



T.C

SIVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇEŞİTLİ GIDA ÖRNEKLERİNDE
5-HİDROKSİMETİLFURFURAL (5-HMF) VE PROLİNİN
ULTRASONİK DESTEKLİ BULUTLANMA NOKTASI
EKTRAKSİYONU İLE ZENGİNLEŞTİRİLME SONRASI
SPEKTROFOTOMETRİK (UV-VIS) BELİRLENME
OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SEMAHAT DAĞDEVİREN BAŞ

201492051237

Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ramazan GÜRKAN

SIVAS

EYLÜL 2019

SEMAHAT DAĞDEVİREN BAŞ'ın hazırladığı ve **'ÇEŞİTLİ GIDA ÖRNEKLERİNDE 5-HİDROKSİMETİLFURFURAL (5-HMF) VE PROLİNİN ULTRASONİK DESTEKLİ BULUTLANMA NOKTASI EKTRAKSİYONU İLE ZENGİNLEŞTİRİLME SONRASI SPEKTROFOTOMETRİK (UV-VIS) BELİRLENME OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI'** adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **KİMYA ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ramazan GÜRKAN
Sivas Cumhuriyet Üniversitesi

Jüri Üyeleri: Doç. Dr. Demirhan ÇITAK
Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

Doç. Dr. Nail ALTUNAY
Sivas Cumhuriyet Üniversitesi

Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. ÖZLEM PELİN CAN
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 20.08.2014 tarihli ve 7 sayılı kararı ile kabul edilen Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu (Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırlanmıştır.



*Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) Komisyonu tarafından **F-480** Nolu proje kapsamında desteklenmiştir.*



Bütün hakları saklıdır.

Kaynak göstermek koşuluyla alıntı ve gönderme yapılabilir.

© Semahat DAĞDEVİREN BAŞ, 2019



Hayatımıza her yönü ile güzellikler katan canım oğlum Abdülhamid'imize...

ETİK

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tez Yazım Kılavuzu (Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- ✓ Bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- ✓ Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- ✓ Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere, bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- ✓ Bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ✓ Tezin herhangi bir bölümünü, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi veya bir başka üniversitede, bir başka tez çalışması olarak sunmadığımı; beyan ederim.

13.09.2019

Semahat DAĞDEVİREN BAŞ

KATKI BELİRTME VE TEŞEKKÜR

Tez danışmanlığımı yapan, bilgi ve tecrübelerinden her zaman yararlandığım, çalışmamın her aşamasında yol gösterici ve destekleyici olan, emeğini hiçbir şekilde esirgemeyen, Değerli Hocam Prof. Dr. Ramazan GÜRKAN' a çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans öğrenim boyunca bilgi ve deneyimleriyle bana destek olan Doç. Dr. Nail ALTUNAY' a,

Bu çalışmayı F-480 kod numarası ile finansal olarak destekleyen Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Komisyon Başkanlığı'na ve tüm hayatım boyunca yanımda olan aileme çok teşekkür ederim.



ÖZET

ÇEŞİTLİ GIDA ÖRNEKLERİNDE 5-HİDROKSİMETİLFURFURAL (5-HMF) VE PROLİNİN ULTRASONİK DESTEKLİ BULUTLANMA NOKTASI EKTRAKSİYONU İLE ZENGİNLEŞTİRİLME SONRASI SPEKTROFOTOMETRİK (UV-VIS) BELİRLENME OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI

Semahat DAĞDEVİREN BAŞ

Yüksek Lisans Tezi, Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ramazan GÜRKAN

2019, 64+ xvii sayfa

Bu tez çalışmasında, ultrasonik destekli bulutlanma nokta ekstraksiyonu (UA-CPE) ve spektrofotometre kullanılarak bal, şarap ve meyve suyunda prolin ve 5-HMF tayini için iki farklı yöntem geliştirilmiştir. Prolin için geliştirilen yöntemde, prolin, histamin, Cu(II) ve floresein içeren pH' ı 5.5 olan bir kuarterner kompleks oluşturuldu. Numuneler, ekstraksiyondan ve ön deriştirmeden önce etanol-su karışımı ile 40 ° C' de 10 dakika boyunca bir ultrasonik banyo kullanılarak (40 kHz, 300 W) hazırlandı. Ekstraksiyon verimini etkileyen değişkenlerin optimizasyonundan sonra, 105 duyarlılık artırma faktörü ile 15 ila 600 µg L⁻¹ arasında iyi bir doğrusallık elde edildi. Seçme ve tayin sınırları sırasıyla 5.7 ve 19.0 µg L⁻¹ idi. Geri kazanım yüzdesi ve yüzde standart sapmalar (% BSS), sırasıyla % 95.3 ile % 103.3 ve % 2.5 ile % 4.2 arasındadır. Yöntemin doğruluğu standart bir referans maddenin (SRM 2389a) analizi ile test edildi. 5-HMF için geliştirilen yöntemde ise 5-HMF, SDS (Sodyum Dodesil Sulfat) ve fenosafranin içeren pH 5.5 ortamında iyon çifti oluşumuna dayanan ekstrakte edilebilir hidrofobik imin türevi ürün elde edilmiştir. UA-CPE verimini etkileyen parametrelerin optimizasyonu sonrası, örnekler, sonikasyonlu ve sonikasyonsuz, 40-45° C'de 5 ve 15 dakika süre için HClO₄-Carrez I, II çözeltilerinin karışımıyla ön işlem sonrası örneklerin 5-HMF içerikleri 532 nm'de spektrofotometre ile belirlenmiştir. UA-CPE sonrası, 60 (65) katlık duyarlılık iyileştirme faktörü ile kalibrasyon eğrisinin SDS derişimine bağlı olarak 2-200 ve 2-100 µg L⁻¹ arasında doğrusal olduğu gözlenmiştir. Düşük ve yüksek SDS hacimleri varlığında, seçme ve tayin sınırları sırasıyla 0.75/2.51 ve 0.53/1.76 µg L⁻¹ idi. Üç derişim düzeyinde standart eklenmiş

örnekler için (10.25 ve 75 $\mu\text{g L}^{-1}$, n: 5) yüzde geri kazanım ve bağıl standart sapmalar, sırasıyla % 97.5-102.3/ %2.6-3.7 ve % 97.3-101.6/ % 2.5-3.8 arasında idi. Yöntemin doğruluğu, analiz sonuçlarının modifiye spektrofotometrik White yöntemi ile karşılaştırılması ile test edilmiştir. Yöntem, daha sonra seçili örneklerin analizine başarıyla uygulanmıştır.

Anahtar kelimeler: Ultrasonik destekli bulut noktası çıkarımı, spektrofotometre, prolin, bal, şarap, meyve suyu, 5-HMF, Fenosafranin



ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF SPECTROPHOTOMETRIC (UV-VIS) DETERMINATION POSSIBILITIES OF 5- HYDROXYMETHYLFURFURAL (5-HMF) AND PROLINE IN VARIOUS FOOD SAMPLES AFTER PRECONCENTRATION WITH ULTRASOUND ASSISTED-CLOUD POINT EXTRACTION

Semahat DAĞDEVİREN BAŞ

Master of Science Thesis, Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Ramazan GÜRKAN

2019, 64+xvii pages

In this study we developed two different methods for determination of proline and 5-HMF in honey wine and fruit juice spectrophotometry. Initially for determination of proline, a quaternary complex was built, containing proline, histamine, Cu(II), and fluorescein at pH 5.5. Samples were pre-treated with ethanol-water mixture before extraction and preconcentration, by using an ultrasonic bath for 10 min at 40 °C (40 kHz, 300 W). After the optimization of variables affecting extraction efficiency, good linearity was obtained between 15 and 600 $\mu\text{g L}^{-1}$ with sensitivity enhancement factor of 105. The limits of detection and quantification were 5.7 and 19.0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. The recovery percentage and relative standard deviations (RSD %) were between 95.3 and 103.3%, and 2.5 and 4.2%, respectively. The accuracy of the method was verified by the analysis of a standard reference material (SRM 2389a). For determination of 5-HMF, an extractable hydrophobic imine adducts, based on ion-pair formation in pH 5.5 medium containing 5-HMF, SDS and phenosafranine, was obtained. After optimization of the parameters affecting the UA-CPE efficiency, 5-HMF contents of the samples were determined after pretreatment with mixture of HClO_4 -Carrez I, II solutions with and without sonication for 5 and 15 min at 40-45 °C by spectrophotometry at 532 nm. After UA-CPE, with the sensitivity improvement of 60 (65) folds, the calibration curves were linear between 2-200 and 2-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ depending on the SDS concentration. In the presence of low and high SDS volumes, the limits of detection and quantification (LODs and LOQs) were 0.75 / 2.51 to 0.53 / 1.76 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. For samples with spiking at three concentration levels (10,

25 and 75 $\mu\text{g L}^{-1}$, n: 5), the percent recovery rates and relative standard deviations were in the ranges of 97.5-102.3 / 2.6-3.7%, and 97.3-101.6 / 2.5-3.8%, respectively. The accuracy of the method was tested by comparing the analysis results with the modified spectrophotometric White method. Then, the method was successfully applied to the analysis of selected samples.

Keywords: Ultrasound assisted-cloud point extraction, spectrophotometry, proline, honeys, wines, fruit juices, 5-HMF, Phenosafranine,



İÇİNDEKİLER

ÖZET	viii
ABSTRACT	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
KISALTMALAR DİZİNİ	xvii
1.GİRİŞ	1
1.1 Amaç ve Kapsam.....	1
1.1.1 5-HMF'nin kimyasal özellikleri.....	4
1.1.3 Prolin'in kimyasal özellikleri.....	6
1.3 Sürfaktanlar	8
1.3.1 Miseller.....	8
1.3.2 Kritik misel derişimi.....	9
1.4 Ultrasonik Destekli Bulutlanma Noktası Ekstraksiyon Yönteminin Deneysel Aşamaları.....	9
1.5 UA-CPE Yöntemleri Etki Eden Faktörler.....	10
1.5.1 pH etkisi	10
1.5.2 Ligant türü ve derişimi	10
1.5.3 Sürfaktan türü ve derişimi	11
1.5.4 İyonik şiddet.....	11
1.5.5 Denge sıcaklığı ve süresi.....	11
1.5.6 Fazların birbirinden ayrılması	11
1.6 UA-CPE Yönteminin Avantajları	11
1.7 UA-CPE Metodunun Dezavantajları.....	12
1.8 Analitik Yöntemlerin Performans Kriterleri	13
2. MATERYAL VE METOD	15
2.1. Kullanılan Cihazlar.....	15

2.2. Kullanılan Kimyasallar.....	15
2.3 Örnek Toplama ve Analize Hazırlama.....	16
3. BULGULAR.....	18
3.1 Prolin için UA-CPE Yöntemi.....	18
3.1.1. Deney basamaklarının optimizasyonu	18
3.1.2 İyon eşleştirme kompleksinin spektral özellikleri.....	19
3.1.2.1 pH etkisi	20
3.1.2.2 Cu(II) derişiminin etkisi	21
3.1.2.3 Histamin derişiminin etkisi	22
3.1.2.4 Floresein derişiminin etkisi	23
3.1.2.5 Noniyonik yüzey aktif madde türü ve miktarının etkisi.....	24
3.1.2.6 Denge sıcaklığının etkisi	25
3.1.2.7 Sonikasyon zamanının etkisi.....	26
3.1.2.8 Örnek hacminin etkisi	26
3.1.3 Yöntemin analitik parametreleri.....	26
3.1.4 Girişim çalışması.....	29
3.1.5 Yöntemin doğruluğu ve kesinliği.....	30
3.1.6 Yöntemin uygulaması	32
3.2 5-HMF için UA-CPE/spektrofotometrik yöntem.....	35
3.2.1 UA-CPE Verimini Etkileyen Parametrelerin Optimizasyonu.....	36
3.2.1.1 pH etkisi	36
3.2.1.3 Noniyonik surfaktan miktarının etkisi.....	38
3.2.1.4 Anyonik surfaktan miktarının etkisi.....	39
3.2.1.5 İnkübasyon sıcaklığı ve süresi.....	40
3.2.2 Yöntemin analitik parametreleri.....	42
3.2.3 Girişim çalışması.....	44
3.2.4 Yöntemin doğruluğu ve kesinliği	45

3.2.5 Yöntemin analitik uygulaması	46
4. SONUÇLAR	48
KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ.....	64



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 5-Hidroksimetilfurfuralın kimyasal yapısı	3
Şekil 1.2 Prolin'in kimyasal yapısı.....	6
Şekil 1.3 Misel oluşumunun gösterimi	8
Şekil 1.4 UA-CPE yönteminin deneysel basamakları.	10
Şekil 3.1 Kompleksin üç farklı dalgaboyunda optimum koşullarda derişime bağımlı (a) spektrumu ve (b) kalibrasyon eğrileri.....	20
Şekil 3.2 pH etkisi.....	21
Şekil 3.3 Cu(II) derişiminin etkisi	22
Şekil 3.4 Histamin derişiminin etkisi.....	23
Şekil 3.5 Floresein derişiminin etkisi	24
Şekil 3.6 Noniyonik surfaktan türü ve miktarının etkisi.....	25
Şekil 3.7 Örnek boşuna karşı üç farklı 5-HMF derişimi (15, 30 ve 60 µg L ⁻¹) için dalgaboyunun (nm) bir fonksiyonu olarak ekstraksiyon prosesinin absorpsiyon spektrumları.....	35
Şekil 3.8 532 nm de analit boşuna karşı düzeltilmiş absorbansa (a) pH ve (b) tampon hacminin etkisi (n:3)	37
Şekil 3.9 532 nm'de analit boşuna karşı düzeltilmiş absorbansa Fenosafranin derişiminin etkisi (n: 3).....	38
Şekil 3.10 532 nm'de analit boşuna karşı düzeltilmiş absorbansa noniyonik surfaktan miktarının etkisi (n: 3).....	39
Şekil 3.11 532 nm'de analit boşuna karşı düzeltilmiş absorbansa anyonik surfaktan miktarının etkisi (n: 3).....	40
Şekil 3.12 532 nm'de analit boşuna karşı düzeltilmiş absorbansa (a) inkübasyon sıcaklığı ve (b) inkübasyon süresinin etkisi (n: 3)	41
Şekil 3.13 532 nm'de analit boşuna karşı düzeltilmiş absorbansa (a) santrifüjleme hızı ve (b) santrifüjleme süresinin etkisi (n: 3)	42

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Önerilen yönteminin analitik performans kriterleri.....	28
Çizelge 3.2 Önerilen UA-CPE metodu ile muhtemel girişimci türlerin 75 µg L ⁻¹ prolin ölçümleri üzerindeki etkisi (n: 3).....	29
Çizelge 3.3 Önerilen UA-CPE yönteminin doğrulanması için seçilen sertifikalı bir numunenin analiz sonuçları (n: 5).....	31
Çizelge 3.4 Önerilen UA-CPE yöntemiyle ekstraksiyondan önce standart eklenmiş üç kalite kontrol numunesinin analizi için yürütülen, doğruluk, kesinlik ve genişletilmiş belirsizlik (k: 2) çalışmalarının sonuçları (n: 9)	31
Çizelge 3.5 Seçilen örneklerin önerilen UA-CPE yöntemi ile analiz sonuçları (n: 5)	33
Çizelge 3.6 Optimize edilmiş reaktif koşulları altında önerilen ön deriştirme yönteminin analitik özellikleri	43
Çizelge 3.7 Girişimci türler varlığında 100 µg L ⁻¹ 5-HMF' nin tekrarlı ölçüm sonuçları (n: 3)	44
Çizelge 3.8 Kesinlik, doğruluk ve genişletilmiş belirsizlik sonuçları (k: 2).....	45
Çizelge 3.9 Gıda örneklerinde mevcut 5-HMF' nin belirlenmesi için yapılan çalışma	46
Çizelge 4.1 Yöntemin analitik özelliklerinin diğer analitik yöntemlerle karşılaştırılması	50
Çizelge 4.2 Yöntemin analitik özelliklerinin diğer analitik yöntemlerle karşılaştırılması	52

KISALTMALAR DİZİNİ

5-HMF:	5-Hidroksimetilfurfural
AAS:	Atomik Absorpsiyon Spektrometresi
AdCSV:	Adsorptif Katodik Sıyırma Voltametrisi
BN:	Bulutlanma Noktası
BSS:	Bağlı Standart Sapma
CMC:	Kritik Misel Derişimi
CPT:	Bulutlanma Noktası Sıcaklığı
EF:	Duyarlılık İyileştirme Faktörü
ET-AAS:	Elektrotermal Atomik Absorpsiyon Spektrometresi
FAAS:	Alevli Atomik Absorpsiyon Spektrometresi
GK:	Geri Kazanım
GS:	Tayin Sınırı
HPLC-DAD:	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-Diyot Dizi Tespiti
HPLC-ECD:	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi- Elektokimyasal Tespiti
HPLC-ICP-MS:	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Arayüz Edilmiş İndüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometrisi
ICP-AES:	İndüktif Eşleşmiş Plazma-Atomik Emisyon Spektrometrisi
ICP-MS:	İndüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometresi
ICP-OES:	İndüktif Eşleşmiş Plazma-Optik Emisyon Spektrometresi
IEC:	İyon Dışarılama Kromatografisi
LLME:	Sıvı-Sıvı Mikro Ekstraksiyon
LOD:	Tespit Sınırı
LOQ:	Tayin Sınırı
MEKC:	Misel Elektrokinetik Kromatografi

SCFE:	Süper Kritik Akışkan Ekstraksiyonu
SDS:	Sodyum Dodesil Sulfat
SMF:	Sülfooksimetilfurfural
SPE:	Katı Faz Ekstraksiyonu
SRM:	Standart Referans Madde
UA-CPE:	Ultrasonik Destekli-Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu



1.GİRİŞ

1.1 Amaç ve Kapsam

Bal yüzyıllardır insanlar tarafından tüketilen bir gıda maddesidir. Ülkemizin coğrafyası, iklimi ve bitki florası bakımından zengin bir yapısı vardır. Bu zenginlik arıcılık ve bal üretiminde ülke kalkınmasına katkıda bulunmaktadır. Her yıl 80 bin tonun üzerinde bal üretimi ile dünyada ilk sıralarda yer almaktadır. Bu potansiyelini hem iç hem de dış satımda artırabilmesi için baldaki kalite standartlarını iyileştirmesi oldukça önemli bir konudur [1].

Türk Gıda Kodeksi 2005/49 sayılı Bal Tebliğinde "bal, bitki nektarlarının, bitkilerin canlı kısımlarının salgılarının veya bitkilerin canlı kısımları üzerinde yaşayan bitki emici böceklerin salgılarının bal arısı (Apis Mellifera) tarafından toplandıktan sonra kendine özgü maddelerle birleştirilerek değişikliğe uğrattığı, su içeriğini düşürdüğü ve petekte depolayarak olgunlaştırdığı doğal ürünü olarak tanımlanmıştır [2]. Türkiye sahip olduğu bitki örtüsü ve ekolojik koşulları bakımından dünyanın en kaliteli ballarının üretilebileceği bir ülke olup 2013 yılındaki bal üretimi 102 bin 486 tondur [3]. Türkiye’de mevcut standart ve tüzüklerle doğal ve sahte bal ayrımı yapılmamaktadır. Çok miktarda üretilen ve sahte/suni ballar, iç pazarlarda genel bal kalitesini düşürmekte, hem gerçek bal üreticisi ürününü iyi fiyata satamamakta hem de tüketici kandırılmaktadır [4]. Bal üretiminde dünya ikincisi olmamıza rağmen dış pazarda (ihracat konusunda) ilk on içerisinde değiliz. Bunun temel nedeni kalitesiz balların ihracat kapasitemizi düşürmesidir [5]. Yapılan çalışmalar, balın protein içeriğini saptamak için prolin miktarı (K/Na) ve balın kimyasal kalitesini belirlemek için 5-HMF miktarı en önemli parametrelerdir [6].

Prolin, balda en çok bulunan serbest aminoasit olup, nektarda ve özellikle polende bulunur [7]. Prolin miktarı özellikle doğal bal ve şurup (sahte) balların birbirinden ayrılmasında, balın tipinin ve olgunluğunun belirlenmesinde kullanılan önemli kriterdir. Yapılan çalışmalarda saf balın, sahte baldan daha fazla prolin içerdiği tespit edilmiştir [8]. Ayrıca saf balda prolin içeriğindeki potasyumun daha yüksek sahte balda ise sodyum değerinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Prolin miktarı çiçeğin kaynağına bağlı olarak farklılık göstermektedir. Türk Gıda Kodeksine göre baldaki prolin miktarının en az 180 mg kg⁻¹ olması gerektiği rapor edilmiştir [9].

