite ve güvenlik göstergesidir. Özellikle bal ve bal aromalı ürünlerde HMF, ürünün tazeliği ve uygun üretim-depolama koşullarına uyum açısından temel bir belirteç olarak değerlendirilmektedir. Uluslararası Bal Komisyonu (IHC) ve Avrupa Birliği (2001/110/EC) direktiflerine göre, HMF sınır değeri ılıman iklimlerden gelen saf ballar için 40 mg kg⁻¹, tropikal iklim balları için 80 mg kg⁻¹ ve Türkiye Gıda Kodeksi Bal Tebliği'ne göre de bu sınır 40 mg kg⁻¹ olarak belirlenmiştir.

Bu çalışmada, HMF miktarlarının tespiti için yüksek duyarlılık ve doğruluk sağlayan HPLC yöntemi kullanılmıştır. Yöntemin doğruluğu, kesinliği ve tekrarlanabilirliği validasyon çalışmalarıyla doğrulanmıştır.

Çalışmada analiz edilen ürünler 3 adet eczanede satılan bal aromalı şurup, 1 adet petekli bal, 2 adet süzme sıvı bal, 2 adet üzüm pekmezi, 2 adet vişne reçeli, 2 adet keçiyoynuzu pekmezi ürünüdür. Tüm numuneler 50 mg mL⁻¹ konsantrasyonunda hazırlanarak analiz edilmiştir. HMF değerleri ise 12 farklı numune için 2.030-38.631 µg mL⁻¹ konsantrasyon aralığında bulunmuştur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) yöntemi kullanılarak bal aromalı şuruplar, petekli ve süzme bal, üzüm pekmezi, reçel ve keçiboynuzu pekmezi ürünlerinde hidroksimetilfurfural (HMF) miktarları belirlenmiş ve elde edilen veriler ulusal ve uluslararası mevzuatla karşılaştırılmıştır.

Analiz sonuçlarına göre tüm numunelerde tespit edilen HMF miktarları, Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (2012/58) ile Avrupa Birliği Direktifi (2001/110/EC) ve International Honey Commission (IHC) tarafından belirlenen 40 mg/kg sınır değerinin altında kalmıştır. Bu durum, analiz edilen ürünlerin kalite ve güvenlik açısından risk taşımadığını ve üretim ile depolama koşullarının büyük oranda uygun şekilde yürütüldüğünü göstermektedir.

Bal aromalı şuruplarda belirlenen HMF miktarları 3.113 - 6.023 $\mu\text{g mL}^{-1}$ aralığında olup, bu değerler uluslararası sınırların oldukça altında seyretmektedir. Benzer şekilde, petekli ve süzme ballarda 2.030 - 6.345 $\mu\text{g mL}^{-1}$, reçel ve üzüm pekmezi örneklerinde 3.718 - 30.174 $\mu\text{g mL}^{-1}$, keçiboynuzu pekmezi ürünlerinde ise 31.104 - 38.631 $\mu\text{g mL}^{-1}$ HMF konsantrasyonları tespit edilmiştir. HMF düzeylerinin düşük bulunması, ürünlerin aşırı ısı işleme maruz kalmadığını ve uygun saklama koşullarında muhafaza edildiklerini göstermektedir.

Çalışmada kullanılan HPLC yöntemi, duyarlılığı (LOD: 0.03 $\mu\text{g mL}^{-1}$, LOQ: 0.10 $\mu\text{g mL}^{-1}$), doğruluğu ($r = 0.9971$), kesinliği (%BSS < %2.40) ve hızlı analiz süresi (HMF alıkonma zamanı: 5.6 dakika) ile güvenilir ve uygulanabilir bir analitik yöntem olarak değerlendirilmiştir. Bu yöntem, gıdalarda HMF tayini için ileri düzeyde güvenilirlik sunmakta ve rutin kalite kontrol analizlerinde kullanılabilir niteliktedir.

HMF oluşumu; ürünün içerdiği şeker tipi, pH düzeyi, uygulanan ısıl işlem ve depolama süresine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Bu nedenle üretim süreçlerinde ısıya maruz kalma süresi ve sıcaklık değerleri dikkatle optimize edilmelidir.

Özellikle reçel, üzüm pekmezi ve keçiyoynuzu pekmezi gibi yoğun şeker içeren ürünlerin üretiminde, geleneksel yöntemlerin modern teknolojilerle desteklenmesi ve vakum altında üretim gibi alternatif yöntemlerin tercih edilmesi HMF oluşumunu azaltabilir.

Bal aromalı şurupların üretiminde taze, düşük nem içerikli ve doğal şeker profiline sahip ham maddeler kullanılmalı, raf ömrü boyunca ürünlerin uygun koşullarda saklanması sağlanmalıdır.

HMF düzeylerinin raf ömrü boyunca sabit kalıp kalmadığının değerlendirilmesi amacıyla ürünlerin depolama süresince izlenmesi ve periyodik analizlerle denetlenmesi önerilmektedir.

