

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI
-KİM-YL-2007-0003**

**BALLARIN UÇUCU BİLEŞENLERİNİN GAZ
KROMATOĞRAFI – KÜTLE SPEKTROMETRİ İLE
BELİRLENMESİ**

Mert SOYSAL

**DANIŞMAN
Prof. Dr. A. Ersin KARAGÖZLER**

AYDIN – 2007

İntihal (Aşırma) Beyan Sayfası

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan, ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Adı Soyadı : Mert SOYSAL

İmza :

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

**BALLARIN UÇUCU BİLEŞENLERİNİN GAZ KROMATOĞRAFI-KÜTLE
SPEKTROMETRİ İLE BELİRLENMESİ**

Mert SOYSAL

Adnan Menderes Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. A. Ersin KARAGÖZLER

Bal çok önemli bir besin maddesidir. Ayrıca, antiseptik/antimikrobiyal özellikleri nedeniyle çok eski tarihlerden beri tedavi amacıyla da kullanılan bir maddedir. Bal esasen iki monosakkaritin yoğunlaşmış bir karışımı olmakla birlikte çeşitli vitaminler, enzimler, mineral tuzlar ile bala rengini, tadını ve kokusunu veren, büyük bir kısmı uçucu nitelikteki, çeşitli organik sınıflara ait bileşenler içermektedir.

Bal, aynı zamanda ticari bir maldır. Her alanda standartlaşmanın önerildiği/yapıldığı günümüzün dünyasında balın özellikleri için de standartlar getirilmiştir. Bu standartlarda balın çeşitli fizikokimyasal özellik/büyüklikleri tanımlanmaktadır. Ancak son yıllarda, az sayıdaki bu fizikokimyasal özelliğin yanında balın bitkisel ve coğrafik orijininin belirtilmesi için de Avrupa Birliği Komisyonlarında kuvvetli öneriler yapılmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, Aydın-Denizli-Muğla illerinde üretilen, bitki orijini değişik ballardaki uçucu bileşenleri analizleyerek balın bitkisel orijinini karakterize edebilecek olan ve böylece bir bal türünün diğer türlerden ayrılmasını sağlayan “işaretleyici” niteliğindeki bileşenleri ortaya çıkarmaktır.

Bitkisel orijini farklı dokuz bal örneğinin ultrason yardımıyla organik ekstraktlarındaki uçucu bileşenler gaz kromatografi-kütle spektrometri tekniğiyle analizlenmiştir. Kromatografik alıkonma süreleri yardımıyla hesaplanan Kovat indisleri ve kütle spektrometrenin spektral veri bankası yardımıyla, çok kesin olmayan bir biçimde olsa dahi, bu bileşenlerin yapıları aydınlatılmış, çeşitli görsel metotlar kullanılarak farklı türdeki balları karakterize eden bileşiklerin neler olabileceği tartışılmıştır.

2007, 72 sayfa**Anahtar sözcükler:**

Ultrasonik ekstraksiyon, kromatogram, spektrum

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

**IDENTIFICATION OF VOLATILE COMPOUNDS IN HONEY SAMPLES
BY GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY**

Mert SOYSAL

Adnan Menderes University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. A. Ersin KARAGÖZLER

Honey is a widely appreciated food. Additionally, it has found intense medicinal use due to its antiseptic/antimicrobial activities since ancient times. Although honey is essentially a concentrated mixture of two monosaccharides it also includes vitamins, enzymes, mineral salts and compounds from various organic classes with volatile properties that largely determines the taste, color and aroma of honeys.

Honey is also an economical commodity. In today's world, as standardization is a common practice for every production/products, there are standards for the honey production as well. These standards mainly regulate physicochemical properties/measures. However in recent years, determination of botanical and geographic origin of honey is strongly recommended by European Union Commission.

The aim of this work was to identify the "markers" that characterize the botanical origin of honey and differentiate honey samples by analyzing the volatile compounds from various origins. In this study, volatile components of honey samples from nine different plant origins were extracted by ultrasound assisted organic solvent extraction and analyzed using gas chromatography-mass spectrometry technique.

By the help of Kovat's indexes calculated from chromatographic retention times and spectral data bank of mass spectrometer, the structure of these volatile components were elucidated, although tentatively. Compounds that characterize the origin of honey samples are discussed using various visual methods.

2007, 72 pages**Key Words:**

Ultrason assisted extraction, chromatogram, spectrum

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans öğrenimim boyunca her türlü olanak ve imkanı sağlayan, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, bu tezin konu seçiminden yazımına kadar her aşamada yoğun emeğini ve desteğini gördüğüm sevgili hocam Prof. Dr. A. Ersin KARAGÖZLER'e,

Laboratuvarlarında, çalışmamı sağlayan Kimya Bölüm Başkanlığı'na ve A.D.Ü Fen – Edebiyat Fakültesi Dekanlığı'na,

Laboratuvar çalışmaları sırasında yardımlarını ve desteklerini kesmeyen arkadaşlarım Kimya Anabilim Dalı DOKTORA öğrencileri Arş. Gör. Mihrican ERDEM'e ve Arş. Gör. Fatih Alpay VURAN'a, yüksek lisans öğrencisi ve eşim S. Ebru SOYSAL'a

Çalışmamı FEF – 06008 nolu proje ile destekleyen Adnan Menderes Üniversitesi Rektörlüğü'ne,

Gaz kromatografi – kütle spektrometri cihazının kullanımı konusunda desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü öğretim üyesi Prof. Dr. Tamerkan ÖZGEN ve Arş. Gör. Murat ERDOĞAN'a, Adnan Menderes Üniversitesi öğretim üyeleri Doç. Dr. Cafer TURGUT'a , Yrd. Doç. Dr. M. Emin GÜNAY'a

Adnan Menderes Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarı çalışanlarına,

Çalışmalarım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve emeklerinin karşılığını asla ödeyemeyeceğim ailem, eşim ve dostlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Terpen serisinde biyosentetik ilişkiler	7
Şekil 2.2 Çeşitli fenolik madde sınıfları arasında biyosentetik ilişkiler.....	11
Şekil 4.1 Çam balının GC-MS cihazından alınmış bir kromotogramı.....	40
Şekil 4.2 Kekik balının GC-MS cihazından alınmış bir kromotogramı	41
Şekil 4.3 Portakal balının GC-MS cihazından alınmış bir kromotogramı.....	42
Şekil 4.4 Lavanta balının GC-MS cihazından alınmış bir kromotogramı	43
Şekil 4.5 Keçiboynuzu balının GC-MS cihazından alınmış bir kromotogramı	44
Şekil 4.6 Okaliptüs balının GC-MS cihazından alınmış bir kromotogramı.....	45
Şekil 4.7 Püren balının GC-MS cihazından alınmış bir kromotogramı.....	46
Şekil 4.8 Hayıt balının GC-MS cihazından alınmış bir kromotogramı	47
Şekil 4.9 Adaçayı balının GC-MS cihazından alınmış bir kromotogramı.....	48
Şekil 4.10 C ₁₀ -C ₁₆ alifatik hidrokarbonun GC-MS cihazından alınmış bir kromotogramı.....	49
Şekil 4.11 C ₁₈ -C ₂₄ alifatik hidrokarbonun GC-MS cihazından alınmış bir kromotogramı.....	50
Şekil 4.12 C ₂₂ -C ₃₂ alifatik hidrokarbonun GC-MS cihazından alınmış bir kromotogramı.....	51
Şekil 5.1 Kovat indisinin hesaplanmasını anlatan örnek kromotogram.....	54
Şekil 5.2 Fizikokimyasal büyüklüklere göre gruplandırma	63

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 2.1 Terpen alt sınıfları.....	8
Tablo 2.2 Bitkilerdeki alkoloitler ve azot içeren diğer bileşikler.....	10
Tablo 2.3 Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması.....	12
Tablo 2.4 Üç farklı ekstraksiyon işleminin avantaj ve dezavantajları.....	15
Tablo 2.5 Balın bileşimini oluşturan maddeler.....	24
Tablo 3.1 Deneyleerde kullanılan kimyasallar.....	31
Tablo 3.2 Deneyleerde kullanılan cihazlar.....	32
Tablo 3.3 Baldaki diastaz hesaplanmasında kullanılan çözeltilerin hazırlanışı.....	35
Tablo 3.4 Gaz kromatografi-Kütle spektrometre cihazının sıcaklık koşulları.....	37
Tablo 4.1 Bal örneklerinden elde edilen spektrum sayıları.....	38
Tablo 4.2 Diastaz ve Hidroksimetil furfurol deney sonuçları.....	52
Tablo 5.1 Kovat indisinin hesaplanmasını anlatan örnek kromatogram.....	54
Tablo 5.2 Bal örneklerine ait kromatogramlardaki piklerin alıkonma süreleri, Kovat indisleri, bileşiğin bulunduğu balın türü ve bileşiğin adı/yapısı ..	55
Tablo 5.3 Balların bazı alıkonma zamanlarına karşılık gelen pik alanları.....	58
Tablo 5.4 Balın cinsine göre örtüşen pik sayısı.....	61
Tablo 5.5 Balın orijinini tahmin etmek için işaretleyici bileşiklerin belirlenmesi.	65

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	i
İNTİHAL BEYAN SAYFASI	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
TABLolar DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	5
2.1. Bitki Kimyasalları	5
2.1.1. Bitki Kimyasallarının Sınıflandırılması.....	6
2.1.1.1. Terpenler.....	6
2.1.1.2. Alkoloitler	8
2.1.1.3. Fenolik Bileşikler.....	10
2.1.2. Bitki Pigmentleri ve Kokuları.....	12
2.2. Uçucu Bileşenlerin İzolasyonu ve Analizi	13
2.2.1. Ekstraksiyon Teknikleri	13
2.2.2. Ayırma ve Saflandırma Teknikleri	16
2.2.3. Baldaki Uçucu Bileşenlerin İzolasyonu	17
2.3. Gaz Kromatografisi – Kütle Spektrometresi.....	20
2.3.1. Kütle Spektrometresi.....	21
2.3.2. Organik Kütle Spektrometresi için İyon Kaynakları.....	21
2.3.3. Kütle Analizörleri	22
2.3.4. İyon Deteksiyonu ve Kayıt	22
2.3.5. Kompüterize Kütle Spektrometreleri	22
2.4. Bal ve Analizi	23
2.4.1. Balın Tanımı	23
2.4.2. Balın Sınıflandırılması.....	23
2.4.3. Balın Bileşimi.....	24
2.4.4. Balın Bileşimini Oluşturan Maddeler	25
2.4.5. Balın Fiziksel Özellikleri	26

2.4.6. Balın Kimyasal Özellikleri	27
2.4.7. Bal Standardı.....	28
2.4.8. Bal Analizleri.....	29
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	31
3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar	31
3.2. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar	32
3.3. İşlemler.....	33
3.3.1. Çözeltilerin Hazırlanması.....	33
3.4. Konvansiyonel Bal Deneyleri	34
3.5. Baldaki Uçucu Bileşenlerin Analizi	36
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	38
4.1. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi Sonuçları.....	38
4.2. Baldaki Klasik Analizler	52
5. SONUÇ ve TARTIŞMA	53
5.1. GC-MS Sonuçları.....	53
5.2. Tartışma	61
5.3. Öneriler	68
KAYNAKLAR	70
ÖZGEÇMİŞ.....	72

1. GİRİŞ

Bal, bal arısı tarafından çiçeklerden ve meyve tomurcuklarından yutulan nektarın arı tarafından kimyasal değişime uğratılmasıyla oluşan çok önemli ve faydalı bir besindir.

Balın rengini, balda bulunan şekerlerin cins ve miktarlarıyla bu miktarlar arasındaki oranları, balın tadını ve kokusunu, büyük ölçüde balın toplandığı çiçeklerin cinsi belirler.

T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı tarafından 17.12.2005 tarihli 26026 sayılı Resmi Gazete yayımlanarak yürürlüğe giren Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (2005/49)'nde bal arısı (*Apis Mellifera*) tarafından üretilen balın tekniğine uygun ve hijyenik şekilde hazırlanması, depolanması, nakledilmesi ve pazarlanması aşamalarında taşınması gereken özellikler ayrıntılı olarak gösterilmiştir. Bu tebliğde ticari ballarda ambalajın etiketinde belirtilen bal botanik orijininin polen analizi ile belirleneceği (madde 6/h) belirtilmektedir. Bunun dışında, baldaki maksimum pestisit kalıntısının 0,1 mg/kg olabileceği, balda bulunabilecek diğer veteriner ilaçları kalıntı miktarlarının Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği Veteriner İlaçları Tolerans bölümüne uygun olması gerektiği (madde 10) ifade edilmektedir. Tebliğin EK'inde ballara ait diğer özellikler bir tabloda gösterilmiştir. Bu tabloda balın fizikokimyasal değişkenlerinin çiçek, salgı, bunların karışımı ve fırıncılıkta kullanılan ballardaki bulunması gereken değerler aralığı, maksimum ve minimum değerleri belirtilmektedir.

Ülkemiz dünyanın 4. büyük bal üreticilerinden biridir. Avrupa Birliği ülkeleri her yıl 800 milyon euro'luk bal ithal etmektedir. Ancak, ülkemizin bu pazardan aldığı pay sadece 3 milyon euro'dur¹.

¹ Radikal Gazetesi, 27.01.2006

Türkiye coğrafyasının kıydan içlere doğru artan rakımı, bitkilerin çiçeklenme mevsimlerinde değişiklik göstermesine ve bu da ülkemizi arıcılık için çok uygun bir duruma getirmektedir. Ayrıca, tüm dünyadaki ballı bitki türlerinin 3/4'ü ülkemizde bulunmaktadır. Bütün bu olumlu koşullara rağmen;

1. Koloni başına bal üretimi çok düşüktür.
2. Sahte bal ihraç girişimleri ihracatı, dolayısıyla üretimi olumsuz etkilemektedir.

Avrupa Birliği Komisyonu balı ilgilendiren 74/409/EEC konsül direktifini değiştiren bir teklifi kabul etmiştir. Bu teklifte balın fizikokimyasal, organoleptik ve mikroskopik özelliklerinin balın bitkisel, bölgesel ve topoğrafik orijini ile belirtilmesi istenmektedir. Avrupa Birliği Komisyonu, ayrıca, farklı balların kalite özelliklerinin kontrol edilebilmesi ve orijinin belirlenebilmesi için analitik metotlarının geliştirilmesini de tavsiye etmektedir.

Balın bitkisel orijini geleneksel olarak baldaki polen tiplerinin mikroskop ile incelenmesiyle yapılmaktadır (D'Albore *et al.*, 1978; Moore *et al.*, 1978). Ancak bu yöntem, aşağıdaki problemleri taşımaktadır.

- Polen miktarı mevsimden mevsime değişir,
- Erkek ve dişi çiçeklerin nektar miktarı farklıdır,
- Arı, nektarı toplamadan poleni alabilir. Bu nedenle, baldaki polenler balın orijinini işaret etmez.
- Balın satış için şişelenmesinden önce yapılan filtreleme işleminde polen filtrede kalabilir.
- Bazen, hile amaçlı olarak bala dışarıdan polen de katılabilir.

İşte, sayılan bu nedenlerden ötürü polen analizi balın bitkisel orijinini belirlemede etkin değildir.

Bal numunelerinin analizinde amaçlar farklı olabilir.

1. Balın insan sağlığı için tehlikeli zirai veya veteriner ilaçlarının kalıntılarının belli bir düzeyin üstünde olup olmadığını saptamak için,
2. Balın nem, pH, elektriksel iletkenlik, diastaz sayısı, hidroksimetil furfural miktarı gibi fizikokimyasal özelliklerinin/büyüklüklerinin ulusal ve/veya uluslararası kabul edilmiş standartlara uygunluğunu kontrol etmek için,
3. Balın tağış edilip edilmediğini anlamak için,
4. Balın bitkisel veya coğrafik orijinini belirlemek için,

Her ne kadar, ölçülen çeşitli fizikokimyasal parametrelerin, istatistik yöntemler uygulayarak, balın bitkisel ve coğrafik orijinini ortaya koyabileceğini gösteren çalışmalar mevcutsa da (Anklam E., 1998) son yıllarda bal orijininin uçucu bileşenler analiziyle belirlenebileceğine ilişkin çalışmalar ağırlık kazanmaktadır (Radovic, 2001; Rowland *et al.*, 2004). Bu kapsamda fenolik bileşiklerin (Tan *et al.*, 1990; Yao, 2004), norisoprenoitlerin (Tan *et al.*, 1989; Tan *et al.*, 1990; Guyot *et al.*, 1999), terpenoitlerin (Wilkins *et al.*, 1993; Guyot *et al.*, 1998; Alissandrakis *et al.*, 2003) alifatik dikarboksilik asitlerin balın botanik orijinini belirlemede işaretili bileşikler (markers) olarak kullanılabileceği ortaya konmuştur.

Bu çalışmanın amacı, Aydın-Denizli-Muğla illerinde üretilen ballardaki uçucu bileşenlerin analizini gerçekleştirmek ve uçucu bileşen cins ve miktarlarından yararlanarak balın bitkisel orijinini, belli bir güvenirlik düzeyinde, ortaya koyan bileşenleri belirlemektir. Bu amaçla; bitkisel kaynakları bir ticari analiz laboratuvarı ve bir satıcı firma tarafından belirtilen dokuz değişik bal numunesi uçucu bileşenler, bakımından analizlenmiştir. Bu tür bileşiklerin izolasyonu ve ekstraksiyonu için kullanılabilecek yöntemler literatür düzeyinde araştırılmış, niversite laboratuvar şartları dikkate alınarak sulandırılmış bal numunesinde ultrasonik dalgalar yardımıyla organik faza ekstraksiyon yöntemi benimsenmiştir.

Ultrasonik ekstraksiyon ile elde edilen ve uçucu bileşikler içeren bal ekstraktları kötü spektrometresinin detektör olarak kullanıldığı kapiler kolon gaz kromatografisi

ile ayrılmıştır. Her bir bal numunesi için çok sayıda analiz yapılmıştır (Toplam 60 analiz).

Aynı bal numunelerinde balın kimyasal özelliklerinden olan diastaz sayısı ve hidroksimetil furfurol düzeyleri de belirlenmiştir.

Uçucu bileşenlerin kromatografik alıkonma zamanlarının, aynı kromatografik koşullarda alifatik hidrokarbonlar için ölçülen alıkonma zamanlarının karşılaştırılmasıyla elde edilen alıkonma indisleri ve kütle spektrometresinin üretici firması tarafından geliştirilen dijital spektral veri kütüphanesinden yararlanarak her bir bal türünde bulunan uçucu bileşenler, çok kesin olmayan bir biçimde (tentative), tanımlanmıştır. Ayrıca, çeşitli görsel metotlar kullanılarak balları bitkisel orijini itibarıyla gruplandırmaya olanak verecek işaretleyici niteliğindeki bileşiklerin neler olabileceği tartışılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. BİTKİ KİMYASALLARI

Çağdaş bilimin ilk günlerinden itibaren bitkilerin kimyasal içerikleri ile ilgilenilmektedir. Bitkiler yiyecek elde etmenin ötesinde giysi boyama ya da çeşitli hastalıklar ile mücadele gibi birçok amaca yönelik olarak kullanılmıştır. Striknin, kinin ve brusin gibi bitkisel alkoloitler ilk olarak 1817-1820 yılları arasında Fransa'daki Pelletier ve Caventou laboratuvarında kristalize halde izole edilmiştir (Cordell, 1981). Kayın ağacının kabuğundan triterpen betülin elde edilmesi bilimsel literatürde ilk defa 1788 yılında tanımlanmıştır (Hayek *et al.*, 1989). Birçok bitkide bulunan ve boyacılıkta kullanılan flavonların ortaya çıkmaları İngiliz kimyagerler tarafından 19. yüzyılın ortalarında geniş çapta çalışılmaktayken, antosiyanin pigmentlerinin incelenmesine 1664 yılında Robert Boyle tarafından başlanmıştır (Harbone, 1967).

Bitki kimyası geçen yüzyılın başlarında üniversitelerde okutulan oturmuş bir disiplin haline gelmiş ve büyük ölçüde kimyasal bozulmalara ve biyogenetik oluşumlara bağlı olarak bitkilerin yeni içeriklerinin ve özelliklerinin keşfedilmesi ile 1950'ye kadar geliştirilmiştir (Robinson, 1955). 1957 yılında basılan bir ansiklopedide (Karrer, 1958) alkoloitler dışında bitkilerde bulunan 2750 bileşik kapsamlı bir biçimde listelenmiştir. Bunlara bugün bilinen alkoloitler eklenecek olsaydı bu sayının o zaman 5000 civarında olması muhtemeldi.