Balın kimyasal kalitesini belirleyen en önemli etmenlerden biri de 5-HMF (5-hidroksimetilfurfural) miktarıdır. 5-HMF pişirme ya da sterilizasyon esnasında gıdalara uygulanan ısı işlemler sonucu, indirgen şekerlerin aminoasitlerle oluşturduğu enzimatik olmayan esmerleşme (Maillard) tepkimesi ya da heksozların asit katalizörlüğünde dehidrasyonu sonucunda oluşan istenmeyen bir kimyasal türüdür [10]. Karbonhidrat içeren birçok gıda maddesinde aşırı ısı işlem uygulamasını önlemek için miktarı yönetmelikler ile sınırlanmıştır. İçeriğindeki yüksek orandaki basit şekerlerin (glukoz ve fruktoz) varlığı ve birçok asit nedeniyle bal, 5-HMF oluşumu için çok uygun koşullar sağlamaktadır [11]. Balda, 5-HMF miktarının artmasına, ısı işleminin derecesi ve süresi, saklama koşulları (ışığa maruz kalma gibi) ve metal kapların muhafazada kullanılması sebep olabilmektedir [12-13]. Yapılan bir çalışmada 15 ile 20 °C'de muhafaza edilen ballarda 5-HMF miktarı 6 ayda 1.10 kat artarken 1 yılda 2 katına çıkmıştır [14]. Türk Gıda Kodeksi balda 5-HMF miktarını 40 mg kg⁻¹ ile sınırlamıştır [15].

Tüm bu bilgiler balların kalitesi için önemli parametreler olan prolin ve 5-HMF miktarlarının analitik olarak belirlenmesinin önemli bir konu olduğunu açığa çıkarmaktadır. Literatürde bu türlerin analizi öncesi katı faz ekstraksiyon [16], katı-faz mikroekstraksiyon [17], vorteks destekli sıvı-sıvı mikroekstraksiyon [18] ve bulutlanma noktası ekstraksiyonu [19] gibi ayırma ve zenginleştirme teknikleri uygulanmıştır. Belirleme yöntemi olarak ise sıvı ve gaz kromatografisi ile ayırma sonrası (LC- ve GC-) UV dedeksiyonu [20,21], misel elektrokinetik kromatografi (MEKC) [22] ve iyon dışarılama kromatografisi (IEC) [23] gibi birçok kromatografik, elektroanalitik ve spektrofotometrik teknik kullanılmıştır. Çalışmamızda ilgili analitlerin matriksten ayrılması ve zenginleştirilmesi için ultrasonik destekli bulutlanma noktası ekstraksiyonu (UA-CPE) kullanılacaktır. Bu zenginleştirme yönteminde kullanılacak surfaktanların misel oluşturması için ana parametreler bulutlanma noktası sıcaklığı ve kritik misel derişimidir. Bir surfaktan çözeltisi belirli bir sıcaklığa kadar ısıtıldığında, kısmi çözünürleşme nedeniyle bulanıklaşacaktır. Bulanıklığın gözleendiği bu sıcaklığa bulutlanma noktası sıcaklığı denir. Bulutlanma noktası sıcaklığının üzerinde ve surfaktan derişiminin kritik misel derişimine (CMC) yakın olduğu yerde düşük hacimli surfaktanca zengin faz ve seyreltik sulu faz santrifüjleme ile birbirinden ayrılır. UA-CPE, çevre dostu (kirletici olmayan) ve organik toksik çözücü içermeyen bir yöntemdir. Bu yöntem, karmaşık matriks yapılı

çevresel ve biyolojik örneklerin ayrılmasında başarı ile uygulanmaktadır [24,25]. UA-CPE, FAAS ve UV-VIS gibi hemen hemen her araştırma laboratuvarında bulunabilen basit, seçimli ve doğru atomik ve moleküler spektroskopi ile birleştirildiğinde daha da etkili bir analitik teknik olabilir.

Baldaki kalite standartlarının belirlenmesinde fiziksel ve kimyasal bazı analizler yapılmaktadır. Her balın bu özellikleri birbirinden farklıdır. Bu farklılığın nedeni; üretilen bölgenin coğrafyası iklimi bitki florasının farklılığı polenin rengi, şeker ve protein içeriğidir [26].

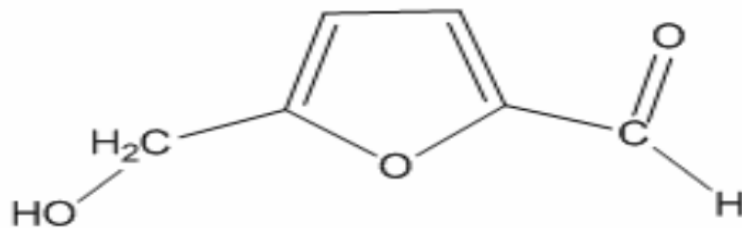
Balın paketleme aşamasında fermantasyon oluşmaması ve şekerlenmenin önlenmesi için ısı işlem uygulanmak zorundadır. Bu ısı işlem uygun zaman ve sürede yapılmadığında baldaki diastaz enzimi düşmekte ve 5-HMF değeri artmaktadır. Bu durum balın besin değerini büyük ölçüde düşürmektedir. 5-HMF'nin genotoksik etkileri tespit edilmiştir. Yüksek derişimi ise üst solunum, göz ve deriyi tahriş etmeye neden olmaktadır [27].

İnsan sağlığı ve ürün kalitesi açısından 5-HMF'nin öneminin göz ardı edilemeyeceği hususunda yeterli miktarda literatür bilgisi vardır.

Baldaki 5-HMF oluşum süreci; Balın kimyasal özelliklerine (asitlik, mineral miktarı, glukoz ve fruktoz) balın paketlenme sürecine, depolama şartlarındaki sıcaklık ve süreye bağlıdır [28].

5-HMF balın yapısında bulunmayan bazı asitler nedeniyle fruktozun parçalanması sonucu meydana gelen toksik bir bileşiktir. Bala ısı işlem uygulandığında 5-HMF'nin oluşum hızı artmaktadır [28].

5-HMF aromatik alkol, aromatik aldehit ve furan halkasından oluşmaktadır.



Şekil 1.1 5-Hidroksimetilfurfuralın kimyasal yapısı

Baldaki diğerk bir besin parametresi ise prolindir. Bal protein kaynağı olarak görölmez ama baldaki aminoasitler balın orijini açısından oldukça önemlidir. Prolin, lisiin, fenilalanin, gama-aminoütirik asit, beta-alanin, arjinin, glutamin, serin, glutamik asit ve aspartik asit balda bulunan bazı amino asitlerdendir [1].

Miktar olarak diğerk aminoasitlere oranla en yüksek miktarda prolın bulunur. Bunun nedeni prolinin bazı bitkilerde bulunuyor olmasıdır. Örneğın akasya, kekik vs. Bu bitkilerden nektar alan arıların ürettikleri ballarda prolın daha çok bulunmaktadır. Balın gerçek bal mı yoksa şeker şurubu ile beslenen arıdan elde edilen bal mı olduğı prolın tayini ile kolayca ayırt edilebilir [1].

1.1.1 5-HMF'nin kimyasal özellikleri

5-HMF, aromatik alkol, aromatik aldehit ve furan halkasından oluşmaktadır. 5-Hidroksimetil furfuralın kimyasal formülü $C_6H_6O_3$,molekül ağırlığı 126.11 g/mol, yoğunluğu $1.29 g/cm^3$ dür. 5-Hidroksimetilfurfural, asitli ortamda hegzozun parçalanması ya da Maillard reaksiyonu ile oluşmaktadır. Monosakkaritlerin dehidrasyonu yani yoğun asit ortamlarda kaynatılmakla monosakkarit molekülünün üç molekül su kaybetmesi olayı sonucunda pentozlardan furfural, heksozlardan 5-hidroksimetil furfural meydana gelmektedir [29].

Başka bir deyişle şekerli gıdaların, uygun olmayan sıcaklıklarda saklanması ve üretimleri sırasında uygulanan ısıl işlemden dolayı meydana gelmektedir.5- HMF ürünlerde kalite kriteri olarak da görölmektedir. 5-HMF balın ısıtılmasıyla oluştuğı gibi, uzun süre bekletilmesiyle de oluşabilmektedir. Uygun olmayan şartlarda depolanan ballarda 5-HMF miktarı ciddi oranda artmaktadır. Işık, depo sıcaklığı ve nem baldaki 5- HMF miktarını etkileyen faktörler arasındadır [29].

1.1.2 5-HMF'nin insan sağlığı üzerine etkileri

Hayvanlar üzerine yapılmış çalışmalarda toksik etkileri bulunmuş olan 5-HMF kanserojenik etkiye sahip olduğı, bu nedenle de bu bileşiğın insanlarda da kanserojen etkiye sahip olabileceğı belirtilmiştir. 5-HMF ile ilgili literatürde çok fazla kaynak olmakla beraber yapılan genotoksik çalışmalarda bu maddeyle ilgili çalışılmıştır. Halen bazı gıdaları fazla pişmiş ve kavrulmuş olarak yemeyi seven bir tüketici kitlesi bulunmakta olup, bu sınıfa giren gıdaların ne kadar gıda güvenliği riski taşıdığı

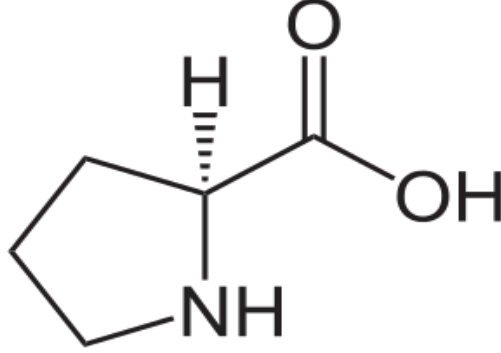
bilinmemektedir [30]. Fakat bu tür gıdalar insanlar tarafından çok uzun yıllardır tüketilmektedirler.

5-HMF'nin birçok çeşit gıda ürününde tespiti insan sağlığı üzerine olan risk faktörünün de belirginleşmesine yol göstermiştir. 5-HMF'nin in vitro genotoksisite testlerinde negatif sonuç verdiği, ancak insanlarda bulunan SULT 1A1 (sülfotransferaz) enzimini eksprese eden genetiği değiştirilmiş bakteriler ve memeli hücrelerde mutajenik olabildiği bildirilmiştir [31].

5-HMF'nin yüksek derişiminde sitotoksisiteye, gözlerde irritasyona (tahriş), üst solunum yolu rahatsızlıklarına, cilt ve mukoza membran rahatsızlıklarına neden olabildiği bildirilmektedir. Epidemiyolojik çalışmalarda, 5-HMF'nin insanlarda kanser riski ya da kronik kanser ile ilişkili bir veriye ulaşılmamıştır. Ancak ratlarda ve farelerde tümorojenik aktiviteler gözlenmiştir. Günümüzde genotoksisite çalışmalarında birçok yöntem kullanılmaktadır. Bunların basit, ucuz ve tekrarlanabilir olanları mevcuttur [32].

Elde edilen bu bulgular, 5-HMF'nin başlıca biyoaktivasyon döngüsünde sülfotransferazların sülfonasyonu ile sülfooksimetilfurfural (SMF)'in oluştuğunu ortaya koymuştur. Bu bileşiğin, Ames testi (bakterilerin kullanıldığı mutajenite testi) ile mutajenik olduğu belirlenmiş ve farelerde cilt tümörünün öncülü olduğu bildirilmiştir.

1.1.3 Prolin'in kimyasal özellikleri



Şekil 1.2 Prolin'in kimyasal yapısı

Kimyasal yapısı şekil 1.2 'de gösterildiği gibi Prolin proteinleri oluşturan 20 aminoasitten biridir. Diğer tüm aminoasitler birincil amin grubu taşımalarına rağmen, prolin, yan zincirindeki üç karbon atomu bir halka oluşturarak tekrar peptid bağındaki nitrojen atomuna bağlandığı için, birincil amin grubundan yoksundur [33].

Bal, çok az da olsa protein içermektedir ve genellikle % 0.5' ten düşüktür. Protein içeriği, balın doğal veya yapay olup olmadığını saptanması açısından olduğu kadar beslenme yönünden de önemlidir.

Baldaki protein arıdan veya bitkiden kaynaklanmaktadır ve miktar balın cinsine bağlı olarak değişmektedir. Protein ve aminoasitlerin başlıca kaynağı polen olmakla birlikte, hayvansal veya bitkisel kaynaklı da olabilmektedir.

Balın protein içeriği genellikle prolin miktarı ile belirtilmektedir. Çünkü aminoasitlerin % 50-85'ini prolin oluşturmaktadır ve prolin içeriği bal çeşitleri arasında oldukça farklılık göstermektedir [33].

Prolin, nektarın bala dönüşmesi sırasında arı tarafından bala katılan tek aminoasittir. Baldaki prolin miktarı arıya bağlı olan diğer bileşenlerle birlikte, sakkaraz ve glikozoksidaz aktiviteleri gibi balın olgunluk düzeyini yansıtan bir indikatördür. Prolin ayrıca balda gerçeklik kriteri olarak da önemlidir. Amino asitlerinin esas kaynağı polen olduğu için, balın aminoasit profili botanik kaynağının da bir karakteristiğidir. Balda, prolin dışında 26 amino asit daha saptanmıştır ve bunların oranı balın kaynağına (nektar ya da salgı) göre değişmektedir [33].

1.2-Ayırma ve Zenginleştirme Yöntemleri

Son yıllarda fizik, kimya, biyoloji, farmakoloji, çevre, tekstil, gıda, boya, metalurji, biyokimya, tıp ve teknolojik alanlarda elementlerin eser düzeydeki miktarlarının önemi artmaktadır. Bu durum eser düzeydeki elementlerin nitel ve nicel tayinlerine olan ihtiyacı da artırmaktadır. Eser elementlerin tayininde kirlenme, aletsel problemler, saf madde ihtiyacı gibi pek çok güçlükler vardır. Bu problemler sebebiyle, eser element ve kimyasal türlerin analizinde tayin öncesi bir ayırma ve zenginleştirme basamağının uygulanması mecburi hale gelmiştir. Bu amaçla katı faz ekstraksiyonu (SPE), sıvı-sıvı mikro ekstraksiyonu (LLME), super kritik akışkan ekstraksiyonu (SCFE), membrane ekstraksiyonu (ME), ultrasonic destekli bulutlanma noktası ekstraksiyonu (UA-CPE), birlikte çöktürme ve iyon değiştirme yöntemleri kullanılmaktadır [34]. Eser elementin içinde bulunduğu ortamın tayin tekniğine uygun olmaması, yani ortamın bozucu etki göstermesi ve bu ortamda eser element derişiminin aletin tayin sınırının altında olması halinde zenginleştirme işlemi kaçınılmazdır.

Ekstraksiyon yöntemleri

- Sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi
- Katı-faz ekstraksiyonu yöntemi
- Birlikte çöktürme yöntemi
- Uçuculaştırma yöntemi

Ultrasonik etki

Analitik kimyada yaşanan son gelişmelerle ultrasonik uygulamaların önemi artmıştır. Ekstraksiyon yöntemlerine yardımcı bir yaklaşım olarak görülen ultrasonik etki geleneksel ekstraksiyon süresini kısaltmış ve verimi artırmıştır. Özellikle bazı gıda maddelerinin ısıl yönden kararsız olduklarından dolayı ısıtma sürecinde bozunması hızlanmaktadır. Bu bozunma hızının azaltılması için ultrasonik etki büyük önem taşımaktadır. Ultrasoniğin mekanik etkisi hücre duvarlarının bozunmasını artırmakta ve böylece kütle transferini hızlandırmaktadır. Laboratuvarda en çok kullanılan ultrasonik cihazlar iki çeşittir. İlki ultrasonik banyosu ikincisi ise ultrasonik probdur. Bu tez de ultrasonik banyo kullanılmıştır.

Bilim laboratuvarlarında kullanılan ultrasonik banyolar genellikle tabanı

dönüştürücüler ile bağlanmış paslanmaz çelik bir tabandan oluşmaktadır. Bu banyolar piezoelektrik dedektör ile 1-5 Watt cm⁻² güç yoğunluğu ile 35-60 kHz'lik bir frekans aralığına eşittir. Ultrasonik etki tepkime ortamının özelliklerine (buhar basıncı, yüzey gerilimi, viskozite, doğal ve çözünmüş gaz derişimi, katı parçacıkların varlığı vs), işlem parametreleri (sıcaklık, basınç), ultrasonik güç performansı (güç ve frekans), ultrasonik banyonun boyutu ve tankın geometrisine bağlıdır [35].

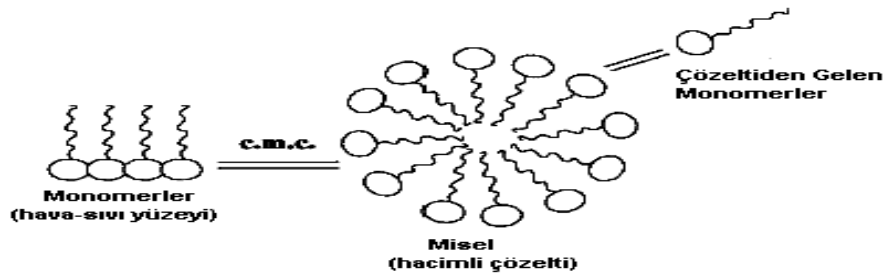
Ultrasonik etki ile yapılan çalışmalarda daha düşük sıcaklıklar ve daha seyreltik çözme yeteneğine sahip indirgen/yükseltgen kimyasallar kullanılmaktadır. Ultrasonik dalgalar banyo boyunca eşit şekilde aktarılır. Ultrasonik etkide tepkime daha kısa sürede dengeye gelmektedir ve diğer yöntemler ile karşılaştırıldığında çevreye daha duyarlıdır [35].

1.3 Surfaktanlar

Suda veya sulu bir çözeltide çözüldüğünde yüzey gerilimini etkileyen kimyasallara surfaktan denir. Surfaktanlar aynı zamanda iki sıvı arasındaki yüzeyler arası gerilimi de etkiler. Surfaktan kelimesi yerine yüzey aktif madde kullanılır. Bulutlanma noktası ekstraksiyonunda kullanılan surfaktanlar genellikle noniyoniktir. Sebebi ise iyonik surfaktanların bulutlanma noktası sıcaklığı genellikle 100°C' nin üstündedir. Sıcaklığın yüksek olması analiz şartlarını zorlamaktadır [36].

1.3.1 Miseller

Surfaktan moleküllerinin kritik misel derişimi (CMC) adı verilen belli bir derişimin üstünde kendi aralarında oluşturdukları kümelere misel denir. Şekil olarak aşağıda gösterilmiştir [37].



Şekil 1.3 Misel oluşumunun gösterimi

1.3.2 Kritik misel derişimi

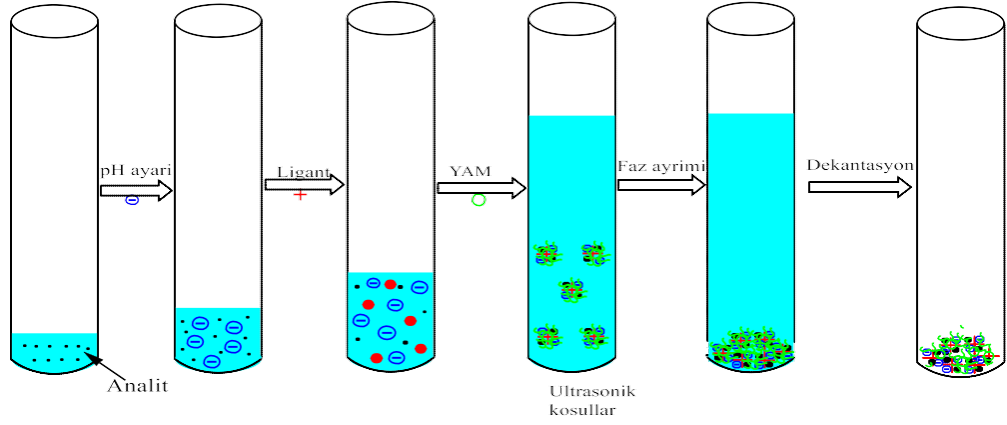
Miseller belirli bir derişim ve sıcaklıktan sonra oluşmaya başlar. Miseli oluşturan bu derişime kritik misel derişimi (cmc) , sıcaklığa ise krafft sıcaklığı adı verilir. Misel oluşumu çok sayıda molekülün çözücünün özelliğine göre hidrofobik ya da hidrofilik grupların bir araya gelerek düzenlenmesiyle oluşur. Aşağıdaki şekilde misel oluşumu gösterilmiştir. Sürfaktanlar sulu çözeltilerde polar kısımları dışarıda hidrokarbon kuyruk kısımları içerde kalacak şekilde misel adı verilen küresel bir yapı oluştururlar. Oluşan misel kitleleri küresel olduğu gibi silindirik, çift tabakalı ve elipsoidik şekilde olabilir. Genel yapıları, miselin boyutları ve şekilleri; surfaktan moleküllerinin geometrisine, surfaktanın derişimine, sıcaklık, pH, iyonik şiddet gibi ortam koşullarına bağlıdır [37].

1.4 Ultrasonik Destekli Bulutlanma Noktası Ekstraksiyon Yönteminin Deneysel Aşamaları.

Ultrasonik destekli bulutlanma noktası ekstraksiyon (UA-CPE) yöntemi uygulanış açısından birkaç basit basamaktan oluşmaktadır. Bunlar;

- ✓ Analit-ligant kompleksinin uygun şartlarda oluşumu,
- ✓ Ortama iyonik şiddet ayarlayıcı ve uygun surfaktanın eklenmesi,
- ✓ Ultrasonik güç altında surfaktanın CPT'ya kadar çözeltilinin ısıtılması,
- ✓ Faz ayrımını kolaylaştırmak için karışımın santrifüjlenmesi ve soğutulması,
- ✓ Surfaktanca zengin faz ve sulu fazın dekantasyonla birbirinden ayrılması,
- ✓ Surfaktanca zengin fazın uygun bir çözücü ile çözülüp tayine hazır hale getirilmesinden oluşmaktadır.

