

**T.C.**  
**BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİNGÖL ÇEVRESİNDE ÜRETİLEN BALLARIN AMİNO ASİT İÇERİĞİNİN**  
**HİDROFİLİK ETKİLEŞİM KROMATOĞRAFİSİ TEKNİĞİ İLE**  
**BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**ERTUĞ KIRKAN**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI**  
**Doç. Dr. Cemil AYDOĞAN**

**BİNGÖL-2019**

## ÖNSÖZ

İlk olarak bu çalışmamda emeği sonsuz olan ve beni yalnız bırakmayan danışmanım Doç. Dr. Cemil AYDOĞAN'a teşekkür ederim.

Duaları ile yardımlarını eksik etmeyen aileme teşekkür ederim.

HPLC cihazını bana öğreten ve ders döneminde dersime girip bilgilerinden faydalandığım hocam Dr. Öğr. Üyesi Aydın Şükrü BENGÜ'ye teşekkür ederim.

Tez yazılma kuralları konusunda engin tecrübelerinden faydalandığım Nimetullah KORKUT'a teşekkür ederim.

Çalışmamda imkanlarını esirgemeyen Bingöl Üniversitesi Merkezi Laboratuvar Uygulama ve Araştırma Merkezine ve güler yüzlü çalışanlarına teşekkür ederim.

Yüksek lisansımın ders döneminde bilgilerinden ve tecrübelerinden faydalandığım saygıdeğer hocalarıma teşekkür ederim.

Çalışmamda kullandığım kolonu hibe eden Ankara Gıda Kontrol Laboratuvarı ilgililerine teşekkür ederim.

**Ertuğ KIRKAN**

**Bingöl 2019**

# İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	ii
İÇİNDEKİLER .....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ .....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	viii
TABLolar LİSTESİ .....	x
ÖZET .....	xi
ABSTRACT .....	xii
1. GİRİŞ .....	1
1.1. Bal .....	1
1.1.1. Balın İçeriği .....	1
1.1.2. Balın Tarihçesi .....	1
1.1.3. Balın Önemi .....	2
1.1.4. Balda Protein ve Amino Asit Çeşitliliği .....	3
1.1.5. Balda Kalite Göstergeleri .....	4
1.1.6. Arıcılığın Ekonomik Parametreleri .....	5
1.2. Amino Asitler .....	7
1.2.1. Amino Asitlerin Sınıflandırılması .....	9
1.2.1.1. Gruplarına Göre Amino Asitler .....	9
1.2.1.2. İzoelektrik Noktalarına Göre Amino Asitler .....	10
1.2.1.3. Metabolik Özelliklerine Göre Amino Asitler .....	10
1.2.1.4. Kimyasal Yapılarına Göre Amino Asitler .....	11
1.3. Kromatografi .....	12
1.3.1. Sıvı Kromatografi .....	13
1.3.1.1. Normal Faz Sıvı Kromatografisi (NP) .....	15
1.3.1.2. Ters Faz Sıvı Kromatografisi (RPLC) .....	15
1.3.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) .....	16
1.3.2.1. HPLC' nin Kısımları .....	17
1.4. Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi (HILIC) .....	20
1.4.1. HILIC Kullanım Alanları .....	21

2. KAYNAK ÖZETLERİ .....	22
3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	26
3.1. Literatür Araştırma .....	26
3.2. Aromatik ve Aromatik Olmayan Amino Asitler İçin Metod Geliştirilmesi .....	27
3.2.1. Materyal ve Kromatografik Analizler .....	27
3.2.2. Aromatik Amino Asitler ve Histidin Amino Asidi için Standart ve Türevlendirme Çözeltilerin Hazırlanması .....	30
3.2.3. Hareketli Faz ve Tamponların Hazırlanması .....	30
3.2.4. Hareketli Faz İçeriği Optimizasyonu .....	31
3.2.5. pH Etkisi .....	32
3.2.6. Su Etkisi.....	32
3.2.7. Aromatik Olmayan Amino Asitler İçin Standart ve Türevlendirme Çözeltilerin Hazırlanması .....	33
3.2.8. HPLC Metodunda Analiz Şartları .....	37
3.2.9. Kalibrasyon.....	41
3.2.10. Örnek Hazırlanması .....	41
3.2.11. Kromatografik Piklerin Değerlendirilmesi.....	42
4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	45
4.1. Aromatik Amino Asitler ve L-Histidin İçin Validasyon Sonuçları .....	45
4.2. Aromatik Olmayan Amino Asitler İçin Validasyon Sonuçları.....	54
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....	57
KAYNAKLAR .....	59
EKLER.....	63
ÖZGEÇMİŞ .....	66

## SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

HPLC	:	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
UPLC	:	Ultra Performans Sıvı Kromatografisi
HPCE	:	Yüksek Performans Kapiler Elektroforez
LC	:	Sıvı Kromatografisi
RP	:	Ters Faz
UV	:	Ultraviyole
FL	:	Floresans
ESI	:	Elektro Sprey İyonizasyon
SPE	:	Katı Faz Ekstrasyon
LLE	:	Sıvı-sıvı Ekstrasyon
HRMS	:	Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektroskopisi
MS/MS	:	Tandem Kütle Spektrofotometrisi
UP	:	Ultra Saf Su
ml	:	Mililitre
g	:	Gram
Kg	:	Kilogram
HILIC	:	Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi
LC-MS/MS	:	Sıvı Kromatografi Tandem Kütle Spektroskopisi
MeOH	:	Metanol
Pro	:	Prolin

Trp	:	Triptofan
Tyr	:	Tirozin
His	:	Histidin
Asp	:	Aspartik Asit
Glu	:	Glutamik Asit
Dns-Cl	:	Dansil Klorid
Dns-Pro	:	Dansil Prolin
Dns-His	:	Dansil Histidin
Dns-Asp	:	Dansil Aspartik Asit
Dns-Glu	:	Dansil Glutamik Asit
ppm	:	Milyonda Bir
A.a.	:	Amino Asit
mg	:	Miligram
M	:	Molar
mM	:	Milimolar
L	:	Litre
$\mu$ g	:	Mikrogram
nm	:	Nanometre
LOQ	:	Miktar Tayin Limiti
LOD	:	Tanımlama Tayin Limiti
Rs	:	Rezolüsyon
SS	:	Standard Sapma
RSD	:	Bağıl Standart Sapma

N	:	Teorik Tabaka Sayısı
k	:	Alıkonma Faktörü
A	:	Seçicilik
T <sub>R</sub>	:	Alıkonma Zamanı
T <sub>0</sub>	:	Ölü Zaman
R <sup>2</sup>	:	Belirleme Katsayısı
W	:	Analit Tabanının Geniřlięi
MRL	:	Maksimum Kalıntı Seviyesi
ODS	:	Oktadesilsilika
SPE	:	Katı Faz Ayrımı
SCX	:	Güçlü Katyon Deęiřtirici
ppb	:	Milyarda Bir
ACN	:	Asetonitril
TFA	:	Trifloroasetik Asit
HCl	:	Hidroklorik Asit
KOH	:	Potasyum Hidroksit