Bitki kimyası konusu, İkinci Dünya Savaşı sonrasında bitki içeriklerinin saflaştırılması için karmaşık kromatografik yöntemlerin ve ayrıca bu içeriklerin hızlı bir biçimde tanımlanabilmelerine olanak veren spektral yöntemlerin geliştirilmesi ile hızla evrimleşmiştir. Kimyasal maddeler sadece miligramdan küçük miktarlarda ve kristalize olmayan bir halde kullanılırken bile birçok yeni yapı tanımlanmıştır. Bu nedenle, yapısal tanımlamaların hızı 1950'den beri her on yılda bir katlanarak artmış ve böylece bitkilerden elde edilen doğal ürünlerin sayısı 100 bin civarına ulaşmıştır.

2.1.1. Bitki Kimyasallarının Sınıflandırılması

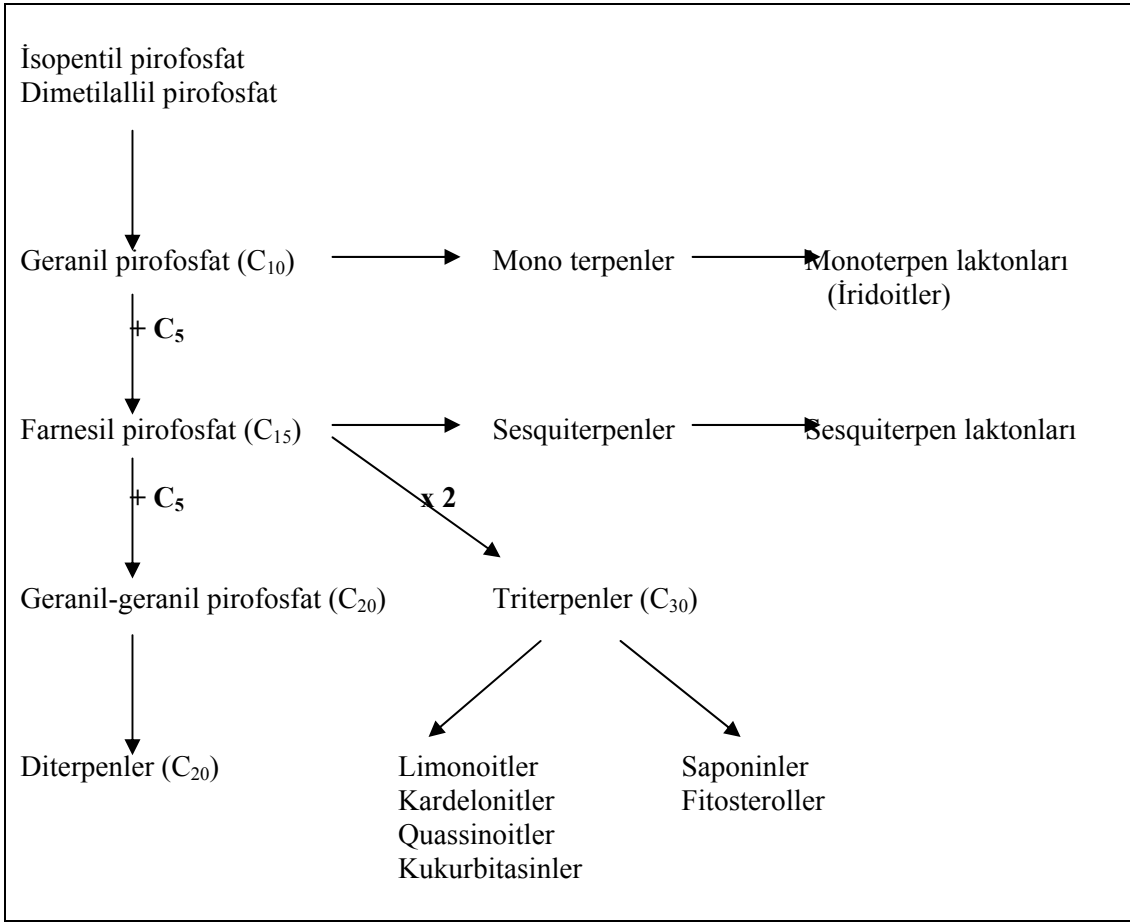
Bitkisel kimyasallar bitki metabolizmasındaki rollerinin önemine ve genel olarak bütün bitkilerde bulunup bulunmadıklarına bağlı olarak birincil ve ikincil bileşenler olarak sınıflandırılmaktadır.

Birincil bileşenler şeker, protein amino asitleri, nükleik asitlerin purin ve pirimidinleri, klorofiller ve benzeri bileşenleri içermektedir. İkincil bileşenler alkoloitlerden tripenoitlere, asetogeninlerden fenoliklere geriye kalan bütün bitkisel kimyasalları ve metabolizmada ana rolde bulunmayan ve dağılımı bitkiden bitkiye değişen kimyasal maddeleri içermektedir.

Bu çeşit bir sınıflandırmanın bazı dezavantajları bulunmaktadır. İkincil terimi bu kimyasalların bitki için daha az derecede önem taşıdığını ima etmektedir. Ancak, bu bileşenler bitkiyi çevresel baskılardan korumada ya da bitki gelişimini kontrol altında tutmada kilit bir rol oynuyor olabilirler. Birincil ve ikincil metabolizmalar arasında kesin bir ayırım yoktur. Örneğin erüsik asit, turpgiller familyasının doğada çok kısıtlı bir dağılıma sahip olan karakteristik bir yağ asididir ve böylece ikincil bileşen olarak sınıflandırılmaktadır. Öte yandan, erüsik asit turpgiller familyasının üyelerinde tohum yağının temel asidi olarak önemli bir enerji depolama biçimini teşkil etmekte ve genç fidanlar geliştikçe birincil metabolizmaya dahil olmaktadır (Hitchcock *et al*, 1980).

2.1.1.1. Terpenler

Terpenler veya isoprenler, onların isopentil ve dimetilallil pirofosfat biyosentetik kaynağına ve lipofilik karakterine bağlı olarak karakterize edilir. Bu maddeler özellikle yaprakta bulunan dikenlerde yer alır. Bunlar, karbon iskeletine bağlı alkoloit veya ketonoit substütüentler içeren doymamış hidrokarbonlardır. Beşli karbon birimlerine bağlı olarak alt gruplara ayrılırlar: monoterpenler (C₁₀), tetraterpenler (C₄₀) gibi. Terpen serisindeki biyosentetik ilişki şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1 Terpen serisinde biyosentetik ilişkiler

Terpenleri artan molekül ağırlığına bağlı olarak alt gruplara ayırmak mümkündür.

Tablo 2.1 Terpen alt sınıfları.

Terpen sınıfları	Tanım
Monoterpenler	Uçucu, esansiyel yağ bileşenleri
Sesquiterpenler	Yüksek kaynama sıcaklığına sahip esansiyel yağ bileşenleri
Sesquiterpen laktonlar	Karakteristik <i>Compositae</i> ailesinde bulunur
Diterpenler	Resin asitler ve gibberillinler
Triterpen saponinler	<i>Haemolytic</i> glikozidaz
Fitosteroller	Membran bileşenleri
Nortriterpenler	Limonoitler ve kuassinoitler
Diğer terpenler	Lupanlar,hapanlar, ursanlar, vb..
Karotenoitler	Renk pigmentleri
Steroid saponinler	<i>Haemolytic</i> glikozidaz

2.1.1.2. Alkoloitler

Alkoloitler, genellikle bitkilerde bulunan, insan ve hayvanlar tarafından alındıklarında belli fizyolojik etkileri olan ve kimyasal yapılarında en az bir azot atomu içeren karmaşık yapılı doğal organik bileşiklerdir. En çok bilinen alkoloitlere örnek olarak morfin, nikotin, striknin, kafein, kokain, efedrin ve kinin verilebilir. Bunlara alkoloit denmesinin nedeni, baz gibi davranan bileşikler olmaları, yani asitlerle tepkimeye girerek çoğu kez suda çözünebilen tuz vermeleridir. Alkoloitlerin çoğu sistematik adları yerine kökenlerine göre isimlendirilmişlerdir. Genellikle, izole edildikleri bitkiden türetilen bir isme sahiptirler. Örneğin striknin alkoloiti, *strychnos* (karabüken) bitkisinin tohumlarından elde edilir. Bazı alkoloitlere ilginç adlar da verilmiştir. Afyon alkoloiti olan morfinin adı eski Yunan rüya tanrısı Morpheus'tan gelir. Tütün alkoloiti olan nikotin, adını tütün tohumlarını Fransa'ya ilk getiren eski bir Fransız elçisi Nicot'tan almıştır. Adlarının sonunda genellikle –in

eki vardır. Bu ek, alkoloitlerin birer amin olduğunu belirtir. Alkoloitler suda çözünmezler, fakat organik çözücülerde çözünürler. Bir kısmı hariç (konin, papaverin) alkoloitlerin çoğu optikçe aktiftir. Genel olarak tatları acıdır, kokusuzdurlar ve fizyolojik aktivitelerinden söz edilir. Alkoloitlerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılmasında, bileşiklerindeki halkalar ve bunlara bağlı gruplar göz önüne alınır. En basitleri, bir azot ile dört karbon atomundan oluşan beş üyeli pirol halkasının türevi olan bileşiklerdir. Daha karmaşık yapılar, halka sistemlerine, sayısına ve moleküldeki azot atomlarının sayısına göre önemli değişiklikler gösterir. 1950'lerde biyogenetik açıdan incelenerek sınıflandırılmalarına başlanmıştır. Bu sınıflandırmaya göre alkoloitler 3 grupta toplanmıştır. Gerçek Alkoloitler; Biyogenetik bir aminden meydana gelen bir amino asidin dekarboksilasyonu ile oluşanlardır. Protoalkoloitler; alkoloit benzeri şekilde tanımlanabilen bu grup maddeler de aminoasitlerden veya biyogenetik aminlerden oluşur, fakat triptofandan sentezlenenler dışında kalanlar heterosiklik sistem içermezler. Psödoalkoloitler; azotlu bazik bileşikler olan alkoloit benzeri maddeler arasında yer alanlar mono-, di- ve tri-terpenler veya steroller, asetattan türeyen alifatik poliketo asitler gibi bileşiklerdir.

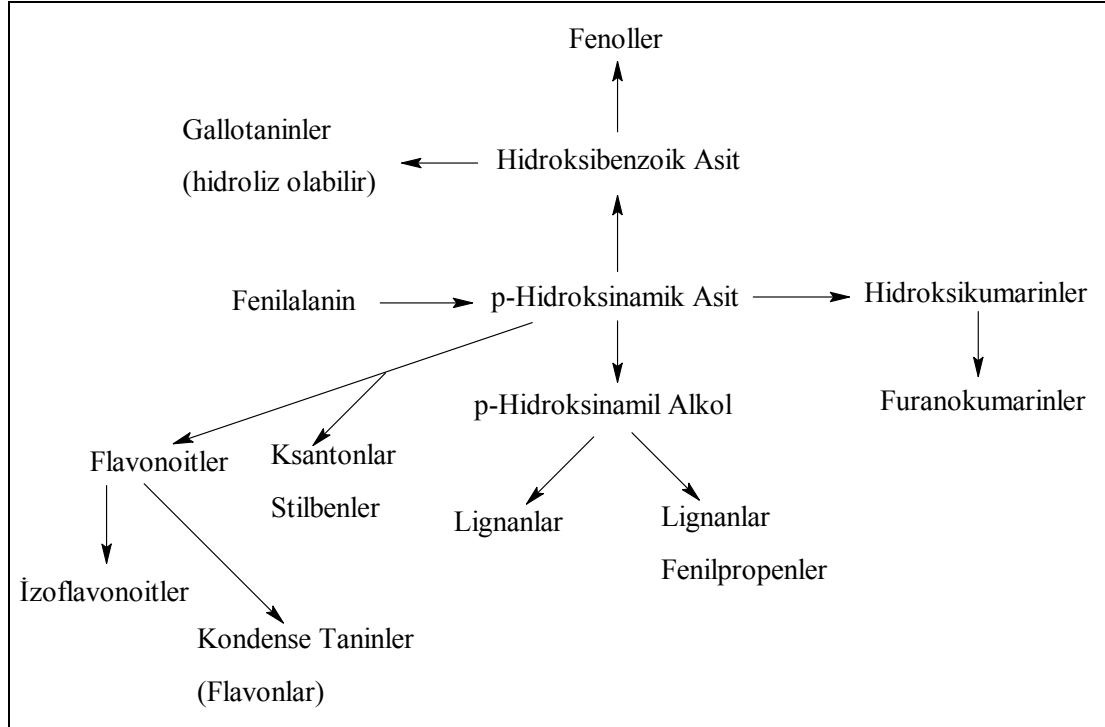
Tablo 2.2 Bitkilerdeki alkoloitler ve azot içeren diğer bileşikler.

Alkoloitler	
Amarillidake	Nergisler ailesiyle sınırlı, 275 yapı.
Betalanin	<i>Centrospermae</i> 'ların sarı veya mor pigmentlerinde bulunur.
Diterpenler	Başlıca <i>düğün çiçeği</i> 'nde bulunur; çoğunlukla zehirlidir
İndoller	<i>Apocynaceae</i> ve <i>Loganiaceae</i> de yapılarında bulunur.
İsoquinolinler	En geniş alkoloit grubudur
Lycopodium	Liken familyası haricinde 150 yapısı bulunur.
Monoterpenler	İridolislerle ilişkili ve birlikte gözükür.
Peptit	Özellikle <i>Rhamnaceae</i> 'larda bulunur; 130 yapısı vardır.
Sesquiterpenler	Özellikle bazı orkide türlerinde bulunur.
Pyrolidin ve piperidin	Polihidroksialkoloit içerirler.
Pyrolizidin	Özellikle <i>Boraginaceae</i> ve <i>Compositae</i> 'larda bulunur
Quinolin	Özellikle <i>Rutaceae</i> 'larda bulunur.
Quinolizidin	<i>Leguminosae</i> 'ler için karakteristiktir
Steroidal	<i>Apocynaceae</i> , <i>Buxaceae</i> , <i>Liliaceae</i> ve <i>Solanaceae</i> 'de bulunur.
Tropane	Başlıca <i>Solanaceae</i> 'de bulunur.
Aminler	Balık kokusu karakterinde; seyrek dağılımdadır.
Siyanogenik glikozidaz	Geniş olarak olmasına rağmen ara sıra bulunur.
Purinler ve pirimidinler	Kafeinli kahve ve çaylarda bulunur

2.1.1.3. Fenolik Bileşenler

Bir veya daha fazla hidroksil grubu içeren aromatik yapılardır. Polifenollerin çoğunda bir veya daha fazla sayıda hidroksil grubu metil veya glikozil gruplarıyla yer değiştirmiş olabilir. Fenolik bileşikler fenilalaninden kaynaklanan biyosentetik

orijine sahiptir. Farklı fenolik sınıfların biyosentetik ilişkisi şekil 2.2’de gösterilmiştir.



Şekil 2.2 Çeşitli fenolik madde sınıfları arasındaki biyosentetik ilişkiler

Polifenollerin en fazla bilinen grubu flavon (2-fenil benzopiron) karbon iskeletine sahip olan 4000 civarında farklı bileşik içeren flavonoitlerdir. Flavonoit olmayanlarla birlikte fenolik bileşiklerin sayısı 8000 civarındadır; bunların çoğu bitki kaynaklıdır. Fenolik bileşiklerinin sınıflandırılması tablo 2.3’de gösterilmiştir.

Tablo 2.3 Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması

Alt sınıfları	Tanım
Antosiyaninler	Maviden kırmızıya kadar çiçek pigmentleridir.
Antocholarlar	Sarıçiçek pigmentleri: <i>chalcones</i> ve <i>aurones</i>
Benzofuranlar	Bitkiler ve likenlerde yüksek miktarda içerir.
Kromonlar	Küçük bir gruptur, terapi için önemlidir.
Kumarinler	Hemen hemen bütün bitkilerde bulunur.
Minor flavoitler	Flavanoller ve dihidroflavonoller örnek verilebilir.
Flavonlar ve flavanoller	Özellikle glikozidik bileşiminde bulunur.
İsoflavonoitler	Karakteristik olarak <i>Leguminoase</i> de bulunur.
Ligninler	Özellikle odunsu bitki ve ağaç kabuklarında bulunur.
Fenoller ve fenolik asitler	Bazı asitler bütün bitkilerde bulunur.
Fenolik ketonlar	Eğreltiotu ve şerbetçiotu bulunur.
Fenolpropanoitler	Yaygın olarak bitkilerde bulunur.
Kinonoitler	Benzokinonlar, naftokinonlar ve antrokinonlar örnek verilir.
Stilbenoitler	Dihidrofenantrenler içerir.
Taninler	Kondenize ve hidrolize olurlar.
Ksantonlar	Özellikle <i>Gentianaceae</i> ve <i>Guttiferae</i> 'lerde bulunur.

Fenolik bileşiklerin önemli bir özelliği bazların varlığında iyonlaşmalarıdır. Polifenollerin çoğunda kateşol grupları bulunur; bu gruplar vasıtasıyla 2 veya 3 değerlikli metal iyonlarıyla kelat bileşikleri oluşturur.

2.1.2. Bitki Pigmentleri ve Kokuları

Çiçeklerin renk ve kokuları için tozlaşma faktörleri önemli yer tutmaktadır. Bitkilerin kendine has renk ve kokuları, tozlaşma faktörlerini (arı, kelebek, kuş, vb.) kendilerine çekmeyi mümkün kılar. Buna örnek vermek gerekirse, arılar, mavi ve

sarı çiçekleri olan veya ultraviyole ışını soğuran madde (flavonlar) içeren ve çekici kokuları bulunan bitkilere konarak tozlaşmaya yardımcı olur.

Angiosperm çiçeklerin kokularında çok sayıda ve çeşitlilikte uçucu kimyasal bileşikler bulunmaktadır (Knudsen, 1993). Bir tür orkidede 150 kadar koku veren bileşik saptanmıştır (Kaiser, 1993). Mono ve sesquiterpenler en yaygın uçucu bileşikler olmakla birlikte pentadekan gibi alifatik ve eugenol gibi aromatik bileşikler pek çok çiçekte bulunur.

Pigment ve koku bileşikleri sadece bitkilerin sadece çiçeksi kısımlarında değil yapraklarda ve meyvede de bulunur. Ancak, yaprak dışındaki bileşiklerin cinsi çiçekte bulunanlardan farklıdır.

2.2. UÇUCU BİLEŞENLERİN İZOLASYONU ve ANALİZİ

Bitkilerden veya bitki uçucu bileşenlerini içeren gıdalardan özellikle ikincil bileşenlerin ekstraksiyonu, bu bileşenlerin ayrılması ve analizinde aşağıda sıralanan işlemler/yöntemler uygulanır.

2.2.1. Ekstraksiyon Teknikleri

Kurutulmuş bitkilerin başlıca bileşenleri selüloz, hemiselüloz ve lignindir. Gıda maddelerinin başlıca bileşenleri ise karbonhidratlar, proteinler ve yağlardır. Bu matrikslerden ikincil bileşenleri izole etmek için en yaygın kullanılan yöntem ekstraksiyondur.

Tayin edilmek istenen ikincil bileşenler matriksteki diğer bileşiklere bağlanmış olabilir veya bunların ekstraksiyonu diğer bileşiklerce engellenebilir. Bu nedenle, ekstraksiyon her zaman kolayca gerçekleşmeyebilir. Ancak, farklı ekstraksiyon ortamları kullanılarak ekstraksiyon verimini arttırmak mümkün olabilir. Ekstraksiyon ortamları olarak sıvılar (genellikle organik), süperkritik akışkanlar ve buhar destilasyonu kullanılabilir. "Headspace" tekniği de bir izolasyon tekniğidir.

Çözgen ekstraksiyonu, en yaygın kullanılan ekstraksiyon tekniğidir. Genellikle ilgilenilen bileşikler ekstrakte edilir. Ancak bazen, numune matriksinin ekstraksiyonu gerekebilir. Ekstraksiyonda, ekstrakte edilecek maddenin polaritesine bağlı olarak farklı çözgen veya çözgen karışımları kullanılabilir. Hidrokarbonlar genellikle hekzan veya petrol eteri ile ekstrakte edilir. Ancak, moleküldeki oksijen ve azot atomları toplamının dört katından daha az karbon içeren bileşikler hekzan ve petrol eterinde çok az çözünürler. Glikozitler gibi polar bileşikler için diklorometan veya petrol eteri/etil asetat karışımı tercih edilir. Apolar karakterdeki bileşikler için kloroform veya hekzan/etil asetat karışımı da önerilmektedir.