Burada dikkat edilmesi gereken önemli parametre ilave edilen surfaktan miktarının sulu çözelti içerisinde misel şekillerinin oluşumunu sağlayabilecek miktarda olmasıdır. UA-CPE'nin deneysel basamakları Şekil 1.4'te gösterilmiştir.



Şekil 1.4 UA-CPE yönteminin deneysel basamakları.

1.5 UA-CPE Yöntemleri Etki Eden Faktörler

UA-CPE yöntemi ile etkin ayırma ve zenginleştirme elde edebilmek için parametreler şunlardır; surfaktan derişimi ve kimyasal yapısı, kompleksleştirici madde derişimi (gerekli ise), pH, tampon derişimi, elektrolitik şiddet, kompleks kararlılığı, tepkime süresi, ultrasonik koşullar, santrifüj koşulları, surfaktanca zengin fazın seyreltilmesi ve girişimlerin etkisidir.

1.5.1 pH etkisi

Organik ve inorganik moleküllerin misel ortam içerisine çekilerek istenilen verime ulaşılmasında ortam pH'ı büyük önem taşır. Bu nedenle pH'ın duyarlık ve ekstraksiyon parametreleri üzerindeki etkisi araştırılmalıdır. Analit içeren şelatların oluşumu durumunda, en uygun pH kompleks oluşumunun olduğu aralık ile sık sık eşleşmektedir.

1.5.2 Ligant türü ve derişimi

Bulutlanma noktası ekstraksiyon analizlerinde kullanılan ligantlar, analit ile kararlı kompleks oluşturabilen analite karşı seçici davranan hidrofobik karakterli reaktiflerdir. Seçilen ligantın hidrofobik özellikte olması oluşan kompleksin bulutlanma noktası sonrasında surfaktan faza geçişini kolaylaştırır. Ligant seçiminden sonra derişiminin optimize edilmesi gerekir. Kompleksleştirici derişimi yeterli olmadığında ekstraksiyon etkinliği düşerken, gereğinden fazla olduğunda ise bulutlanma noktası sıcaklığı değişeceğinden faz ayırımı zorlaşır.

1.5.3 Sürfaktan türü ve derişimi

Surfaktanların derişimi UA-CPE'nin üzerine etkisi önemlidir. Yapılacak zenginleştirme işlemleri için en verimli surfaktan derişim değeri dar bir aralıkta gözlemlenir. Eğer surfaktan derişimi olması gerekenden daha düşük ise misel oluşumu yeterince gerçekleşmez ve elde edilecek verim değeri düşer [38].

1.5.4 İyonik şiddet

Surfaktan kümeleri ve analit arasında hidrofobik etkileşimleri artırarak misel fazının sulu fazdan daha kolay ayrılmasını olumlu biçimde etkilemektedir [39].

1.5.5 Denge sıcaklığı ve süresi

UA-CPE yönteminde en iyi zenginleştirme faktörü denge sıcaklığı CPT'nin üstünde olduğu durumlarda elde edilir. Çünkü ortam sıcaklığı yeterince yüksek olmazsa bulutlanma noktası ve faz ayırımı gözlenmez. Sıcaklık çok yüksek olması durumunda ise faz ayırımı gözlenir fakat yüksek sıcaklıkta analit-ligant kompleksinin bozulma ihtimali artar [40].

1.5.6 Fazların birbirinden ayrılması

Surfaktanca zengin fazı sulu fazdan ayırmak için farklı yöntemler uygulanmaktadır. En sık kullanılan yöntem santrifüjleme işleminden sonra surfaktanca zengin fazın viskozitesini artırmak için deney tüplerinin - 4°C 'de soğutularak surfaktanca zengin fazın jelimsi bir katı haline getirdikten sonra basit bir dekantasyon işlemiyle sulu faz kolayca ayrılır.

1.6 UA-CPE Yönteminin Avantajları

- ✓ UA-CPE yönteminin uygulandığı çalışmalarda yüksek verim elde edilmesi.
- ✓ Küçük örneklerle düşük derişimlerde doğrudan analize izin vermesi.
- ✓ Diğer birçok ekstraksiyon yöntemine göre çevreye daha duyarlı olması.
- ✓ Deneysel yöntemin basit ve kullanışlı olması.
- ✓ UA-CPE yöntemiyle elde edilen fazlarda tayin yapabilmek için birçok spektroskopik metodun kullanılabilmesi.
- ✓ Organik yapıların ayrılması ve tayini için klasik sıvı-sıvı ekstraksiyon metoduna bir alternatif olması.

- ✓ Elde edilen sonuçların güvenilirliği ve ekstraksiyon işleminin maliyetinin düşüklüğü bu yöntemi cazip kılan bir başka faktördür.
- ✓ Biyolojik ve çevresel numunelere rahatlıkla uygulanabilir oluşu kullanım alanını genişletmektedir.
- ✓ Klasik yöntemlere göre yüksek zenginleştirme faktörü elde edilmesi.
- ✓ İşlem sırasında en yüksek harcamanın sadece ısıtma sırasında gerçekleşmesi enerji tasarrufu sağlaması.
- ✓ Sürfaktan kullanımı hem çevreye karşı sorun olmaması hemde ticari yönden kolay bulunması.

1.7 UA-CPE Metodunun Dezavantajları

- ✓ Yapılacak çalışmada en uygun deneysel koşulları belirlemek için geniş kapsamlı araştırmalar (optmizasyon) yapılmaktadır.
- ✓ En iyi deneysel şartlar için yüksek sıcaklık gerekiyorsa bu durumlarda kompleksleştirici maddeler için dayanıklılık sorunu ortaya çıkmaktadır.
- ✓ Santrifüjleme yaparken optimum sıcaklık değeri azda olsa düşer ve bu durum ekstraksiyon verimini azaltır. Bu nedenle surfaktan seçimi esnasında CPT değeri göz önünde bulundurulmalı ve muhtemel verim kayıplarını engelleme için düşük CP değerine sahip olan surfaktan tercih edilmelidir [41].
- ✓ Santrifüjleme sonrasında elde edilen surfaktanca zengin faz oldukça viskoz olduğunda çoğu tayin yöntemi öncesinde seyreltilmesi gerekir. Bu nedenle zenginleştirme faktörü düşer.

1.8 Analitik Yöntemlerin Performans Kriterleri

Deneysel çalışmaların sonucu elde edilen değerler yöntemin doğruluğunu, güvenilirliğini belirtecek şekilde olmalıdır. Gerekli olan analitik parametreler aşağıda açıklanmıştır.

Doğruluk: Ölçülen değer doğru ya da doğru kabul edilen değere yakınlığını gösterir. Uluslararası bağımsız laboratuvarlar tarafından tayin edilmiş değerleri doğru değer olarak kabul edilen standart referans maddelerin tayininden elde edilen sonuç ile aynı maddenin kullanılan yöntemle elde edilen sonuçları karşılaştırılır. Doğruluk, mutlak hata ya da bağıl hata terimleri ile açıklanır.

Mutlak hata: Ölçülen değerle gerçek değer arasındaki farktır.

Bağıl hata: Mutlak hatanın gerçek değere oranıdır.

Duyarlık: Bir cihazın veya bir yöntemin duyarlılığı, bir analit derişimindeki en düşük farkları ayırt edebilme yeteneğinin bir ölçüsüdür. Duyarlılığı iki faktör etkiler:

- Kalibrasyon eğrisinin eğimi (kesinliği aynı olan iki yöntemden kalibrasyon eğrisi daha dik olan tercih edilir).
- Ölçüm aracının kesinliği veya tekrarlanabilirliğidir.

Seçicilik: Bir yöntemin seçiciliği, numunedeki diğer maddelerden etkilenmeden sadece ilgilenilen maddeyi ölçebilme özelliğidir.

Kesinlik: Aynı yolla elde edilen deney verilerinin arasındaki uyum derecesine analitik verilerin kesinliği denir. Rastgele veya belirsiz hataların bir ölçüsüdür. Aşağıdaki terimler kesinliği ifade etmek için kullanılır:

- Dağılım,
- Sapma,
- Standart sapma,
- Varyans,
- Bağıl standart sapma.

Gözlenebilme sınırı (GS): Belirli bir güven seviyesinde tayin edilebilen en düşük derişimdir.

Tayin sınırı: Gözlenebilme sınırında tekrarlanabilirlik çok düşük olduğundan gerçek tayinler için genellikle gözlenebilme sınırının üç katı alınır bu değere de tayin sınırı denir. Bu sınır için önemli olan ölçüt kabul edilebilir bağıl standart sapma değerine sahip olmasıdır [42].

Gürültü: Yapılan bir analizde, analiz ile ilgisi olmayan, yabancı ve istenmeyen sinyallere gürültü denir. Gürültü sinyalleri analitik sinyaller ile çakıştığı için analitik yöntemin doğruluğunu ve duyarlılığını sınırlar [42].

Sinyal/gürültü oranı: Gürültünün etkisi ölçülen miktar azaldıkça büyür. Gürültü kaynakları:

- Kimyasal gürültü,
- Aletsel gürültü,
- Kesikli gürültü,
- Titreşimsel gürültü,
- Çevresel gürültü.

Doğrusal aralık: Tayin sınırı ile doğrusallığın saptmaya başladığı aralık olarak kabul edilir. Ayrıca nicel analiz için elverişli, yüksek kesinlik ve doğrulukta sonuçlar veren derişim aralığı olarak da tanımlanabilir [42].

Geri kazanım: Bileşimi bilinen bir maddenin analizi sonucunda elde edilen değer in başlangıç değerine oranı olarak tanımlanır. Geri kazanım verimi, yöntemin optimizasyonu için incelenen faktörlerin değerlendirilmesinde ölçüt olarak kullanılır [42].

2. MATERYAL VE METOD

Bu tez çalışmasında çeşitli gıda örneklerinde bulunabilecek eser düzeylerde prolin ve 5- HMF tayini için iki farklı ultrasonik destekli bulutlanma noktası ekstraksiyon (UA-CPE) yöntemi geliştirildi.

2.1. Kullanılan Cihazlar

Absorpsiyon spektrumları ve absorbans ölçümleri 480 nm'de çift ışın yollu UV-vis spektrofotometrede (Shimadzu UV-1800 PC modeli, Kyoto, Japonya) okundu. Örnekleri homojenleştirmek için 300 W' ta sabit frekansta 40 kHz ile çalışan bir ultrasonik banyo (UCS-10 modeli, Seul, Kore) kullanıldı. Faz ayrılmasını kolaylaştırmak için Hettich santrifüj kullanıldı (Universal-320 model, Almanya). Numune çözeltilerinin pH' ını ayarlamak için bir dijital pH metre (JP Selecta, Barcelona, İspanya) kullanıldı. Ultra saf su elde etmek için Labconco su arıtma sistemi (Kansas City, ABD) kullanılmıştır. Sürfaktanca zengin fazın viskozitesini az reaktif tüketimiyle azaltmak için VM-96B model vorteks karıştırıcı da kullanılmıştır. Tez çalışması süresince hazırlanan tüm çözeltiler ve analiz edilen örnekler buzdolabında 4 °C'de saklanmıştır.

2.2. Kullanılan Kimyasallar

Deneyleerde kullanılan tüm reaktifler analitik saflıktaydı ve Sigma-Aldrich'ten (St. Louis, MO, ABD) satın alınmıştır. Standart bir amino asit referansı olan SRM 2389a, Ulusal Standartlar ve Teknoloji Enstitüsü'nden (Gaithersburg, MD, ABD) elde edildi. Stok prolin (1000 mg L⁻¹) çözeltileri suda hazırlandı, mikrobiyal büyümeyi önlemek için 20 mg L⁻¹ NaN₃ ile stabilize edildi ve 4 °C ' de saklandı. Çalışmadan önce standart çözeltiler, asidik su (0.1 mol L⁻¹ HC1) ile aşamalı seyreltme ile kullanımdan önce hazırlandı. İyon eşleştirme reaktifi, floresein (1.0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹) etanol-su karışımında (1:1, h/h) hazırlandı. Cu(II) (Cu (NO₃)₂ · 3H₂O) stok standart çözeltisi (1000 mg L⁻¹) su içinde hazırlandı. Çalışma standartı Cu(II) çözeltisi (5 mg L⁻¹), kullanımdan önce suyla aşama aşama seyreltilerek hazırlandı. Histamin (1.0 x 10⁻³ mol L⁻¹), sekonder şelat ligand su içinde hazırlandı. % 1.0 (a/h), Tween 80' in özütleme çözeltisi su içinde hazırlandı. Çözeltilerin pH'ı fosfat tamponu ile (96.4 mL 0.1 mol L⁻¹ KH₂PO₄ ve 3.6 mL 0.25 mol L⁻¹ Na₂HPO₄) ile 5.5' e ayarlandı. Cam malzemeler: Deney başlamadan önce tüm cam malzemeler önce deterjanlı suda yıkanıp, sonra bol su ile durulanmıştır.

Sonrasında % 10'luk (h/h) HNO₃ çözeltisi ve seyreltilmiş HCl çözeltisinde beş dakika bekletildikten sonra de iyonize su ile yıkanıp kurutulmuştur.

İkinci çalışma olan 5-HMF 'nin tayininde; 100 mg L⁻¹ 5-HMF: 100 mg 5-HMF bir miktar etanolde çözülmüş ve damıtık suyla 100 mL'ye tamamlanmıştır. Gerektiğinde homojen çözelti elde etmek için çözelti etkin biçimde vorteksle karıştırılmıştır. Hazırlanıp ardışık seyreltme ile 1 ve 10 mg L⁻¹ lik seyreltik çalışma çözeltileri hazırlanmıştır. 3.0x10⁻³ mol L⁻¹ Fenosafranin: 0.121 g %80 saflıkta fenosafranin duyar bir terazide tartılmış ve etanolde çözme sonrası hacmi saf suyla 100 mL'ye tamamlanmıştır. Sodyum dodesil sülfat çözeltisi (SDS), 1.0x10⁻³ mol L⁻¹: Analitik saflıktaki SDS'den uygun miktarı tartılarak suda çözülmüş ve suyla hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır. 5 mL Triton X-114 alınmış vorteksle karıştırılarak hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. pH 5.5 sitrat tamponu: 21.01g C₆H₈O₇×H₂O (sitrik asit mono hidrat) duyar terazide tartıldı pH'ını ayarlamak için 0.1 mol L⁻¹ 200 mL NaOH çözeltisi ve pH metre yardımıyla pH 5,5 a getirilip hacmi 1 L' ye saf su ile tamamlanmıştır.

2.3 Örnek Toplama ve Analize Hazırlama

Prolin için örnek hazırlama adımları; Üç farklı örneklem grubu kullanılmıştır. Bal örnekleri 5.0 g (çam, çiçek ve kestane balı) sırasıyla Muğla, Sivas ve Artvin'den toplandı. Ev yapımı şarap numuneleri 3.0 mL, Kapadokya' dan toplandı, meyve suyu numuneleri yerel süpermarketlerden satın alındı. Köpüklenmeyi önlemek için, şarap ve meyve suyu numunelerine 1.0 mL 1-oktanol, %0.5(h/h) ilave edildi. Sonikasyondan sonra, fenolik içeriğin prolin spektrometrik kaydı ile olası girişimini ortadan kaldırmak için numunelere 0.025 g polivinilpirolidon (PVP) ilave edildi. Bu örneklerden prolinin ekstraksiyonu aşağıdaki gibi gerçekleştirildi. Ultrasonik ekstraksiyon koşulları [35]. SRM 2389a, 0.2 g sertifikalı numune, 10 mL etanol-su karışımı (1.3, h/h) içinde çözüldü ve daha sonra asitleştirilmiş su içinde 20 kat seyreltildi. Bulunan en uygun sonikasyon koşulları aşağıdaki gibidir: Su içinde % 25 (h / h) etanol, 40 °C' de 10 dakika ve % 80 sonikasyon genliği. Aynı koşullar, numunelerin çıkarılması için de kabul edildi. Sonikasyondan sonra elde edilen berrak numune çözeltileri, 5 dakika boyunca 3500 rpm' de santrifüjlendi ve daha sonra 0.22 µm'lik membran filtre ile süzüldü. Son olarak, numuneler 2.0 mol L⁻¹ HCl ile asitleştirildi ve son numune hacmi su ile 100 mL'ye ayarlandı.

5-HMF için örnek hazırlama adımları; Analiz için kullanılan ballar (çiçek ve çam) Sivas ve Muğla yörelerinden toplandı, reçel örnekleri ise Sivas'taki yerel marketlerden alınmıştır. 2 g örnek tartıldı ve proteinlerin çökmesi için üzerine 1ml asetik asit eklendi. Daha sonra örneklerde bulunan inert şekerlerin(glukoz ve fruktoz) çökmesi için üzerine 2,0 mL 0,25 mol L⁻¹ Carrez I (15 g K₄Fe(CN)₆.3H₂O / 100 mL su) çözeltisi ve 2,0 mL Carrez II çözeltisi (30 g Zn(CH₃COO)₂.2H₂O / 100 mL su) eklenerek su ile hacmi 50 mL' ye tamamlandı. Sonrasında örneğin homojen olması için ultrafonik su banyosunda 45 °C' de 15 dk ısıtılmaya bırakıldı. Bal ve reçel örnekleri asidik olduğundan pH' ı 1,5 mol L⁻¹ NaOH ile 7 'ye ayarlandı. 3500 rpm' de 10 dk santrifüjlendi ve süzgeç kâğıdıyla süzülerek sıvı kısmı kullanılmak üzere süzüldü. Örnek analize hazır hale getirildi.

3. BULGULAR

3.1 Prolin için UA-CPE Yöntemi

Ön derişim prosedürü aslında (i) kromojenik reaksiyon ve (ii) UA-CPE'yi içeren iki aşamalı bir prosedürdür. İlk adımda, önceden işleminden geçirilmiş, ekstrakte edilmiş ve seyreltilmiş örnek çözeltilerindeki lineer çalışma aralığında belirli miktarda standart prolin çözeltisi, 50 mL'lik bir santrifüj tüpüne aktarıldı. Daha sonra prolin şelat kompleksi oluşturmak için sırasıyla 1.5 mL pH 5.5 fosfat tampon çözeltisi, 1.5 mL 5 mg L⁻¹ Cu (II) çözeltisi ve 0.60 mL 1.0 x 10⁻³ mol L⁻¹ histamin çözeltisi ilave edildi. Bu aşamada, ekstrakte edilemeyen bir [Cu(Pro)₂(Him)₂]²⁺ katyonik kompleks meydana geldi. Bu nedenle, bu karışıma ekstrakte edilebilir bir hidrofobik iyon çifti kompleksi oluşturmak için 1.8 mL 1.0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ floresein ilave edildi ve dengeye gelmesi için 2 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Hidrofobik iyon çifti kompleksinin oluşumundan sonra, ikinci aşamada, bu kompleksi daha düşük bir hacme çekmek için 1.5 mL % 1.0 (a / h) Tween 80 ilave edildi ve son hacim su ile 75 mL'ye tamamlandı. İyon çifti kompleksini kantitatif olarak çıkarmak için, santrifüj tüpü 50 °C' de 10 dakika boyunca ultrasonik etki altında tutuldu. İyon çifti kompleksinin, Tween 80' in surfaktan bakımından zengin fazına ekstraksiyonundan sonra, fazların ayrılması, 3000 rpm' de 5 dakika santrifüjleme ile gerçekleştirildi. Surfaktan bakımından zengin fazın viskozitesini arttırmak için bir buz banyosunda 5 dakika soğutuldu. Sulu fazın çıkarılmasından sonra, misel fazının hacmi, viskozitesini azaltmak ve analizden önce numune muamelesini desteklemek için asetonitril ile 400 µL'ye seyreltildi. Aynı prosedür numune boşu içinde tekrarlandı ve numune boşuna karşı düzeltilmiş absorbans ölçümleri 480 nm' de yapıldı. Optimum deney koşulları altında, ön işleminden geçirilmiş ve ekstrakte edilmiş örnek çözeltiler, matris etkisini azaltmak ve lineer çalışma aralığında analit derişimini düşürmek için su ile 30-150 kat uygun oranlarda seyreltildi.