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Yıllara göre arıcılıkta önde gelen ülkelerin kovan varlığı .....	5
Şekil 1.2.	2016 yılı illere göre bal üretimi .....	7
Şekil 1.3.	Ters faz sıvı kromatografisinde kullanılan diğer durgun faz çeşitleri	16
Şekil 1.4.	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisinin kısımları .....	17
Şekil 1.5.	HILIC sabit ve hareketli faz şematik gösterimi .....	19
Şekil 1.6.	HILIC metodu şematik gösterimi.....	20
Şekil 3.1.	Farklı hareketli faz oranlarında amino asitlerin HILIC modunda gösterdikleri alıkonma zamanları .....	31
Şekil 3.2.	%30 su ve %70 ACN'den oluşan hareketli faz oranlarında amino asitlerin HILIC modunda gösterdikleri alıkonma zamanları .....	32
Şekil 3.3.	Kalibrasyonda kullanılan amino asitlerin alıkonma zamanları .....	33
Şekil 3.4.	Amino asitlerin Dns-Cl ile türevlendirme reaksiyonu .....	34
Şekil 3.5.	Türevlendirmeden yapılan L-Prolin analizi kromatogramı .....	34
Şekil 3.6.	Dns-Cl için HPLC-UV kromatogramı .....	35
Şekil 3.7.	84 ppm'lik L-Prolinin HILIC-HPLC kromatogramı .....	36
Şekil 3.8.	165 ppm'lik L-Prolinin HILIC-HPLC kromatogramı .....	36
Şekil 3.9.	372 ppm'lik L-Prolinin HILIC-HPLC kromatogramı .....	37
Şekil 3.10.	L-Fenilalanin kalibrasyon grafiği .....	40
Şekil 3.11.	L-Triptofan kalibrasyon grafiği .....	40
Şekil 3.12.	L-Tirozin kalibrasyon grafiği .....	41
Şekil 3.13.	Piklerde rezolüsyonu gösteren Rs değeri .....	44
Şekil 3.14.	Rs değerinin etkinlik, seçicilik ve kapasite faktörü ile ilişkisi .....	44
Şekil 4.1.	A1 numunesi için HILIC-HPLC-UV kromatogramı .....	46
Şekil 4.2.	A2 numunesi için HILIC-HPLC-UV kromatogramı .....	47
Şekil 4.3.	K1 numunesi için HILIC-HPLC-UV kromatogramı .....	47



Şekil 4.4.	K2 numunesi için HILIC-HPLC-UV kromatogramı .....	48
Şekil 4.5.	S1 numunesi için HILIC-HPLC-UV kromatogramı .....	49
Şekil 4.6.	S2 numunesi için HILIC-HPLC-UV kromatogramı .....	49
Şekil 4.7.	S3 numunesi için HILIC-HPLC-UV kromatogramı .....	50
Şekil 4.8.	S4 numunesi için HILIC-HPLC-UV kromatogramı .....	51
Şekil 4.9.	S5 numunesi için HILIC-HPLC-UV kromatogramı .....	51
Şekil 4.10.	S6 numunesi için HILIC-HPLC-UV kromatogramı .....	52
Şekil 4.11.	Bal örneklerinde ppm cinsinden L-Tirozin miktarları .....	53
Şekil 4.12.	Bal örneklerinde ppm cinsinden L-Triptofan miktarları .....	53
Şekil 4.13.	Bal örneklerinde ppm cinsinden L-Fenilalanin miktarları .....	54
Şekil 4.14.	S3 numunesi kullanılarak elde edilen L-Prolin kromatogramı .....	55
Şekil 4.15.	S5 numunesi kullanılarak elde edilen L-Prolin kromatogramı .....	55
Şekil A.1.	LC-HRMS’de 1 ppm’lik L-Glutamik Asit kromatogramı .....	63
Şekil A.2.	LC-HRMS’de 1 ppm’lik L-Histidin kromatogramı.. .....	64
Şekil A.3.	LC-HRMS’de 1 ppm’lik L-Serin kromatogramı.....	64
Şekil A.4.	LC-HRMS’de 1 ppm’lik L-Treonin kromatogramı .....	65

## TABLolar LİSTESİ

Tablo 1.1.	Türkiye için arıcılık verileri .....	6
Tablo 1.2.	Polar ve nonpolar amino asitler .....	9
Tablo 1.3.	İzoelektrik noktalarına göre amino asitler .....	10
Tablo 1.4.	Metabolik özelliklerine göre amino asitler .....	10
Tablo 1.5.	Kimyasal yapılarına göre amino asitler .....	11
Tablo 1.6.	Esansiyel ve non-esansiyel olmalarına göre amino asitler .....	11
Tablo 3.1.	Aromatik ve histidin amino asitlerin 1ml/dk'da pH:7'de alıkonma süreleri .....	37
Tablo 3.2.	Çalışmada kullanılan HPLC'nin otosampler özellikleri .....	38
Tablo 3.3.	Çalışmada kullanılan HPLC'nin pompa özellikleri .....	38
Tablo 3.4.	Çalışmada kullanılan HPLC'nin fırın özellikleri .....	38
Tablo 3.5.	Çalışmada kullanılan HPLC'nin dedektör özellikleri .....	39
Tablo 3.6.	Çalışmada kullanılan HPLC'nin kolon özellikleri .....	39
Tablo 3.7.	Analitlerin kalibrasyon listesi .....	39
Tablo 3.8.	Örnek isim listeleri ve kodlama .....	41
Tablo 4.1.	A1 numunesi için istatistiksel veriler .....	46
Tablo 4.2.	A2 numunesi için istatistiksel veriler .....	47
Tablo 4.3.	K1 numunesi için istatistiksel veriler .....	48
Tablo 4.4.	K2 numunesi için istatistiksel veriler .....	48
Tablo 4.5.	S1 numunesi için istatistiksel veriler .....	49
Tablo 4.6.	S2 numunesi için istatistiksel veriler .....	50
Tablo 4.7.	S3 numunesi için istatistiksel veriler .....	50
Tablo 4.8.	S4 numunesi için istatistiksel veriler .....	51
Tablo 4.9.	S5 numunesi için istatistiksel veriler .....	52
Tablo 4.10.	S6 numunesi için istatistiksel veriler .....	52

# BİNGÖL ÇEVRESİNDE ÜRETİLEN BALLARIN AMİNO ASİT İÇERİĞİNİN HİDROFİLİK ETKİLEŞİM KROMATOĞRAFİSİ TEKNİĞİ İLE BELİRLENMESİ

## ÖZET

Gıdalarda amino asit içeriğinin belirlenmesi, ilgili gıdanın kalitesi ve orijini bağlamında önemli bilgi vermektedir. Bu çalışmada balda amino asit analizi için yeni bir HILIC-HPLC-UV metodu geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Geliştirilen metot LC-HRMS analizleri ve Dansil Klorid türevlendirme çalışmalarını içermektedir. 6 farklı bölgeden (Genç, Solhan, Kiğı, Karlıova, Bingöl Merkez, Yedisu) elde edilen bal numunelerindeki amino asit içeriği ilgili metot uygulanarak analiz edilmiştir. Yapılan çalışmada analizi yapılan balların L-Triptofan, L-Fenilalanin ve L-Tirozin miktarları tespit edilmiştir. Bazı L-Prolin ve L-Histidin gibi aromatik olmayan amino asitlerin türevlendirilmesi ve gerçek numunede analiz çalışmaları yapılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** HPLC, HILIC, prolin, bal, amino asit.