Ekstraksiyon genellikle üç şekilde uygulanır. Gıda veya bitki numunesi çözgünde bekletilir. Bekletme süresi birkaç dakikadan birkaç haftaya kadar uzayabilir. Bu uygulama şekline “maserasyon” denir. Taze çözgenin sürekli olarak numune üzerinden geçirildiği uygulama “perkolasyon” olarak isimlendirilir. Gerektiğinde aynı numuneden ikinci ve farklı bir çözgen geçirilerek yeterli miktarda ekstraksiyon elde edilmeye çalışılır. Toplam çözgen miktarının sabit kaldığı ve taze çözgenin ekstrakte edilmiş analitleri içeren çözgünden buharlaşmayla elde edildiği uygulama şekline ise “soxhlet ekstraksiyonu” denir. Bu üç tür çözgen ekstraksiyonunun avantaj ve dezavantajları aşağıdaki tablo 2.4’de özetlenmiştir.

Tablo 2.4 Üç farklı ekstraksiyon işleminin avantaj ve dezavantajları.

Avantajları	Dezavantajları
Maserasyon	
Basit ve ucuzdur.	Analit mutlaka çözelti olmalıdır.
Çözgen kullanımı azdır	Karıştırılmalı ve/veya ısıtılmalıdır.
İyi ve seçici bir ekstraksiyon tekniğidir.	
Perkolasyon	
Kolay bir tekniktir	Seçiciliği düşüktür, yavaştır, kontrol gerekir
Ekstrasyon işlemi uğraştırıcı değildir.	Kullanılan çözgen miktarı fazladır
Soxhlet ekstraksiyonu	
Kullanılan çözgen miktarı çok azdır.	Termal bozulmayla olur, su ve elektriği çok kullanır, zor bir tekniktir.
Kontrol edilmesine gerek yoktur.	Çalışma zamanı uzundur, ekstraksiyon bazen iyi sonuç vermeyebilir.

Süperkritik akışkanlar, bir bileşiğin gaz ve sıvı özellikleri arasında bir özelliğe sahiptirler. Bir bileşik süperkritik sıcaklık ve basıncının üzerinde ise süperkritik akışkan olarak isimlendirilir. En yaygın kullanılan süperkritik akışkan karbondioksittir. İzolasyon için etkili bir teknik olmasına rağmen süperkritik akışkan ekstraksiyonu bileşen(ler)in tayini için ekstraksiyonundan daha çok preparatif ekstraksiyonlar için kullanılmaktadır.

Buhar destilasyonu çeşitli matrikslerdeki suda çözünmeyen uçucu bileşenlerin izolasyonu için basit, temiz ve aynı zamanda oldukça seçici bir izolasyon tekniğidir. Bu teknikle kaynama noktaları 100–350 °C olan uçucu bileşenler -ki bunlar genellikle numunenin kütlece %1'inden azdır- izole edilir. Ekstraksiyon sonunda renksiz veya açık sarı renkli, sadece uçuculardan oluşan yağimsı bir ekstrakt elde edilir. Bu teknik aynı zamanda bitki esansiyel yağlarının laboratuvar ölçekli hazırlanmasında çok yaygın olarak kullanılır.

Bir objenin “headspace”i onu yakından çevreleyen atmosferidir. Bu atmosferde numuneden kaynaklan uçucu bileşenler toplanıp analizlenebilir. Analitik amaçlar için

statik (veya denge) headspace, preparatif amaçlar için dinamik headspace teknikleri tercih edilir.

Statik headspace tekniğinde numune (bitki veya gıda örneği) kapalı bir kapa yerleştirilir, gerekirse ısıtılarak bir süre (30 dakika kadar) beklenir. Headspacedeki gaz basıncı oda basıncından daha yüksek olduğu için headspace'i temsil eden ve hacmi bilinen bir miktar gazı, gaz kromatografi aygıtına, mesela bir şırınga ile taşımak zordur. Bu nedenle otomatik headspace örnekleyicileri geliştirilmiştir.

Numunedeki uçucu miktarının çok düşük olması ve bu nedenle tayinde duyarlılık problemleri yaşanması söz konusu olduğunda dinamik headspace tekniğine başvurulur. Bu teknikte temizlenmiş hava veya azot gazı önce numune üzerinden ve sonra uygun adsorbant veya soğuk tuzak üzerinden geçirilir. Numune tarafından salınan uçucular gaz ile taşınıp adsorbanda tutulurlar. Adsorbanlar yüzey alanı büyük ve apolar bileşiklere affinitesi olan maddelerdir. En yaygınları Tenax, Porapak veya Amberlite XAD ile aktif karbon ve C-18 ile türevlenmiş silikadır. Adsorban üzerinde belli bir süre (1 dakika – 24 saat) toplanan uçucu bileşikler termal veya kimyasal olarak desorbe edilerek çoğunlukla gaz kromatografi ile analizlenir. Kimyasal desorpsiyonda adsorban küçük bir miktar çözücü (pentan, dietil eter, CS₂) ile yıkanır, yıkama çözeltisi doğrudan veya değiştirilerek gaz kromatografi cihazına enjekte edilir. Kimyasal desorpsiyon termal desorpsiyonundan daha basit olmakla beraber kontaminasyon ve tayin duyarlılığı problem olabilir.

2.2.2. Ayırma ve Saflandırma Teknikleri

Miktar tayini veya yapı aydınlatılması için ilgilenilen bileşiklerden mümkün olan en fazla sayıyı içeren ekstrakt, analizden önce hala ayırma ve/veya örnek hazırlama adımlarını gerektirebilir. Bu amaçla izlenebilecek yaklaşımlar aşağıda özetlenmiştir.

- a) Çözgen partisyonu
- b) Kromatografi
- c) Karşıt Akım Teknikleri
- d) Sıvı Kromatografisi
 - Gravitasyon Komotografi
 - Flash Kromatografi
 - Vakum-Sıvı Kromatografi
 - Düşük veya Orta Basınç Sıvı Kromatografi
 - Yüksek Basınç Sıvı Kromatografi
 - Katı Faz Ekstraksiyonu
 - İnce Tabaka Kromatografisi
- e) Kapiler Elektroforez
- f) Süperkritik Akışkan Kromatografisi
- g) Gaz Kromatografi
- h) Fraksiyonlu Destilasyon
- ı) Çöktürme
- i) Kristalizasyon

2.2.3. Baldaki Uçucu Bileşenlerin İzolasyonu

Balların kimyasal bileşimi, arıların nektarını topladığı çiçek veya meyve tomurcuklarının ait olduğu bitkilerin türüne bağlı olarak değişmektedir. Ballarda 300'den fazla uçucu bileşik tanımlanmıştır. Bu uçucu bileşiklerin analizi genellikle gaz kromatografi – kütle spektrometri tekniği ile yapılmaktadır. Uçucu bileşiklerin izolasyonu için ilgili literatürde kullanılan ve karşılaştırılan teknikler: sıvı-sıvı ekstraksiyonu (LLE), hidrodistilasyon (HD), simultane buhar destilasyonu-çözgen ekstraksiyonu (SDE), katı faz ekstraksiyonu (SPE), katı faz mikroekstraksiyonu (SPME) ve ultrasonik ekstraksiyon (USE)'dur.

Bu yöntemlerden en basiti LLE'dir. Düşük polariteli çözgenler kullanıldığında su ve şekerin ekstrakte olmaması bu yöntemin avantajıdır. Ancak, uçucu bileşikler yanında uçucu olmayan bileşiklerin de ekstraksiyonu söz konusu olup bu ikinci tür grubun

gaz kromatografik enjeksiyon bloğunu ve kromatografik kolonu kirletme olasılığı vardır.

Bu teknikle uçucu bileşiklerden norisoprenoidler, terpenler ve benzen türevleri (Wilkins *et al.*, 1993; D'Arcy *et al.*, 1997) yanında alifatik bileşikler (Tan *et al.* , 1988, 1989) ve hidrokarbonların varlığı belirlenmiştir (Gradon *et al.* , 1979).

Önceki yıllarda LLE tercih edilen ekstraksiyon yöntemi olmakla birlikte, bu yöntem, daha önce de belirtilen (Tablo 2.4) dezavantajlarıyla nedeniyle günümüzde adeta terkedilmiştir.

Katı faz ekstraksiyonunda (SPE) bal numuneleri suda çözülüp uçucu bileşenler bir organik faza (sikloheksanol gibi) ekstrakte edildikten sonra gözenekli polimer boncukları (Porapak Q gibi) içeren kolondan geçirilerek uçucu bileşenlerin adsorbe olması sağlanır. Daha sonra kolon uygun bir eluent (dieterler gibi) ile yıkanır. Organik çözünenin GC ile analizinde neden olacağı olumsuzluklar burada da söz konusudur.

Simultane distilasyon ekstraksiyon tekniğinde (SDE) bir mikro distilasyon aparatı kullanılır. İlk kez 1983'de bal örneklerine uygulanan bu yöntem (Bicchi *et al.*, 1983) analizdeki şeker girişiminden kaçınmak için bir ön aseton ekstraksiyon adımı içermektedir. Buhar distilasyonu ve çözünen ekstraksiyonunun eş zamanlı uygulandığı bu teknikte, sıcaklığın istenmeyen bazı reaksiyon ürünlerine neden olabileceği görülerek değişik aşamalarda iyileştirme önerileri getirilmiştir. (Malignial *et al.* , 1992; Willis *et al.* , 1993; Bouseta, ve Collin, 1995)

LLE, SPE ve SDE teknikleri, toksik organik çözünenlerin kullanılmasını gerektirmektedir. Bu durum, daha sonra bu çözünenlerin atık olarak çevreyi kirletebileceği endişesini getirmektedir. Dinamik headspace tekniği çözünen kullanımını gerektirmemekle birlikte gaz kromatografik enjeksiyon bloğunun tasarımında değişiklikler gerektirmektedir. Katı faz mikroekstraksiyon tekniğini son yıllarda geliştirilen, bir organik çözünenin kullanılmadığı, bağıl olarak ucuz sayılabilecek bir tekniktir. Bu teknik gaz, sıvı ve katı numunelerdeki hem polar hem

de apolar bileşiklerin ekstraksiyonu için kullanılır ve teknik çeşitli analitik tekniklerle (GC, GC-MS, HPLC, LC-MS) kolaylıkla eşlenir. SPME’de ince bir silika fiber üzerine kaplanmış olan organik polimer, fiberin bulunduğu ortamdaki (Headspace veya sıvı) organik maddeleri adsorbe eder. Daha sonra fiber kromatografik enjektör bloğuna yerleştirilir; adsorblanan bileşikler termal desorbsiyonla kolona gönderilir. Kaplamada kullanılan polimerin cinsi değiştirilerek farklı karakterdeki bileşiklerin adsorpsiyonu sağlanır (Pawliszyn, 1997). Bu teknik son yıllarda çevre, gıda, klinik, medikal ve adli örneklerle yaygın bir şekilde uygulanmaktadır (Pawliszyn, 1999).

Son yıllarda uçucu bileşiklerin doğal ürünlerden ultra ses dalgaları yardımıyla izolasyonu gündeme gelmeye başlamıştır. Şaraplara (Cocito *et al.*, 1995; Vila *et al.*, 1999) uygulanan yöntem 2003 yılında bal numunelerine de uygulanmıştır (Alissandrakis *et al.*, 2003).

Baldaki aroma bileşiklerinin izolasyon tekniklerinin ayrıntılı olarak karşılaştırıldığı çalışmalar bulunmaktadır. Biberiye (rosemary) balındaki uçucu bileşiklerin analizi için LLE, SPE ve SDE teknikleri karşılaştırılmış. Her üç teknik ile de çok sayıda uçucu bileşik elde edildiği, SDE ekstraktlarının terpenlerce ve esterlerce zengin olduğu, ancak SDE’nin polaritesi yüksek ve uçuculuğu düşük asit ve benzen türevlerinde geri kazanım oranının iyi olmadığı gösterilmiştir (Castro-Vazquez *et al.*, 2003). Aynı çalışmada SPE ile esterlerin çok iyi ekstrakte edilmediği ileri sürülmüştür.

Daha yakın tarihli bir çalışmada (Alissandrakis *et al.*, 2005) SDE, hidrodistilasyon (HD), SPME ve USE izolasyon teknikleri karşılaştırılmıştır. HD ve SDE tekniklerindeki sıcaklık uygulaması nedeniyle bazı bozulma ürünlerinin oluştuğu, SPME ile elde edilen kromatografik profilin diğerlerinden çok farklı ve kullanılan fiberin yapısına çok bağlı olduğu, buna karşılık, USE ile elde edilen ekstraktların numuneyi en iyi temsil eden profili verdiği ve aynı zamanda uçucular yanında numuneyi işaretleyici (marker) niteliğindeki yarı uçucuların ekstraksiyonuna da imkan verdiği görülmüştür.

2.3. GAZ KROMATOĞRAFİSİ-KÜTLE SPEKTROMETRESİ

Spektroskopik analizler için en karmaşık örneklerden birisi de gıdalardır. Bir gıdanın

- besin değeri,
- kimyasal yapısı ile dokusu arasındaki ilişki,
- gıdaların işlenmesinde işlenme tekniğinin gıdanın kalitesini nasıl etkilediği,
- gıdalara yapay tatlandırıcı veya koku verici maddelerin eklenip eklenmediği

gibi sorular, gaz kromatografi-kütle spektrometresi (GC-MS) gibi çok güçlü bir analitik aygıt kombinasyonu ile büyük ölçüde yanıtlanabilmektedir.

2.3.1. Kütle Spektrometresi

Bu yöntemde M gibi molekül iyonlaştırılarak M^+ moleküler iyonu elde edilir. İyonlaşma sırasında molekül iç enerji kazanarak moleküler iyondaki bazı bağlar kırılarak yüklü parçacıklar (fragmanlar) ve nötral türler oluşur. Kütle spektrometre aygıtı oluşan tüm iyonları kütle/yük (m/z) oranına göre ayıran ve kaydeden aygıttır. Oluşan iyonların hemen hemen tümü $+1$ yüklü olduğundan m/z oranı doğrudan iyonun veya molekülün kütlesine eşittir. Fragman iyonlar moleküler iyondan kopan fonksiyonel gruplardan oluştuğu için elde edilen spektrum molekülün yapısı hakkında çok önemli bilgiler içermektedir. Kütle spektrumu, iyon bolluğunun m/z 'ye karşı çizildiği bir grafikdir.

2.3.2. Organik Kütle Spektrometresi için İyonlaştırma Kaynakları

Numune spektrometreye genellikle buhar halinde verilir. GC/MS kombinasyonunda kromatografik kolonu terk eden maddeler zaten buhar fazında olduğundan özel bir numune verme manifolduna ihtiyaç yoktur. Vakum ($\sim 10^{-6}$ torr) altında iyon kaynağına gelen numune buharı burada genellikle üç yöntemle iyonlaştırılır. Bunlar: elektron iyonizasyonu (EI), kimyasal iyonizasyon (CI) ve hızlı atom bombardmanı (FAB=Fast Atom Bombardment)'dir.

Elektron iyonizasyonunda elektriksel olarak ısıtılmış tungsten veya renyum flamanından fırlayan ve uygun gerilim uygulayarak hızlandırılan elektronlar moleküllerle çarpışarak pozitif yüklü radikal iyonların oluşmasına yol açar. Bazı bileşikler o kadar kolaylıkla parçalanır ki, moleküler iyonu görmek mümkün olmayabilir. Bu durumlarda, daha “yumuşak” iyonlaşma teknikleri tercih edilir.

Kimyasal iyonizasyon bir yumuşak iyonlaştırma tekniğidir. Bu teknikte metan veya amonyak gibi gazlar elektronlarla bombardıman edilerek bir iyon plazması oluşur. Bu plazma C_5^+ , $C_2H_5^+$ ve NH_4^+ gibi iyonlar içerir. Bu iyonlar M molekülü ile çarpışarak M'nin protonasyonuna (MH^+) yol açabildiği gibi elektrofilik katılma veya hidrür uzaklaşmasıyla ($M + NH_4^+$ ve $(M - (-H))$) gibi türlerin oluşmasına yol açar. İyonlaşan molekülün iç enerjisi elektron iyonlaştırmasındakinden daha düşük olduğundan moleküler iyonun parçalanma derecesi daha düşüktür. Spektrometreler çoğunlukla hem EI hem de CI modunda çalışacak şekilde tasarlanmışlardır. Bazı spektrometrelerde bu iki iyonlaştırma tekniği sürekli olarak ve çok hızlı bir şekilde birinden diğerine değiştirilerek uygulanır. Bu teknik ilgili terminolojide ACE terimiyle isimlendirilir.

Polar, uçuculuğu düşük ve termal olarak labil numuneler için en yaygın kullanılan iyonlaştırma tekniği, aynı zamanda yumuşak bir teknik olan FAB'dır. Gliserol gibi bir sıvı maktrikte çözülen numune, bir atom veya iyon demetiyle bombardıman edilir. Yeterli enerjideki iyonlar gaz faza geçerler ve spektrometre ile analizlenir. FAB, genellikle molekül kütlesi çok büyük olan (> 20000 Da) biyopolimerlerin analizinde kullanılmaktadır.

2.3.3. Kütle Analizörleri

Farklı m/z oranına sahip iyonlar elektrik, manyetik veya her ikisinin kombinasyonu uygulanarak birbirinde ayrılırlar. Dört tip kütle analizörü kullanılmaktadır: Quadropol analizör, iyon tutucu (ion trap) analizör, manyetik sektör analizör ve uçuş zamanlı (time-of-flight) analizördür.

Quadropol analizörler manyetik sektör analizörlere kıyasla daha az yer işgal eden, daha ucuz ve mekanik olarak daha dayanıklı analizörlerdir. Aynı zamanda tarama hızları oldukça düşüktür (< 100 ms). Bu nedenlerle masaüstü (bench-top) GC-MS kombinasyonlarında, kromatografik piklerin gerçek zamanlı (reel time) analizi için tercih edilen analizör tipidir. Bu analizörde dairesel veya hiperbolik kesitli dört adet, birbirine paralel çubuk bulunur. Bu çubuklar alternatif ($V_0 \cos\omega t$) ve doğru akım (U) güç kaynaklarına bağlıdır. Analizör, U/V_0 sabit kalacak şekilde U ve V_0 değiştirilerek taranır. Bu taramalarda m/z oran aralığı çok küçük olan iyonlar detektöre ulaşırken diğerleri nötralize olup yüksüz türler olarak taşınırlar.

2.3.4. İyon Deteksiyonu ve Kayıt

Birkaç tip detektör kullanılmakla birlikte rutin olarak kullanılmak üzere tasarlanmış aygıtlarda elektron çoğaltıcı (electron multiplier) detektör kullanılır. Bu detektör Cu–Be “dinot”lar içerir. Enerjik iyonların bu diyetlerden ilkinde çarpmasıyla oluşan yavaş elektronlar, her defasında elektriksel alanda hızlandırılarak diğer dinotlara çarparlar. Tipik bir detektörde 10-20 kadar dinot bulunur.

Fotoğraf plakası, sintilasyon türü veya faraday kafesi esaslı detektörler, çok daha az olmak üzere, iyonlaşma kaynağı veya analizörün bu tür detektör kullanımını zorunlu kılması nedeniyle kullanılmaktadır.

2.3.5. Kompüterize Kütle Spektrometreleri

Tipik bir kütle spektrumu kimyasal bileşiklerin yapısına ilişkin çok zengin bir bilgi içermektedir. Örneğin, molekül kütlesi 500 civarında olan bir molekülden 100 veya daha fazla sayıda farklı iyon oluşabilir. Bu nedenle, karmaşık bir numunenin kromatografik analizinde birbirinden ayrılarak spektrometreye gönderilen 20-100 kadar bileşenin oluşturacağı iyonların toplam sayısı binlerle ifade edilecek kadar fazla olacaktır. Yapı tayini için her bir iyonun ait pikinin hem yüksekliği (bolluğu) hem de m/z oranının kaydedilmesi gerekmektedir. Kaydedilecek bilginin çok fazla miktarda olması nedeniyle veri kaydedilmesi ve işlenmesi çok hızlı olmalıdır. Böyle bir görev, ancak bir bilgisayar tarafından gerçekleştirilebilir. Öte yandan bilgisayar,

hem kromatograf hem de spektrometrenin enstrümantal değişkenlerinin ayarlanmasında ve kontrolünde kullanılabilir.

Bilgisayarlara depolanan spektral bilgiler, özel yazılımlarla işlenip istenen bilgi halinde bir yazıcıdan çıktı alınabilmektedir. Bilgisayarın belki de en büyük avantajı çok sayıda bileşiğe ait spektrumun sayısal formatta bilgisayarda depolanmış olmasıdır. Böylece analitlere ait spektrumlar, bilgisayar kütüphanesinde depolanmış olan spektrumlarla karşılaştırılarak bileşiğin yapısı, belli bir olasılık düzeyinde, tahmin edilebilmektedir.