3.1.1. Deney basamaklarının optimizasyonu

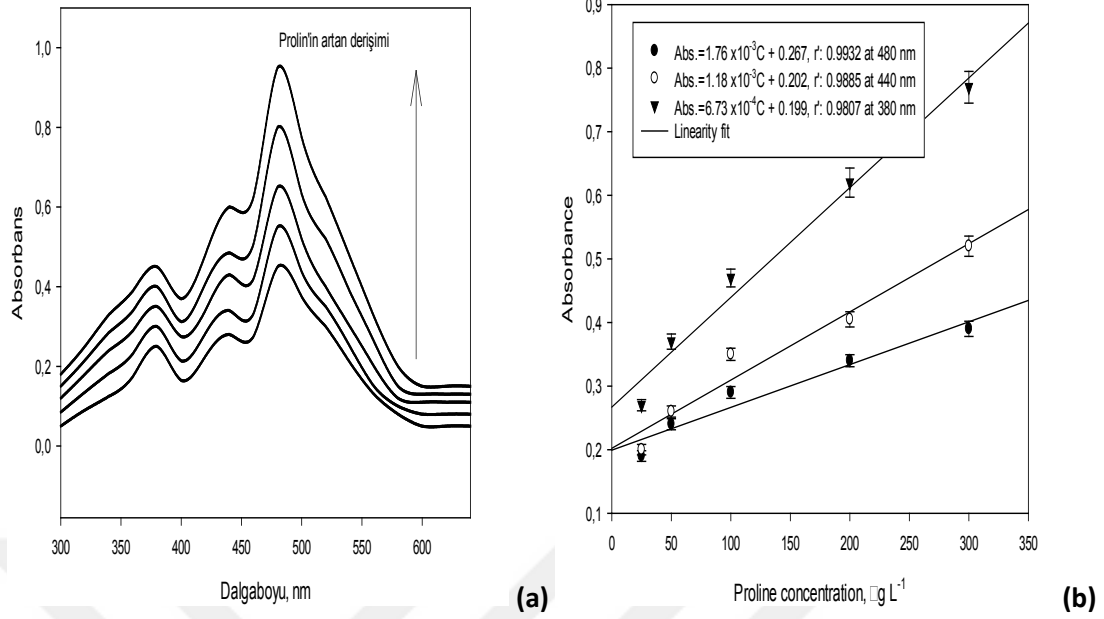
Önerilen yöntemin optimizasyon sürecinde, prolin geri kazanım değeri veya ekstraksiyon etkinliği her parametre için referans olarak alınmıştır. Aşağıdaki denklem kullanılarak her değişken için geri kazanım (% R) hesaplandı;

$$R\% = [C_f \times V_f / C_i \times V_i] \times 100$$

C_i , başlangıçtaki numune hacmindeki V_i (50 mL) prolin ve 5-HMF derişimi ve C_f , yüzey aktif madde bakımından zengin faz hacmi V_f' deki (0.4 mL) prolin ve 5-HMF derişimi. pH, metal miktarı, şelatlanma ve iyon eşleştirme derişimleri, surfaktanın tipi ve derişimi, numune hacmi, ultrasonik zaman ve sıcaklık gibi deneysel değişkenlerin optimal değerini belirlemek için adım adım optimizasyon şeması tasarlanmıştır. Optimizasyon çalışmaları, 50 mL'lik bir santrifüj tüpünde $75 \mu\text{g L}^{-1}$ prolin içeren çalışma çözeltileri kullanılarak gerçekleştirildi. Her değişkenin optimizasyonu için üçlü deneyler yapıldı ve sonuçların ortalaması eğrilerin çizilmesinde kullanıldı.

3.1.2 İyon eşleştirme kompleksinin spektral özellikleri

Başlangıçta, Şekil 3.1' deki (a-b) absorpsiyon spektrumları ve kalibrasyon verilerinden görülebileceği gibi, prolin' in pH 5.5' te histamin ve floresein varlığında Cu(II) ile ekstrakte edilebilir bir stabil iyon eşleştirme kompleksi oluşturduğu gözlenmiştir. Prolinin beş noktalı derişimlerine bağlı olarak $25\text{-}300 \mu\text{g L}^{-1}$ aralığında prolin kompleksinin oluşması ile, surfaktan bakımından zengin fazın 380 nm'de, karakteristik absorpsiyon dalga boylarında, belirgin bir duyarlılık farkına sahip olan lineer artışlar gözlemlendi. 480 nm' de boş analite karşı düzeltilmiş emilimdeki artış (prolin hariç kalan tüm reaktifleri içeren) 480 nm' de prolin derişimiyle orantılıdır. Burada 380, 440 ve 480 nm'de boşlukların emiciliği Cu(II) için 0.05, 0.04 ve 0.15'tir. Histamin-floresan, Cu(II) -histamin için 0.30, 0.05 ve 0.02 ve pH 5.5'te floresans için 0.06, 0.08 ve 0.18, ancak pH 5.5' te herhangi bir fazda sadece Cu(II) veya histamin varlığında ayrılma gerçekleşmedi. Bu nedenle, üretilen iyon eşleştirme kompleksi UA-CPE ile kolayca ekstrakte edilebilir ve spektrofotometre ile tespit edilebilir. Sonuç olarak, metot numune matriksinden prolin ekstraksiyonu ve ön derişiminden sonra, diğer zirve maksimumlara göre daha duyarlı olması nedeniyle, spektrofotometre ile 480 nm'de saptanması için son derece uygundur.

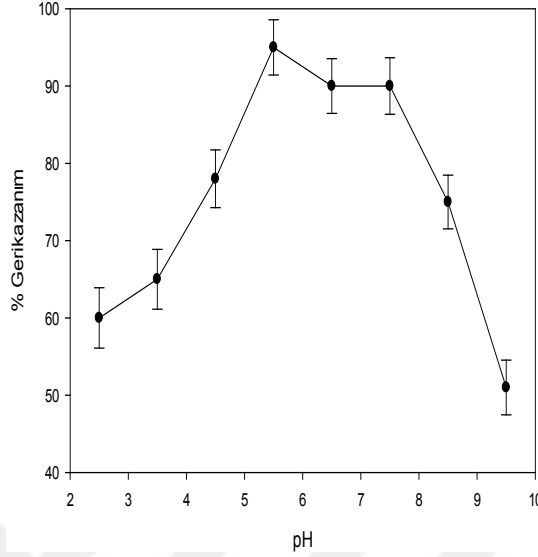


Şekil 3.1 Kompleksin üç farklı dalgaboyunda optimum koşullarda derişime bağımlı (a) spektrumu ve (b) kalibrasyon eğrileri

3.1.2.1 pH etkisi

Bu çalışmadaki temel mantık, ekstraktan, Tween 80'in ultrasonik enerjisi ile hızlı bir şekilde ve kolayca çıkarılabilen derişime bağılı bir iyon çifti kompleksi oluşturmaktır. Çalışma ortamının pH' ı, kompleksleşme, hidroliz, protonasyon, deprotonasyon ve dimerizasyon gibi birçok kimyasal olguyu mümkün kılan en önemli faktördür. Ek olarak, Cu (II) içeren reaktiflerin (histamin ve floresein) mevcut olduğu form, pH ile yakından ilişkilidir. Bu nedenlerden dolayı, reaktifler arasında uygun etkileşimi sağlamak için pH kontrol edilmelidir. pH' ın prolin geri kazanımı üzerindeki etkisi, 2.5-9.5 pH aralığında incelenmiştir. Sonuçlar her bir noktanın üçlü ölçümlerine dayanan hata çubukları (% BSS olarak % 3.3 ile % 3.8 arasında değişen bir hassasiyetle) ile Şekil 3.2'de gösterilmektedir. Başlangıçta, geri kazanım yaklaşık % 60' tı, pH 5.5' te maksimum değere ulaşırken, pH 5.5-7.5 aralığında azalan eğim ile kısmen azaldı ve daha sonra artan pH' lı Cu(II) iyonlarının hidrolizi nedeniyle keskin şekilde azaldı. Seçicilik ve duyarlılık açısından pH 5.5' te en iyi analitik sinyali veren tamponu oluşturmak için, eşit molar derişimlerde (0.05 mol L^{-1}) asetat, ftalat, fosfat ve fosfat-sitrat gibi farklı tampon sistemleri kullanılmıştır. Bununla birlikte, prolin $75 \mu\text{g L}^{-1}$ için fosfat > fosfat-sitrat > asetat > ftalat tampon dizisindeki artan absorbans ile fosfat tampon çözeltisinde maksimum duyarlılık (0.175 absorbans ile) elde edildi. Bu

gerçeklere dayanarak, pH 5.5' teki fosfat tampon çözeltisi, ileriki çalışmalar için en uygun tampon sistemi olarak kabul edildi.

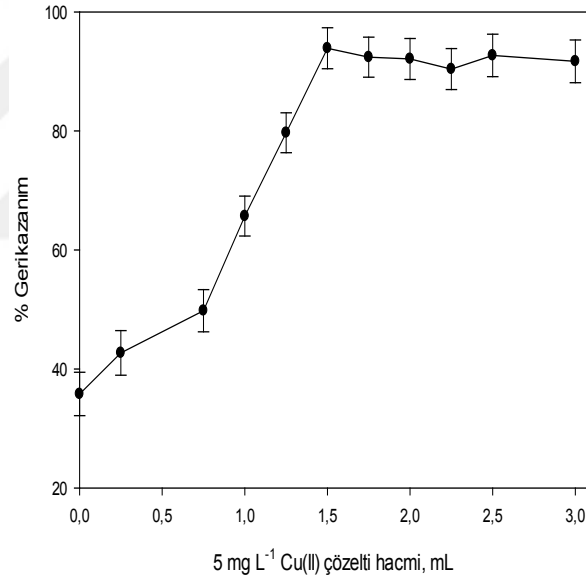


Şekil 3.2 pH etkisi

3.1.2.2 Cu(II) derişiminin etkisi

Çalışma, bir metal, histamin ve prolin arasında koordineli olarak doymuş bir şelat kompleksi oluşturmayı ve daha sonra bu kompleksi görünür bölgede kuvvetlice emen iyon eşleştirme reaktifi olan floreseine elektrostatik olarak bağlamayı amaçlıyordu. Bu amaca ulaşmak için, ön deneyler, Cu(II), Ni(II), Co(II) ve Zn(II) gibi bazı geçiş metallerinin varlığında, 1.5 mL 5 mg L⁻¹ seviyelerinde gerçekleştirildi. Daha stabil bir kompleks oluşumunun bir sonucu olarak, Cu(II) > Ni(II) > Co(II) > Zn(II) sekansında artan absorbans ile en iyi analitik sinyal Cu(II) varlığında (0.185 absorbans ile) elde edildi. Metal tipi belirlendikten sonra, prolin geri kazanımı üzerindeki Cu(II) miktarının etkisi, 5 mg L⁻¹ sabit derişimde 0.0-3.0 mL aralığında incelenmiştir. Şekil 3.3' te görülebildiği gibi, artan Cu(II) miktarı ile geri kazanım arttırılmış ve en iyi değere 1.5 mL Cu(II) çözeltisi kullanılarak ulaşılmıştır. Ancak, 1.5 mL' den daha yüksek hacimlerde önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. Ayrıca, literatürde Cu(II) iyonlarının, ortamın pH' ına bağlı olarak farklı bileşimlerde bağımsız olarak hem prolin hem de histamin ile bağımsız olarak diğer geçiş metali iyonlarından daha stabil şelat kompleksleri verdiği belirtilmektedir [43]. Histaminin ortam pH' ına bağlı olarak hem monodentat hem de bidentat ligant olarak etki ettiği ilk çalışmada, hem amin grubunun hem de imidazol halkasının Cu(II) koordinasyonunda IR' den 6.0' ya göre

daha düşük pH' larda yer aldıkları ve Raman, CuL^{2+} monomerik kompleksinin oluşumuna yol açan çalışmaları inceler. İkinci çalışmada pKa ve pKb değerleri 2.6 ve 11.2 (veya 2.01 ve 11.4) olan prolin (2-pirolidinkarboksilik asit) 2.6 ve 11.2 (veya 2.01 ve 11.4)' te kuvvetli Cu(II) iyonlarını Ni(II) ve Co(II) iyonlarına göre, 6.31×10^{16} da sabit bir şekilde sabitlediği açıklanmaktadır. Potansiyometrik titrasyonla pH aralığı 5.0-9.0. Benzer bir şekilde, Cu(II) iyonları gibi metal iyonlarına bidentat ligand görevi gören ve aynı zamanda pH ve sulu / misel ortamına bağlı olarak tautomerleştirme davranışı sergileyen ve ayrıca pKa değerlerine sahip bir tautomerleştirme davranışı sergileyen histamin (1H-imidazol-4-etanamin) açıklanmaktadır. 6.09 ve 9.88, CuL ($\log\beta$: 10.20) ve CuL_2 ($\log\beta$: 17.53) şeklinde Cu(II) iyonları ile stabil şelat kompleksleri oluşturur. Bütün bu gerçeklere dayanarak, $1.5 \text{ mL } 5 \text{ mg L}^{-1}$, daha ileri çalışmalar için optimum Cu(II) miktarı olarak kabul edildi.

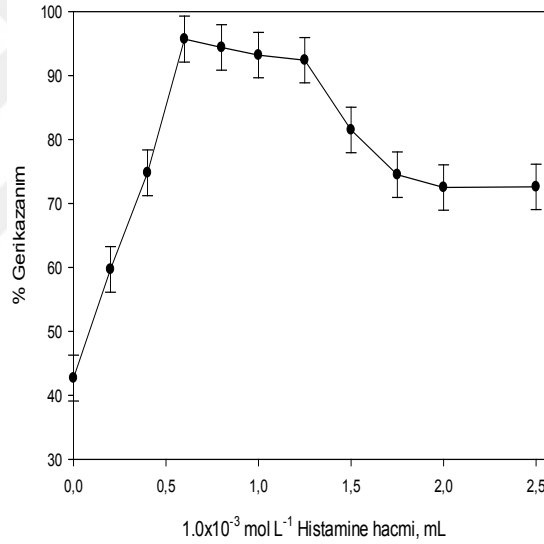


Şekil 3.3 Cu(II) derişiminin etkisi

3.1.2.3 Histamin derişiminin etkisi

Bakır ve prolin arasında primer ligant olarak oluşan kompleks, bakırın koordinasyonunu tamamlamadı, bu nedenle şelatlama amin ve imidazol-N atomları nedeniyle histamin (2-aminetilimidazol, Him), sekonder yardımcı şelat ligand olarak kullanıldı. pH 5.5' te, histamin, bir monodentat ligand olarak görev yapar, çünkü amin grubu protonlanır. -420 mV'de Cu(II) iyonlarının varlığında oluşan stabil şelat kompleksin katodik sıyırma tepesine dayanarak, histamin herhangi bir matris etkisi

olmadan bakır numunelerinde 1-8 ve 30-90 $\mu\text{mol L}^{-1}$ aralığında güvenilir bir şekilde belirlenebilir. Diğer metal geçiş iyonlarından kare dalga sıyrma voltametri ile yapılmıştır. Bakır koordinasyonunu tamamlamak için histamin, bakırdan daha fazla miktarda kullanılmıştır. Çalışmanın sonuçları Şekil 3.4' de verilmiştir. Histamin yokluğunda iyileşme % 45 idi. Geri kazanımın, 0.0-2.5 mL $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ aralığında artan histamin miktarı ile arttığı açıkça görülmüştür. Bu durumda, üçlü kompleksin de histamin miktarına bağlı olduğu açıktır. Sonuçlardan görülebileceği gibi, en iyi geri kazanım, 0.60 mL $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ histamin kullanıldığında elde edildi. 0.6 mL' den daha yüksek hacimlerde, derişime bağlı olarak ikili ligantların yer değiştirmesinin bir sonucu olarak karmaşık bileşimdeki değişim nedeniyle geri kazanım kademeli olarak azalmıştır. Bu gerçeklere dayanarak, 0.60 mL $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ in kantitatif iyon eşleştirme kompleksi oluşumu için yeterli olduğu bulundu.

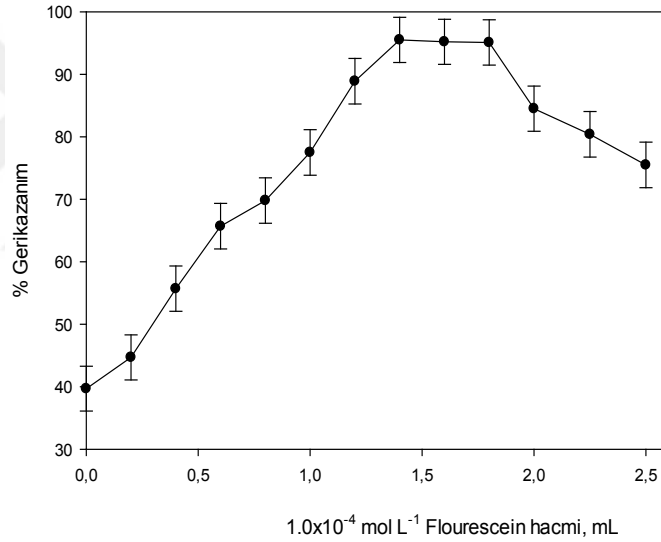


Şekil 3.4 Histamin derişiminin etkisi

3.1.2.4 Floresein derişiminin etkisi

Karışık şelat kompleksi doğası katyonik olduğundan, elektrostatik etkileşimle hidrofobik bir iyon çifti kompleksi oluşturmak için pH' a bağlı iyonlaştırılabilir bir ligant eklenebilir. Bu bağlamda, pKa değeri 2.08, 4.31 ve 6.48 (H_3F^+ , H_2F , HF^- ve F^{2-}) olan floresein, farklı ortamlarda farklı absorpsiyon ve floresans özelliklerini gösteren iyonize edilebilir bir ksantan grubu boyasıdır [44]. Sadece bir hidrofobik kompleks oluşturmak değil, aynı zamanda hassas ve seçici spektrofotometrik analizler için stabil ve çok renkli bir hidrofobik kompleks elde etmek de önemlidir. Bu nedenlerden dolayı,

pH 5.5' te HF veya F₂ şeklinde baskın olan floresein, bu çalışmada yüksek emme katsayısı ve iyi metal bağlama özelliği nedeniyle iyon eşleştirme reaktifi olarak kabul edildi ve seçildi. İyon eşleştirici reaktif miktarının prolin geri kazanımı üzerindeki etkisi 0.0-2.5 mL 1.0x10⁻⁴ mol L⁻¹ aralığında çalışılmıştır. Sonuçlar, Şekil 3.5' de verilmiştir. Geri kazanımın floresein miktarına bağlılığı şu şekilde açıklanabilir: geri kazanım sürekli olarak 1.4 mL hacme yükseltildi, neredeyse 1.4-1.8 mL hacim aralığında sabit tutuldu ve 1.8 mL'den daha yüksek hacimlerde hızlı bir düşüş gözlemlendi. Yüksek hacimlerde, geri kazanımdaki azalma ya boya moleküllerinin derişimine bağlı topaklanmasından ya da serbest boya moleküllerinin kompleks ile birlikte misel fazına aktarılmasının bir sonucu olarak boş sinyalde artıştan kaynaklanabilir. Bu gerçeklere dayanarak, aşağıdaki deneylerde 1,8 mL 1,0x10⁻⁴ mol L⁻¹ optimum floresein miktarı olarak kabul edilmiştir.

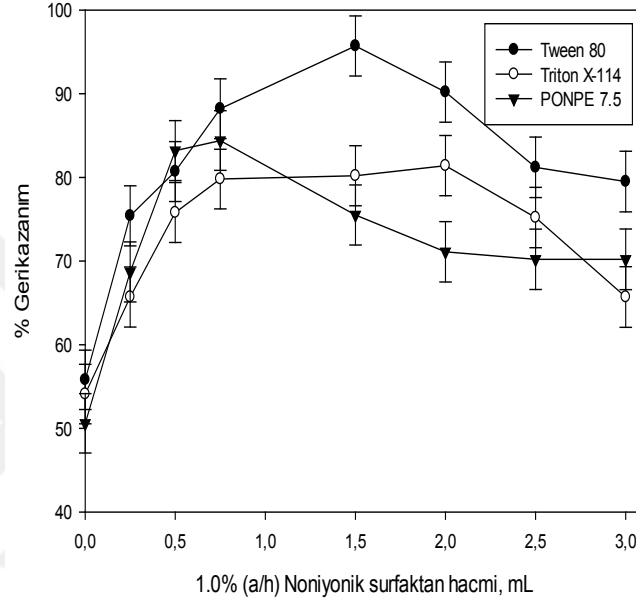


Şekil 3.5 Floresein derişiminin etkisi

3.1.2.5 Noniyonik yüzey aktif madde türü ve miktarının etkisi

Hidrofobik iyon çifti kompleksinin oluşumundan sonra, kompleksi sulu fazdan düşük hacimli misel fazına çıkarmak için iyonik olmayan surfaktan kullanıldı. Noniyonik surfaktanın seçimi kantitatif ekstraksiyon için önemlidir. Bu nedenlerden dolayı, farklı alkil yapıları ve farklı etoksi grupları içeren noniyonik surfaktanlar ile ön çalışmalar yapılmıştır. Üç farklı noniyonik surfaktan için elde edilen sonuçlar, Şekil 3.6' da verilmiştir. Farklı ekstraksiyon yetenekleriyle, her bir surfaktan miktarının geri

kazanım üzerindeki etkisi, 0.0-3.0 mL aralığında sabit derişimde (% 1.0, a/h) araştırıldı. En iyi geri kazanım değeri 1.5 mL Tween 80' de elde edildi. Ayrıca, 0.228 mmol L⁻¹ derişimine eşdeğer olan bu değeri, 0.012 mmol L⁻¹ CMC' den 19 kat daha yüksektir. Geri kazanımda 1,5 mL'den yüksek hacimlerde azalma sebebi, daha fazla surfaktanın sediment fazına geçişi idi. Bu gerçeklere dayanarak, daha fazla çalışma için % 1.0 (a/h) 1.5 mL, optimum Tween 80 miktarı olarak kabul edildi.