# **THE DETERMINATION OF AMINO ACID CONTENTS IN HONEY SAMPLES FROM BİNGÖL PROVINCE BY USING HYDROPHILIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY TECHNIQUE**

## **ABSTRACT**

The determination of amino acid content in foods provides significant information about the quality and origin of relevant food. In this study, a novel method based on HILIC-HPLC-UV for the analysis of amino acids in honey was developed and validated. The method included the analysis of LC-HRMS and precolumn derivatization with dansyl chloride. 6 different honey samples from Bingöl province including (Genç, Solhan, Kiğı, Karlıova, Bingöl, Yedisu) were successfully analyzed using the developed HILIC method. L-Tryptophan, L-Phenylalanine and L-Tyrosine were determined. In addition, some non-aromatic amino acid derivatization studies including L-proline, L-histidine were also performed along with the analyses of them in real honey samples.

**Keywords:** HPLC, HILIC, proline, honey, amino acid.

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Bal

### 1.1.1. Balın İçeriği

Bal, yapısal açıdan su, organik asit, şeker, vitamin, protein, mineral, amino asit, fenolik bileşikler gibi çeşitli bileşenlerden oluşmaktadır (Da Silva 2016). Mineral bazında bakıldığında balın içerisinde demir, kobalt, silisyum, nikel, potasyum, bakır bulunmaktadır. Bahsedilen yapılar balın aromasını, biyolojik ve fiziki özelliklerini etkilemektedir. Fruktoz ve glikoz balın içeriğinin yaklaşık %85'ini oluşturmaktadır.(Karimov 2014). Bal arıları (Apis mellifera) topladıkları polen, salgı ve nektarları kullanarak arı zehri, arı sütü, propolis, polen ve bal gibi çeşitli ürünler üretmektedirler (Bargańska 2016). Balın içindeki yapıların önemli kısmı yüksek ısıya karşı duyarlıdır. (Gheldof 2002) .Arıların en ünlü ve en çok tüketilen ürünü olan bal, organik ve içerik açısından zengin bir gıda olarak antik çağlardan beri birçok toplum tarafından tüketilmektedir (Chua 2012). Salgı balının kaynağı bitkilerin öz salgıları ve bitkileri emen böceklerin çıkardıkları salgılar iken çiçek balının kaynağı nektarlardan oluşmaktadır (Codex Alimentarius 1998).

### 1.1.2. Balın Tarihçesi

Balın farklı kültürler ve farklı çağlarda zengin bir gıda kaynağı olarak tüketiminin nedeni, balın doğal olarak insana sunulan tek konsantre şeker formu olmasıdır. Balcılık ile ilgili kayıtların MÖ 14000 – 9000 yılları arasına ait olduğu ve ilk olarak İspanya'nın doğusunda Valencia şehri yakınlarındaki bir mağara duvarına işlenmiş en az on bin yıllık olduğu düşünülen bir resimde, bir adet ip merdiven yardımı ile elinde torbaya bal toplayan insan şekilleri, bal peteği ve bal peteğinden sızan balın resmedilmesi bu görüşü doğrular niteliktedir (Kahraman 2012). Antik çağlarda, Mısır, Hindistan ve Yunanistan'da enfeksiyon ve yanıkta balın tedavi amaçlı olarak kullanıldığı bildirilmiştir. Yanık tedavisinde bal, gres yağı veya hayvansal nitelikli yağlar, 1/3 baldan, 2/3 yağdan olacak şekilde birleştirilerek; yaranın üzerine katman olarak uygulanır. Yunanlılar tedavi edici

karışımın içine bal ve yağın yanı sıra sirke, bitki sapı, sodyum karbonat ve düşük bir oranda da safra ekleyerek merhem haline getirmekte ve bu uygulama ile mevcut yaranın enfeksiyon kapmasını da önledikleri bildirilmiştir. Enhemes adıyla bilinen bu karışımın, bileşiminde bulunan balda ozmotik basınç, safra ve sodyum karbonattan kaynaklı yüksek pH özelliğinde olması nedeniyle antiseptik niteliktedir (Özmen 2006).

### **1.1.3. Balın Önemi**

Bal hazmı rahat olan monosakarit şekerlerin derişik bir çözültisi olduğu için bol miktarda kalori veren bir gıdadır. Balın 100 gramında ortalama 325 kalori vardır. Bu sebeple, yüksek enerji ihtiyacına sahip her yaştaki insan için uygun bir besin maddesidir (Sato 2000). İnsanlık için bal bir besin maddesi olarak hayati bir öneme sahiptir. İnsan ve bal ile ilişkili Epidemiyolojik araştırmalar kalp-damar rahatsızlıkları ve kanseri önlemede çok önemlidir. (Pyrzynska ve Biesaga 2009). Bal, asırlardır çeşitli yara ve yanık tedavisinde, buna ilaveten çeşitli cilt hastalıkları ve mide rahatsızlıklarında sıklıkça kullanılmıştır. Yürütölen çalışmalarda, yara ve yanıkların iyileşmesinde, mide ve barsak rahatsızlığı, anti mikrobiyal etkisi nedeniyle tedavide koruma ve başarı sağlamaktadır (Ali 1991; Ali 1995; Biglari 2012). İlaveten, bal birçok enfeksiyonun giderilmesi, yara etrafında bulunan dokuların ve yabancı maddelerin temizlenmesi, yangı oluşumun baskı altına alınması, yara izlerinin hızla azaltılması ve aynı anda yeni damar oluşumunu sağlayarak, epitelyumun olgunlaşmasını, doku granülasyonunu sağlamaktadır. Araştırmalar göstermektedir ki balın, karaciğer hastalıklarında da tedavi edici ve yenileyici özelliğı vardır. (El Denshary 2011). Bunlara ek olarak, yara ve yanıkları hızla iyileştirdiğı, kanın sirkülasyonunu kolaylaştırdığı damarları genişlettiğı, vücutta dolaşan kanı temizlediğı ve kabızlığı engellediğı de bilinmektedir (Molan 2000). Başka bir çalışmada da AIDS hastalarında ağız bölgesinden alınmış Candida türlerine karşı, balın mantarların üremesini engelleyen özellik gösterdiğı ve bu sebeple AIDS hastalarında oral yaraları önlemede kullanılabileceğı belirtilmiştir (Mulu 2010). Son dönemlerde, ABD ve Avrupa'daki gelişmiş ölkelerde yanık tedavi merkezlerinde bal tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Alternatif tedavi uygulamalarında, bal deri ülserlerinin tedavisi ve kronik yaraların iyileşmesi üzerine etkin olduğu bildirilmiştir. Bir başka bal uygulamasında da sivilce tedavisinde kullanıldığı ve hatta tedavisi zorlu bir akne türü olan Hidradentis Suppurativa'nın oluşturduğu sorunların iyileşmesini desteklemektedir. (Ulusoy 2012). Anti bakteriyel denemelerde 10 veya daha fazla

seyreltmelerde dahi balın birçok bakteri türlerinin üremesini tamamen engellediği belirtilmiştir (Dunford 2000). Çalışmalar gösteriyor ki bal yalnızca bakterilere karşı değil aynı zamanda parazit, mantar ve virüslere karşı da üremelerini engelleyici özelliklerini bildiren çalışmalar vardır (Mundo 2004).