2.4. BAL ve ANALİZİ ¹

2.4.1. Balın Tanımı

Türk Gıda Kodeksi 2000/39 sayılı Bal Tebliğinde “Bal; bal arılarının çiçek nektarlarını, bitkilerin veya bitkiler üzerinde yaşayan bazı canlıların salgılarını topladıktan sonra, kendine özgü maddelerle karıştırarak değişikliğe uğratıp, bal peteklerine depoladıkları tatlı madde” olarak tanımlanmıştır. Tanımından da anlaşılacağı üzere bal saf ve doğal olmalı, hiçbir katkı maddesi veya kalıntı içermemelidir.

2.4.2. Balın Sınıflandırılması

Balın sınıflandırılması üretim ve pazarlama şekline ya da kaynağına göre yapılmaktadır. Üretim ve pazarlama şekline göre bal; süzme ve petekli, elde edildiği kaynağına göre ise çiçek ve salgı balı olarak sınıflandırılabilir.

Çiçek balı; genellikle bitkilerin çiçeklerinde bazen de kiraz, bakla, pamuk ve şeftali gibi bitkilerin yaprak sapı ve gövdelerinde bulunan nektar bezlerince salgılanan nektarın arılar tarafından toplanması ile oluşturulan baldır.

¹ Bu bölümdeki bilgiler, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Yaygın Çiftçi Eğitimi Projesi kapsamında hazırlanan YAYÇEP’in “Arıcılık” adlı kitabından alınmıştır.

Salgı balı; çam, meşe, kayın ve ladin gibi orman ağaçları üzerinde yaşayan böceklerin salgıladığı tatlı salgıların arılar tarafından toplanması ile oluşturulan baldır. Ülkemiz için en önemli salgı balı çam balıdır.

2.4.3. Balın Bileşimi

Balın bileşimi, üretimin yapıldığı yöredeki bitki türlerine ve üretimin yapıldığı zamana göre değişmektedir. Ancak genel ortalama olarak balın % 80'i değişik şekerlerden % 17'si sudan meydana gelmektedir. Geri kalan % 3'lük kısım başta enzimler olmak üzere, balı bal yapan ve balı değerli kılan maddelerden oluşur. Balın bileşimini oluşturan maddelerin % ortalama değerleri aşağıda verilmiştir.

Tablo 2.5 Balın bileşimini oluşturan maddeler

Su	% 17,20
Şekerler	% 79,59
Fruktoz (Meyve Şekeri)	% 38,19
Glukoz (Üzüm Şekeri)	% 31,28
Sakkaroz (Çay Şekeri)	% 1,31
Maltoz (Disakkaritler)	% 7,31
Yüksek Şekerler	% 1,50
Asitler	% 0,57
Proteinler	% 0,26
Kül	% 0,17
İz Elementler	% 2,21
Pigmentler	
Tat ve Aroma Maddeleri	
Şeker Alkolleri	
Teninler	
Enzimler	
Vitaminler	

2.4.4. Balın Bileşimini Oluşturan Maddeler

Su

Baldaki su miktarı balın olgunlaşma durumuna bağlı olarak farklılık gösterir. Normal olarak olgunlaşmış ballar % 17 dolayında su içerirler. Baldaki su oranının yüksek olması balın daha kolay bozulmasına neden olur. Bu nedenle süzme bal, tamamen veya en azından yarısı sırlanmış peteklerden elde edilmelidir.

Karbonhidratlar

Bal, kaynağına ve bal özünü bala çeviren arıların salgı bezlerinin salgıladıkları enzimlerin aktivitelerine bağlı olarak yaklaşık 15 çeşit şeker içerir. Ancak, şekerler içerisinde büyük çoğunluğunu fruktoz ve glukoz oluşturur. Balda toplam şeker oranı % 80 dolayındadır.

Mineral Maddeler

Balda; demir, potasyum, kalsiyum, magnezyum, fosfor, silisyum, alüminyum, krom, nikel ve kobalt gibi değerli mineral maddeler vardır. Salgı balları mineral maddelerce daha zengindir. Bu özelliğinden dolayı tedavi amaçlı da kullanılırlar ve kristalize olmadıkları için bazı tüketiciler tarafından tercih edilirler.

Proteinler

Balın kaynağına bağlı olarak, proteinlerin yapı taşları olan aminoasitler ballarda oldukça düşük düzeylerde bulunurlar. Balda 17 adet farklı aminoasit tespit edilmiştir.

Asitler

Asitler, bala kendine has kokuyu veren maddeler olup balın asidik yapıda olmasını sağlarlar. Balın pH değeri değişik şartlar altında 3,4 ile 6,1 arasında değişmekle birlikte ortalama olarak 3,9'dur.

Enzimler

Balda, bir kısmı bitkilerden bir kısmı da arının salgı bezlerinden gelen değişik enzimler bulunur. Enzimler balın en değerli maddeleridir. Doğal ve ısıtılmamış

ballarda enzim miktarı oldukça yüksek olup bu tür ballar kaliteli ve çok değerlidir. Bal ısıtıldığı oranda enzim değerinde kayıplar olur.

Vitaminler

Bal, kaynağına ve içerisindeki polenlerin miktar ve çeşidine bağlı olarak B, C, E ve K vitaminleri içerir.

2.4.5. Balın Fiziksel Özellikleri

Renk Özelliği

Balın rengi, elde edildiği kaynağına bağlı olarak su renginden siyaha kadar büyük bir varyasyon gösterir. Ayrıca, balın ısıtılması ve uzun süre açıkta tutulması balın rengini değiştirmektedir.

Viskozite

Balın bünyesi ya da akıcılığına karşı koyma özelliği de denilen viskozite, bal içinde mevcut su oranı ile yakından ilgilidir. Balı ısıtarak viskozitesini azaltmak mümkündür.

Işığın Döndürme

Balın polarize ışığı sağa ve sola döndürmesi, balın kaynaklarına göre farklılık gösterir. Nektar balları ışığı sola, salgı balları ise sağa döndürmektedir. Sakaroz denen çay şekeri de ışığı sağa döndürür. Bu özellik sahte balların tanınmasında yardımcı olur.

2.4.6. Balın Kimyasal Özellikleri

Balın Tadı ve Kokusu

Bal, elde edildiği kaynağına bağlı olarak kendine has tat ve kokuya sahiptir. Bu itibarla ısıtma, işleme, depolama gibi işlemlerde balın kendine özgü tat ve kokusunu değiştirecek yanlış uygulamalardan kaçınmak gerekir.

Balın Şekerlenmesi

Bazı tanım ve hükümleri “Bal Standardı” bölümünde verilen 2000/39 sayılı “Bal Tebliği”nde kristalize bal “kristalizasyon metotlarının herhangi birine tabi tutularak veya balın kristalleşmesi için herhangi bir işleme tabi tutulmaksızın tamamen veya kısmen şekerleşmiş, krema ve fondan kıvamındaki bal” şeklinde tanımlanmıştır. Görüldüğü gibi balın şekerlenmesi bozulma olmayıp balın elde edildiği bitkisel kaynağa göre oluşabilen doğal bir olaydır. Ancak, tüketicilerin çoğu kristalize olan balı bilgisizlik sonucu hileli bal olarak düşünürler. Gerçek olan, pek çok doğal ve kaliteli balın çok çabuk hatta süzme aşamasından hemen sonra bile şekerlenmeye başlayabileceğidir.

Balın şekerlenip şekerlenmemesi üzerine; balın su, glikoz ve früktoz oranları, balın depolanma sıcaklığı, depolama sıcaklığının dalgalanması ve balda bulunan polen gibi katı partiküllerin miktarı etkili olmaktadır. Balın früktoz oranı düşerken glikoz oranının artması şekerlenmeyi destekler. Ancak, son yapılan çalışmalarda balın şekerlenme eğiliminin belirlenmesinde daha çok glikoz/su oranı üzerinde durulmaktadır. Buna göre, glikoz/su oranı 1,7'den daha düşük balların şekerlenmediği, bu oranın 2,1'den daha yüksek olan balların ise kısa sürede şekerlendiği bildirilmektedir.

Özellikle tüketicilerin bilgilendirilmesi yönünden tekrar etmek gerekirse, balın şekerlenmesi tamamen doğal bir olaydır ve balın kalitesini etkilemez. Batı ülkelerinde kristalize olmuş hatta özel yöntemlerle kristalleştirilip krem haline getirilmiş ballar zevkle tüketilirken ülkemizde bu tür ballara şüphe ile bakılması büyük bir yanlış olup doğal ve kaliteli bala yapılabilecek en büyük haksızlıktır.

Balın kristalleşmesini önlemek için bazı yöntemler önerilse de çoğu ya yasal değildir ya da pratik uygulamadan uzaktır. Uygulanabilecek en basit yöntem balın önce 25°C'de 5 hafta bekletilmesi, sonra da 14 °C'de saklanmasıdır. Tüketiciler, istediklerinde kristalize olan balı sıvı hale getirmek için bal kabını, sıcaklığı 38 °C'yi geçmeyen ılık su içinde tutabilirler.

Ayçiçeği, yonca, kavun, karahindiba, pamuk balları çok çabuk şekerlenirken akasya, hardal, orman gülü ve salgı balları geç şekerlenir. Adaçayı balı yıllarca şekerlenmeden kalabilir.

Balın Fermantasyonu

Balın içindeki şekerlere dayanıklı mayalar, özellikle su oranı yüksek balların fermantasyonuna (ekşimesine) neden olur. Sırlanmış ve olgunlaşmış balların su oranı daha az olduğu için ekşimesi zordur. Bu yüzden ballar olgunlaşmadan hasat edilmemelidir. Balın ekşimesini önlemek veya geciktirmek için bal, belli sıcaklıklarda, belli sürede ısıtılıp pastörize edilebilir. Ancak her ısısız işlem balın kalitesini ve değerini olumsuz yönde etkiler.

Balın Antibakteriyel Özelliği

Bal, antibakteriyel bir özelliğe sahip olduğundan içerisinde mikroorganizma yaşayamaz ve çoğalamaz. Son yıllarda bütün dünyada hızla gelişen arı ürünleri ile tedavi olarak adlandırılan “apiterapi”de arı zehiri, propolis, arı sütü ve polen yanında bal da kullanılmaktadır. Arı ürünlerinin tümünün genel sağlık ve vücut direncini koruması yanında tedavi edici özellikleri de vardır. Balın antibakteriyel özelliği; asidik yapıda oluşuna, büyük oranda kuru madde (şeker) ve ayrıca enzimlerle glikozun parçalanması sonucu oluşan antiseptik bir madde olan hidrojen peroksit içermesine bağlıdır. Yüksek oranda şeker içeren bal, yüksek oranda su içeren hastalık etmeni mikroorganizmanın su kaybederek ölmesine ya da çoğalamamasına yol açarak antibakteriyel etkisini gösterir.

2.4.7. Bal Standardı

Bal, 22 Ekim 2000 tarihinde kadar “TS 3036” sayılı bal standardı ile tanımlanmaktaydı. Ancak, bundan böyle bu tarihte 24208 sayılı Resmi Gazetede yayımlanarak yürürlüğe giren Türk Gıda Kodeksi 2000/39 sayılı “Bal Tebliği” hükümlerince tanımlanmaktadır. Bal tebliği’nin 6. maddesinin bazı hükümleri aşığıda verilmiştir. Buna göre;

- Balın nem miktarı % 20'den, asitlik miktarı 40 meg/kg'dan fazla olamaz .
- Balda diastaz sayısı 8'den az olamaz, ancak narenciye balı gibi yapısında doğal olarak düşük miktarda enzim içeren ve doğal olarak HMF miktarı 15 mg/kg'dan fazla olmayan balda diastaz sayısı 3'den az olamaz.
- Balda hidroksimetil furfurool(HMF) miktarı 80 mg/kg'dan fazla olamaz.
- Bala herhangi bir madde katılmaz ve yapısında bulunan herhangi bir madde uzaklaştırılmaz.
- Bal ticari glukoz, naftalin ve nişasta içeremez.

İlgili tebliğde balın ambalajlanması, etiketlenmesi ve diğer konularında ayrıntılı tanım ve açıklamalara yer verilmiştir. Bu nedenle balla ilgilenen herkesin Bal Tebliği'ni bilmesi ve buna göre hareket etmesi zorunludur.

2.4.8. Bal Analizleri

Bal aynı bitki kaynağından elde edilmiş olsa bile iklimsel ve coğrafik koşullar balın uçucu bileşen yapısını değiştirir. Bal esasen fruktoz ve glukoz (oran 1,2/1) monosakkaritlerinden oluşur. Sukroz (sakkaroz) kuru kütleinin % 1'i düzeyindedir. Protein miktarı % 0,5'den azdır; bunların bir kısmı enzimdir. Bunlar; invertaz, diastaz, glukoz oksidaz ve katalazdır.

Bal şu şekillerde taşış edilir:1-Sulandırılır, 2- Fruktozca zengin şuruplar eklenir.

Balın azot içeriği düşük ve değişkendir. Ortalama miktar 40 mg/100g bal'dır, ancak standart sapma çok yüksektir. Azotlu bileşiklerin % 50-85'si prolinden ibarettir. Çeşitli amino asitlerin derişimleri arasındaki oranın balın coğrafik kaynağı hakkında bilgi vereceği düşünölmüştür. Ancak, tek bir amino asit veya amino asit grubunun balı karakterize edemeyeceği görölmüştür. Farklı ölkelerde üretilen ballardaki serbest amino asit analiz sonuçlarının bir istatistiksel yöntem olan "canonical variate" analizi ile farklılandırılabilir olduğu görölmüştür. Genel olarak; balın coğrafik veya bitkisel orijinini belirlemede amino asit profilinin protein bileşiminden daha uygun olduğu gösterilmiştir. Baldaki uçucu bileşikler bala özel kokuyu belirler. Bu bileşiklerin

niteliği hem bitkisel orijine hem de balın elde ediliş yöntemine bağlıdır. Uçucu bileşiklerin miktarı balın depolanması ile de değişmektedir (Anklam, 1998).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar

Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasallar tablo 3.1’de belirtilmiştir.

Tablo 3.1. Deneyslerde kullanılan kimyasal maddeler.

Kimyasal	Firma	No
Dietil Eter	Merck	M1.00921.5000
n-pentan	Merck	M8.20927.2500
MgSO ₄ .7H ₂ O	Merck	M1.05886.0500
NaCl	Merck	M1.06404.1000
Barbitürik asit	Merck	M1.00132.0100
Sitrik asit monohidrat	Merck	M1.00242.0100
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	Merck	M1.06573.0500
p-toluidin	Merck	M1.10841.0050
İyot	Riedel de Haen	R30305
HCl (%38, d: 1,19 kg/L)	J.T. Baker	0135510001
NaOH	Merck	1.06462.1000
Nişasta	Merck	1.01252.0100

3.2. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar tablo 3.2’de belirtilmiştir.

Tablo 3.2. Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar

Cihaz	Marka, model
Analitik terazi	Sartorius, GC1603S-OCE
Mikropipet takımı (10– 100 µL; 100– 1000 µL; 0,5– 5 mL)	Transferpette
Çalkalayıcı	Heidolph, PROMAX 2020
Etüv	Nüve, FN 400
Manyetik karıştırıcı	VELP Scientifica,
Gaz Kromatografi - Kütle spektrometresi	Varian, 3800
Bilgisayar yazılımı	Varian Gaz kromatografi- Kütle spektrometresi programı. Saturn 2000
Santrifuj aygıtı	Hettich EBA 8S
pH metre	WTW İmolab pH/ion Level2
Ultrasonik banyo	Ultrasonik LC 30

3.3. İşlemler

3.3.1.Çözeltilerin hazırlanması

İyot çözeltisi (0,1 N)

Analitik saflıktaki iyottan 1,27 g analitik terazide tartılmıştır. İyodun sudaki çözünürlüğünün düşük olmasından dolayı KI ilave edilip çözünürlük artırılmış ve distile su ile balonjojede 100 mL’ye tamamlanmıştır.

Sitrik asit monohidrat çözeltisi

Analitik saflıktaki sitrik asit monohidrat’tan ($C_6H_8O_7 \cdot 2H_2O$) 21,01 g/1000 mL olacak şekilde tartılıp distile suda çözünmesiyle hazırlanmıştır.

Disodyum hidrojen fosfat dodekahidrat çözeltisi

Analtik saflıktaki disodyum hidrojen fosfat dodekahidrat'tan ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 52,58 g/1000 mL olacak şekilde tartılıp distile suda çözünmesiyle hazırlanmıştır.

Hidroklorik Asit Çözeltisi (yaklaşık 0,5 N)

Yoğunluğu 1,19 g/mL olan kütlece % 37'lik derişik asitten 2,8 mL alınıp 500 mL'lik balonjojede distile su ile hazırlanmıştır.

Sodyum Hidroksit Çözeltisi (0,5 M)

Analitik saflıktaki sodyum hidroksitten (NaOH) 10 g/500 mL olacak şekilde tartılıp distile suda çözünmesiyle hazırlanmıştır.

Fosfat/Sitrat Tamponunun Hazırlanması

Sitrik asit çözeltisinden 469 mL 2 L'lik behere alınmış ve üzerine fosfat çözeltisinden 531 mL ilave edilmiştir. Beher, magnetik karıştırıcı ile orta hızda karıştırılırken cam elektrotlu pH metre ile pH'sı kontrol edilmiştir. Karışımın pH'sını 5,2'ye getirilmek için ölçülen pH 5,2'den büyükse hazırlanan HCl çözeltisinden birkaç damla, eğer küçükse de NaOH çözeltisinden birkaç damla eklenmiştir.

Sodyum Klorür Çözeltisi (0,1 N)

Analitik saflıktaki sodyum klorürden (NaCl) 2,93 g/500 mL olacak şekilde tartılıp distile suda çözülerek hazırlanmıştır.

Nişasta Çözeltisinin Hazırlanması

Suda tamamen çözünebilen nişastadan yaklaşık 1 g alınıp 60 mL su ile beherde karıştırılmıştır. Çözünürlüğü arttırmak için karışım ısıtılmıştır. Çözelti birkaç dakika kaynatıldıktan sonra beher alınıp ağzı kapatılarak çözeltinin soğutulması sağlanmıştır. Soğutulan çözelti, daha sonra balonjojede 100 mL'ye distile su ile tamamlanmıştır.

Nişasta + Fosfat/sitrat Tampon Karışımı

Fosfat/sitrat tamponundan 40,0 mL, nişasta çözeltisinde 100,0 mL ve daha önce hazırlanmış olan 0,1 N NaOH çözeltisinden 20,0 mL alınıp bir reaktif kabına aktarılmıştır.

p-Toulidin özeltisi (100 g/L)

Analitik saflıktaki p-toluidin (C_7H_9N) 10,0 g/50,0 mL olacak şekilde tartıldıktan sonra bir miktar izopropil alkol (C_3H_8O) içinde su banyosunda hafif ısıtılarak özölmüştür. Daha sonra 100 mL'lik balonjojeye aktarılıp üzerine 10,0 mL buzlu asetik asit ilave edilip 100 mL'ye izopropil alkol ile tamamlanmıştır.

Barbütürik Asit özeltisi (%0,5)

Analitik saflıktaki barbütürik asit ($C_4H_4N_2O_3$) 0,5 g/100 mL olacak şekilde tartıldıktan sonra distile suda çözölerek hazırlanmıştır.

Oksijensiz Distile Su

Belli bir miktar distile su alınıp kaynayıncaya kadar ısıtılır. Daha sonra % 99,99'lük azot gazı geçirilir ve su soğutulur. Ağzı hava sızdırmayan bir reaktif kabında korunur.

3.4. Konvansiyonel Bal Deneyleri

Diastaz sayısı ve metil furfurol tayinleri, ilgili TSE (Mart 2002, TS 3036) standartlarında tanımlanan deneylerden yararlanılarak yapılmıştır.

Baldaki Diastaz Sayısının Belirlenmesi

10,0 g bal tartılıp ön ısıtma yapılmıştır ve 100 mL'lik beherde distile su ile çözünüp hazırlanmıştır. Aşağıdaki tabloda belirtilen işlemler yapıldıktan sonra son hacim 18 mL olmuştur.

Tablo 3.3 Diastaz sayısının hesaplanmasında kullanılan çözeltilerin hazırlanışı.