Şekil 3.6 Noniyonik surfaktan türü ve miktarının etkisi

3.1.2.6 Denge sıcaklığının etkisi

Sıcaklık, hem surfaktanın bulanıklığını etkileyen hem de iyon çifti kompleks oluşumunun denge süresini kontrol eden önemli bir parametredir. Bu etkiyi değerlendirmek için sıcaklığın geri kazanım üzerindeki etkisi oda sıcaklığından 80 °C' ye çıkarıldı. Oda sıcaklığından 40 ° C' ye faz ayrımı yoktu. Muhtemel sebep, Tween 80 için gerekli olan bulutlanma sıcaklığına ulaşılmamış olabilir. 40 °C' den 60 °C' ye faz ayrımı vardı, ancak faz ayrımı 60 °C' den yüksek sıcaklıklarda azaldı. Bu, kompleksin sulu çözeltiye yüksek sıcaklıkta yeniden dağıtılmasından kaynaklanabilir. Bu gerçeklere dayanarak, daha ileri çalışmalar için en uygun denge sıcaklığı olarak 50 °C' lik bir sıcaklık kabul edildi.

3.1.2.7 Sonikasyon zamanının etkisi

Sonikasyon etkisi, sulu çözeltide, surfaktanın misel kürelerinin stabil dağılımını sağlayan ve kütle transferini hızlandıran önemli bir faktördür. Sonikasyon süresinin iyileşme üzerindeki etkisi optimal reaktif koşullarında 1-20 dakika arasında çalışıldı ve sonuçlar iyileşmenin ilk 10 dakikada doğrusal olarak arttığını ve ardından azaldığını ortaya koydu. Özellikle 10 dakika sonra geri kazanım, çözeltinin aşırı ısınması, kararsız hale gelmesi ve / veya iyon çifti kompleksinin misel fazdan yoğun sulu faza geri dönüşümlü ayrışması nedeniyle önemli ölçüde azaldı. Belki de geri kazanımdaki bu düşüş, prolin reaktif hidroksil radikalleri ile oksidasyonu veya bozunması, longer OH, ultrasonik güç ve termal enerjinin daha uzun zaman periyotlarında birleştirilmesiyle üretilir [45]. Bu gerçeklere dayanarak, 10 dakika ileriki çalışmalar için en uygun sonikasyon süresi olarak kabul edildi.

3.1.2.8 Örnek hacminin etkisi

Prolin, seçilen örnek matrislerinde bulunan engelleyici türlerle birlikte potansiyel olarak bulunduğundan, örnek hacminin belirlenmesi hem derişim öncesi faktörü (PF) arttırmak hem de olası matris etkisini azaltmak için önemli bir değişkendir. UA-CPE sisteminin ön derişim kabiliyeti, sulu numune hacminin, farklı numune hacimlerinden (5-200 mL) prolin (25 µg) geri kazanımı üzerindeki etkisinin incelenmesiyle de düşünölmüştür. Sonuçlar, ekstraksiyonun sulu faz hacminde 75 mL' ye kadar nicel olduğunu ve daha sonra numune hacmindeki artışla azaldığını gösterdi. Böylece, 0.4 mL nihai ekstrakt hacmine ve ekstraksiyonun nicel olduğu maksimum 75 mL numune hacmine dayanarak, 187.5' lik bir ön-derişim faktörü belirlendi.

3.1.3 Yöntemin analitik parametreleri

Yöntemin analitik özellikleri, olası matris etkisini kontrol etmek için iki farklı çalışma ile test edilmiştir. İlk olarak, model çözeltiler kullanılarak, yöntem optimum deney koşulları altında prolin için 1-1000 µg L⁻¹ derişim aralığında kullanılmış ve kalibrasyon grafiği elde edilmeye çalışılmıştır. Tekrarlanan deneyler sonucunda, model çözeltiler için kalibrasyon grafiği 15-600 µg L⁻¹ aralığında doğrusaldı. Model çözümlerinden elde edilen analitik özelliklerden bazıları aşağıda verilmiştir. Tespit (LOD) ve tayin (LOQ) limitleri, boş sinyalin standart sapmasının kalibrasyon eğrisinin eğimine üç veya on katının oranı olarak hesaplandı. Tespit ve tayin sınırı sırasıyla 5.7 µg L⁻¹ ve 19.0 µg L⁻¹ idi. Kalibrasyon eğrilerinin eğim eğrisinin ön derişimi olan ve

olmayan derişim oranı olarak tanımlanan duyarlık iyileştirme faktörü (EF) 105 idi. İkincisi, numune hazırlama aşamasında prolin, farklı derişim aralığında numunelere ilave edildi. Ekstraksiyondan ve ön derişimden önce -1000 mg L^{-1} ve kalibrasyon grafiği elde edilmeye çalışıldı. Bu çalışmada asıl amacımız model çözümlerine göre matris eşleşmesine göre matris etkisinin olup olmadığını belirlemektir. Matris eşleştirmesinden elde edilen analitik sonuçların bazıları aşağıdaki gibidir. Lineer aralık, tespit sınırı (LOD), tayin sınırı (LOQ) ve EF değerleri sırasıyla $25-550 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, $8.2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, $27.3 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ve 96 idi. Her iki kalibrasyon eğrisinin eğimleri, herhangi bir matris efekti göstermemek için % 5.6' lık hassasiyet farkıyla birbirine yakındır. Her iki çalışma için daha kapsamlı sonuçlar Çizelge 3.1' de verilmiştir.



Çizelge 3.1 Önerilen yönteminin analitik performans kriterleri

Analitik özellikler	Model sulu standart çözeltilerden kalibrasyonla	Matriks uyumlu çözeltilerden kalibrasyonla
Regresyon denklemi	$A=1.95 \times 10^{-3} C (\mu\text{g L}^{-1}) + 0.0291$	$A=1.84 \times 10^{-3} C (\mu\text{g L}^{-1}) + 0.0305$
Korelasyon katsayısı, r	0.9949	0.9925
Doğrusal çalışma aralığı, $\mu\text{g L}^{-1}$	15-600	25-550
*LOD, $\mu\text{g L}^{-1}$	5.7	8.2
*LOQ, $\mu\text{g L}^{-1}$	19.0	27.3
% Gerikazanım (30, 100 ve 250 $\mu\text{g L}^{-1}$, n: 5)	95.3, 97.5 ve 103.3	92.7, 98.3, 104.7
% Bağlı standart sapma (30, 100 ve 250 $\mu\text{g L}^{-1}$, n: 5)	2.5, 3.6, 4.3	2.8, 3.8, 5.1
**Duyarlık iyileştirme faktörü	105	96
Önderiştirme faktörü	187.5	187.5
Örnek hacmi, mL	75	75
Ölçüm dalgaboyu, nm	480	480

*On iki tekrarlı boş analizin standart sapmasının üç ve on katına karşılık gelen analitik sinyalin UA-CPE sonrası elde edilen kalibrasyon eğrisinin eğimine oranıdır.
** UA-CPE ile zenginleştirme öncesi ve sonrası elde edilen kalibrasyon eğrilerinin eğim oranı olarak hesaplanan değerdir

3.1.4 Girişim çalışması

İyi ekstraksiyon etkinliği sağlamak ve matris etkisini azaltmak için $75 \mu\text{g L}^{-1}$ prolin tayini için yöntemin seçiciliğinin değerlendirilmesi önemlidir. Seçicilik çalışması şu şekilde yapıldı. Model derişimlerine farklı derişim oranlarındaki girişim türleri eklenmiş ve karışımları önerilen UA-CPE yöntemine ileterek tolerans seviyeleri ve her müdahale eden tür için geri kazanım değerleri belirlenmiştir. UA-CPE ile ön derişimden sonra misel faz emiliminde $\pm\% 5.0'$ dan daha az bir hatanın tolere edilebilir olduğu düşünülmüştür. Ayrıca, amino asitler ve proline kimyasal olarak benzer diğer türler bu çalışmada seçildi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.2' de verilmiştir. Sonuçlar, $\%93.2-104.8$ iyileşme aralığında, 25-1500' de buldukları zaman %BSS ile $\% 4.3'$ ten daha düşük bir etkileşim oranı olmadığı görülebilir. Yöntem performansının değerlendirilmesinde açıklandığı gibi, matris eşleştirme çalışmaları yapıldı ve önerilen yöntemin seçiciliği model çözüm ortamı ile karşılaştırıldı. Her iki çalışmadan elde edilen analitik veriler (LOD, % BSS, % R ve kalibrasyon grafiklerinin eğimi) birbirine çok yakındı ve bu sonuçlar önerilen yöntemin seçiciliğini destekliyor.

Çizelge 3.2 Önerilen UA-CPE metodu ile muhtemel girişimci türlerin $75 \mu\text{g L}^{-1}$ prolin ölçümleri üzerindeki etkisi (n: 3)

İyonlar	Tolerans sınırı, [Girişimci]/[Prolin]	GK (%)	BS S (%)	İyonlar	Tolerans sınırı, [Girişimci]/[Prolin]	GK (%)	BSS (%)
Co^{2+}	1500	97.5	2.4	Ca^{2+}	750	96.7	3.0
Glycine	1500	101.8	2.5	Methionine	500	103.5	3.1
Pb^{2+}	1500	98.2	2.5	SO_4^{2-}	500	96.2	3.4
Tyrosine	1500	98.7	2.7	K^+	500	95.3	3.5
Valine	1500	102.1	2.8	Lysine	500	104.4	3.6
Threonine	1000	101.9	2.5	Isoleucine	200	96.5	4.0
CO_3^{2-}	1000	96.5	2.9	Cl^-	200	96.3	3.3
Cr^{3+}	1000	96.4	2.6	Tryptophan	100	104.8	3.5
Glutamine	1000	96.8	2.7	Mn^{2+}	100	94.9	3.2
Al^{3+}	750	95.7	2.9	Fe^{3+}	100	94.7	3.7
Histidine	750	95.4	3.0	Phenylalanine	50	93.9	4.3
Na^+	750	95.2	3.0	Zn^{2+}	25	93.2	4.2

3.1.5 Yöntemin doğruluğu ve kesinliği

Yeni bir yöntem geliştirildiğinde, validasyon çalışması yöntemin güvenilirliğini sağlamak için çok önemlidir. Bu nedenle, yöntemin kesinliği ve doğruluğu belirli analitik adımlarla test edilmelidir. Yöntemin doğruluğunu test etmek için, standart bir referans materyali olan SRM 2389a Amino, 0.2 g sertifikalı numune ve optimize edilmiş deney koşulları altında 20 kat seyreltme çözüldükten sonra 0.1 mol L⁻¹ HCl içinde asitlendi. Detaylı sonuçlar Çizelge 3.3' te verilmiştir. Sonuçlar, bir doğruluk ölçütü olan istatistiksel metin değerinin kritik değerlerden düşük olduğunu göstermektedir. Ek olarak, 100 ve 300 µg L⁻¹ ile çıktıktan sonra kantitatif geri kazanımlar (% 97.2-98.9), % 4.4' ten daha düşük % BSS' ler ile bulundu.

Ara hassasiyet, doğruluk ve genişletilmiş belirsizlik üç kopya halinde üç derişim prolin seviyesi ile birlikte bal, şarap ve meyve suyu örnekleri kullanılarak test edildi. Gerçeği, Thompson tarafından önerilen yönteme göre toparlanmaya bağlı olarak verildi [46]. İyileşmenin hesaplanması için formül, optimizasyon adımlarının ilk bölümünde verildi. Bu çalışma ile elde edilen nicel geri kazanımlar Çizelge 3.4' te verilmiştir.

Ara kesinliği test etmek için bazı parametreler değiştirildi: iki hafta boyunca üç farklı analiz günü ve farklı standart miktarlar. Orta düzey hassasiyet, Horwitz denklemine göre [47] prolin geri kazanımının bağlı standart sapması (% BSS) olarak değerlendirildi. Ayrıntılı sonuçlar Çizelge 3.4' te verilmiştir ve bunun kesinliği kabul kriterine uygun olduğunu göstermiştir.

Bağıl genişlemiş belirsizlik (k = 2), [48] tarafından önerilen formül (yukarıdan aşağıya yöntem) kullanılarak belirlenmiştir. Her örnekleme grubu için elde edilen nispi genişletilmiş belirsizlik değerleri, Çizelge 3.4' te verilmiştir. Görüldüğü üzere, hesaplanan değerler, istatistiksel olarak kabul edilen belirsizlik değerleri ile tutarlıydı.

Çizelge 3.3 Önerilen UA-CPE yönteminin doğrulanması için seçilen sertifikalı bir numunenin analiz sonuçları (n: 5)

SRM	Eklene	^a 20 kat seyreltme sonrası sertifikalı değ	Bulunan	GK	BSS	^a t _{exp}
	(µg L ⁻¹)	(µg L ⁻¹)	(µg L ⁻¹)	(%)	(%)	
SRM 2389a 0.1	-		27.2±1.2	96.4	4.4	1.86
mol L ⁻¹ HCl'de	100	28.2±1.3	125.4±4.7	97.2	3.8	-
amino asitler	300		324.9±10.1	98.9	3.1	-

^aKritik t değerleri, % 95 güven düzeyi ve dört serbestlik derecesi için 2,78'dir.

Çizelge 3. 4 Önerilen UA-CPE yöntemiyle ekstraksiyondan önce standart eklenmiş üç kalite kontrol numunesinin analizi için yürütülen, doğruluk, kesinlik ve genişletilmiş belirsizlik (k: 2) çalışmalarının sonuçları (n: 9)

Örnek	Eklene prolin	¹ Genişletilmiş belirsizlik	² Kesinlik	³ Doğruluk
	(µg kg ⁻¹)	(U %)	(BSS %)	(GK %)
Bal	25	11.4	6.8	106.8
Şarap	75	9.2	4.5	92.1
Meyve	150	7.4	3.9	104.5

¹Kabul kriteri: Horwitz ve Thompson ve ark'a göre Horwitz fonksiyonundan, $U_{max} < 2 * \%BSS$ [47],[46].

²Kabul kriteri: Horwitz–Thomson fonksiyonuna göre % BSS <2/3, %BSS; 100 µg kg⁻¹ ve daha düşük değerler için 14.7% ve 200 µg kg⁻¹ için 13.6% olmalıdır [46].

³Kabul kriteri: Geikazanım 85–115% olmalı. CODEX kriteri: 10 µg kg⁻¹ için 60–115% ve 0.1–10 mg kg⁻¹ arası için 80–110% olmalıdır [48],[49].

3.1.6 Yöntemin uygulaması

Validasyon çalışmalarının ardından, bal, şarap ve meyve suyu örneklerinde prolin tayini ile spektrofotometri ile birleşik UA-CPE yönteminin uygulanabilirliği ve güvenilirliği incelenmiştir. Yöntemin doğruluğu, bilinen farklı prolin miktarlarıyla (50 ve 100 $\mu\text{g L}^{-1}$) çalışılan numunelerin analizi ile de doğrulandı. Çizelge 3.5' teki bu çalışmanın sonuçları, eklenen prolin geri kazanımlarının iyi olduğunu (% 91.7-108.5), % 2.5 ile % 4.6 arasında değişen bir % BSS ile incelendi, bu da incelenen tüm örnek tiplerinin matrislerinin üzerinde önemli bir etkisi olmadığını gösterir. Bu nedenle, yöntem seçilen gıda maddelerinde prolin ekstraksiyonu, ön derişimi ve prolin tayini için güvenilirdir. Tüm örneklerin prolin içeriği, literatürdeki değerlerle iyi bir uyum içindedir. Özellikle, sonuçlar bal örneklerinin, düşük prolin içeriğinin olabileceği Çin'deki bir aracıdan doğrudan tedarik edilen bal örneklerinde bildirilen sonuçlarla oldukça uyumlu olan kabul edilebilir miktarda prolin içerdiğini göstermiştir [50]. Şeker katılımı için gösterge olarak kullanılır. Bununla birlikte, çeşitli ballarda yüksek miktarda prolin, yüksek miktarda polen içeriğinden kaynaklanabilir. Baldaki minimum prolin içeriği, 2002 yılında AB tarafından belirlendi, 180 mg kg^{-1} , uluslararası kabul için asgari değer olarak kabul edildi [51].

Çizelge 3.5 Seçilen örneklerin önerilen UA-CPE yöntemi ile analiz sonuçları (n: 5)

Örnek tipi	Eklenen ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Bulunan ($\mu\text{g L}^{-1}$)	^a Bulunan (mg kg^{-1})	^b GK (%)	BSS (%)
Bal örnekleri					
Çiçek balı	-	402.8	322.2	-	3.9
	50	450.2	-	94.7	4.2
	100	498.6	-	95.8	4.4
Çiçek balı	-	418.7	335.0	-	3.9
	50	464.8	-	92.1	4.3
	100	513.6	-	94.9	4.6
Çiçek balı	-	395.1	474.1	-	3.5
	50	446.7	-	103.2	3.7
	100	497.5	-	102.4	3.8
Kestane balı	-	359.6	431.5	-	3.3
	50	411.7	-	104.2	3.5
	100	462.5	-	102.9	3.7
Kestane balı	-	348.4	487.8	-	3.2
	50	395.3	-	93.7	3.4
	100	444.3	-	95.9	3.5
Çam balı	-	320.8	513.3	-	3.2
	50	369.9	-	98.2	3.3
	100	419.6	-	98.8	3.5
Çam balı	-	354.7	496.6	-	3.5
	50	403.9	-	97.1	3.7
	100	452.9	-	98.3	3.9
Çam balı	-	301.9	483.0	-	2.8
	50	353.3	-	102.7	2.9
	100	403.1	-	101.2	3.5
Şarap Örnekleri					
Kırmızı şarap	-	210.4	245.5	-	3.1
	50	256.3	-	91.7	3.3
	100	304.2	-	93.8	3.5

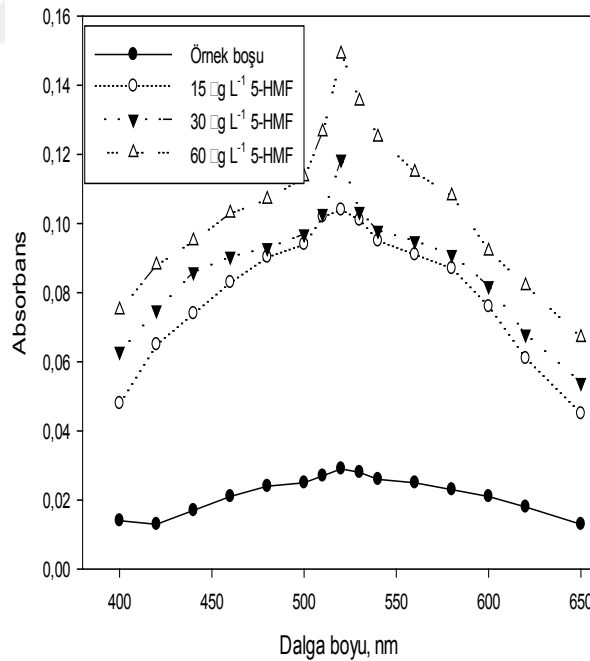
Kırmızı şarap	-	245.1	285.9	-	3.2
	50	291.6	-	92.9	3.4
	100	340.6	-	95.5	3.7
Kırmızı şarap	-	198.2	231.2	-	2.9
	50	251.2	-	105.9	3.2
	100	302.3	-	104.1	3.4
Beyaz şarap	-	83.6	97.5	-	2.5
	50	131.5	-	95.7	2.7
	100	180.4	-	96.8	2.8
Beyaz şarap	-	99.1	115.6	-	2.6
	50	147.7	-	97.1	2.8
	100	197.8	-	98.7	3.0
Meyve suyu örnekleri					
Portakal suyu	-	194.9	974.5	-	3.0
	50	243.3	-	96.7	3.2
	100	292.8	-	97.9	3.4
Elma suyu	-	161.4	538.0	-	2.8
	50	215.7	-	108.5	2.9
	100	266.6	-	105.2	3.2
Kivi Suyu	-	223.8	373.0	-	3.1
	50	275.2	-	102.8	3.4
	100	325.3	-	101.5	3.5
Üzüm suyu	-	286.4	286.4	-	3.6
	50	334.3	-	95.7	3.8
	100	383.2	-	96.8	3.9

^a Her bir bal numunesinin ön muamelesinden sonra (5 g), her bir şarap ve meyve suyu numunesi (3 g, sıvı fazdaki 3 mL örneğin, 3 mL'ye eşdeğer olduğu varsayılarak, 100 mL etanol-su karışımı (1: 3). v / v) UA-CPE ile 40 ° C'de 10 dakika boyunca ve lineer çalışma aralığında düşecek şekilde analizden önce 30-150-kat uygun oranlarda seyreltme.

^b Sırasıyla 50 ve 100 µg⁻¹ ile çıktıktan sonra beklenen ve gözlemlenen toplam prolin miktarlarının oranının çarpımı olarak hesaplandı.