#### **1.1.4. Balda Protein ve Amino Asit Çeşitliliği**

Balda bulunan amino asitlerin temel kaynağı polen olduğu için, balın amino asit profili botanik kaynağının da bir karakteristiğidir (Hemosin 2003). Balda bulunan protein miktarının arının türüne göre değişmektedir. En bilindik tür olan *Apis mellifera* cinsi bal arılarının ürettiği balların protein oranları %0,2-1,6 arasında olduğu belirlenmiştir (Won 2009). Balın içeriğindeki protein miktarı aynı zamanda üretimin yapıldığı floradan da kaynaklanmaktadır (Ötleş 1995). Aynı zamanda balın protein miktarı arının salgı ve nektar kaynağına göre değişmektedir. Baldaki proteinin kaynağı ise bitki polenleridir (Da Silva 2016; Hermosin 2003). Balda protein oranının düşük olmasına rağmen, amino asitlerin çeşitliliği açısından zengin bir gıda olup balda 11-21 farklı amino asidi çeşidi bulunduğu belirlenmiştir (Islam 2012). Amino asitler yüzde olarak balın toplam bileşiminin yaklaşık %1 kadarını oluşturur ve bu oranlar salgı veya nektar kaynaklarına göre değişmektedir. (Da Silva 2016). Bal içerisinde prolin, arginin, lizin, histidin, glutamin, treonin, glisin, fenilalanin, arginin, metiyonin, valin, lösin triptofan, izolösin, alanin, serin ve sistein gibi amino asitleri bulundurmaktadır (Kečkeš 2013). Amino asit çeşitliliği balın nektar veya salgı balı olmasına göre de farklılık göstermektedir (Hermosin 2003). Balda bulunan amino asitlerin yarısından fazlasını L-Prolin oluşturmaktadır (Bogdanov 2002; Hermosin 2003). L-Prolin amino asidinin kaynağını arının salgıladığı, nektarı bala dönüştüren sıvıdan kaynaklanmaktadır (Truzzi 2014). L-Prolin miktarı balın kalitesi ve balda yapılabilecek sahte olup olmadığı hakkında değerlendirmelerde kullanılan önemli parametrelerden birisidir. (Islam 2012). Ülkemizde Ulusal anlamda geçerliliği olan Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği'ne göre baldaki L-Prolin miktarının 300 mg/kg'dan daha yüksek olması gerektiği belirtilmiştir. (Anonim 2012). Aazza ve ark (2014), 3 tanesi kekik balı olmak üzere toplamda 17 tane çeşitli Fas balının L-Prolin miktarları 906 mg/kg ile 1171,67 mg/kg arasında bulmuştur. Türkiye'de çeşitli çam ballarının L-Prolin miktarını 569,41 mg/kg ile 653,83 mg/kg aralığında bulunmuştur (Çınar 2010; Kaplan 2014). Türkiye'deki çeşitli çiçek balların L-Prolin 300 mg/kg ile 860 mg/kg miktarları arasında bulunmuştur (Yılmaz 2000; Kaplan 2014).

Heredia (2003), Fas ülkesinin ballarında yapılan bir miktar analizinde L- Prolin miktarları 315,9 mg/kg ile 770 mg/kg arasında bulmuşlardır. (Oddo 2004), Avrupa’da araştırılan salgı ballarında L-Prolin miktarlarının ortalama 468 mg/kg olarak tespit edilmiştir. Kovanından işlenmeden alınan ham bal direkt olarak yenebilmektedir (Molan 1996).

### **1.1.5. Balda Kalite Göstergeleri**

L-Prolin, Diastaz ve Hidroksimetilfurfural en bilinen balda kalite göstergeleridir. Hidroksimetil furfural (HMF) bal kalitesinde bir gösterge olarak kullanılır. Uygun olmayan depolama koşulları ve ısıl işlem uygulaması balda HMF oluşumuna neden olmaktadır. Ayrıca HMF oluşumu; süt, meyve suları, tahıl ürünleri, bal, reçel gibi birçok ürünün uygun ısıl işlemin yapıp yapılmadığını uygun koşullarda depolanıp depolanmadığını anlamak için de parametre olarak kullanılmaktadır (Nassberger 1990). Taze ballarda Hidroksimetil furfural (HMF) içeriği azdır. Dolayısıyla, yüksek HMF konsantrasyonu eski ballarda mevcut olup, bu durum, bala invert şeker veya şurup ilave edildiği ya da balın ısıtılmış olduğunu göstermektedir (Nozal 2001). Diastaz bala balarları tarafından eklenmektedir. Balarları, topladıkları nektarı, tükürük ve hipofaranjial bezlerin salgılarıyla karıştırır; kovanda nektar, petek gözlerine doldurulmadan önce arıdan arıya aktarılırken, balın olgunlaşmasını kolaylaştıran daha fazla salgı eklenmektedir. Bu süreç sonucunda eklenen enzim miktarı, balarlarının yaşı, fizyolojik evresi ve beslenmesi, koloninin gücü, sıcaklık, nektar akışına bağlı olarak değişmektedir. Diastaz balda beslenmeyle ilgili en önemli enzimdir. Diastaz, karbonhidratları, kolay sindirebilmesi için hidrolize eder. Diastaz, dekstrin ve maltozdaki nişasta tanelerini kırmaktadır. L-Prolin de bal kalite parametrelerinde oldukça kullanılmaktadır. Balda sahtecilik testlerinde en güvenilir test L-Prolin olmaktadır.