Tüp No	Bal Çözeltisi (mL)	Distile su (mL)	Nişasta + Tampon	Toplam hacim (mL)
1	10,0	5,33	2,67	18
2	10,0	3,3	4,7	18
3	10,0	0	8,0	18
4	7,7	2,3	8,0	18
5	6,0	4,0	8,0	18
6	4,6	5,4	8,0	18
7	3,6	6,6	8,0	18
8	2,8	7,2	8,0	18
9	2,1	7,9	8,0	18
10	1,7	8,3	8,0	18
11	1,3	8,7	8,0	18
12	1,0	9,0	8,0	18

Hazırlanan bu tüpler sıcaklığı 40 °C olan su banyosunda konulup 1 saat beklenildi. Bu süre sonunda her bir tüpe bir damla iyot çözeltisi damlatıldıktan sonra renk değişimi gözlemlendi. İlk kalıcı mavi rengi gösteren tüp sınır olarak belirlendi. Bir önceki deney tüpüne karşılık gelen diastaz sayısı kaydedildi. Bu işlem bütün ballar için tekrarlanmış ve balların diastaz sayıları belirlendi.

Baldaki Hidroksimetil Furfurol Miktarının Belirlenmesi

Ön ısıtmaya maruz kalmamış 10,0 g bal alınıp 50 mL oksijensiz suda çözüldü. Hazırlanan bu çözeltilerden iki ayrı deney tüpüne 2'şer mL konuldu. İki tüpe de daha önce hazırlanan 5 mL p-toluidin çözeltisi ilave edildi. İki deney tüpünden birine 1 mL su (referans çözelti), diğerine ise 1 mL barbüterik asit konuldu. Bu şekilde hazırlanan çözeltilerin spektrofotometrede 550 nm dalga boyundaki değerleri okunup, kaydedildi.

3.5. Baldaki Uçucu Bileşenlerin Analizi

Aydın-Denizli-Muğla yörelerinde alınan balları analize hazırlamak için şu işlemler yapılmıştır: Bir bal örneğinden yaklaşık 10 g bal alınıp 10 mL distile su ile küçük bir behere konuldu ve manyetik karıştırıcı yardımıyla çözünmesi sağlandı. Karıştırma sırasında ortama 1 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ eklenildi. Homojen bir karışım elde edilince karışım beherden erlene aktarıldı. Erleneki karışım üzerine organik faz olarak 15 mL dietil eter/n-pentan (2:1) karışımı konuldu ve oda sıcaklığında ultrasonik banyoda 15 dk. çalkalanarak baldaki uçucu bileşenlerin organik faza ekstraksiyonu sağlandı. Ekstraksiyon işlemi sonrasında numune ayırma hunisine aktarıldı ve üzerine ayırmanın daha iyi gözlenebilmesi için 10 mL doymuş NaCl çözeltisi ilave edilip karışım çalkalandı. Alt kısımda su olmak üzere iki faz birbirinden ayrıldığında su fazı atılıp organik faz bir santrifüj tüpüne alındı. Organik fazda bulunan katı taneciklerin kromatografik kolonu kirletmesine engel olmak için tüp, 10 dk süre ile 3000 rpm'de santrifujlendi. Santrifuj sonrasında tüp üstündeki berrak çözelti bir başka tüpe aktarılıp, düşük hızda olmak üzere azot gazı ile üflenerek hacim küçültüldü. Son hacmi 2 mL olan numune GC-MS aygıtı otomatik enjektöründe kullanılan vidalı kapaklı özel şişelere (vial) konuldu ve analiz yapılincaya kadar 4 °C'de buzdolabında bekletildi.

GC-MS Optimum Koşullarının Belirlenmesi

Çeşitli bal örneklerinde yapılan uçucu bileşen analizlerinin tanımlandığı literatürden esinlenmekle birlikte ADÜ Kimya Bölümünde bulunan gaz kromatograf cihazı ile ADÜ Merkez Araştırma Laboratuvarında bulunan GC-MS ve İYTE Kimya Bölümünde bulunan GC-MS cihazlarıyla yapılan ön denemelerde farklı bal örneklerinin karakterizasyonuna imkan verecek sayıda ve birbirinden yeter rezolüsyonda ayrılmış piklerin makul bir sürede gözlenebileceği kromatografik koşullar aşağıdaki gibi belirlenmiştir.

Tablo 3.4 Gaz kromatografi-Kütle spektrometre cihazının optimum koşulları

Enjeksiyon bloğu sıcaklığı	220 °C
Sıcaklık Programlama	
İlk sıcaklık: 50 °C	Süre: 5 dk
Sıcaklık artış hızı:	5 °C/dk
Son sıcaklık: 300 °C	Süre: 5 dk
Toplam analiz süresi	60 dk

4. BULGULAR

4.1. Gaz Kromatografisi – Kütle Spektrometresi Sonuçları

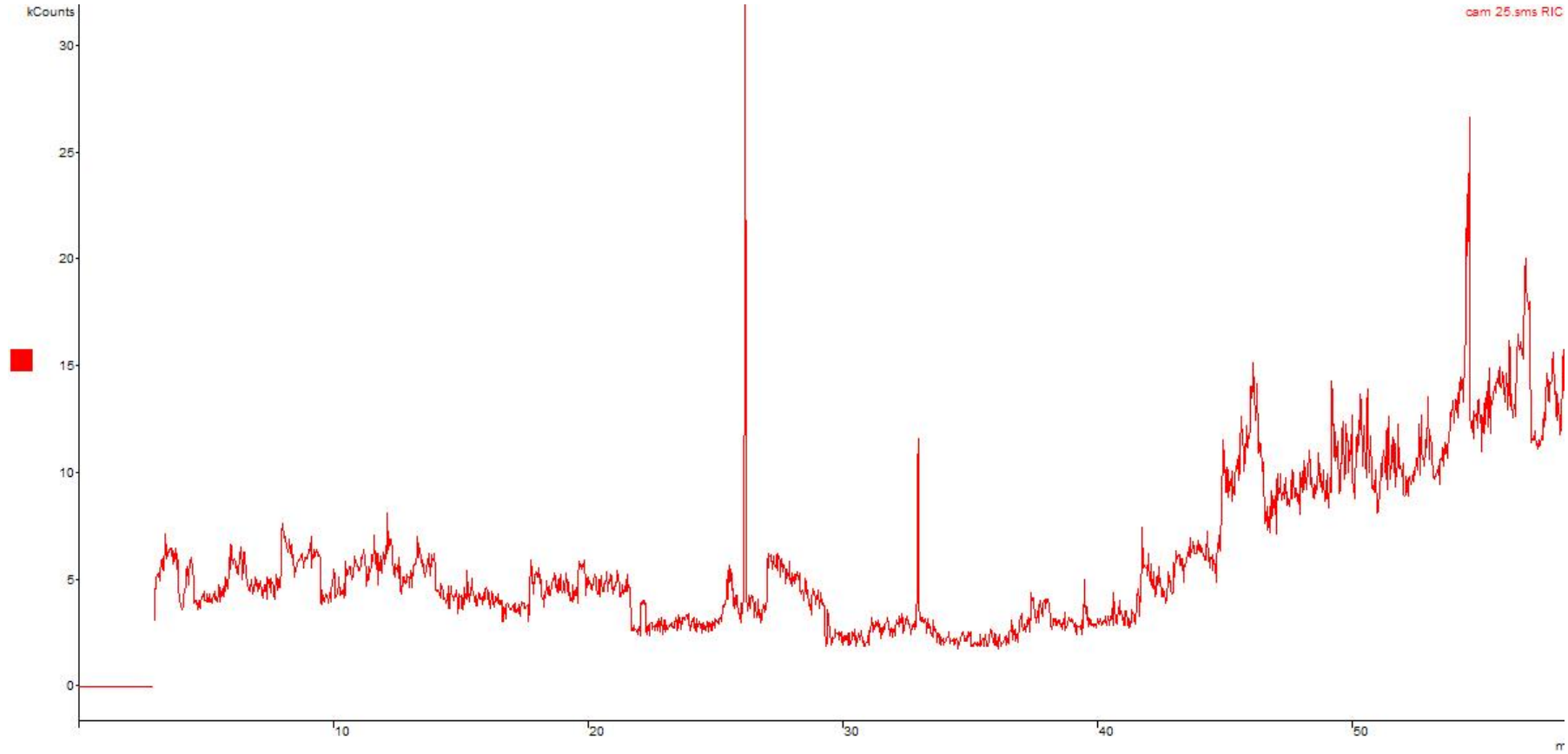
Birbirinden farklı dokuz bitki orijinli toplam on adet bal örneği (ikisi çam balı) bölüm 3.5’de anlatıldığı şekilde işleme uğratılarak bunların 12 aylık bir dönem içinde farklı zamanlarda, yine bölüm 3.5’te gösterilen kromatografik koşullarda GC-MS spektrumları alındı. Gerekirse istatistiksel analizlere olanak vermek üzere dokuz adet bal numunesinden toplam 60 adet kütle spektrumu elde edildi. Bal numuneleri ve her birinden elde edilen spektrum sayıları aşağıda gösterilmiştir.

Tablo 4.1 Bal örneklerinden alınan spektrum sayıları

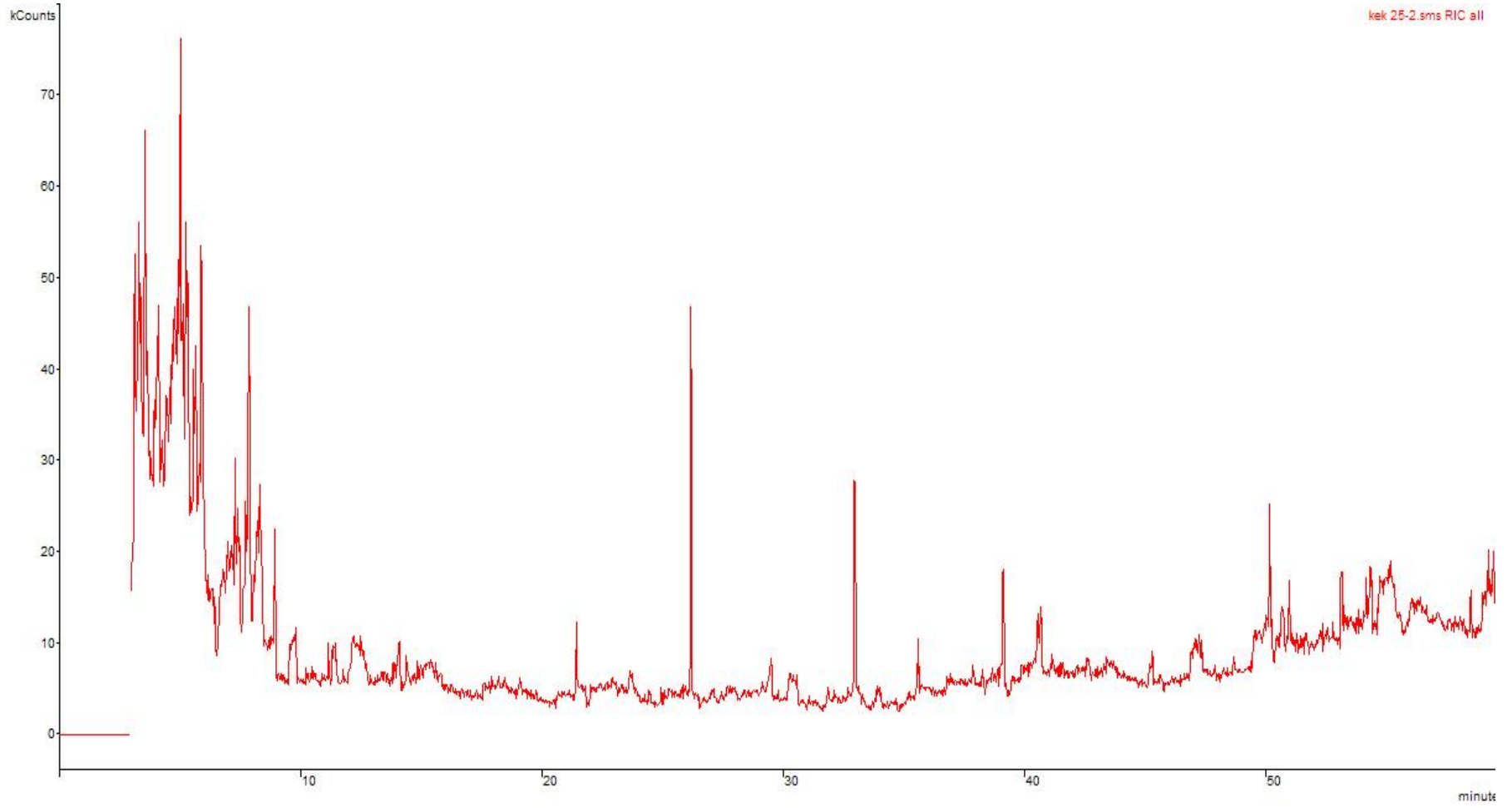
No	Numune	Spektrum sayısı
1	Çam Balı	8
2	Portakal Balı	9
3	Kekik Balı	13
4	Lavanta Balı	5
5	Keçi Boynuzu	5
6	Okaliptus Balı	5
7	Püren Balı	5
8	Hayıt Balı	5
9	Adaçayı	5

Yukarıdaki 9 adet baldan dört tanesi Aydın Ticaret Odası Borsa Laboratuvarından temin edildi. Balların bitki orijinleri laboratuvar yetkileri tarafından belirtildi. Diğerleri (Çam, portakal, lavanta, kekik, adaçayı, püren) Marmaris “Gökmen Balcılık”tan temin edildi. Balın orijini etiket üzerinde belirtilmişti. Aynı dönemde okunan her bir bal numunesine ait gaz GC-MS ile elde edilen kromatogramlar aşağıda şekil 4.1-4.9’da gösterilmiştir. Kromatogramlardaki piklerin tanımlanmasında gerekli olan alıkonma indisini (Kovat indisi) hesaplayabilmek için

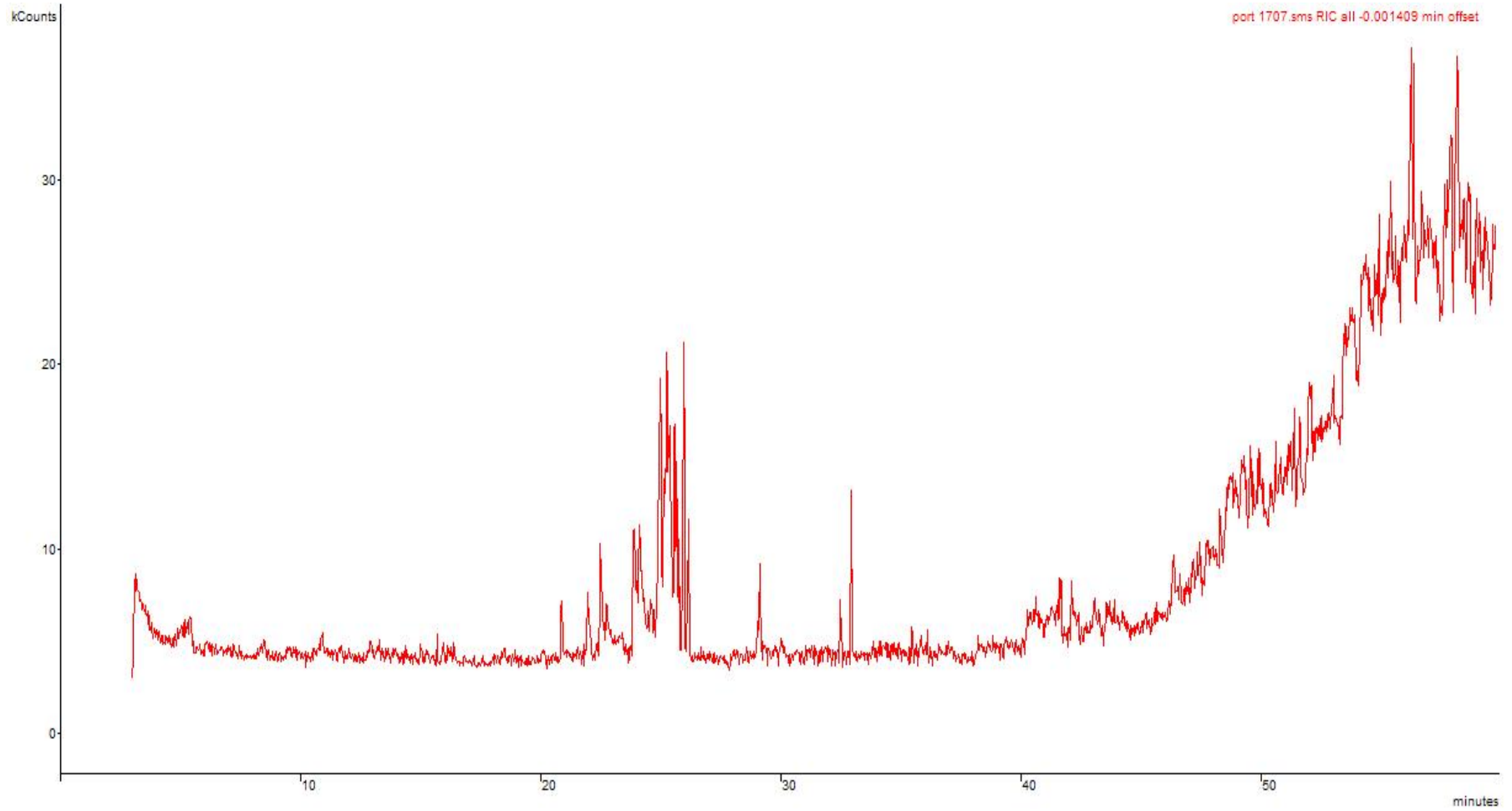
dokuz adet normal hidrokarbon içeren 3 adet standart hidrokarbon karışımının aynı kromatografik koşullarda kromatogramları/spektrumları alınmıştır. Bu üç standarda (C₁₀-C₁₆, C₁₈-C₂₄, C₂₂-C₃₂) ait kromatogramlar şekil 4.10-4.12 arasında gösterilmiştir.