3.2 5-HMF için UA-CPE/spektrofotometrik yöntem

Optimum koşullar altında; 50 mL'lik santrifüj tüpüne 1/50 oranında seyreltilmiş örnekten 3 mL konularak sırasıyla $30 \mu\text{g L}^{-1}$ 5-HMF, 2,5 mL pH 5,5' te sitrat tampon çözeltisi , 0,4 mL $3.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ Fenosafranin , $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ SDS , 1,2 mL %5 (h/h) Triton X-114 eklenerek karışımın hacmi 50 mL'ye tamamlanmıştır. Elde edilen karışım, 45°C ' de 15 dakika ultrasonik etki altında (300 watt, 40 kHz) edilen bekletildikten sonra, 4000 rpm'de 20 dakika santrifüjlenerek surfaktanca zengin fazın tüpün altında toplanması sağlanmıştır. Surfaktanca zengin faz ile sulu fazın ayrılmasını kolaylaştırmak için tüpler 5 dakika buzdolabında bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda tüpün alt kısmındaki surfaktan fazının yoğunluğu artırılmış, üst kısımda yer alan sulu faz ise dekantasyon işlemiyle ayrılmıştır. Ayrılan kısım etanolde çözülmüştür. Daha sonra, UV-VIS spektrofotometre ile 532 nm 'de tayin yapılmıştır. Ayrıca, kullanılan reaktiflerin analitik sinyale etkisini belirlemek için reaktif boşuna paralel aynı işlemler uygulanmıştır. Önerilen yöntemin optimum koşullarda 5-HMF miktarına bağlı spektrumu Şekil 3.7'de gösterilmektedir.



Şekil 3.7 Örnek boşuna karşı üç farklı 5-HMF derişimi ($15, 30$ ve $60 \mu\text{g L}^{-1}$) için dalgaboyunun (nm) bir fonksiyonu olarak ekstraksiyon prosesinin absorpsiyon spektrumları

3.2.1 UA-CPE Verimini Etkileyen Parametrelerin Optimizasyonu

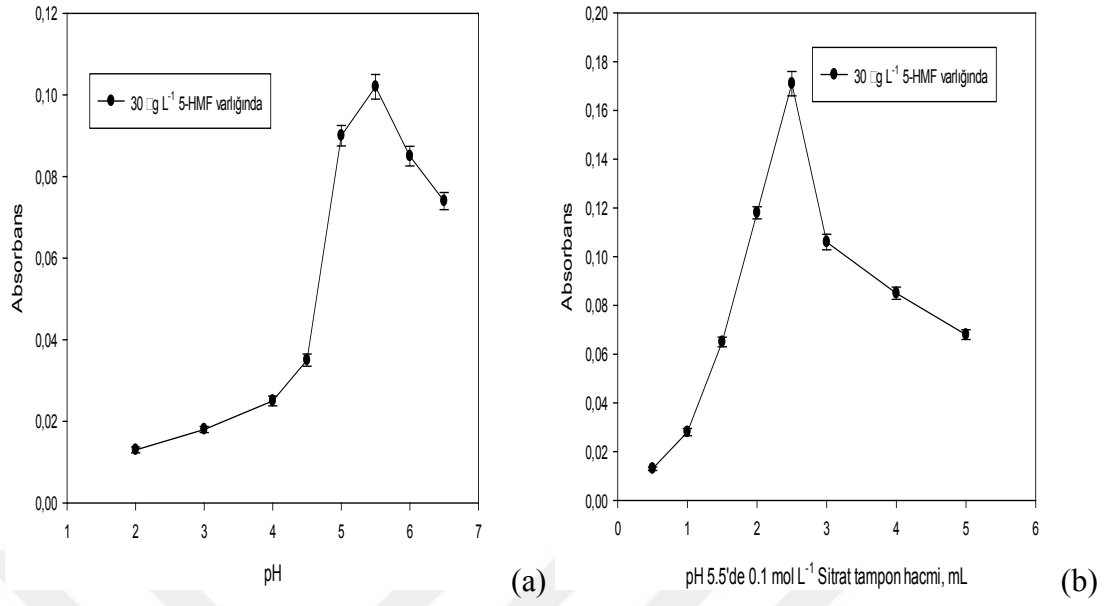
Önerilen yöntemin optimizasyon sürecinde, 5-HMF geri kazanım değeri her parametre için referans olarak alınmıştır. Aşağıdaki denklem kullanılarak her değişken için geri kazanım (% R) hesaplanmıştır.

$$R\% = [C_f \times V_f / C_i \times V_i] \times 100$$

Burada C_i , başlangıç numune hacmindeki V_i (50 mL) 5-HMF değişimini ve C_f , yüzey aktif madde bakımından zengin faz hacmi V_f deki (0.2 mL) 5-HMF değişimi, pH, kompleksleştirici, surfaktan tipi ve derişimi, numune hacmi, sonikasyon sıcaklığı ve zamanı, santifüjleme hızı ve zamanı gibi deneysel değişkenlerin optimal değerini belirlemek için adım adım optimizasyon şeması tasarlanmıştır. Optimizasyon çalışmaları, 50 mL'lik bir santrifüj tüpünde $150 \mu\text{g L}^{-1}$ 5-HMF içeren çalışma çözeltileri kullanılarak yapıldı. Her bir değişkenin optimizasyonu için üç tekrarlı ölçümler düzenlendi ve sonuçların ortalaması optimal eğrilerin oluşturulmasında kullanıldı.

3.2.1.1 pH etkisi

Çalışma ortamının pH'ı hem analit ile ligant arasındaki iyonik kompleksin oluşumunu hem de bir sonraki basamakta yapılacak olan zenginleştirme işlemini etkilediğinden, pH optimizasyonu önemlidir. Bu amaçla çeşitli tamponlar denenmiştir. Britton-Robinson (BR) tamponu, sitrat tamponu ve ftalat tamponu bunlardan bazılarıdır. 50 mL' lik final örnek hacmi için 2.0-6.5 pH aralığında inceleme sonucu en iyi duyarlılığın pH 5,5'te sitrat tamponu varlığında elde edildiği gözlenmiştir. Şekil 3.8 'de bu durum açık bir biçimde görülmektedir.

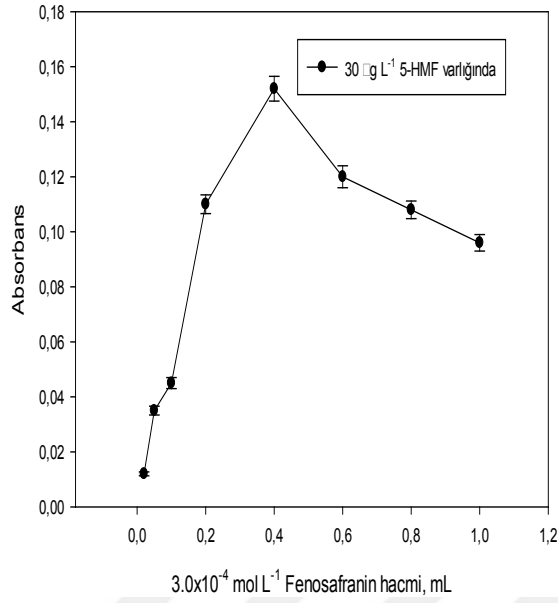


Şekil 3.8 532 nm de analit boşuna karşı düzeltilmiş absorbansa (a) pH ve (b) tampon hacminin etkisi (n:3)

Optimal pH belirlendikten sonra seçilen tampon çözeltinin tampon hacminin de duyarlılığa etkisi araştırılmıştır. 0.1-5,0 mL aralığında hacim optimizasyonu yapılarak Şekil 3.8 (b) de görüldüğü gibi en yüksek sinyal 2,5 mL' lik bir tampon ile elde edilmiştir.

3.2.1.2 Fenosafranin derişiminin etkisi

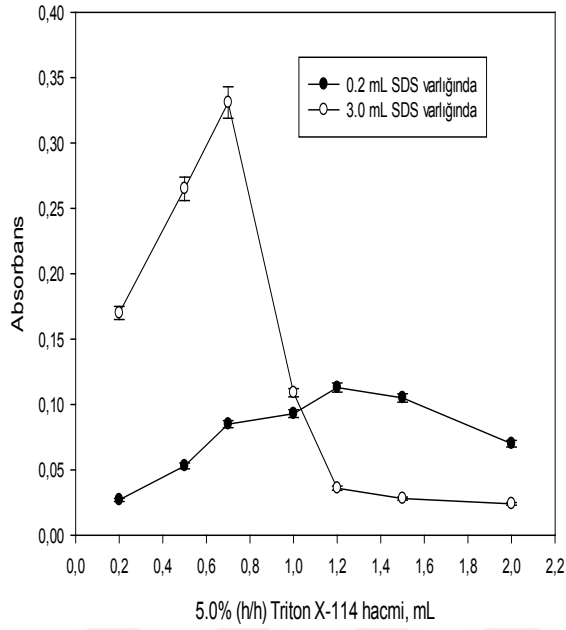
UA-CPE yönteminde kompleksleştirici türün, analit ile hızlı ve kararlı hidrofobik özellikte bir kompleks yapı oluşturması istenir. Bu nedenle kompleksleştirici madde seçimi önemlidir. En iyi analitik sinyali elde edebilmek için serbest amin grupları içere heterosiklik fenazin grubu katyonik bir boya olan redoks duyarlı fenosafranin kullanılmıştır. Bu amaçla 3.0×10^{-4} mol L⁻¹ fenosafranin'den 0,1-1,2 mL hacimleri arasında kullanılmıştır. En yüksek sinyal Şekil 3.9 'da görüldüğü gibi 0,4 mL'lik bir hacim ile elde edilmiştir. Daha düşük hacimlerde absorbansın doğrusal olarak artması ise anyonik surfaktan olan SDS varlığında 5-HMF ve boya arasında seçimli imin oluşumundan kaynaklanır. Burada SDS' nin hem bir duyarlık arttırıcı yardımcı bir ligant hem de boyanın ya da analit-boya kompleksinin karşıt yük tamamlayıcısı/yük nötralleştiricisi olduğu varsayılmaktadır. Daha yüksek hacimlerde sinyalin düşmesi pH 5.5' te boyanın derişime bağımlı dimerleşmesi ve daha ileri aggregasyonundan ileri gelebilir. Bu durum analit yokluğunda boş sinyalin artmasından kaynaklanmaktadır.



Şekil 3.9 532 nm’de analit boşuna karşı düzeltilmiş absorbansa Fenosafranin derişiminin etkisi (n: 3)

3.2.1.3 Nonyonik surfaktan miktarının etkisi

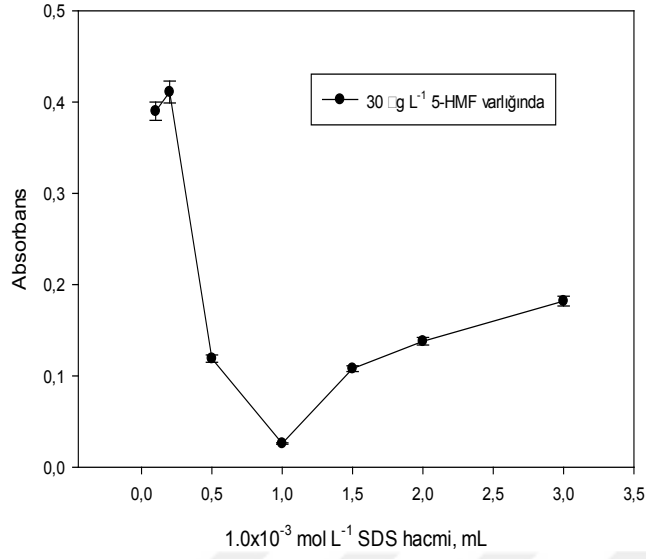
Surfaktan derişimi, UA-CPE yöntemini etkileyen önemli parametrelerden biridir. Çünkü, surfaktan derişiminin düşük olması durumunda misel oluşumu istenilen düzeyde gerçekleşmez veya oluşan kompleksin tamamı kantitatif olarak surfaktan fazına geçemez, dolayısıyla analitik sinyal değerinde düşme gözlenir. Surfaktan derişiminin yüksek olması durumunda ise surfaktanca zengin fazın hacmi artacağından ön deriştirme faktörü düşer. Yapılacak ayırma işlemleri için en uygun surfaktan derişimi dar bir aralıkta gözlemlenir. Bu amaçla iki farklı SDS hacmi varlığında (düşük, 0.2 mL ve yüksek, 3.0 mL) çeşitli nonyonik surfaktanlar denenmiş ve en yüksek analitik sinyal(ler) Triton X-114 ile elde edilmiştir. Nonyonik surfaktan hacminin absorbansa etkisi 0,2-2,0 mL aralığında incelenmiştir. 3.0 mL SDS varlığında, en iyi sinyal 0.7 mL 5% (h/h) Triton X-114 ile elde edilirken; yaklaşık 3.0-3.5 katlık duyarlık farkıyla 0.2 mL SDS varlığında 1.2 mL %5 (h/h) Triton X-114 ile edilmiştir. Şekil 3.10 ‘daki grafikte bu durum daha açık biçimde sunulmuştur.



Şekil 3.10 532 nm’de analit boşuna karşı düzeltilmiş absorbansa noniyonik surfaktan miktarının etkisi (n: 3)

3.2.1.4 Anyonik surfaktan miktarının etkisi

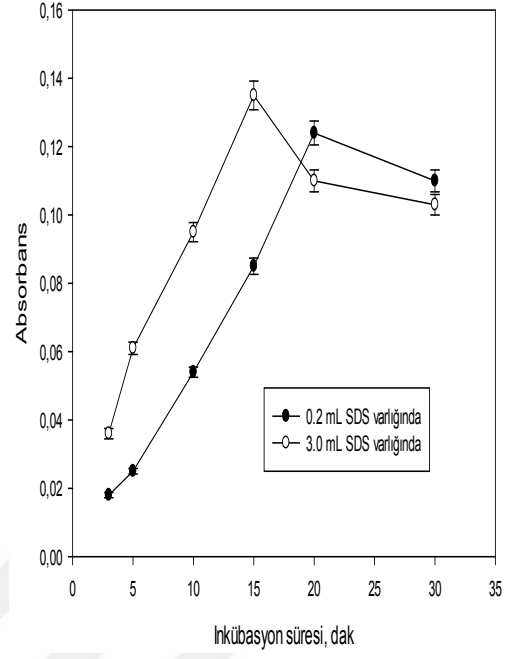
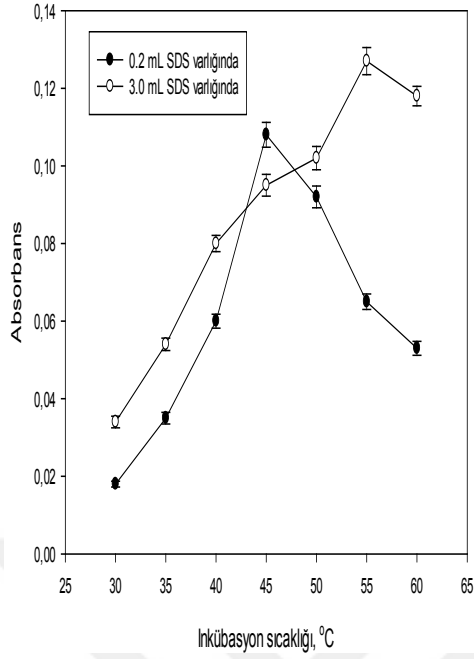
Bulutlanma noktası ekstraksiyonu deneylerinde, ortama ikinci bir iyonik surfaktan eklenmesi (SDS, CPC, CTAB gibi), analitin etkin çözünürleşmesine katkı sağlayacak biçimde yardımcı bir ligant olarak ayırma verimini arttırdığı literatürde bildirilmiştir [52]. Ortama eklenen surfaktan ikinci bir ligant gibi davranabilir. Yapılan analizde en iyi sinyal SDS ile elde edilmiştir. Bu durum açıkça oluşan imin kompleksinin pozitif yüklü bir ara kompleks olduğunu gösterir. 50,0 mL’lik final hacimde 1.0×10^{-3} mol L⁻¹ derişiminde SDS’nin 0.1-3.0 mL arasında değişen hacimlerle deneyler yürütülmüştür. Derişime bağımlı SDS’ nin dimerleşme gösterdiği gözlenen sonuçlardan bellidir. 1 mL’nin altında ve üstündeki maksimum değerler (0.2 ve 3.0 mL’lik hacimler) dikkate alındığında SDS’nin monomer ve dimer ya da daha ileri aggregasyon halinin kompleks oluşumuna katıldığı görülmektedir. Bu optimal hacimlerde SDS’nin sabit derişimde 5-HMF’ nin sinyaline katkısının farklı boyutlarda ve yönlerde olması beklenen bir durumdur. Daha ileri çalışmalar için hem 0.2 mL hem de 3.0 mL’lik SDS hacimleri dikkate alınmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.11 ‘de açık biçimde sunulmuştur.



Şekil 3.11 532 nm’de analit boşuna karşı düzeltilmiş absorbansa anyonik surfaktan miktarının etkisi (n: 3)

3.2.1.5 İnkübasyon sıcaklığı ve süresi

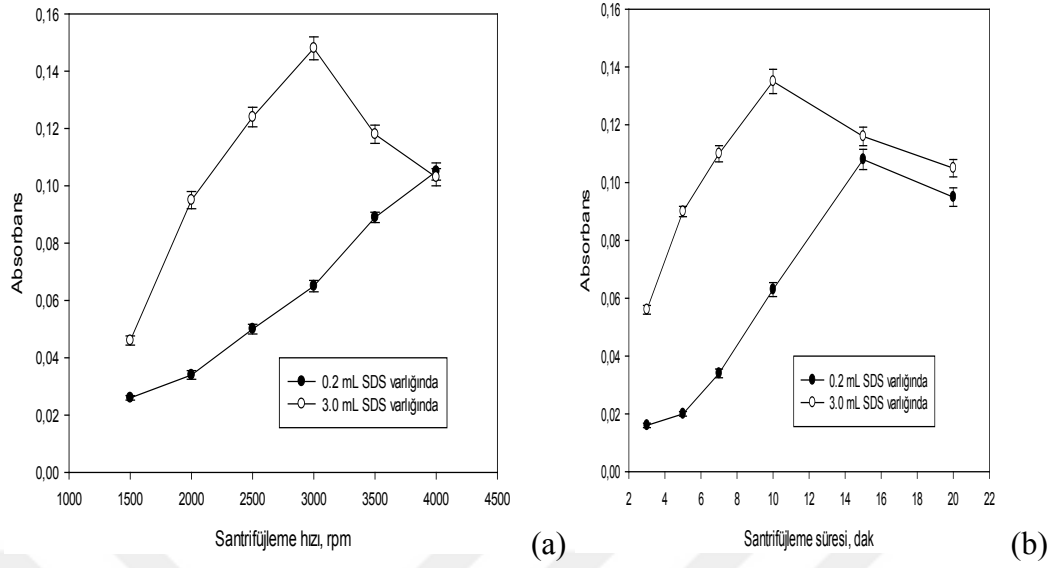
Diğer parametrelerin optimizasyonu tamamlandıktan sonra, ultrasonik güç, inkübasyon sıcaklığı ve süresi gibi parametreler optimize edilmiştir. UA-CPE için sıcaklık, misel oluşumunda önemli bir etkidir. Çünkü düşük sıcaklıklarda, bulutlanma sıcaklığına ulaşamadığı için ayırma tam olarak gerçekleşmezken, yüksek sıcaklıklarda ise özellikle zayıf kompleks oluşum sabitine sahip şelat ve iyon çifti kompleksler için oluşan kompleksin tersinir olarak ayrılma ihtimali vardır. Bu nedenle optimal ultrasonik banyo sıcaklığını belirlemek için 25–65 °C arasında deneyler yapılmıştır. Şekil 3.12’de görüldüğü gibi en iyi analitik sinyal 45 °C’de elde edilmiştir. En yüksek analitik sinyali elde etmek için önemli parametrelerden biri de örnek çözeltilerin ultrasonik banyosunda bekleme süresidir. Bu amaçla 45 °C sabit sıcaklıkta örnekler için 2-20 dakika aralığında süre optimizasyonu çalışması yapılmıştır. Şekil’de 0.2 mL SDS varlığında 20 dakika’lık bir bekleme süresinin optimum değer olduğu; 3.0 mL SDS varlığında ise 15 dakika’lık bekleme süresinin optimal olduğu görülmektedir. Ultrasonik banyo sıcaklığı ve süresinin optimizasyonundan sonra ultrasonik banyonun güç optimizasyonu (düşük (30%), orta (50%) ve yüksek (70%) güç genlik modunda) çalışması da gerçekleştirilmiştir. Her iki SDS hacmi için ultrasonik banyonun maksimum genlikte optimal sinyaller verdiği gözlemlenmiştir.