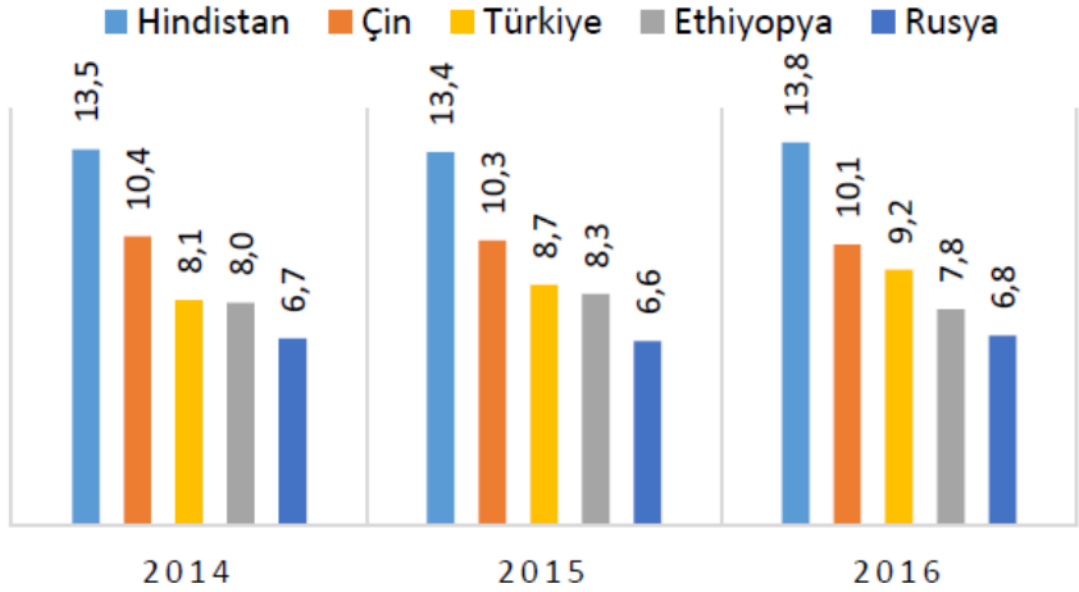


### 1.1.6. Arıcılığın Ekonomik Parametreleri

Türkiye’de bulunan 81,000 adet tarım işletmesi arıcılık ile profesyonelce ilgilenmekte; arıcılık faaliyetleri ile doğrudan 160 milyon Türk Lirası ve dolaylı olarak ise yaklaşık 1,6-2,4 milyar Türk Lirası gelir oluşturmaktadır.

Türkiye yaklaşık olarak sekiz milyon kovan varlığı vardır. Kovan sayısı bakımından Çin’in ardından Dünya’da üçüncü sırada bulunmaktadır. Çin’in kovan başına düşen ortalama bal üretimi 52 kilogramdır. Dünya’da ise kovan başına düşen bal ortalaması 22 kilogramdır (FAO 2015).

### Kovan miktarında önemli ülkeler (%)



Şekil 1.1. Yıllara göre arıcılıkta önde gelen ülkelerin kovan varlığı

Yıllara göre Dünya’da kovan varlığı kaynak FAO 2016 verileri şekil 1.1’de verilmiştir. (Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü 2018). Şekil 1.1’de görüldüğü üzere Türkiye’nin kovan varlığı oransal açıdan 2014 yılından 2016’a doğru arttığı görülmektedir.

2016 yılında toplam kilogram bazında bakıldığı zaman Türkiye, 114 bin tonluk bal üretimi ile Çin’in ardından ikinci sırada bulunmaktadır (Semerci 2017). Türkiye arıcılığının

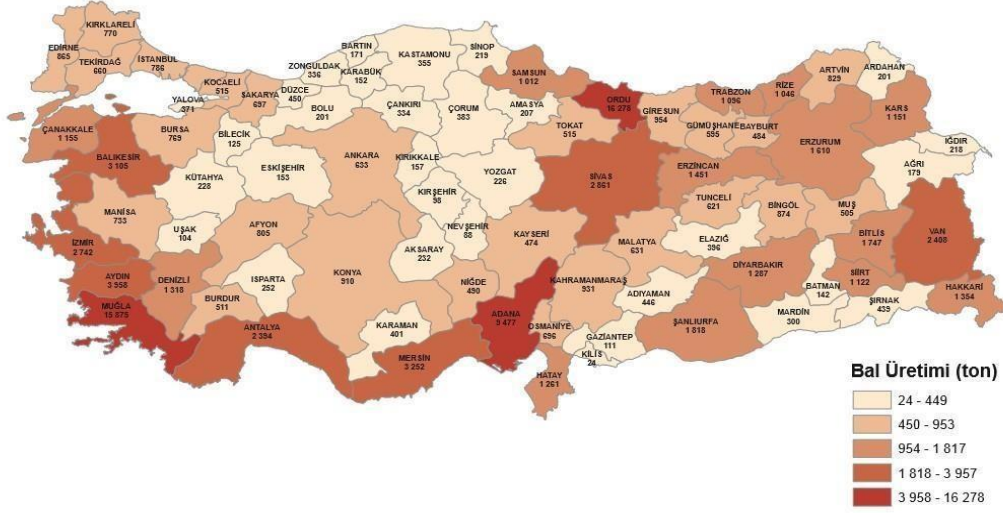
gelişim oranları 1996-2015 yıllarında arasında bal üretimi %71, bal mumu üretimi ise %47 oranında artmıştır. Koloni sayısı ise %94 oranında artış olmuştur (Semerci 2017). Türkiye'nin 2020 yılında bal üretiminde 120 bin ton miktarında üretim yapacağı tahmin edilmektedir. Kovan sayısının ise on milyon civarına ulaşması beklenmektedir (Semerci 2017). Türkiye'de 2018 yılı itibari ile kovan başına ortalama 13,4 kilogram bal üretilmektedir.

Tablo 1.1. Türkiye için arıcılık verileri (TÜİK 2018)

Arıcılık Verileri						
Yıl	Arılı Kovan			Bal Üretimi (ton)	Bal Verimi (kg/kovan)	Balmumu (ton)
	Eski Kovan(adet)	Yeni Kovan (adet)	Toplam			
2002	180,232	3,980,660	4,160,892	74,554	18	3,448
2003	190,538	4,098,315	4,288,853	69,540	16	3,130
2004	162,660	4,237,065	4,399,725	73,929	17	3,471
2005	157,059	4,432,954	4,590,013	82,336	18	4,178
2006	146,950	4,704,733	4,851,683	83,842	17	3,484
2007	135,318	4,690,278	4,825,596	73,935	15	3,837
2008	137,963	4,750,998	4,888,961	81,364	17	4,539
2009	128,743	5,210,481	5,339,224	82,003	15	4,385
2010	137,000	5,465,669	5,602,669	81,115	15	4,148
2011	149,020	5,862,312	6,011,332	94,245	16	4,235
2012	156,777	6,191,232	6,348,009	89,162	14	4,222
2013	183,265	6,458,083	6,641,348	94,694	14	4,241
2014	193,825	6,888,907	7,082,732	103,525	14	4,053
2015	222,635	7,525,652	7,748,287	108,128	14	4,756
2016	220,882	7,679,482	7,900,364	105,727	13,4	4,440
2017	194,406	7,796,666	7,991,072	114,471	14,3	4,488

Dünya üzerinde kovan ve bal üretimi ile ilgili veriler incelendiği zaman Türkiye'nin arı ve arı ürünlerinin öneminin hızla arttığı Tablo 1.1'de gösterilmiştir.