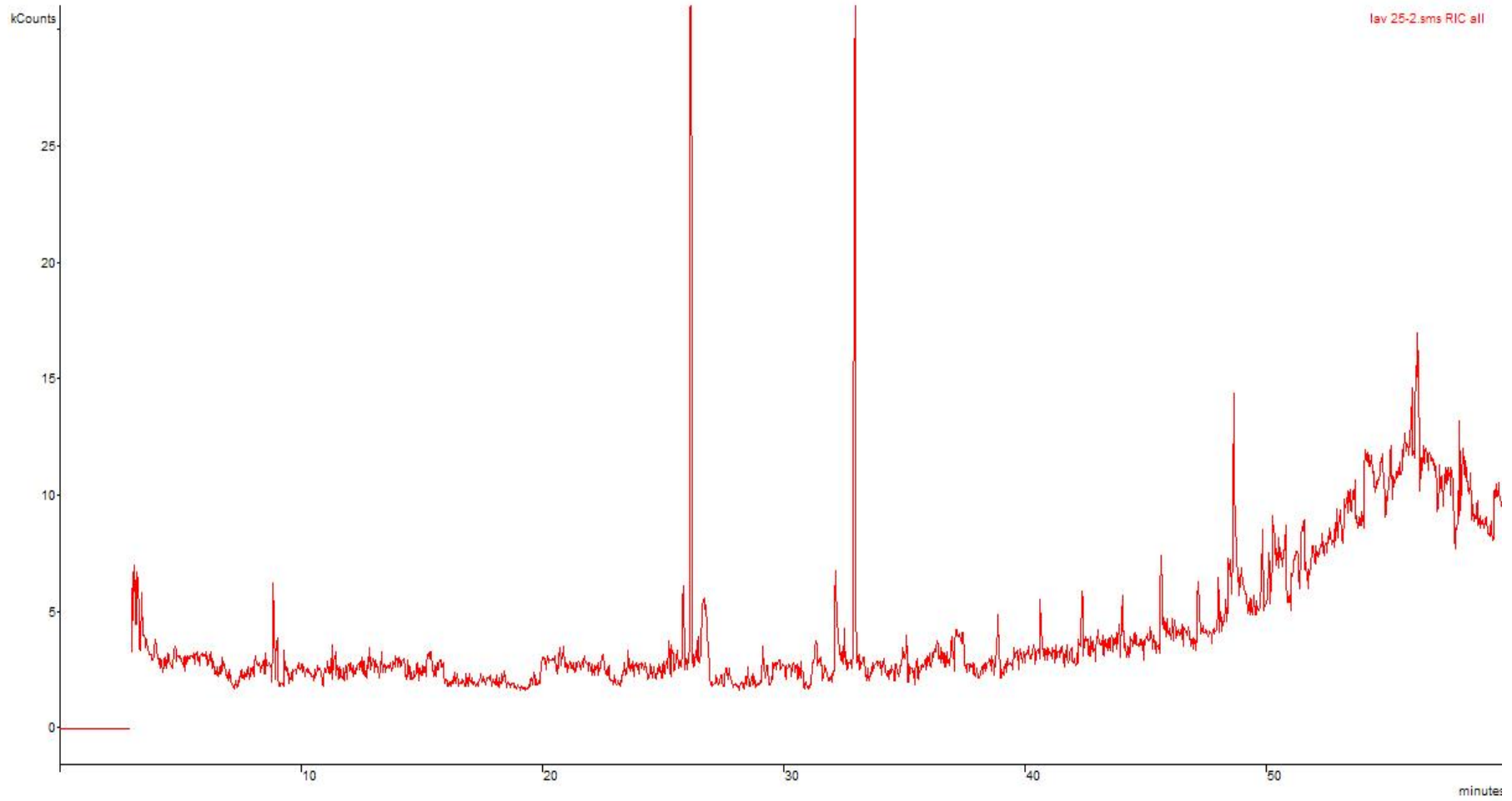
Şekil 4.1 Çam balının Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometri cihazından alınmış bir kromatogramı



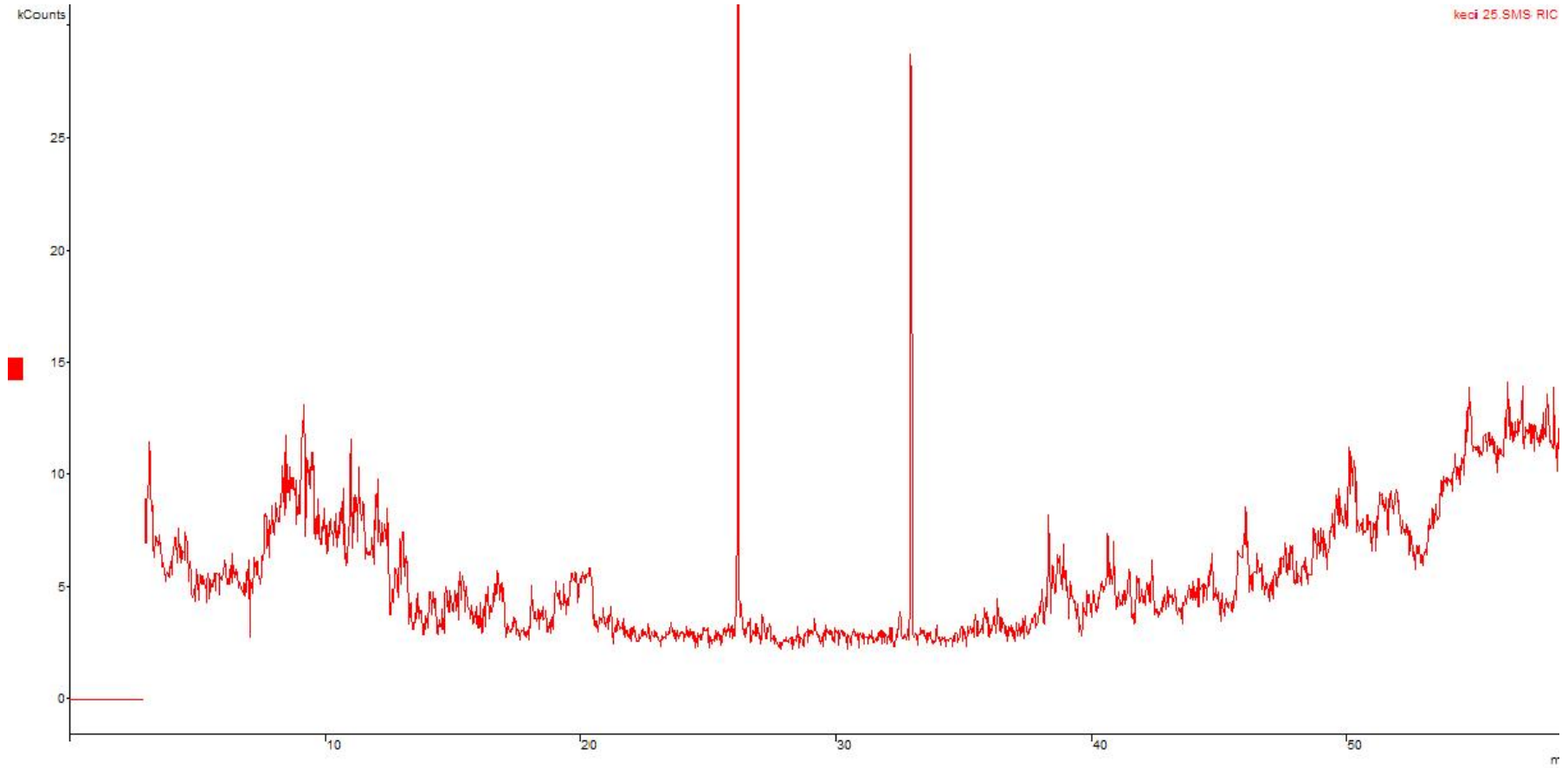
Şekil 4.2 Kekik balının Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometri cihazından alınmış bir kromatogramı



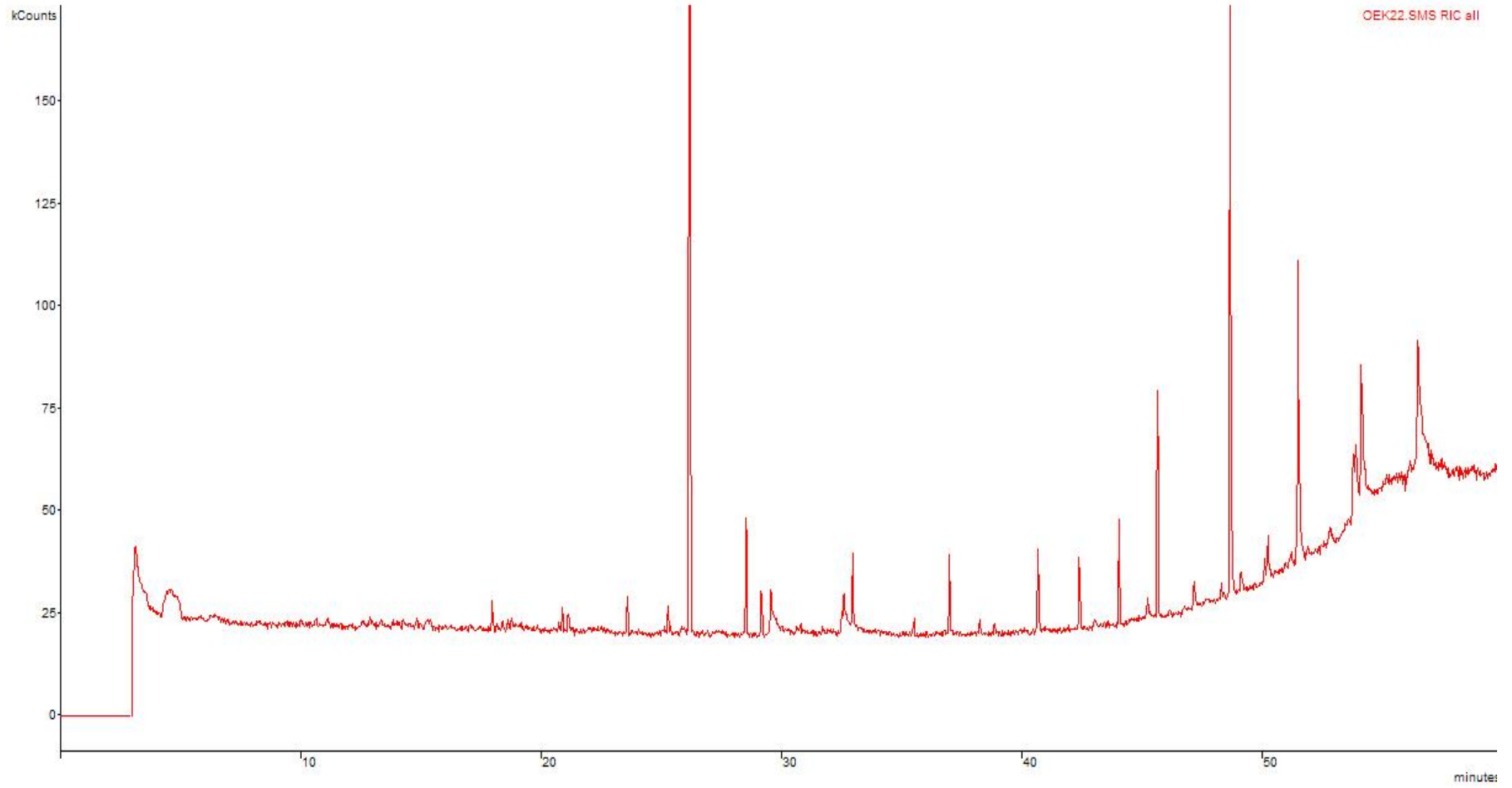
Şekil 4.3 Portakal balının Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometri cihazından alınmış bir kromatogramı



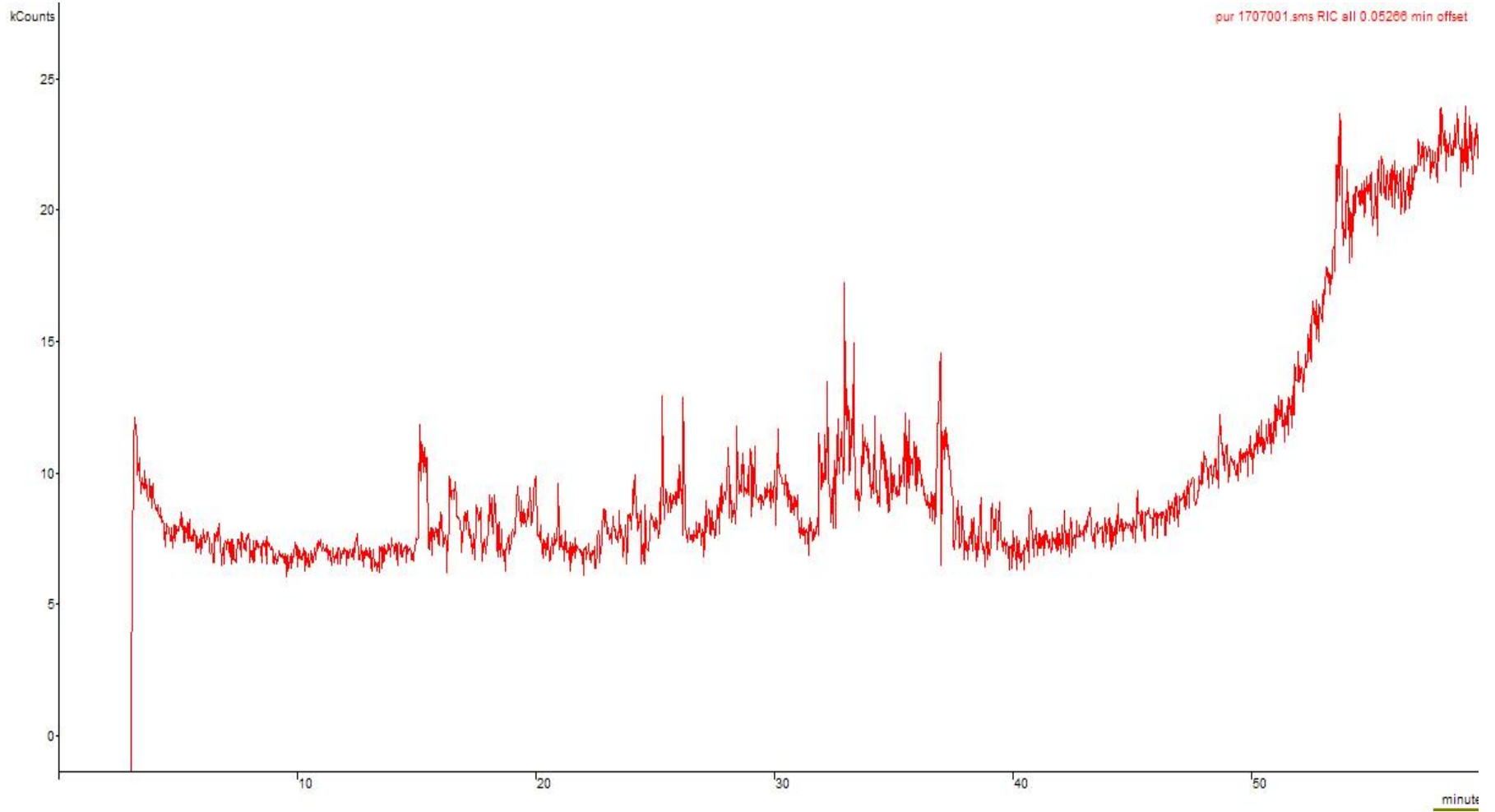
Şekil 4.4 Lavanta balının Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometri cihazından alınmış bir kromatogramı



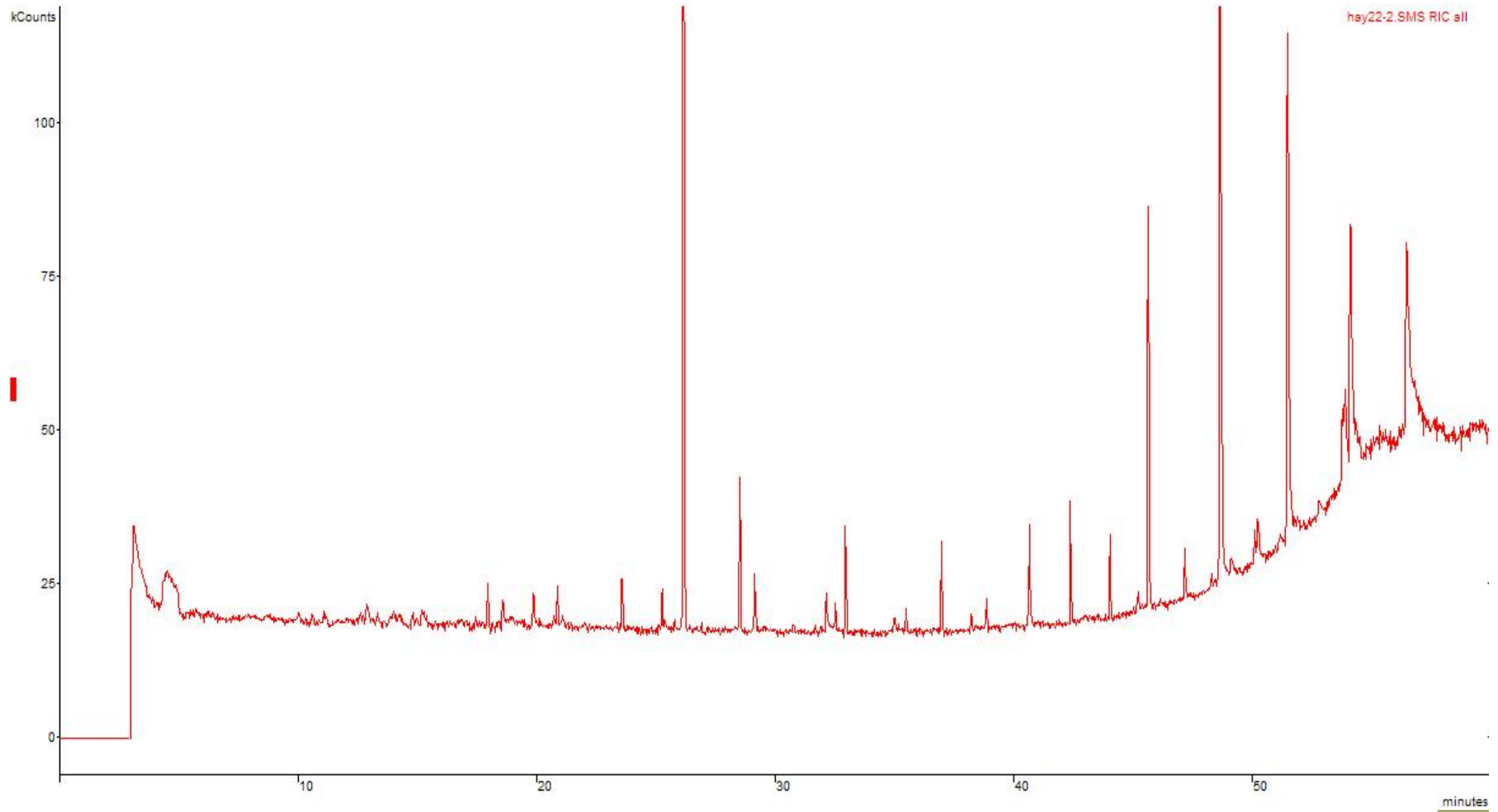
Şekil 4.5 Keçiboynuzu balının Gaz Kromatogafi-Kütle Spektrometri cihazından alınmış bir kromatogramı



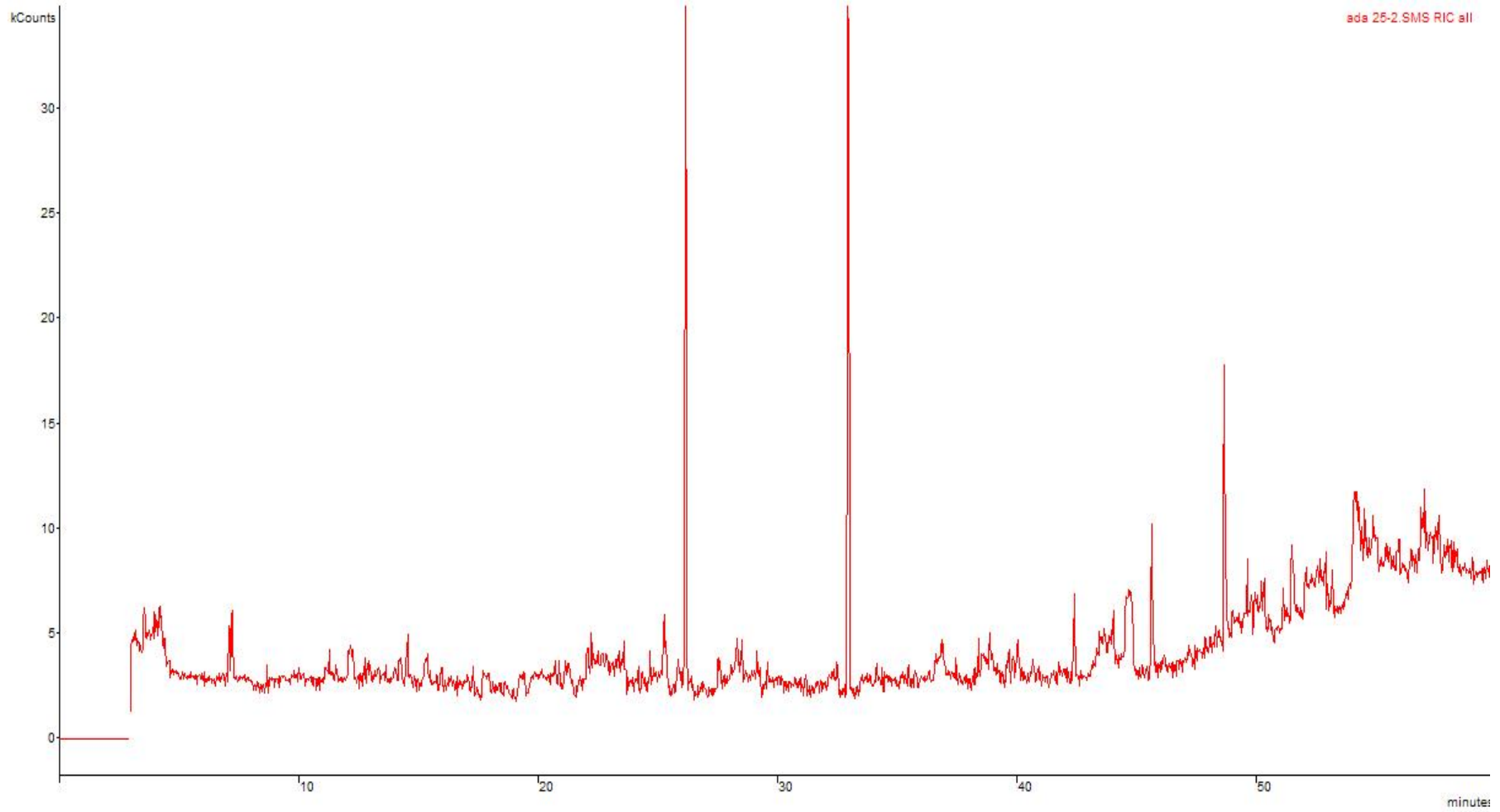
Şekil 4.6 Okaliptüs balının Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometri cihazından alınmış bir kromatogramı