Şekil 3.12 532 nm’de analit boşuna karşı düzeltilmiş absorbansa (a) inkübasyon sıcaklığı ve (b) inkübasyon süresinin etkisi (n: 3)

3.2.1.5 Santrifüleme hızı ve süresinin etkisi

Santrifüleme hızı, faz ayrımını etkileyen parametrelerdendir. Bu nedenle optimum koşullar altında aynı miktarda 5-HMF içeren çözeltilerin bulutlanma noktası gözlemlendikten sonra 1500 ile 4000 rpm arasında farklı hızlarda santrifüleme işlemi yürütülmüştür. Etkin bir faz ayrımı için 3500 rpm’lik bir santrifüleme hızının uygun olduğu bulunmuştur. Santrifüleme zamanının etkisini incelemek amacıyla 2-20 dakika arasında çalışılmalar yürütülmüştür. Gözlenen sonuçlardan en uygun santrifüleme süresinin 10 dakika olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.13 532 nm’de analit boşuna karşı düzeltilmiş absorbansa (a) santrifüjleme hızı ve (b) santrifüjleme süresinin etkisi (n: 3)

3.2.2 Yöntemin analitik parametreleri

UA-CPE yöntemi için analitik sinyali etkileyen parametrelerin optimizasyonu sonrası analitik parametreler belirlenmiştir (Regresyon eşitliği, doğrusal çalışma aralığı, tayin sınırı gözlenebilme sınırı, bağıl standart sapma). Bu parametreler Çizelge 3.6 ‘da ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

Çizelge 3.6 Optimize edilmiş reaktif koşulları altında önerilen ön deriştirme yönteminin analitik özellikleri

Parametreler	0.2 ml 1.0×10^{-3} mol L ⁻¹ SDS varlığında	3,0 mL $1,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ SDS varlığında
Regresyon denklemi	$A_1 = 5.18 \times 10^{-3}C$ (5-HMF, $\mu\text{g L}^{-1}$) + 0.053, $A_2 = 1.01 \times 10^{-3}C$ (5-HMF, $\mu\text{g L}^{-1}$) + 0.0883	$A_1 = -0.0215C$ (5-HMF, $\mu\text{g L}^{-1}$) + 0.378, $A_2 = -1.31 \times 10^{-3}C$ (5-HMF, $\mu\text{g L}^{-1}$) + 0.203
Korelasyon katsayısı, r	0.9866, 0.9915	0.9992, 0.9856
Doğrusal çalışma aralığı, $\mu\text{g L}^{-1}$	2-20, 20-200	2-15, 15-100
LOD, $\mu\text{g L}^{-1}$	0.75	0.53
LOQ, $\mu\text{g L}^{-1}$	2.51	1.76
% Gerikazanım (10, 25 ve 75 $\mu\text{g L}^{-1}$, n:5)	97.5-102.3	97.3-101.6
%BSS (10, 25 ve 75 $\mu\text{g L}^{-1}$, n:5)	2.6-3.7	2.5-3.8
^a Duyarlık iyileştirme faktörü	60	65
^b Ön deriştirme faktörü	38.5	38.5
Örnek hacmi, mL	15	15
Ölçüm dalgaboyu, nm	532	532

^aUA-CPE li ve siz kalibrasyon eğrilerinin eğim oranıdır

^bUA-CPE öncesi ve sonrası sulu çözelti hacminin seyreltilmiş surfaktanca zengin faz hacmine oranıdır

3.2.3 Girişim çalışması

Gerçek örneklerle çalışırken karşılaşılan sorunlardan biri gerçek örneklerin yapısında bulunabilecek diğer kimyasal türlerin olası girişim etkisidir. Girişimler genellikle zenginleştirme basamağıyla ilgilidir. Zenginleştirme yönteminde, analit-ligant kompleksinin oluşumunu sınırlayıcı veya bu kompleksin surfaktan açısından zengin faza geçişini sınırlayıcı türler girişime neden olurlar. Bir yüklü yada yüksüz nötral türün girişimci tür olarak kabul edilmesi için analitik sinyalde \pm % 5.0'lik bir değişim meydana getirmelidir. Bundan dolayı 5-HMF analizi için ilgili gıda örneklerinde bulunabilecek türlerin değişen derişimlerdeki olası girişim etkileri incelenmiştir. Yapılan çalışmanın sonuçları Çizelge 3.7' de ayrıntılı olarak verilmiştir.

Çizelge 3.7 Girişimci türler varlığında $100 \mu\text{g L}^{-1}$ 5-HMF' nin tekrarlı ölçüm sonuçları (n: 3)

Girişimci türler	Tolerans sınırı	Gerikazanım %	BSS
Inorganik katyonik türler			
Na ⁺ , K ⁺ , NH ₄ ⁺ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Sr ²⁺	1000	96.5-101.5	3.2-4.8
Zn ²⁺ , Al ³⁺ , Co ²⁺ , Ni ²⁺ , Mn ²⁺ , Fe ²⁺	500	93.5-102.2	2.8-5.7
Mo ⁶⁺ , Pb ²⁺ , Cd ²⁺ , V ⁵⁺ , V ⁴⁺	350	94.5-98.2	3.2-5.5
Se ⁴⁺ , Cr ³⁺ , Sb ³⁺ , As ³⁺ , As ⁵⁺	250	95.5-98.5	3.1-5.3
Sn ²⁺ , Cu ²⁺ , Fe ³⁺	100	93.5-97.2	2.5-6.5
Inorganik anyonik türler			
Cl ⁻ , SO ₄ ²⁻ , NO ₃ ⁻ , H ₂ PO ₄ ⁻ , HCO ₃ ⁻ , Br ⁻ , F ⁻	1000	94.0-98.0	3.0-5.0
SCN ⁻ , NO ₂ ⁻	500	95.5-98.5	3.2-5.5
I ⁻ , C ₂ O ₄ ²⁻	250	93.5-97.5	2.5-5.0
HSO ₃ ⁻	25-100	92.5-96.5	3.5-5.5
*HSO ₃ ⁻	>100	97.5-101.5	2.5-4.0
Organik türler			
Valin, Trosin, Glisin, Alanin,	750	96.5-102.0	3.0-4.5
Fenilalanin, Glutamin, Metionin	500	95.5-102.0	2.5-5.0
Etionin, Triptofan	250	94.5-98.0	2.5-4.0
Fenol, Histidin	150	95.5-99.5	3.0-5.2
Askorbik asid	100	93.5-98.5	2.0-4.5
Formaldehit, **Asetaldehit	>100	95.5-103.5	2.5-5.8

*UA-CPE öncesi ya pH 2.0 civarında 1.0 mL 0.2 mol L⁻¹ H₂O₂ ile karışımı tepkimeye sokmakla yada ön ısıtmakla uzaklaştırılmalıdır

** UA-CPE ile zenginleştirme öncesi 80 °C de 10 dakika süreyle ultrasonic banyoda ön işlenmiş örnekleri karıştırma sonrası derişime bağımlı girişim etkisi etkin biçimde giderilebilir [53].

3.2.4 Yöntemin doğruluğu ve kesinliği

Yöntemin doğruluğu ve kesinliği, örnek matrisle uyumlu serifikalı bir referans örnek olmaması nedeniyle kontrol amaçlı örneklere kalibrasyon aralığında bilinen derişim düzeylerinde standartlar eklenmiş ve ölçüm belirsizliği (genişletilmiş belirsizlik, orta düzeyde belirsizlik ve sağlamlık/doğruluk kriterleri) gün içi ve günlerarası ölçümler yürütülerek saptanmıştır. 10, 15, 20 ve 25 µg kg⁻¹ düzeylerinde standartların eklenmesi sonrası ölçüm sonuçlarından bulunan belirsizlik ve doğruluk/sağlamlığın sırayla yüzde olarak %6.4-10.4, %3.5-6.5 ve %94.5-103.5 olduğu Çizelge 3.8’ de ayrıntılı olarak görülmüştür. %95 güven sınırında bulunan kesinlik ve doğruluk verilerinin hem istatistiksel hem de kantitatif olarak kabul edilebilir olduğu görülmüştür.

Çizelge 3.8 Kesinlik, doğruluk ve genişletilmiş belirsizlik sonuçları (k: 2)

Örnek	Eklenen 5-HMF (µg kg ⁻¹)	¹ Genişletilmiş belirsizlik (U %)	² Kesinlik (BSS %)	³ Doğruluk (GK %)
Çam balı	10	10.4	6.5	103.5
Çilek reçeli	15	8.2	4.5	94.5
Üzüm pekmezi	20	6.4	3.5	101.5
Elma sirkesi	25	7.2	3.6	102.5

¹Kabul kriteri: Horwitz ve Thompson’a göre $U_{max} < 2 * \%RSD$ Horwitz fonksiyonu [47],[46]

²Kabul kriteri: % BSS <2/3 Horwitz–Thomson fonksiyonu (Horwitz, 1982) ve $\leq 100 \mu\text{g kg}^{-1}$ ve %13.6 $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ değerleri için (% BSS): %14.7

³Kabul kriteri: GK = 85–115%. CODEX kriteri: GK = $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ ve 0.1–10 mg kg⁻¹ için sırasıyla 60–%115 ve %80–110

3.2.5 Yöntemin analitik uygulaması

Geliştirilen yöntem bal, pekmez, reçel ve sirke gibi farklı gıda örneklerinin analizine uygulanmıştır. Yöntemin doğruluk ve güvenilirliği kontrol etmek için bağımsız bir karşılaştırma yöntemine paralel analizler yürütülmüştür. Aynı zamanda örneklere bilinen derişim düzeyinde standartlar da eklenmiş ve yöntemin doğruluğu ve kesinliği tekrarlı ölçümlerin sonuçları karşılaştırmalı olarak izlenmiştir. Her iki yöntemle bulunan sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olduğu ve ortalama değerlerinin birbirine yakın olduğu gözlenmiştir. Standart ekleme sonuçlarına göre her iki çözme yaklaşımı sonrası geliştirilen yöntemin doğruluk ve kesinlik açısından kantitatif olduğu görülmüştür. Ayrıntılı sonuçlar Çizelge 3.9’da açık biçimde görülebilir.

Çizelge 3.9 Gıda örneklerinde mevcut 5-HMF’ nin belirlenmesi için yapılan çalışma

Örnekler	45 °C de 15 dak süre için sırasıyla 2.0 mol L ⁻¹ HClO ₄ , ve Carrez-I and II çözeltileri (ardışık olarak, 2 mL) ile ekstraksiyon sonrası (N: 5)				40 °C de 5 dak süre için sırasıyla 0.2 mol L ⁻¹ HClO ₄ , ve Carrez-I and II çözeltileri (ardışık olarak, 2 mL) ultrasoik güçaltında ekstraksiyon sonrası (n: 5)				**Deneyisel t-değerleri	***Modifiye White yöntemi ile bulunan, mg kg ⁻¹ (N: 5)
	Eklenen, mg kg ⁻¹ 5-HMF	*Bulunan, mg kg ⁻¹ 5-HMF	BSS %	Gerikazanım %	Eklenen, mg kg ⁻¹ 5-HMF	*Bulunan, mg kg ⁻¹ 5-HMF	Bulunan %	Gerikazanım %		
Üzüm pekmezi	-	7.65±0.30	3.9	-	-	7.70±0.30	3.9	-	0.53, 0.26	7.75±0.30
	15	22.30±0.80	3.7	98.0	15	22.40±0.80	3.6	98.0		
Keçiboynuzu reçeli	-	18.05±0.70	3.9	-	-	18.10±0.70	3.9	-	0.12, 0.24	18.00±0.60
	10	27.80±1.0	3.6	97.5	10	27.70±1.0	3.6	96.0		
Nar ekşisi	-	12.60±0.50	4.0	-	-	12.65±0.50	4.0	-	0.35, 0.17	12.70±0.40
	10	22.30±0.80	3.6	97.0	10	22.20±0.80	3.6	95.5		

Kayısı reçeli	-	4.30±0.15	3.6	-	-	4.30±0.15	3.5	-	0.53, 0.53	4.35±0.15
	15	18.80±0.60	3.2	97.3	15	18.90±0.60	3.2	97.3	-	-
Çilek reçeli	-	1.15±0.04	3.5	-	-	1.05±0.04	3.8	-	1.98, 1.98	1.10±0.04
	15	15.70±0.60	3.8	98.2	15	15.60±0.60	3.8	97.5	-	-
Vişne reçeli	-	2.20±0.07	3.2	-	-	2.25±0.07	3.1	-	2.26, 1.13	2.30±0.07
	15	17.00±0.50	2.9	99.0	15	16.90±0.40	2.4	98.0	-	-
İncir reçeli	-	9.55±0.35	3.7	-	-	9.65±0.35	3.6	-	0.23, 0.23	9.60±0.35
	10	19.10±0.70	3.7	96.0	10	19.20±0.70	3.6	96.0	-	-
Çiçek balı	-	4.75±0.20	4.2	-	-	4.85±0.20	4.2	-	0.40, 0.40	4.80±0.20
	15	19.20±0.70	3.6	96.7	15	19.40±0.70	3.6	97.3	-	-
Çam balı1	-	8.60±0.30	3.5	-	-	8.65±0.30	3.5	-	0.53, 0.26	8.70±0.30
	10	18.10±0.60	3.3	95.0	10	18.20±0.60	3.3	95.5	-	-
Çam balı2	-	13.60±0.50	3.7	-	-	13.70±0.50	3.6	-	0.17, 0.17	13.65±0.40
	10	23.40±0.70	3.0	96.0	10	23.30±0.70	3.0	96.0	-	-
Üzüm sirkesi	-	3.10±0.10	3.2	-	-	3.20±0.10	3.2	-	0.79, 0.79	3.15±0.10
	15	17.70±0.60	3.4	97.7	15	17.80±0.60	3.4	97.7	-	-
Elma sirkesi	-	2.20±0.07	3.1	-	-	2.25±0.07	3.1	-	2.26, 1.13	2.30±0.07
	15	16.75±0.50	3.0	97.3	15	16.70±0.50	3.0	97.3	-	-

*Ultrasonik etkili ve etkisiz iki yaş çözme yaklaşımı ile ön işlem sonrası beştekrarlı ölçümün ortalaması ve standart sapması

**Eş örnek boyutlu bağımsız iki analizine dayanan t-F değerlerini karşılaştırmak için sırasıyla %95 güven düzeyi ve 8 serbestlik derecesi için istatistiksel t- ve F-değeri 2.31 ve 6.39 dur.

***Ultrasonik güç (300 Wate, 40 kHz) altında 40 °C de 5 dakikalık sonikasyonla ön işlenmiş örnekler için modifiye spektrofotometrik White yöntemi kullanılarak elde edilen 5 tekrarlı ölçümün ortalaması ve standart sapmasıdır.

4. SONUÇLAR

Birinci çalışmada, şelatlandırıcı olarak Cu(II) ve histamin varlığında ekstrakte edici olarak Tween 80 kullanan UA-CPE prosedürü prolin ekstraksiyonu ve ön deriştirme için optimize edilmiş ve daha sonra bal, şarap ve meyve suyu örneklerinde prolin tayini spektrofotometre ile belirlemek için uygulanmıştır. Düşük sıcaklık ve kısa ultrasonikasyon süresi, prolin ekstraksiyonuna olumlu katkıda bulunurken, santrifüjleme oranı prolin ekstraksiyonuna önemli bir katkı yapmamıştır. Yöntemin geçerliliği, doğruluk, kesinlik, doğruluk ve genişletilmiş belirsizlik çalışmaları ve SRM analizi gibi birkaç farklı analitik adımla doğrulandı. Bu yöntem basit, kullanımı kolay, hızlı, çevre dostu, girişimsiz ve düşük maliyetlidir. Örneklerin kalitesinin izlenmesinde uygun bir doğrusallık düzeyi, kabul edilebilir tespit ve tayin sınırı, iyi EF, kantitatif geri kazanım ve düşük % BSS elde edildi. Numunelerin analiz sonuçlarında gösterildiği gibi, prolin doğru ve güvenilir analizine izin veren ve kolayca ulaşılabilen basit ve etkili bir yöntem geliştirilmiştir. Bildiğimiz kadarıyla, seçilen örnek matrislerde prolin izlenmesi için UA-CPE'yi spektrofotometre ile birleştiren ilk çalışmadır. Geliştirilen analitik yöntemin performansının diğer yöntemlerle karşılaştırılması Çizelge 4.1'de gösterilmiştir. Yöntemler seçme sınırı, doğrusal çalışma aralığı, bağıl standart sapma ve iyileştirme faktörü yönünden karşılaştırılmıştır.

İkinci çalışmada ise, ekstrakte edilebilir hidrofobik türev ürün elde etmek için fenosafranin ve SDS varlığında ekstrakte edici olarak Triton X-114 kullanan UA-CPE yöntemi bal gibi gıda ürünlerinin kalite kontrolünde negatif kalite kontrol indikatörü olan 5-HMF'nin ekstraksiyonu ve ön deriştirilmesi için optimize edilmiş ve daha sonra bal, pekmez, reçel ve sirke örneklerinde tayini spektrofotometre ile belirlemek için uygulanmıştır. Ultrasonik etki, seyreltik asitle çözme koşullarında 5-HMF ekstraksiyonuna olumlu katkı sağlarken, santrifüjleme hızı 5-HMF ekstraksiyonuna önemli bir katkı yapmamıştır. Yöntemin geçerliliği, doğruluk, kesinlik ve genişletilmiş belirsizlik çalışmaları ve matriks uyumlu bir SRM olmaması nedeniyle kalibrasyon aralığında standart ekleme-gerikazanım çalışmaları gibi birkaç farklı analitik adımla doğrulanmıştır. Bu yöntem basit, kullanımı kolay, hızlı, çevre dostu, girişimsiz ve düşük maliyetlidir. Örneklerin kalite kontrolünün izlenmesinde uygun bir doğrusal çalışma aralığı, kabul edilebilir tespit ve tayin sınırı, iyi duyarlık iyileştirmesi, kantitatif geri kazanım ve düşük % BSS elde edilmiştir. Örneklerin analiz sonuçlarında

gösterildiği gibi, 5-HMF'nin doğru ve güvenilir analizine izin veren ve kolayca erişilebilen basit ve etkili bir yöntem geliştirilmiştir. Geliştirilen analitik yöntemin performansının diğer yöntemlerle karşılaştırılması Çizelge 4.2'de gösterilmiştir. Yöntemler seçme sınırı, doğrusal çalışma aralđı, bağıl standart sapma ve duyarlık iyileştirme faktörü yönünden karşılaştırılmıştır.



Çizelge 4.1 Yöntemin analitik özelliklerinin diğer analitik yöntemlerle karşılaştırılması

Örnek matris	Türev reaktif	Ekstraksiyon yöntemi	Tayin tekniği	Çalışma aralığı ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Seçme sınırı ($\mu\text{g L}^{-1}$)	BSS (%), GK (%)	PF, ekstraksiyon zamanı	Kaynaklar
Bal ve Arı Sütü	<i>o</i> -Phthalaldehyde (OPA) and 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl).	-	LC-UV	-	30	<1.8, ≥ 81.3	-	[53]
Şarap örnekleri	Tris(2,2-bipyridyl)ruthenium(II)	-	FIA-chemiluminescence Fluorescence	0-5756.5	1.15	1.0 (460.5 $\mu\text{g L}^{-1}$, n: 5)	20, 60 h ⁻¹	[54]
Arı sütü	6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimide carbamate	UAE	UPLC	290-4266.0	20.9	0.7-1.3, 92.7-102.4	≥ 35 min	[55]
Şarap örnekleri	<i>o</i> -phthalaldehyde (OPA)-N-acetyl-L-cysteine	-	Spectrofluorimetry based microplate	46.05-5756.5	14.97	2.80,	-	[56]

Üzüm suyu, farklı şarap örnekleri	Fluorenylmethoxy carbonyl chloride (FMOC)	-	HPLC-DAD	0-5000	-	3.1-4.8, 96.4-102.4	-	[57]
Monofloral honeys	-	SPE	HPLC-ECD/Chemometrics	34-6800	6.0	1.28-3.23, 95.3	-, -	[58]
Meyve, meyve suyu örnekleri	Ninhydrin	-	Spectrophotometry	2500-15000	30	, 98.3-17.7, 2.0-5.9	25 min	[59]
Bal örnekleri	Benzoate-CTAB as background electrolyte	-	CE-UV	2500-25000	720	98-102, 0.92-5.43	15 min	[60]
Nar suları, elma suları	FITC-SDBS-β-CD	-	MEKC-LIF	3.45-103.6	0.0976	85-104, 2.68	30 min	[61]
Gıda örnekleri	4-Chloro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-Cl)	-	CE-UV	2500-40000	320	85-108, 0.72-5.68	10-80 min	[62]
Bal örnekleri	7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-F)	-	HPLC-FL	150-100000	60	≤4.0, ≥90%	10 min	[63]

Bal, şarap ve meyve suyu örnekleri	Cu(II)/Histamine/Fluorescein	UAE-CPE	Spectrophotometry	15-600	5.7	2.5, ≥ 91.7	187.5, 15 min	Meycut çalışma
------------------------------------	------------------------------	---------	-------------------	--------	-----	------------------	---------------	----------------

Çizelge 4.2 Yöntemin analitik özelliklerinin diğer analitik yöntemlerle karşılaştırılması

Matriks tipi	Örneğin adı	Tayin yöntemi	Çalışma aralığı	Seçme sınırı	Derişim, $\mu\text{g g}^{-1}$		Yayınlanmış veriler, $\mu\text{g g}^{-1}$	Kaynaklar
					Ortalama (N: 3)	BSS%		
Bal	Multi-floral A	RP-HPLC	0.13-100 mg L^{-1}	0.04 mg L^{-1}	38.3	3.0	0.8-138	[64],[65],[66]
	Multi-floral B				4.6	10.0		
Tahıl ürünleri	Bal peteği	LC	10-150 $\mu\text{g g}^{-1}$	0.03 $\mu\text{g g}^{-1}$	24.7	3.0	4-193	[67]
	Mısır gevreği				46.8	4.0		
İçecekler	Alkollü/alkol süz	HPLC/PA D	0.1-100 mg L^{-1}	3 $\mu\text{g L}^{-1}$ at 280 nm	8.5	4.0	4-22, 1-3	[68],[69]
					6.3	7.0		
Bisküvi	Ballı bisküvi	GC-MS	25-700 $\mu\text{g kg}^{-1}$	6 $\mu\text{g kg}^{-1}$	7.0	5.0	-	
Reçel	Erik				12.7	2.0		
Bal ve sıvı yağlar	Bal	MEKC	1-25 mg L^{-1}	0.43 mg L^{-1}	3-25	0.60-4.05	11-1145	[70]