### İllere Göre Bal Üretimi Dağılımı (ton) - 2016



Şekil 1.2. 2016 yılı illere göre bal üretimi verileri (TÜİK 2017)

Dünyada bulunan yaklaşık olarak 89 milyon adet kovan varlığının % 20'sinden fazlası Çin ve Hindistan'da bulunmaktadır. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü'nün (FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations) kaynaklarında Dünya üzerinde 89,930,087 adet (FAO 2013) kovan varlığı mevcut olmaktadır; bu sayı bir önceki yıla göre %0,64 oranında arttırmıştır. Türkiye'de bulunan illere göre bal üretim verileri Şekil 1.2'de gösterilmiştir (TÜİK 2017).

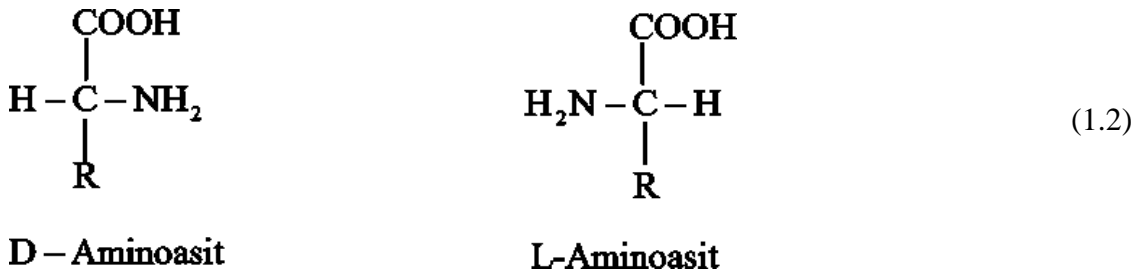
## 1.2. Amino Asitler

Amino asitler proteinlerin temel yapı taşıdır. Proteinler, her bir amino asit birbirleriyle kovalent bağ ile bağlanması ile oluşur ve amino asitlerin dehidrat polimeridir (Nelson 2005). Amino asitler, farklı kimyasal yapıda bir köke (R) bağlı bir karboksil grubu (COOH) ve bir de amin (NH<sub>2</sub>) grubundan oluşan organik moleküllerdir.



Amino asitlerin genel formülü

İlk keşif edilen ve kuşkonmazdan temin edilen asparajın amino asidi 1806 yılında keşfedilmiştir. Amino asitlerde isimlendirme genel bir yapıdadır, genellikle elde edildikleri maddeye göre isimlendirme yapılmıştır. Örnek olarak glutamat buğday gluteninden Asparajın ilk defa asparagusta bulunmuştur ve bu isimler verilmiştir. Bu şekilde isimlendirilmesinden farklı olarak Glisin tatlı tadından dolayı Tirozin ise ilk kez peynirden izole edilmiştir ve bu adları almıştır (Nelson 2005). Amino asitler rahat çözünebilen bir yapıdadır ve genellikle yüksek erime noktası olan, beyaz renkli katı maddelerdir. Tatsız, acı, tatlı olabilmektedir (Demirci 2016). Proteinler, alkali ve asit ya da enzimler yolu ile hidroliz edilirse amino asitlere parçalanmış olurlar. Amino asitler D-formu ya da L-formu şeklinde olup, canlılarda bulunan amino asitler L- formuna sahiptirler.



Amino asitlerin D- ve L- formu

Amino asitler, nötr çözeltiler içinde karboksil grubundaki protonunun ( $\text{H}^+$ ), azot atomuna doğru hareket etmesi ile meydana gelerek dipolar iyon (iç tuz) şeklinde bulunmaktadır. Şayet bu çözeltilere asidik bir yapı eklendiği vakit karbonil anyonuna proton bağlanacağından katyonik formu oluşmaktadır.

Bunun tersi olarak bazik bir yapı eklenir ise amonyum katyonunun  $[OH]^-$  iyonuna proton vermesi ile anyonik form oluşur. Amino asitlerin bu amfoter özelliklerinden dolayı proteinler kandaki tampon etkisi göstermektedir. Aynı zamanda amfoter özelliklerinden kaynaklı, asidik ve bazik çözeltiler ile reaksiyon geçirdiği takdirde tuz oluştururlar.

Dünyada 300 adet amino asit bulunmaktadır, bunlardan sadece 20 tanesi protein yapısına katılır. Proteinlerin tam hidrolizinden 20 L- $\alpha$ -amino asit ortaya çıkmaktadır. D-amino asitler, bazı antibiyotiklerin yapısında (tirosidin D-Fenilalanin, gramisidin S) ve bakterilerin hücre duvarlarının yapısında (D-Alanin) bulunur.  $\beta$ -amino asitler:  $\beta$ -alanin,  $\beta$ -aminoasitler  $\beta$ -amino-izobutirattır,  $\beta$ -taurindir.  $\gamma$ -amino asitlerin tek örneği  $\gamma$ -amino butirattır (GABA). Amino asitler, dekarboksilasyonla aminlere dönüşebilirler; triptofan serotonine, histidin histamine, dopa dopamine glutamik asit GABA'ya dönüşmektedir. Glisin dışındaki aminoasitlerin hepsi asimetrik karbon ( $\alpha$ -karbon) bulundurur ve optik olarak aktiftirler.

### 1.2.1. Amino Asitlerin Sınıflandırılması

Amino asitler birçok özelliklerine göre sınıflandırılırlar.

#### 1.2.1.1. Gruplarına Göre Amino Asitler

Tablo 1.2. Polar ve non-polar amino asitler

Polar (hidrofilik) R- grubu taşıyanlar			Non-Polar (hidrofobik) R- grubu taşıyanlar		
Aspartat	Serin	Arginin	Prolin	Lösin	Metionin
Glutamat	Treoinin	Lizin	Alanin	İzolösin	Fenilalanin
Sistein	Tirozin	Histidin	Valin	Triptofan	

### 1.2.1.2. İzoelektrik Noktalarına Göre Amino Asitler

Tablo 1.3. Asidik, Bazik ve nötral amino asitler

Asidik amino asitler	Bazik amino asitler	Nötral amino asitler				
Aspartat	Lizin	Prolin	Triptofan	İzolösin	Lösin	
		Fenilalanin				
Glutamat	Arginin	Serin	Tirozin	Treonin	Alanin	Sistein
	Histidin	Metiyonin	Glisin			

### 1.2.1.3. Metabolik Özelliklerine Göre Amino Asitler

Tablo 1.4. Metabolik özelliklerine göre amino asitler

Alanin	Histidin	Prolin	Serin	Lösin	İzolösin	Lizin	Fenilalanin
Glutamin	Glutamat	Treonin	Sistein		Triptofan	Tirozin	
Valin	Arginin	Lizin	Prolin				

### 1.2.1.4. Kimyasal Yapılarına Göre Amino Asitler

Tablo 1.5. Alifatik, aromatik ve iminoasid amino asitler

Alifatik amino asitler						Aromatik amino asitler	İminoasitler
Düz	-OH grubu	-SH grubu	Asidik	Bazik		Tirozin	Prolin
Glisin	Alanin	Serin	Sistein	Aspartat	Lizin	Fenilalanin	
Valin	Lösin	Treonin	Metionin	Glutamat	Arginin	Triptofan	
İzolösin		Tirozin					

Protein Yapısına Girmeyen Amino asitler: Ornitin, Homosistein, Homoserin, Sitrulin, Dopa, Arjinosüksinat, Sülfirik asid, Sisteindir. Sekiz adet amino asit (valin, lösin, izolösin, fenilalanin, lizin, treonin, metiyonin, triptofan) esansiyel (temel) amino asitler olarak sınıflandırılmaktadır. Fakat fenilalanin, tirozin ve sistein metiyonin amino asitinden türevlendirilmektedir. Fakat bebeklerde ideal gelişme için histidin ve arginin zaruri olduğundan esansiyel olarak kabul görmüştür. Dolayısıyla esansiyel amino asit sayısı 12'de denilebilmektedir.