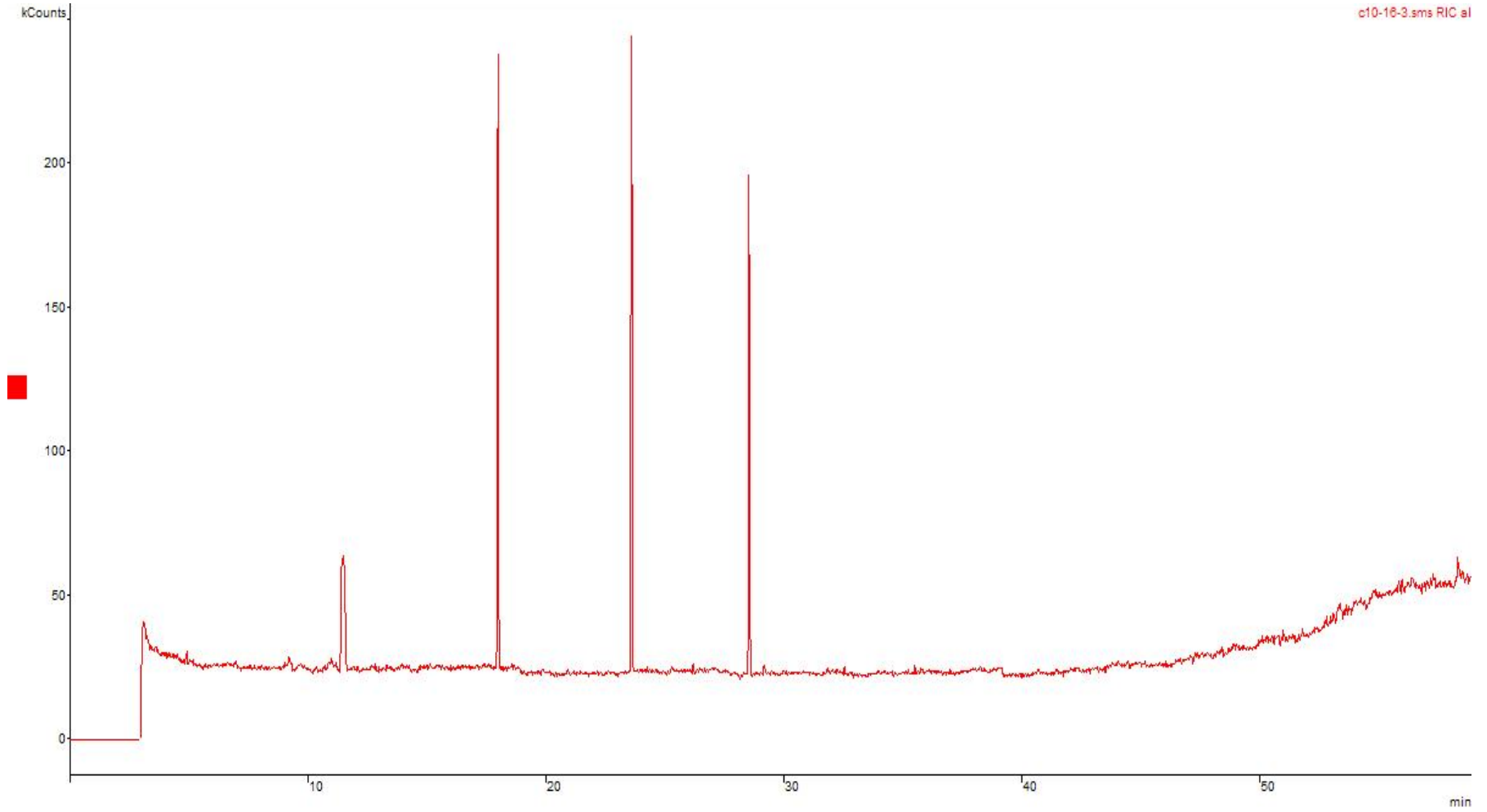
Şekil 4.7 Püren balının Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometri cihazından alınmış bir kromatogramı



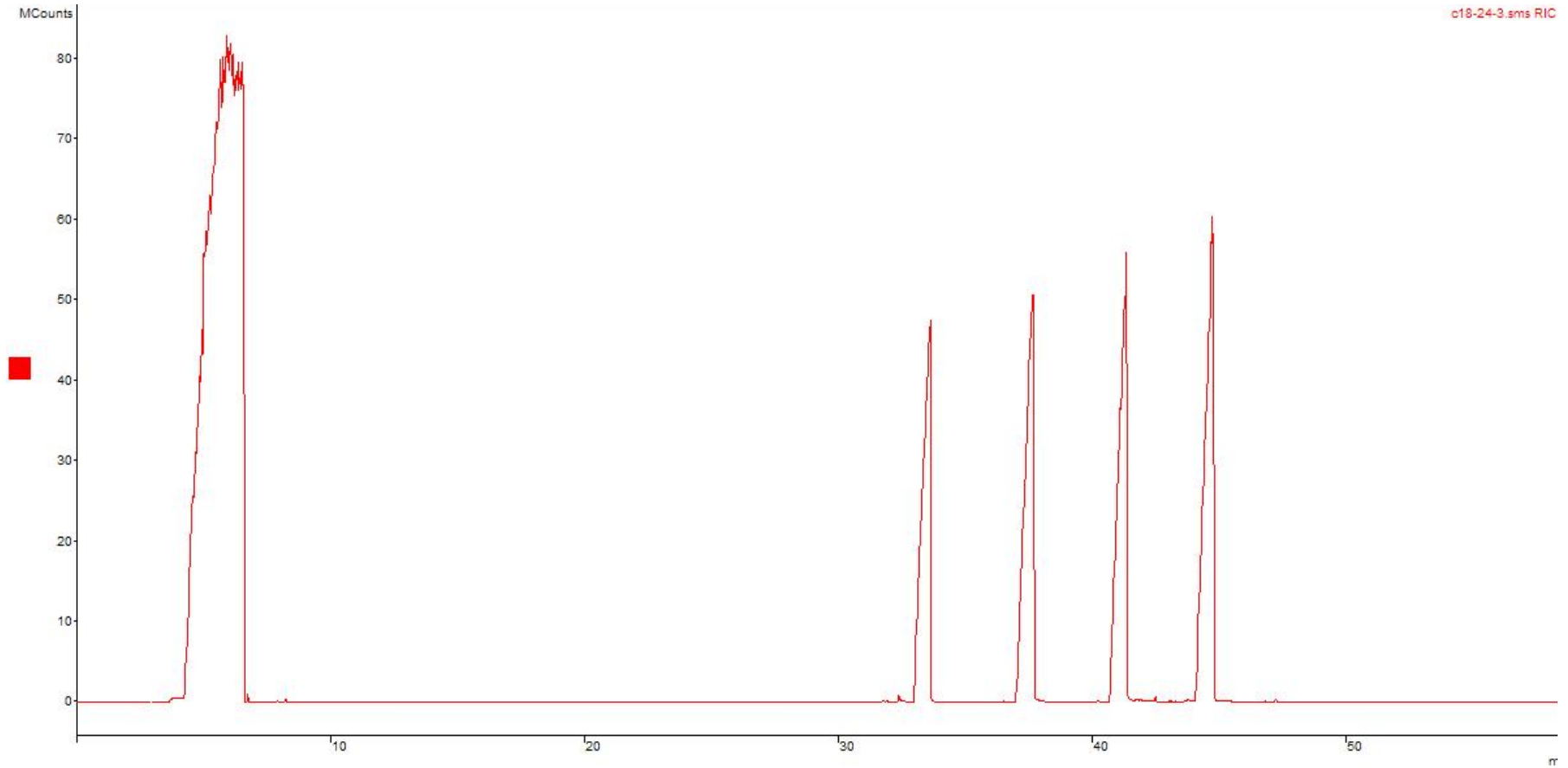
Şekil 4.8 Hayıt balının Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometri cihazından alınmış bir kromatogramı



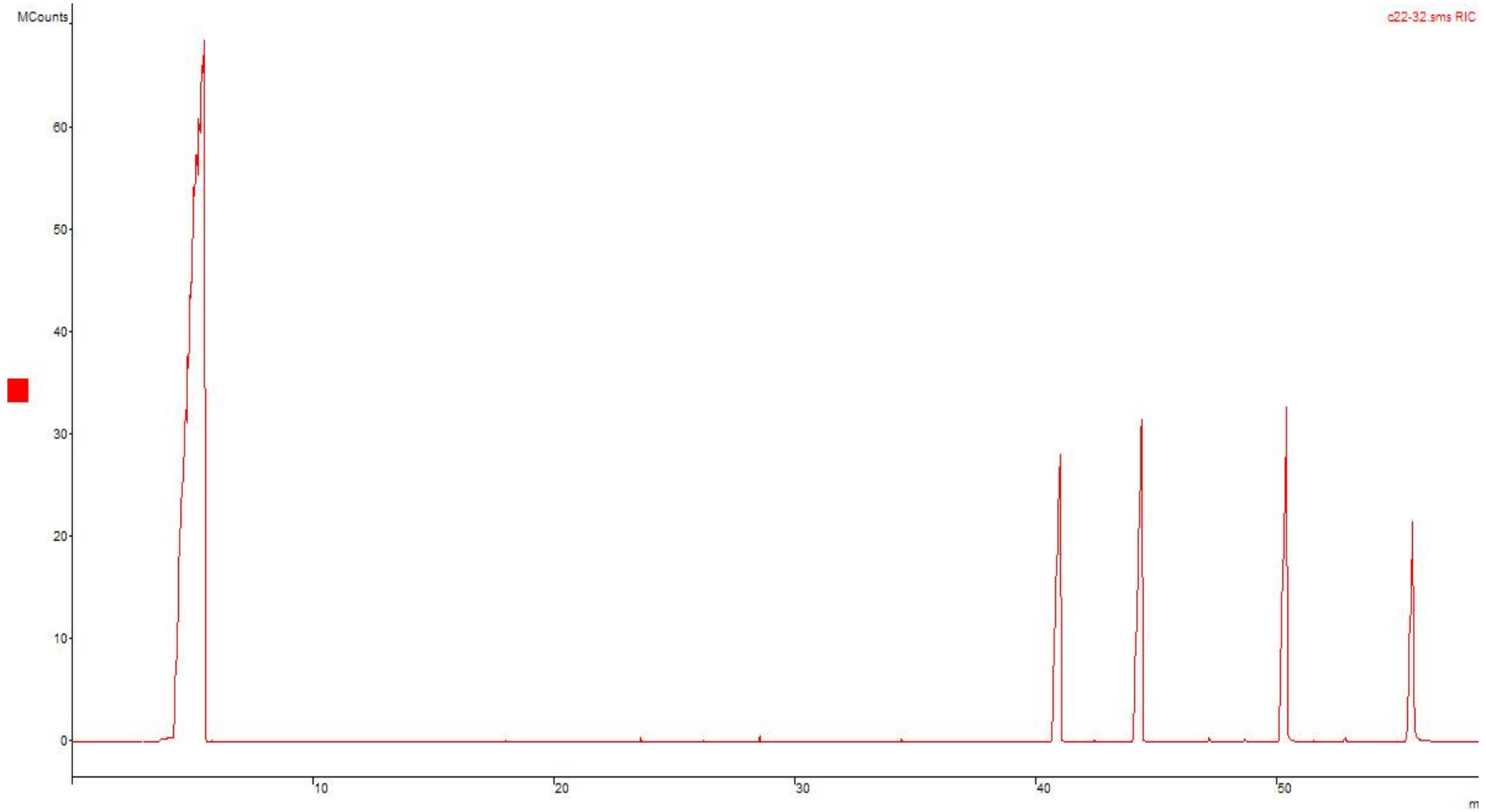
Şekil 4.9 Adacıyı balının Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometri cihazından alınmış bir kromatogramı



Şekil 4.10 C₁₀-C₁₆ alifatik hidrokarbonlarının Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometri cihazından alınmış bir kromatogramı



Şekil 4.11 C₁₈-C₂₄ alifatik hidrokarbonlarının Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometri cihazından alınmış bir kromatogramı



Şekil 4.12 C₂₂-C₃₂ alifatik hidrokarbonlarının Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometri cihazından alınmış bir kromatogramı

4.2. Balda Klasik Analizler

Bitkisel orijini farklı dokuz adet balın her birinde Bal Tebliği'nde belirtilen diastaz sayısı ve hidroksimetil furfurool (HMF) deneyleri 3 kere yapıp sonuçların ortalama ve yüzde standart sapmaları gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Diastaz ve HMF deney sonuçları

Numune	Diastaz Sayısı	HMF (mg/kg)	
		Ortalama	% standart sapma
Portakal	10,9	76,416	± 2,451
Kekik	17,9	68,736	± 2,273
Çam	13,9	73,152	± 1,305
Hayıt	17,9	77,376	± 3,242
Okaliptüs	10,9	75,840	± 2,297
Lavanta	6,5	55,105	± 3,267
Keçiboynuzu	10,9	73,92	± 1,367
Püren	17,9	60,864	± 2,212
Adaçayı	6,5	51,840	± 3,317
TSE*	En az 8	En az 40	

* Türk Standardı Mart 2002 TS 3036 Bal Tebliğindeki (çizelge 1'deki) değerler

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

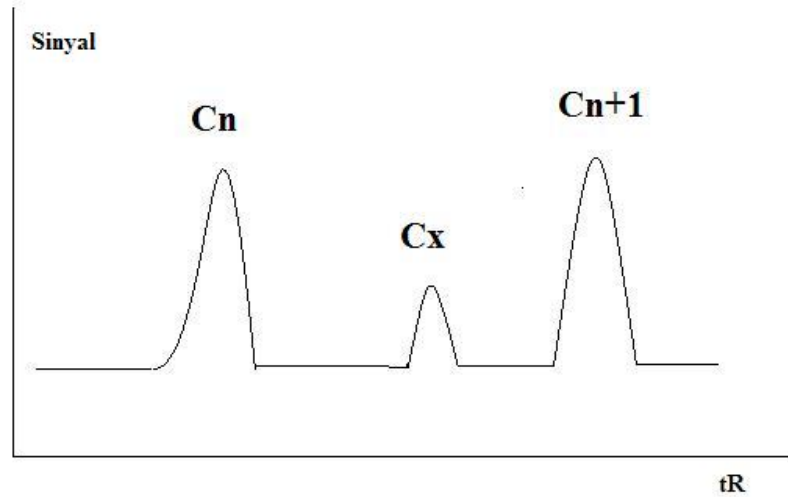
5.1. GC-MS Sonuçları

Farklı bal türlerine ait kromatogramlar incelendiğinde (Şekil 4.1 - 4.9) en fazla pikin, dolayısıyla en fazla bileşenin çam balında olduğu görülmektedir (23 adet). Portakal balında 19 adet, kekik balında 16 adet, hayıt balında 16 adet, adaçayı balında 14 adet, lavanta balında 13 adet, keçiboynuzu balında 9 adet, okaliptüs balında 9 adet, püren balında ise 7 adet pik gözlenmektedir.

Daha önce de söylendiği gibi analizler geniş bir zaman aralığına (12 ay) yayılmıştır. Aynı bir bal numunesi için farklı zamanlarda alınan kromatogramlardaki pik sayıları değişik sayılarda olabilmektedir. Bunun muhtemel sebepleri:

- Bekletme ile balın yapısında meydana gelen kimyasal değişiklikler,
- Numunelerin analize hazırlanması işlemlerinde bazı işlem basamaklarının daha önceki basamaklarından farklı olması (mesela: organik ekstratın kuru azot gazı ile üflenmesi sırasında üfleme hızının farklı olması)
- Gaz kromatograf ve/veya kütle spektrometre cihazlarındaki bazı parametrelerinin analizcinin isteği veya kontrolü dışında değişmesi (enjeksiyon bloğunda veya kolonda oluşabilecek kirlilikler, kolonun kanaması).

Bu nedenle aşağıdaki tablo (Tablo 5.1) hazırlanırken aynı türe ait farklı zamanlarda alınan kromatogramların tümünde bulunan pikler dikkate alınmıştır. Başka bir anlatımla, bazı çam balı kromatogramlarında 23'den fazla pike rastlanmıştır. Ancak, bu türe ait 8 adet kromatogramın hepsinde de bulunan bileşik sayısı 23 tanedir. Aynı tabloda bir türe ait piklerin dakika cinsinden alıkonma süreleri ile o pikin etrafını saran alifatik hidrokarbonların alıkonma süreleri kullanılarak Kovat indisleri hesaplanmıştır. Kovat indisleri aşağıda verilen formülle hesaplanmıştır.



Şekil 5.1 Kovat indisinin hesaplanmasını anlatan örnek kromotogram

$$\text{Kovat İndisi} = (100.n) + \frac{|R.T.(n) - R.T.(x)|}{|R.T.(x) - R.T.(n+1)|} \times 100$$

Bu formülde yer alan n sayısı ilk çıkan hidrokarbondaki karbon sayısını, R.T ise alıkonma zamanını göstermektedir.

Bu hesaplamalar sonucu elde edilen kovat indisleri de tablo 5.1’de verilmiştir. Tabloda bulunan bazı türler için Kovat indisi hesaplanamamış, yerine soru işareti konmuştur. Bunun sebebi, Kovat indisi hesaplanacak olan piki sarmalayan alifatik hidrokarbonların elimizde bulunmaması, dolayısıyla bunlara ait kromatografik verinin olmamasıdır. Örneğin, çam balının 3 no’lu pikinin Kovat indisi 1230’dur, bu pik C_{12} - C_{14} alifatik hidrokarbonlarının arasında konumlanmıştır. Kekik balında ise, C_{10} - C_{12} alifatik hidrokarbonlarının arasında iki pik (pik no 5 ve no 6) bulunmaktadır. C_{10} ’dan daha küçük bir alifatik hidrokarbon elimizde bulunmadığından ve bu nedenle sisteme enjekte edilmediğinden alıkonma zamanı 5 no’lu pikten daha küçük olan piklerin Kovat indisleri hesaplanamamıştır. Kullanılan alifatik hidrokarbonlar serisindeki en büyük hidrokarbon C_{32} idi. Benzer şekilde, alıkonma süresi C_{32} hidrokarbonunkinden daha büyük piklere ait Kovat indisleri de hesaplanamamıştır.

Kullanılan gaz kromatografi-kütle spektrometre aygıtının kütle spektral kütüphanesi ve literatürde bal uçucu bileşenlerinin Kovat indislerinin verildiği makalelerden yararlanarak bal numunelerinde bulunan hidrokarbonlar listesi aşağıdaki gibidir. Bu listede bileşiklerin bulunduğu bal numuneleri de (+) ile işaretlenmiştir.

Tablo 5.1 Bal örneklerine ait kromatogramlardaki piklerin alıkonma süreleri, Kovat indisleri, bileşiğin bulunduğu balın türü ve bileşiğin adı/yapısı.

Pik No	Alıkonma süresi (dk)	Kovat İndisi	Bileşiğin Bulunduğu Bal Türü										Bileşik	
			Çam	Kekik	Portakal	Lavanta	K.boynuzu	Okalıptus	Püren	Hayıt	Adaçayı			
1	4,504	?	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	4,864	?	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	5,175	?	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
4	6,313	?	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
5	7,489	?	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	9,945	?	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	10,048	?	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
8	10,615	?	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
9	10,868	?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
10	10,876	?	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
11	10,913	?	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	11,184	?	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
13	12,911	1026	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	p-cymene
14	13,373	1035	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	(Z)-3,7-dimetil-1,3,6-oktatrien
15	14,818	1051	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	2,3,5-trimetilfuran
16	15,482	1068	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	(E)-bütil 2-metil-2-bütanoat
17	15,987	1074	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	1-siklopentil-2-propanon
18	16,813	1087	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	Eucalyptol
19	17,478	1095	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	Etil heptanoat
20	17,990	1100	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	Undekan

Tablo 5.1 Bal örneklerine ait kromatogramlardaki piklerin alıkonma süreleri, Kovat indisleri, bileşiğin bulunduğu balın türü ve bileşiğin adı/yapısı. **(Devam)**

21	18,046	1208	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	Dekanal
22	19,430	1235	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	(Z)-3,7-dimetil 2,6-oktadienal
23	20,552	1250	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	(Z)-2-dekenal
24	20,900	1258	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	Geranial
25	21,280	1267	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	Etil 2-hidroksibenzoat
26	21,930	1275	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	Fenilasetik asit
27	22,585	1287	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	(4-isopropilfenil)-methanol
28	22,962	1292	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Nonanoik asit
29	23,581	1300	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	Tridekan
30	23,635	1405	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	Vanillin
31	24,20	1415	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	Bilinmiyor
32	25,32	1433	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	Bilinmiyor
33	28,555	1500	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	Pentadekan
34	29,112	1605	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	Vanillik asit
35	29,206	1613	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	10-epi- γ -eudesmol
36	32,616	1663	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	14-hidroksi-9-epi- β -caryophyllene
37	32,975	1855	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	Bilinmiyor
38	35,459	1882	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	Hekzadekan-1-ol
39	36,996	1900	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	Nonadekan
40	38,283	2033	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	Caryophyllene
41	40,440	2100	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	Heneicosane
42	42,444	2267	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	9-tricosene
43	44,037	2300	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	Tricosane
44	47,44	2417	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	Trans-14-isopropylpodocarpa-8,11,13-trien-13-yl asetat
45	48,601	2483	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Bilinmiyor
46	50,237	2500	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	Pentacosane
47	51,267	2825	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	Bilinmiyor
48	54,387	2900	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	Nonacosane
49	56,807	?	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Bilinmiyor
50	58,302	?	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	Bilinmiyor

Bal numunelerinde bulunan bileşiklerin, bulunduğu bala ve aynı zamanda bileşimin neden olduğu pikin alanına göre düzenlenmiş olan tablo aşağıdaki gibidir.