Gıdalar	Bal, meyve suyu	MEKC	2.5–250 mg kg ⁻¹	0.7 mg kg ⁻¹	40	3.0-10.2, 6.9-11.8	3.3-42.3, 2.9-10.6	[71]
Isıl işlenmiş gıdalar, şeker pekmezi	Bal	HS-SPM-HPLC	-	7 µg L ⁻¹ at 280 nm	200 µg L ⁻¹	1.4	66.1-179	[72]
Bal	Farklı botanik orijinli bal	RP-HPLC	0.01-100 µg L ⁻¹	3 µg L ⁻¹ at 284 nm	-	0.2-1.47 % as CV%	5.90-155.8	[73]
İçecekler	Kola ve yumuşak içecekler	SPE-AMTC-PAD	1-100 mg L ⁻¹	0.1 mg L ⁻¹	1.0 mg L ⁻¹	4.68	1.07-4.47	[74]
Gıdalar	Bebek maması, bira ve sirke	SPME-GC-MS	0.1-50 mg L ⁻¹	0.023 mg L ⁻¹	0.23 mg L ⁻¹	1.3-4.74	0.91-46.40, 0.023 -27.87	[75]
İçecekler	Meyve suları	VALLME-HPLC-DAD	1-5000 µg L ⁻¹	0.40-0.45 µg L ⁻¹	2-5000 µg L ⁻¹	1.5-3.2	0.71-28	[76]

Gıdalar	Kızartılmış ürünler	HPLC-DAD-Full factorial CCD	0.8-56 mg L ⁻¹	7.6 µg kg ⁻¹	-	4.1-15.95	1.25	[77]
Bal/Alkollü ve alkolsüz içecekler	Farklı ballar, alkoll-alkolsüz içecekler	UA-CPE-Spectrophotometry	6.5-275 µg L ⁻¹	1.96 µg L ⁻¹	25,75 and 150 µg L ⁻¹	2.8-5.3, 3.8-5.6	0.903-1.555, 0.129-0.758 and 0.206-0.840	[78]
Gıdalar	Bal, reçel, pekmez, ve sirke örnekleri	UA-CPE-Spectrophotometry	2-100, 2-200 µg L ⁻¹	0.53, 0.75 µg L ⁻¹	10, 25 and 75 µg L ⁻¹	2.6-3.7, 2.5-3.8	0.91-13.80	Mevcut çalışma

KAYNAKLAR

- [1] **Anonim. 2010.** TS 3036 *Bal Standartı* 2010.
- [2] **Anonim,(2013).** Bal Tebliği. Türk Gıda Kodeksi. 27.07.2012 tarihli Tebliğ No:2012/58 ve 28366 sayılı *Resmi Gazete*, (2013).
- [3] **KONAK, F.** (2013) Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Arıcılık Araştırma İstasyonu Müdürlüğü, 5,2146 -2720.
- [4] **Başoğlu, F. N.** (1996) K. Sorkun, M. Löker, C. Doğan, H. Wetherilt, Saf ve sahte balların ayırt edilmesinde fiziksel, kimyasal ve palinolojik kriterlerin saptanması. *Gıda Dergisi*,21(2).
- [5] **Soysal, M., Kekeçoğlu, E.K., Gürcan, M.İ.** (2007) "Türkiye Arı Yetiştiriciliğinin Bal Üretimi Bakımından Durumu." *JOTAF/Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi* 42,27-236.
- [6] **Guler, A., Bakan, A., Nisbet, C., Yavuz, O.** (2007) Determination of important biochemical properties of honey to discriminate pure and adulterated honey with sucrose (*Saccharum officinarum* L.) syrup. *Food chemistry*, 105(3),1119-1125.
- [7] **Helrich, K.C.** (1990) Official methods of Analysis of the AOAC. *Association of Official Analytical Chemists Inc..* 2 (1990) Ed. 15.
- [8] **Rybak, H., Achremowicz, B.** (1986). Changes in chemical composition of natural adultrade with inverted by bees sucrose honeys, during storage.
- [9] **Bal Tebliği**, (2005). www.gkgm.gov.tr/mevzuat/kodeks/2005-49.html; Erişim Tarihi: 4 Eylül 2011.
- [10] **Fallico, B., Zappala, M., Arena, E. A.** (2004) Verzera, Effects of conditioning on HMF content in unifloral honeys. *Food Chememistry*. 85,305–313.
- [11] **Khalil, M.I., Sulaiman, S.A., Gan, S.H.** (2010) High 5- hydroxymethylfurfural concentrations are found in Malaysian honey samples stored for more than one year. *Food Chem Toxicol*. 48,2388–2392.

- [12] **Turkmen, N., Sari, F., Poyrazoglu, E.S., Velioglu, Y.S.** (2006) Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey. *Food Chemistry*. 95,653–657.
- [13] **Bath, K.P., Singh, N.A.** (1999) Comparison between *Helianthus annuus* and *Eucalyptus lanceolatus* honey. *Food Chemistry*. 67,389-397.
- [14] **Nombre, I., Schweitzer, P., Boussim, J.I., Rasolodimby, J.M.** (2010) Impacts of storage conditions on physicochemical characteristics of honey samples from Burkina Faso. *Afr J Food Sci*. 4(7),458 – 463.
- [15] **Codex Alimentarius Commission Standards** (2001) Draft revised standart for honey (at step 10 of the Codex procedure). Alinorm 01/25 19, 26; Erişim Tarihi: 4 Eylül 2011.
- [16] **Xu, X. B., Liu, D.B., Yu, S.J., Yu P., Zhao, Z.G.** (2015) Separation and determination of 4-methylimidazole, 2-methylimidazole and 5-hydroxymethylfurfural in beverages by amino trap column coupled with pulsed amperometric detection. *Food Chemistry*. 169,224–229.
- [17] **Tsai, S.W., Kao, K.Y.** (2012) Determination of furfural in beers, vinegars and infant formulas by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 92,76-84.
- [18] **Abu-Bakar, N.B., Makahleh, A., Saad, B.** (2014) Vortex-assisted liquid–liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography for the determination of furfurals and patulin in fruit juices. *Talanta*. 120,47–54.
- [19] **Gürkan, R., Altunay, N.** (2015) Quantification of 5-hydroxymethylfurfural in honey samples and acidic beverages using spectrophotometry coupled with ultrasonic-assisted cloud point extraction. *Journal of Food Composition and Analysis*. 42,141-151.
- [20] **Teixidó, 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*. 1135,85–90.

- [21] **Tomasini, D., Sampaio, M.R.F., Caldas, S.S., Buffon, J.G., Fábio, A.D., Ednei, G.P.** (2012) Simultaneous determination of pesticides and 5-hydroxymethylfurfural in honey by the modified QuEChERS method and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta*. 99,380–386.
- [22] **Teixidó, E., Núñez, O., Santos, F.J., Galceran, M.T.**(2011) 5-Hydroxymethylfurfural content in foodstuffs determined by micellar electrokinetic chromatography. *Food Chemistry*. 126, 1902–1908.
- [23] **Hie-Joon, K., Michelle, R.** (2011) (1992). Determination of 5-hydroxymethylfurfural by ion-exclusion chromatography with UV detection. *Journal of Chromatography A*. 593,153–156.
- [24] **Altunay, N., Gürkan, R.** (2015) A new cloud point extraction procedure for determination of inorganic antimony species in beverages and biological samples by flame atomic absorption spectrometry. *Food chemistry*. 175,507-515.
- [25] **Gürkan, R., Kır, U., Altunay, N.** (2015) Development of a simple, sensitive and inexpensive ion-pairing cloud point extraction approach for the determination of trace inorganic arsenic species in spring water, beverage and rice samples by UV–Vis spectrophotometry. *Food chemistry*. 180,32-41.
- [26] **Kahraman. S.D.** (2012). Süzme ballarda depolama sıcaklığının HMF değeri ve diastaz aktivitesi üzerine etkisi. *Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü (Doktora Tezi)* . 32s, Ankara.
- [27] **Anonim** (2016) Türkiye arı yetiştiricileri birliği.
- [28] **Kahraman. S.D.** (2012). Süzme ballarda depolama sıcaklığının HMF değeri ve diastaz aktivitesi üzerine etkisi. *Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü (Doktora Tezi)* . 30s, Ankara.
- [29] **Kahraman. S.D.** (2012). Süzme ballarda depolama sıcaklığının HMF değeri ve diastaz aktivitesi üzerine etkisi. *Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü (Doktora Tezi)* . 15s, Ankara.
- [30] **Uzunlu, S. Ve Herken E.N.**(2006) Bisküvilerde HMF ve akrilamid oluşumunun önemi *Pamukkale Üniversitesi, Denizli*.

- [31] **El-Shahawi, M.S., Bashammakh, A.S., Bahaffi, S.O.** (2007). Chemical speciation and recovery of gold (I, III) from wastewater and silver by liquid-liquid extraction with the ion-pair reagent amiloride mono hydrochloride and AAS determination. *Talanta*, 72(4), 1494-1499.
- [32] **Camel, V.** (2003) solid phase extraction of trace elements. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 58, 1177-1233).
- [33] **Göçebe, M.** (2007). Hipertrofi hastalarda kan prolidaz aktiviteleri. *Harran üniversitesi sağlık bilimleri enstitüsü biyokimya anabilim dalı*, (Yüksek Lisans Tezi). 14s, Şanlıurfa.
- [34] **Baytak, S., Türker, A.R.** (2005). The use of *Agrobacterium tumefaciens* immobilized on Amberlite XAD-4 as a new biosorbent for the column preconcentration of iron(III), cobalt(II), manganese(II) and chromium(III). *Talanta*, 65-4, 938-945.
- [35] **Altunay, N.** (2015). Ultrasonik destekli bulutlanma noktası ekstraksiyonu yardımıyla bazı gıda örneklerinde sülfitin (serbest sülfid, tersinir organik bağlı sülfid ve toplam sülfid) zenginleştirilmesi ve spektroskopik olarak (UV-GÖR, FAAS) tayini. *Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü* (Doktora tezi). 12s, Sivas.
- [36] **Gu, Tiren. ve Galera, P. A.** (1999). "The effect of different alcohols and other polar organic additives on the cloud point of Triton X – 100 in Water ". *Colloids and Surfaces* 147: 365 – 370.
- [37] **Evangelos, K., Paleologos, Dimosthenis L. Giokas, Miltiades I. ve Karayannis,** (2005). "Micelle-mediated separation and cloud-point extraction", *Trends in Analytical Chemistry*, 24: 426 – 436.
- [38]. <https://prezi.com/z5-j1dj7now6/bulutlanma-noktasi-ekstraksiyon-metodu-uygulama-alanlari/>
- [39] **Evangelos, K.P., Dimosthenis, L.G., Miltiades, K.I.** (2005). Micelle-mediated separation and cloud-point extraction, *Trends in Analytical Chemistry*, 24: 426 - 436.

- [40] **Zorida, S.F., Carolina, P.S., Cristina, M.S., Jose, J.S.R.** (2004). "The use of micellar systems in the extraction and pre-concentration of organic pollutants in environmental samples", *Trends in Analytical Chemistry*, 23: 479- 489.
- [41] **Willie, L.H., Pramauro E.** (1993). "A Critical Review of Surfactant – Mediated Phase Separations (Cloud-Point Extractions): Theory and Applications", *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 24 (2) :133 -177.
- [42] **Yılmaz, Ö.** (2012). Çevresel su örneklerinde spektroskopik (FAAS) siyanür tayini için bulutlanma noktası ekstraksiyonu (CPE) ayırma ve zenginleştirme yöntemi. *Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü* (Yüksek Lisans Tezi). 29s, Sivas.
- [43] **Torreggiani, A., Tamba, M., Bonora, S., Fini, G.** (2003). Raman and IR study on copper binding of histamine. *Biopolymers*, 72(4), 290-298.
- [44] **Batistela, V. R., Costa Cedran, J., Oliveira, H. P. M., Scarminio, I. S., Ueno, L. T., Hora Machado, A. E., Hioka, N.** (2010). Protolytic fluorescein species evaluated using chemometry and DFT studies. *Dyes and Pigments*, 86(1), 15-24.
- [45] **Signorelli, S., Coitino, E.L., Borsani, O., Jorge Monza, J.** (2014) Molecular mechanisms for the reaction between •OH radicals and proline: Insights on the role as reactive oxygen species scavenger in plant stress. *Journal of Physical Chemistry. B*, 118, 37–47.
- [46] **Thompson, M., Ellison, S. L., Wood, R.** (2002). Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 74(5), 835-855.
- [47] **Horwitz, W.** (1982). Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs. *Analytical Chemistry*, 54(1), 67A-76A.
- [48] **Maroto, A., Boqué, R., Riu, J., Ruisánchez, I., Òdena, M.** (2005). Uncertainty in aflatoxin B1 analysis using information from proficiency tests. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382(7), 1562-1566.
- [49] **Joint FAO/WHO** (1974). Expert Committee on Food Additives Toxicological Evaluation of Certain Food Additives with a Review of General Principle and of Specifications. 17th Report. Food and Agriculture Organization. Rome.

- [50] **Li, Y., Zhou, J., Xue, X., Wu, L., Chen, L., Zhang, J., Yang, S.** (2015) Fluorometric determination of proline in honey by high-performance liquid chromatography after pre-column derivatization with 7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-F). *Analytical Methods*, 7, 7625-7630.
- [51] **Hermosin, I., Chicon, R.M., Cabezudo, M.D.** (2003) Free amino acid composition and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 83(2), 263-268.
- [52] **Staliks, C.D.** (2002). Micelle –mediated extraction as a tool for separation and preconcentration in metal analysis, *Trends in Analytical Chemistry*,21(1),343-350).
- [53] **Saito, K., Kohama, J., Sakamoto, Y., Iwasaki, Y., Ito, R., Horie, M., Nakazawa, H.**(2011). Determination of proline enantiomers in honey and royal jelly by LC-UV. *Journal of AOAC International*, 94(2), 482–486.
- [54] **Costin, J. W., Barnett, N. W., Lewis, S. W.** (2004). Determination of proline in wine using flow injection analysis with tris (2,2'-bipyridyl) ruthenium(II) chemiluminescence detection. *Talanta*, 64(4), 894–898.
- [55] **Liming, W., Jinhui, Z., Xiaofeng, X., Yi, L., Jing, Z.** (2009). Fast determination of 26 amino acids and their content changes in royal jelly during storage using ultra-performance liquid chromatography. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, 242–249.
- [56] **Robert-Peillard, F., Boudenne, J. L., Coulomb, B.** (2014). Development of a simple fluorescence-based microplate method for the high-throughput analysis of proline in wine samples. *Food Chemistry*, 150, 274–279.
- [57] **Long, D., Wilkinson, K. L., Poole, K., Taylor, D. K., Warren, T., Astorga, A. M., Jiranek, V.** (2012). Rapid method for proline determination in grape juice and wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(17), 4259–4264.
- [58] **Zhao, J., Dua, X., Cheng, N., Chen, L., Xue, X., Zhao, J., Cao, W.** (2016). Identification of monofloral honeys using HPLC–ECD and chemometrics. *Food Chemistry*, 194, 167–174.
- [59] **Rienth, M., Romieu, C., Gregan, R., Walsh, C., Torregrosa, L., Kelly, M. T.** (2014). Validation and application of an improved method for the rapid

determination of proline in grape berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(15), 3384–3389.

- [60] **Dominguez, M. A., Jacksén, J., Emmer, Å., Centurión, M. E.** (2016). Capillary electrophoresis method for the simultaneous determination of carbohydrates and proline in honey samples. *Microchemical Journal*, 129, 1–4.
- [60] **Tezcan, F., Uzaşçı, S., Uyar, G., Öztekin, N., Erim, F. B.** (2013). Determination of amino acids in pomegranate juices and fingerprint for adulteration with apple juices. *Food Chemistry*, 141(2), 1187–1191.
- [62] **Omar, M. M. A., Elbashir, A. A., Schmitz, O. J.** (2017). Capillary electrophoresis method with UV-detection for analysis of free amino acids concentrations in food. *Food Chemistry*, 214, 300–307.
- [63] **Li, Y., Zhou, J., Xue, X., Wu, L., Chen, L., Zhang, J., Yang, S.** (2015). Fluorometric determination of proline in honey by high-performance liquid chromatography after pre-column derivatization with 7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-F). *Analytical Methods*, 7, 7625–7630.
- [64] **Nozal, M.J., Bernal, J.L., Toribio, L., Jimenez, J.J., Martin, M.T.** (2001). High-performance liquid chromatographic determination of methyl anthranilate, hydroxymethylfurfural and related compounds in honey. *Journal of Chromatography A* 917(1-2), 95-103.
- [65] **Costa, L.S.M., Albuquerque, M.L.S., Trugo, L.C., Quinteiro, L.M.C., Barth, O.M., Ribeiro, M., De Maria C.A.B.** (1999). Determination of non-volatile compounds of different botanical origin Brazilian honeys. *Food Chemistry* 65(3), 347-352.
- [66] **Spano, N., Casula, L., Panzanelli, A., Pilo, M.I., Piu, P.C., Scanu, R., Tapparo, A., Sanna, G.** (2006). An RP-HPLC determination of 5-hydroxymethylfurfural in honey: The case of strawberry tree honey. *Talanta* 68(4), 1390-1395.
- [67] **Garcia-Villanova, B., Guerra-Hernandez, E., Martinez-Gomez, E., Montilla, J.** (1993). Liquid chromatography for the determination of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde in breakfast cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41, 1254–1255.

- [68] **Yuan, J.P., Chen, F.** (1998). Separation and identification of furanic compounds in fruit juices and drinks by high-performance liquid chromatography photodiode array detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46, 1286-1291.
- [69] **Teixidó, 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, 85–90.
- [70] **Wong, Y.F., Makahleh, A., Al Azzam, K.M., Yahaya, N., Saad, B., Siti Amrah, S.** (2012). Micellar electrokinetic chromatography method for the simultaneous determination of furanic compounds in honey and vegetable oils. *Talanta* 97, 23–31.
- [71] **E. Teixidó, O. Núñez, F.J. Santos, M.T. Galceran.**(2011) 5-Hydroxymethylfurfural content in foodstuffs determined by micellar electrokinetic chromatography. *Food Chemistry*. 126, 1902–1908.
- [72] **Edris, A.E., Murkovic, M., Siegmund, B.** (2007). 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*. 104, 1310–1314.
- [73] **Spano, N., Ciulu, M., Floris, I., Panzanelli, A., Pilo, M.I., Piu, P.C., Salis, S., Sanna, G.** (2009). A direct RP-HPLC method for the determination of furanic aldehydes and acids in honey. *Talanta* 78 (1), 310–314.
- [74] **Xu, X.B., Liu, D.B., Yu, S.J., Yu, P., Zhao, Z.G.** (2015) Separation and determination of 4-methylimidazole, 2-methylimidazole and 5-hydroxymethylfurfural in beverages by amino trap column coupled with pulsed amperometric detection. *Food Chemistry*. 169,224–229.
- [75] **Tsai, S.W., Kao, K.Y.** (2012) Determination of furfural in beers, vinegars and infant formulas by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 92,76-84.

- [76] **Abu-Bakar, N.B., Makahleh, A., Saad, B.** (2014). Vortex-assisted liquid–liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography for the determination of furfurals and patulin in fruit juices. *Talanta*. 120, 47–54.
- [77] **Pérez-Palacios, T., Petisca, C., Melo, A., Ferreira., I.M.P.L.V.O.** (2013). Quantification of 5-Hydroxymethylfurfural in Coated Deep-Fried Products: Optimization of the Extraction Procedure by Using Statistical Design. *Food Analytical Methods* 6(1), 10-16.
- [78] **Gürkan, R., Altunay, N.** (2015) Quantification of 5-hydroxymethylfurfural in honey samples and acidic beverages using spectrophotometry coupled with ultrasonic-assisted cloud point extraction. *Journal of Food Composition and Analysis*. 42,141-151.

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı: Semahat DAĞDEVİREN BAŞ
Doğum Yeri ve Tarihi: Zara / 03.06.1988
Medeni Hali: Evli
Yabancı Dil: İngilizce
İletişim Adresi: Kılavuz Mah. 33. Sk. No:3 Öztürk Apt. No:10
E-posta Adresi: semahatzara@hotmail.com

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise: İbrahim Turhan Lisesi, 2004
Lisans: Cumhuriyet Üniversitesi, 2012
İletişim: 0539 451 8896

Yayınlar

- 1- Dağdeviren S, Altunay N, Sayman, Gürkan R, "A new method of UA-CPE coupled with spectrophotometry for the faster and cost effective detection of proline in fruit juice, honey, and wine. Food Chemistry, 2018, 255, 31-40.