Tablo 1.6. Esansiyel ve esansiyel olmayan amino asitler

Esansiyel olan amino asitler	Esansiyel olmayan amino asitler
Arjinin	Alanin
Histidin	Asparajin
İzolösin	Aspartat
Lösin	Sistein
Lizin	Glutamat
Metiyonin	Glutamin
Fenilalanin	Glisin
Treonin	Hidroksiprolin
Triptofan	Hidroksilizin
Valin	Prolin
	Serin
	Tirozin

Esansiyel (temel) olmayan amino asitler ise glisin, serin alanin, prolin, asparjin glutamin, glutamat ve aspartattır (Anonim 2013). Valin doku ve kas onarımı ve nitrojen dengesi için

zaruridir (Saldamlı 2005). Lösin büyüme ve gelişmede, nitrojen dengesinde ve ayrıca kan şekeri düzenlenmesinde görev sahibidir (Saldamlı 2005). Metiyonin (MET) kimyasal yapısında kükürt barındıran esansiyel amino asittir. Protein içeriğinde %3-6 oranları arasında bulunmaktadır. Organizmalara metil takviye ettiği için antioksidant aktivite, RNA, DNA yapımı için zaruridir (Saldamlı 2005). Esansiyel amino asitlerden biri olan histidin çocukluk döneminde çok önemlidir. Dolaşım sisteminde, histamin üretiminde, organ yenilenmesi, gelişme ayrıca nöronlarda miyelin yapı için olmazsa olmaz bir amino asittir (Saldamlı 2005). Aromatik yapıda olup organizmalarda tirozine türevlendirilebilir. Histidin aynı zamanda norepinefrin yapımı için kullanılmakta olup, merkezi sinir sisteminde kritik görevlere sahiptir (Saldamlı 2005). Amino asitlerin kapsamlı analizleri, ilk olarak Stein ve Moore tarafından geliştirmiş, kolon sonrası nihidrin türevlendirmesi yolu ile uygulanmıştır (Moore ve Stein 1954). 124 adet amino asit tayin edilmiş ve bu sayede 1972'de Nobel Kimya ödülünü kazanmışlardır (Toyo'oka 2013). Sıklıkla amino asitlerin kromatografik ayırımı pre-kolon ve post-kolon türevlendirmesinden kaynaklanır. Amino asitlerin tayininde; ters faz kromatografi, iyon-değişim kromatografisi, gaz kromatografisi, mikroçip elektroforez ve kapiler elektroforez ve mikroçip elektroforez gibi çok çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (Toyo'oka 2013). Proteinler asit ve alkalilerle ya da enzimlerle hidroliz edilirse amino asitlere parçalanmış olurlar.

### **1.3. Kromatografi**

Kromatografi, 1900'lerden günümüze kadar gelen bugünkü adı ile klasik kolon kromatografi olarak uygulanmasıyla bir milat oluşturan ayırma tekniğidir. İlk yapılan çalışmalarda bir silindir cam materyali kolona toz haline getirilmiş kalsiyum karbonat dökülmüş daha sonra kolonun üstünden örnek eklenmiş ve daha sonra çözücü eklenmiştir. Çözücü kolondan aşağı doğru akmaya devam ederken örneğin içindeki bileşenler de kolonda değişik hızlarda hareket etmesi yolu sayesinde ayrılmıştır. Kolondan alınan bölümler belli kısımlarda toplanmış çözücüsü buharlaştırılmış ve birbirlerinden ayrılan bileşikler analiz için elde edilmiştir. Kromatografinin ilk çalışmalarında farklı renkli materyaller ile çalışma tercih edilmiş ve bu sayede kolon içerisinde farklı bileşenlerin ayrılması gözlemlenebilmiştir. Kolonun içinin fiziki olarak doldurulması ve her bir numune için yeni bir kolona ihtiyaç duyulduğundan zaman alıcı ve çok zahmetli bir işlem olarak benimsenmiştir (Snyder 2010).



Kromatografinin tarihsel gelişimi incelendiğinde,

1-1900'ların başlarında M.S. Tswett'in kromatografiyi keşfi (Ettre ve Sakodyskii 1993; Ettre 2003),

2-1940'ların başlarında A.J.P. Martin'in kağıt ve dağılma kromatografisi keşfi (Ettre 2001),

3-1950'lerin sonlarında S. Moore ve W. S. Stein tarafından amino asit analizatörünün keşfi (Ettre ve Gehrke 2006),

4-1960'ların başlarında jel geçirgenlik kromatografisinin Waters tarafından geliştirilmesi (Ettre 2005).

1890'lı yıllarda David Day klasik kolon kromatografisine yakın bir teknikle petrolün bileşenlerine ayırmayı sağlamıştır (Ettre 2003). Rus kökenli bilim insanı botanikçi Mikhail Semenovich Tswett 1900'lerin başlarında klasik kolon kromatografisini icat etmiş ve ayrı bitki özütlerini, kalsiyum karbonat ile doldurulmuş cam kolondan geçirerek çözelti içerisinde bulunan ksantofil, klorofil, gibi farklı renkli maddeleri kolonda ayrı tabaka oluşturarak birbirinden ayırmıştır. Renkli tabakalardan yola çıkarak yapıldığı bu ayırmaya Yunan dilinde 'chroma=renk' anlamındaki kromatografi ismini vermiştir.

### **1.3.1. Sıvı Kromatografi**

Kromatografik ayırma biri hareketli diğeri sabit olan iki farklı faz arasında gerçekleştirilir. Hareketli fazın sıvı, durgun fazın katı olduğu yöntem sıvı kromatografik yöntemdir (Harris 2011).

Kromatografi çeşitli yollarla sınıflandırılabilir.

#### **A. Ayırma prensibine göre**

1. Adsorpsiyon kromatografisi
2. İyon değişim kromatografisi
3. Dağılma kromatografisi
4. Size-exclusion kromatografisi
5. Afinite kromatografisi

## **B. Kromatografinin biçimine göre**

1. Normal faz sıvı kromatografi
  2. Ters faz sıvı kromatografi (Bala 2012)
- olarak sınıflandırılır.

## **A. Ayırma prensibine göre**

**1. Adsorpsiyon kromatografisi:** Hareketli fazın gaz ya da sıvı halde olduğu, durgun fazın ise katı, olduğu kromatografi çeşididir. Analizi yapılan madde katı halde bulunan durgun fazın yüzeyine adsorpsiyon yolu ile bağlanır. Kuvvet sırasına göre çok tutunan materyal yavaş şekilde hareket ederken, bunun tam tersi olarak az tutunan madde ise daha hızlı hareket eder.