Literatürde HMF'nin biyoerişilebilirliği ve sindirim sonrası metabolik etkilerine dair çalışmalar sınırlı olduğundan, bu alanda daha fazla in vitro ve in vivo araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Gıda otoriteleri tarafından bal aromalı ürünlere özgü HMF sınır değerlerinin açık bir şekilde tanımlanması, bu ürün gruplarının denetimlerinin daha etkin bir şekilde yapılmasına katkı sağlayacaktır.

Son olarak, tüketici bilinci artırılarak, gıda etiketlemesinde üretim tarihleri, içerik bilgileri ve önerilen saklama koşulları gibi bilgilerin şeffaf ve anlaşılır biçimde sunulması, ürün kalitesinin sürdürülebilirliği açısından önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

- Anonim (2012). *Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği Bal Tebliği 2012/58*.
<https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2012/07/20120727-12.htm>
- Bauer-Marinovic, M., Taugner, F., & Appel, K. E. (2019). The toxicological aspects of the heat-borne toxicant 5-hydroxymethylfurfural in animals: A review. *Molecules*, 25(8), 1941. <https://doi.org/10.3390/molecules25081941>
- Belitz, H. D., & Grosch, W. (1999). *Food Chemistry*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2nd Edition, pp.: 821-828. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-07281-3>
- Bilgen, M. (2010). Farklı yörelerdeki çam ballarında HMF miktarlarının belirlenmesi. *Gıda Teknolojisi Dergisi*, 35(2), 45-49.
- Burdurlu, H. S., & Karadeniz, F. (2002). Gıdalarda maillard reaksiyonu. *Gıda*, 27 (2), 77-82.
- Durling, L. J. K., Busk, L., & Hellman, B. E. (2009). Evaluation of the DNA damaging effect of the heat induced food toxicant 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in various cell lines with different activities of sulfotransferases. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 880-884. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.12.010>
- El-Kalyoubi, M., & Mohamed, A. A. (2021). Determination of patulin and HMF in fruit juices by HPLC-DAD. *Egyptian Journal of Agricultural Sciences*, 72(4), 655-664. <https://10.21608/ejas.2022.228054>
- Fallico, B., Zappalá, M., & Arena, E., Verzera, A. (2004). Effects of conditioning on HMF content in unifloral honeys. *Food Chemistry*, 85, 305-313. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.07.010>
- Janzowski, C., Glaab, V., Samimi, E., Schlatter, J., & Eisenbrand, G. (2000). 5-Hydroxymethylfurfural: assesment of mutagenicity, DNA-damaging potential

and reactivity towards cellular glutathione. *Food and Chemical Toxicology*, 38, 801-809. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(00\)00070-3](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(00)00070-3)

Kaplan, B. (2006). Çukurova Bölgesinde Satışa Sunulan Bazı Reçellerin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri ile T.G.K.'ne Uygunluğu Üzerine Bir Araştırma. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Khalil, M. I., Sulaiman, S. A., Boukraa, L., & Ibrahim, M. (2010). Antioxidant properties of honey and its role in preventing health disorder. *African Journal of Biotechnology*, 9(41), 7083-7087. <https://doi.org/10.2174/18763960010030100006>

Kopjar, M., Piližota, V., & Šubarić, D. (2010). Influence of pH and temperature on HMF formation in fruit jams. *Journal of Food Processing and Preservation*, 34(4), 622-638. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2009.00465.x>

Kumar, R., & Sinha, V. R. (2021). Quantification of a carcinogenic and cytotoxic compound HMF using HPLC. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12(3), 113-119. <https://10.5281/zenodo.10568997>

Kus, S., Gogus, F., & Eren, S. (2005). Hydroxymethyl furfural content of concentrated food products. *International Journal of Food Properties*, 8 (2), 367-375. <https://doi.org/10.1081/JFP-200060257>

Miller, J.A. (1994). Recent studies on the metabolic activation of chemical carcinogens. *Cancer Research*, 54, 1879-1881. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-94-0018>

Moniruzzaman, M., Sulaiman, S. A., & Gan, S. H. (2013). Physicochemical and antioxidant properties of Malaysian honeys. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13, 43. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-43>