Tablo 5.2. Balların alıkonma zamanına karşı gelen pik alanları

Pik No	Kovat İndisi	Bal Türleri																		
		Çam		Kekik		Portakal		Lavanta		Keçiboynuzu		Okalıptüs		Püren		Hayıt		Adaçayı		
		Var/yok	Pik Alanı	Var/yok	Pik Alanı	Var/yok	Pik Alanı	Var/yok	Pik Alanı	Var/yok	Pik Alanı	Var/yok	Pik Alanı	Var/yok	Pik Alanı	Var/yok	Pik Alanı	Var/yok	Pik Alanı	
1	1026	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	9802	-	-
2	1035	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	2304	-	-	-	-	-	+	7591
3	1051	-	-	-	-	+	5916	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	1068	-	-	+	90435	+	11900	-	-	-	-	-	-	+	2757	-	-	+	7591	
5	1074	-	-	-	-	-	-	-	-	+	4644	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	1087	-	-	-	-	+	3933	+	4644	+	2556	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	1095	+	3933	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	2307	-	-	-	-	-
8	1100	+	12854	+	92001	+	5233	-	-	-	-	-	-	-	-	+	27933	-	-	
9	1208	-	-	-	-	-	-	+	2344	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	1235	+	18622	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	2304	+	4516	-	-	
11	1250	+	2323	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	4033
12	1258	+	17117	-	-	-	16217	+	4644	-	-	-	-	-	-	+	2304	-	-	
13	1267	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	2308	-	-	-	-	-	-	-

		Bal Türleri																		
Pik No	Kovat İndisi	Çam		Kekik		Portakal		Lavanta		Keçiboynuzu		Okaliptüs		Püren		Hayıt		Adaçayı		
		Var/yok	Pik Alanı	Var/yok	Pik Alanı	Var/yok	Pik Alanı	Var/yok	Pik Alanı	Var/yok	Pik Alanı	Var/yok	Pik Alanı	Var/yok	Pik Alanı	Var/yok	Pik Alanı	Var/yok	Pik Alanı	
28	2033	+	19432	+	49837	+	33617	+	9983	+	3874	+	2943	-	-	+	46020	+	7272	
29	2100	+	39349	+	14024	+	36164	-	-	+	4647	-	-	+	10550	+	37491	-	-	
30	2267	+	18945	-	-	+	4647	+	3026	-	-	-	-	+	45159	-	-	-	-	
31	2300	+	56755	+	94236	+	44742	-	-	-	-	-	-	-	-	+	44434	-	-	
32	2417	+	37585	+	23479	+	40176	-	-	-	-	+	5657	+	25578	+	70182	+	3026	
33	2483	+	72412	+	14910	+	50264	+	16643	+	13834	+	21440	+	60148	+	12295	+	52347	
34	2500	+	6295	-	-	-	-	-	-	+	4992	-	-	-	-	-	-	-	+	3756
35	2825	+	65518	-	-	-	-	-	-	+	58051	-	-	-	-	-	-	-	-	
36	2900	+	24917	+	13249	-	-	+	4992	-	-	-	-	-	-	+	67742	-	-	
37	?	+	16174	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
38	?	+	5653	+	5373	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	7375	

5.2. TARTIŞMA

Bu çalışmanın amacı, GC-MS sonuçlarından yararlanarak çeşitli bal tiplerinin bitkisel orijini bulmak olduğuna göre önceki sayfalarda verilmiş olan bulgulara farklı açılardan bakmak gerekecektir.

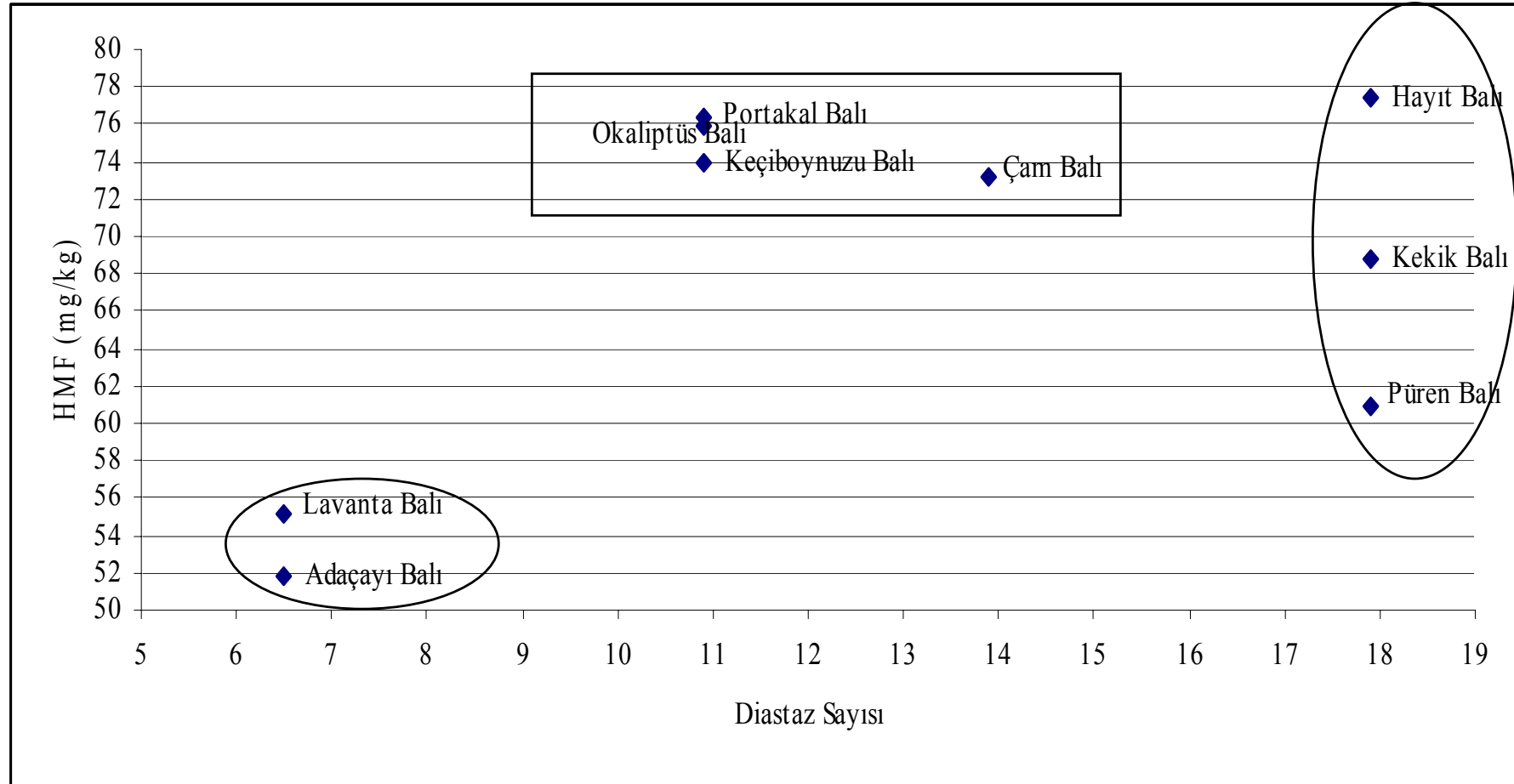
Önce, tanımlanmış olup olmamasına bakmaksızın farklı bal tiplerinde, Kovat indisleri aynı olduğu için, örtüşen pik sayıları hesaplanarak aşağıdaki tablo da (tablo 5.3) gösterilmiştir.

Tablo 5.3 Balın cinsine göre örtüşen pik sayısı

Balın cinsi	Pik sayısı	Örtüşen pik sayısı								
		Çam	Kekik	Portakal	Lavanta	Keçiboynuzu	Okaliptüs	Püren	Hayıt	Adaçayı
Çam	23	23	13	14	9	4	5	6	12	8
Kekik	16	13	16	11	7	7	5	4	11	8
Portakal	19	14	11	19	9	5	6	5	11	7
Lavanta	13	9	7	9	13	4	5	2	8	4
Keçiboynuzu	9	4	7	5	4	9	3	2	4	5
Okaliptüs	9	5	5	6	5	3	9	2	6	6
Püren	7	6	4	5	2	2	2	7	4	3
Hayıt	16	12	11	11	8	4	6	4	16	4
Adaçayı	14	8	8	7	4	5	6	3	4	14

Tablo incelendiğinde çam, kekik, portakal ve hayıt ballarındaki örtüşmelerin en fazla olduğu görülmektedir.

Piklerdeki bu örtüşmenin balların ölçülen fizikokimyasal büyüklükleri (Diastaz sayısı ve HMF) ile ilişkili olup olmadığını anlamak için aşağıdaki grafik (şekil 5.2) çizilmiştir.



Şekil 5.2 Fizikokimyasal büyüklüklere göre gruplandırma

Bu grafikte, bahsedilen büyüklükler bakımından çam balı ile portakal balının bir grupta kekik balı ile hayıt balının ise bir başka grupta yer aldığı söylenebilir.

Balın bitkisel orijininin tahmin etme de kullanılabilir daha etkili bir yöntem, balları birbirinden ayırmaya olanak verecek işaretleyici (marker) bileşiklerin belirlenmesi de bu amaçla her bir balda bulunan bileşenin koyu (●) ile gösterildiği aşağıdaki tablo hazırlanmıştır.

Tablo 5.4 Balın orijini tahmin etmek için işaretleyici bileşiklerin belirlenmesi

R.T.	Çam	Kekik	Portakal	Lavanta	Keçiboynuzu	Okaliptus	Püren	Hayıt	Adaçayı	Bileşik
1026	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	p-cymene
1035	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	(Z)-3,7-dimetil-1,3,6-oktatrien
1051	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	2,3,5-trimetilfuran
1068	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	(E)-bütil 2-metil-2-bütenoat
1074	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1-siklopentil-2-propanon
1087	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Eucalyptol
1095	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Etil heptanoat
1100	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	Undekan
1208	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Dekanal
1235	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	(Z)-3,7-dimetil 2,6-oktadienal
1250	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	(Z)-2-dekenal
1258	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	Geranial

R.T.	Çam	Kekik	Portakal	Lavanta	Keçiboynuzu	Okaliptus	Püren	Hayıt	Adaçayı	Bileşik
1882	●	●	●	●	○	○	○	●	○	Hekzadekan-1-ol
1900	●	●	●	○	○	○	○	○	○	Nonadekan
2033	●	●	●	●	●	●	○	●	●	Caryophyllene
2100	●	●	●	○	●	○	●	●	○	Heneicosane
2267	●	○	●	●	○	○	●	○	○	9-tricosene
2300	●	●	●	○	○	○	○	●	○	Tricosane
2417	●	●	●	○	○	●	●	●	●	Trans-14-isopropylpodocarpa-8,11,13-trien-13-yl asetat
2483	●	●	●	●	●	●	●	●	●	Bilinmiyor
2500	●	○	○	○	●	○	○	○	●	Pentacosane
2825	●	○	○	○	●	○	○	○	○	Bilinmiyor
2900	●	●	○	●	○	○	○	●	○	Nonacosane
?	●	○	○	○	○	○	○	○	○	Bilinmiyor
?	●	●	○	○	○	○	○	○	●	Bilinmiyor

Bu şekil incelendiğinde:

- p-cymene (kovat indisi 1026)'nin sadece hayıt balında bulunduğu,
- 2,3,5-trimetilfuran'ın (kovat indisi 1051) sadece portakal balında bulunduğu,
- 1-siklopentil-2-propanonun (kovat indisi 1074) sadece keçiboynuzu balında bulunduğu,
- Dekanal (kovat indisi 1208) sadece lavanta balında bulunduğu,
- Etil-2-benzoat (kovat indisi 1267) sadece okalıptüs balında bulunduğu,
- Adı belirlenemeyen bileşiğin (kovat indisi 1415) sadece adaçayı balında bulunduğu,

görülmektedir. Ayrıca;

- Etil heptanoat (kovat indisi 1095) çam hariç püren balında, ve
- 2-dekanol (kovat indisi 2150) çam hariç adaçayı balında
- Vanillin'in (kovat indisi 1405) kekik hariç yine sadece hayıt balında

bulunmaktadır.

Şekil daha dikkatle incelendiğinde örtüşmenin büyük oranda olduğu (çam, kekik ve portakal balları) ballarda;

Kovat indisi 1068 olan pikin yokluğu ile,

Kovat indisleri 1095, 1235 ve 1250 olan piklerin varlıklarının sadece çam balını işaretleme de kullanılabileceği görülmektedir.

5.3. ÖNERİLER

Bir analizcinin elinde bulunabilecek en büyük olanaklardan biri GC-MS kombinasyonudur. Kromotografik kolon, koşullar iyi ayarlanmak kaydıyla, numune matriksindeki onlarca, hatta yüzlerce bileşeni birbirinden ayırmakta; bu bileşenler tek tek kütle spektrometre aygıtına gönderilerek, bileşiğin iyonlaşma sonucu oluşan parçacıkların gösterildiği spektrumlar incelenerek bileşiğin yapısı aydınlatılmaktadır.

Bu aydınlatma işlemi elde edilen spektrumun aygıtın spektral kütüphanesindeki spektrumlarla karşılaştırılması suretiyle yapılmaktadır.

Spektral kütüphaneler her ne kadar zengin olursa olsun, bir bileşiğin kütle spektrumundan bileşiğin %100 güvenle tanımlanması çoğunlukla mümkün olamamaktadır.

- Kromotografik koşulların bütün bileşenleri yeter bir rezolüsyonla birbirinden ayırmaya olanak verecek şekilde ayarlanmaması, dolayısıyla kütle spektrometresine giren bileşiğin %100 saflıkta olmaması,
- Bu safsızlığa ayrıca, enjeksiyon bloğu, kolon ile kütle spektrometresinin iyonlaşma odacığı ve analizöründeki kirliliklerin katkı da bulunması,
- Bir bileşiğin parçalanma deseninin iyonlaşma metoduna çok bağlı olduğu ve bu nedenle spektral kütüphanedeki spektrumların hangi iyonlaşma metodu/analizör kullanılarak kaydedildiği hususunu bilinmeyen bileşiği tanımlama da çok önemli olacağı,

gibi nedenlerle kütüphanenin verdiği sonuçları kullanırken analizci çok dikkatli olmalıdır. Bu nedenle, bileşiğin daha yüksek güven düzeyinde tanımlanması için hidrokarbon standartları kullanılarak kovat indisleri belirlenmeli ve bunlardan yararlanılmalıdır.

Ancak, kovat indisleri ayrılmanın gerçekleştiği kolonun durgun fazın karakteristiğine bağlı olduğundan kovat indisleri karşılaştırılırken karakteristiği aynı veya benzer olan kolonlarda elde edilmiş kovat indisleri literatür verilerini kullanma hususunda dikkatli olunmalıdır.

Bileşiğin tanımlanmasında hala tereddütler varsa elbet yapılacak olan kuşku edilen bileşikler bulunduran standartlar temin ederek bunları da GC-MS koşullarında analizlemektir.

KAYNAKLAR

- Alissandrakis, E., Daferera, D., Tarantilis, P.A., Polissiou, M., Harizanis, P.C. 2003. Ultrasound-assisted extraction of volatile compounds from citrus flowers and citrus honey. *Food Chemistry*, 82, pp. 575-582.
- Alissandrakis, E., Tarantilis, P.A., Harizanis, P.C., Polissiou, M. 2005. Evaluation of four isolation techniques for honey aroma compounds. *Food Chem.*, 85, pp. 91-97.
- Bouseta, A., Collin, S. 1995. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, pp. 1890-1897.
- Castro-Vazquez, L., Perez-Coello, M.S., Cabezudo, M.D. 2003. Analysis of volatile compounds of rosemary honey. Comparison of different extraction techniques. *Chromatographia*, 57, pp. 227-233.
- Cocito C., Gaetano G., Deflini C. 1995. Rapid extraction of aroma compounds in must and wine by means of ultrasound., *Food Chemistry*, 52, pp. 311-320.
- Cordell, G. 1981. *Introduction to Alkaloids: a Biogenetic Approach*. Wiley Interscience, New York.
- D' Arcy, B.R., Rintoul, G.B., Rowland, C.Y., Blackman, A.J. 1997. Composition of Australian honeys extractives. Norisoprenoids, monoterpenes and natural volatiles from. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(5)
- Granddon, A.D., Morrison, J.D., Smith, J.S. 1979. Volatile constituents of some unifloral Australian honeys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27 (4), pp. 832-837.
- Harborne, J.B. 1967. *Comparative Biochemistry of the Flavonoids*. Academic Pres, London.
- Hayek, E.W.H., Jordis, V., Moche, W., Santer, F. 1989. *Phytochemistry*, 28, pp. 691.
- Hitchcock C., Nichols B.W. 1980. *Plant Lipid :Biochemistry*, Academic Pres, London.
- Kaiser, R. 1993. *The Scent of Orchids: Olfactory and Chemical Investigations*. Elsevier, Amsterdam.

- Karrer, W. 1958. Konstitution und Vorkommen der Organischen Pflanzenstoffe, Birkhauser-Verlag, Basle.
- Knudsen, J.T., Tollsten L., Bergström, L.G. 1993. Phytochemistry. 33, pp. 253.
- Maignal, L., Pibarot, P., Bonetti, G., Chaintreau, A., Marison, J.P. 1992. Journal of Chromotography, 606, pp. 87-94.
- Pawliszyn J. 1999. Application of solid phase microextraction. Ontario, Canada Royal Society of Chemistry.
- Pawliszyn, J. 1997. Solid-phase microextraction. Theory and practice. New York, Wiley-VCH.
- Radovic B.S., Careri M., Mangia A., Musci M., Gerboles M., Anklam E. 2001. Contribution of dynamic headspace GC–MS analysis of aroma compounds to authenticity testing of honey. Food Chem., 72, pp.511–520.
- Robinson, R. 1955. Structural Relationships of Natural Products. Clarendon Pres, Oxford.
- Rowland C.Y., Blackman A.J., D’Arcy B., Rintoul G.B. 1995. Comparison of organic extractives found in leatherwood (*Eucryphia lucida*) honey and leatherwood flowers and leaves. J Agric Food Chem., 43, pp.753–763.
- Tan S.T., Wilkins A.L., Holland P.T., McGhie T.K. 1990. Extractives from New Zealand honeys. 3. Unifloral thyme and willow honeys constituents. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 38 (9), pp. 1833-1838.
- Tan, S.T., Holland, P.T., Wilkins, A.L., Molan, C.P. 1988. Extractives from New Zealand honeys degraded carotenoids and other substances. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 37(5), pp. 1217-1221.
- Vila D.H., Mira F.J.H., Lucena R.B., Recamales M.A.F. 1999. Optimization of an extractation method of aroma compounds ,in white wine using ultrasound. Talanta, 50, pp. 413-421.
- Wilkins, A.L., Lu,Y., Tan S.T. 1993. Extractives from New Zealand honeys. 4. Linalool derivates and others components from nodding thistle (*Cardans nutans*) honey. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 41(6), pp. 873-878.
- Yao L., Jiang Y., Singanusong R., Datta N., Raymont K. 2004. Phenolic acids and abscisic acid in Australian *Eucalyptus* honeys and their potential for floral authentication. Food Chem., 86, pp.169–177.

ÖZ GEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Mert SOYSAL
Doğum Yeri ve Tarihi : İzmir / 30.06.1981

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Pamukkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya
Bölümü
Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

Bildiriler : XX. Ulusal Kimya Kongresi 4-8 Eylül 2006 Kayseri (Poster)

İLETİŞİM

E-posta Adresi : msoysal@adu.edu.tr / mertsoysal@gmail.com
Tarih : 05 / 09 / 2007