- Morales, V., Sanz, M. L., Martin-Alvarez, P. J., & Corzo, N. (2009). Combined use of HMF and furosine to assess fresh honey quality. *Journal of the Science of Food and Agricultural*, 89, 1332- 1338. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3590>
- Mroczek, T., & Wójciak-Kosior, M. (2018). Rapid determination of HMF in food using HPLC-DAD with chemometric tools. *Chemistry Central Journal*, 12, 64. <https://doi.org/10.1186/s13065-018-0425-2>
- Namaka, A., Kim, E., Shinora, K., & Omura, H. (1993). Formation of furfural derivatives in amino-carbonyl reaction. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 57 (10), 1757-1759. <https://doi.org/10.1271/bbb.57.1757>
- Rada-Mendoza, M., Olano, A., & Villamiel, M. (2002). Determination of hydroxymethylfurfural in commercial jams and in fruit-based infant foods. *Food Chemistry*, 79, 513-516. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00217-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00217-0)
- Rada-Mendoza, M., Sanz, M. L., Olano, A., & Villamiel, M. (2004). Formation of hydroxymethylfurfural and furosine during the storage of jams and fruit- based infant foods. *Food Chemistry*, 85 (4), 605-609. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.07.002>
- Ramírez-Jiménez, A., Guerra-Hernández, E., & García-Villanova, B. (2000). Browning indicators in instant coffees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3), 747–751. <https://doi.org/10.1021/jf990930p>
- Rufián-Henares, J.A. & Morales, F.J. (2007), Functional properties of melanoidins: In vitro antioxidant, antimicrobial and antihypertensive activities, *Food Research International*, 40, 995–1002. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.05.002>
- Sahin, S., & Bilgin, B. (2020). Determination of HMF in apple juice using HPLC. *International Journal of Food Engineering Research*, 4(1), 25-32.

- Sanz, M. L., Castillo, M. D., Corzo, N., & Olana, A. (2003). 2-Furoylmethyl amino acids and hydroxymethylfurfural as indicators of honey quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*, 4278-4283. <https://doi.org/10.1021/jf021235s>
- Smanalieva, J., & Senge, B. (2009). Analysis of HMF in honey: Comparison of methods. *Food Chemistry*, *114*(1), 353-358. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.061>
- Taha, A., Wasif, A. I., & Rauf, A. (2019). HPLC determination of HMF and phenolic compounds in pomegranate juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *99*(4), 1743-1749. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9261>
- Teixido, E., Santos, F. J., Puignou, L., & Galceran, M. T. (2006) Analysis of 5-hydroxymethylfurfural in foods by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1135* (1), 85-90. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.09.023>
- Tosi, E., Ciappini, M., & Lucero, H. (2002). Honey thermal treatment effects on hydroxymethylfurfural content. *Food Chemistry*, *77*: 71-74. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00325-9](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00325-9)
- Vallejo, F., Gil-Izquierdo, A., & Ferreres, F. (2003). Analysis of orange juice flavonoids: A comparison between HPLC and UV-VIS spectrometry. *Journal of Food Science*, *68*(6), 2161-2165. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb14145.x>
- Zhang, Q., Wang, X., Yan, X., & Chen, X. (2019). Effects of 5-hydroxymethylfurfural on pubertal development of female Wistar rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *67*, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.01.001>
- Zhang, Y., Yu, J., & Zhang, Q. (2020). 5-Hydroxymethylfurfural exerts negative effects on gastric mucosal epithelial cells by inducing oxidative stress, apoptosis, and

tight junction disruption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(6), 1701-1709. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c00269>



EKLER

EK-1. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Bölümler	Benzerlik Oranı	Maksimum Benzerlik Oranları
I. Giriş	% 0	% 15
II. Genel Bilgiler	% 12	% 35
III. Materyal ve Metod	% 27	% 35
IV. Bulgular	% 9	% 15
V. Tartışma	% 6	% 20

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
4.8.2025	4.8.2025
İmza:	İmza:

¹ Bu form bilgisayar ortamında doldurulmalı, çıktısı imzalanıp tezin Ekler kısmına EK-1 olarak eklenmelidir.

EK-2. ETİK KURUL ONAYI



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Eczacılık Fakültesi Dekanlığı
Birim Etik Kurulu

Sayı : 93722986.12/

Konu: Birim Etik Kurul Kararı

25/09/2024

Sayın:

İlgi: 24.09.2024 tarih ve 2200310117 sayılı dilekçeniz.

Fakültemiz Birim Etik Kurulunun 25.09.2024 tarihinde 21 numaralı kararı ile danışmanı olduğunuz yüksek lisans öğrencisi _____'in "Hidroksimetilfurfuralın Bal Aromalı Şuruplarda HPLC Yöntemi ile Analizi" (In vitro) başlıklı çalışması etik kurulumuz tarafından kabul edilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Karar -21- Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi _____'in danışmanı olduğu yüksek lisans _____'in Eczacılık Fakültesi Kimyasal Analiz Laboratuvarlarında "Hidroksimetilfurfuralın Bal Aromalı Şuruplarda HPLC Yöntemi ile Analizi" (in vitro) başlıklı araştırma çalışması ile ilgili 24.09.2024 tarih ve 2200310117 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; söz konusu çalışmanın yürütülmesinin etik kurallara uygun olduğu _____ çalışma ekibinde olduğundan oylamaya katılmadı) mevcut oybirliği ile kabul edilmiştir.