**2. Dağılma kromatografisi:** Sıvı halde bulunan sabit faz katı yüzeye bağlanmıştır. Örnek sabit faz içerisindeki sıvı ile mobil faz arasında bir denge oluşturmaktadır.

**3. İyon değişim kromatografisi:**  $-N(CH_3)^{3+}$  gibi katyonlar veya  $-SO_3^-$  gibi anyonların yapısındaki, sıklıkla bir reçine olan sabit faza kovalent bağ ile bağlanır. Negatif yüklü örnek iyonları sabit faza doğru çekilir. Mobil faz sıvıdır.

**4. Jel geçirgenlik kromatografisi:** Bu kromatografik yöntemde örnekler moleküler büyüklerine göre ayırır. Daha çok gaz ya da sıvı halinde bulunan mobil faz bir gözenekli jelin içerisinden geçer. Moleküler anlamda büyük olan örnekler bu akım esnasında gözeneklere girmeden yoluna devam eder ve kolonu terk eder. Dolayısıyla boyutu en büyük olan örnek kolonu en hızlı terk eder. Bunun tam tersi olarak küçük boyuttaki moleküller ise gözeneklerin arasında oyalanır diğer bir deyişle daha küçük boyutta oldukları için kolondan çıkmaları uzun süre alacaktır.

**5. Afinite kromatografisi:** Örnek ile sabit fazın immobilize edilmiş (kovalent bağlanmış) iki molekül arasındaki spesifik etkileşimlerine dayanmaktadır. Sabit faza bağlanmış olan molekül bir proteinin antikoru olabilir. Yüzlerce protein barındıran bir çözeltide bahsedilen antikor kolona uygulandığında yalnızca antikor tanıyan protein, kolon ile etkileşmektedir. Geriye kalan tüm proteinler kolondan atılmış olur. Elde edilmek istenilen

protein en son aşamada ise ya iyonik şiddeti ya da pH'ı değiştirerek kolondan alınır (Harris 2011).

## **B. Kromatografinin biçimine göre**

### **1.3.1.1. Normal Faz Sıvı Kromatografisi (NP)**

Polar dolgu madde yapısı içeren sabit faz ve apolar mobil fazdan oluşur. Normal faz sıvı kromatografisinde dipol-dipol etkileşimleri, alıkonma, elektrostatik etkileşimler ve hidrojen bağı meydana gelir. Normal faz sıvı kromatografisinde en yaygın kullanılan sabit fazlar alümina, silika; kimyasal bağlı fazlar ise diol, nitrofenil, siyanopropil amino propil olabilmektedir (LoBrutto 2000).

Normal faz sıvı kromatografi yaygın olarak kullanılamamaktadır çünkü bu yöntem içerisinde mobil faz olarak saf organik çözücü kullanıldığından, bazik ve asidik bileşiklerde tutarlı sonuç alınamamaktadır. Zaman geçtikçe alkilchloro silanlar ile birlikte modifiye edilmiş silika desteği barındıran ters faz sıvı kromatografi yöntemi oluşturulmuş, bazik ve asidik bileşiklerin iyonlaşması çözücü pH'ının fonksiyonu olarak oluşturulduğundan ve daha stabil alıkonma süresi elde edilmiş ve ters faz sıvı kromatografi yöntemi daha tercih edilir hale gelmiştir (LoBrutto 2000).

### **1.3.1.2. Ters Faz Sıvı Kromatografi (RPLC)**

Sıvı kromatografi tekniğinde en yaygın kullanılan ters faz sıvı kromatografidir (reversed phase liquid chromatography, RPLC) ve ters faz sıvı kromatografi tekniğinde en çok C18 sabit faz kullanılır. C18 silika yüzeye kimyasal olarak bağlanmaktadır. Tekrarlanabilirlik, seçicilik ve kararlılık C18 kolonlarda çok iyidir (Horvath ve Melander 1977; Lee 1996).

• C-2	Etil silil	-Si-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>
• C-8	Oktil silil	-Si-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -CH <sub>3</sub>
• C-18	Oktadesil silil	-Si-(CH <sub>2</sub> ) <sub>17</sub> -CH <sub>3</sub>
• CN	Siyanopropil silil	-Si-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -CN

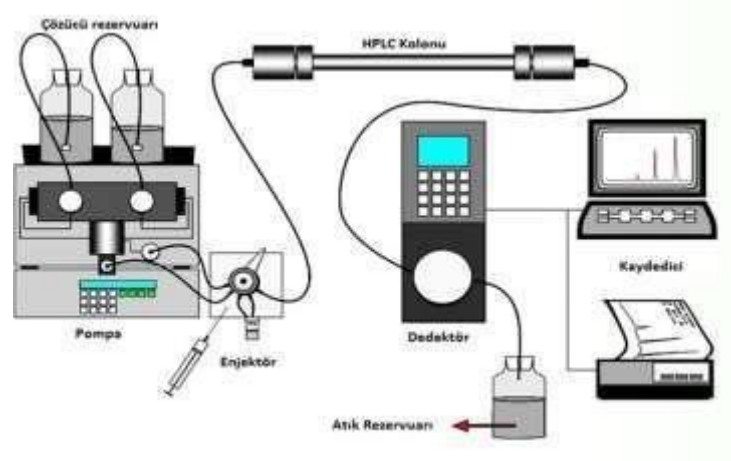
Şekil 1.3. Ters faz sıvı kromatografisinde kullanılan diğer durgun faz çeşitleri

### 1.3.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

1980’li yıllardan bu yana yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ilaç ve gıda analizlerinde en çok kullanılan analitik tekniklerden biridir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi gaz kromatografisi kadar yüksek rezolüsyona sahip olmasa da birçok analizde gaz kromatografisine göre çok daha fazla örnek için uygundur. Örnek vermek gerekirse dayanıklı olamayan uçucu bileşiklerin analizi ve sıcaklığa duyarlı olan materyaller için kolaylık sağlamaktadır. Yüksek performanslı sıvı kromatografisinde bir bütün halindeki bileşenlerin ayrılmasında sıvı mobil faz kullanır. İlk olarak bu bileşenler, ideal bir çözücüde çözündürülür ardından yüksek basınç ile birlikte sabit fazdan geçirilirler.

İlk olarak modern sıvı kromatografisinin temel prensibinin “Basınç” olduğu düşünülmüştür bu yüzden “Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi” isimlendirmesi yapılmıştır. Günümüzde ise yüksek performans sadece basınç kaynaklı olmamakta birçok etkenin birleşmesinden meydana geldiğinden “Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi” olarak isimlendirilir. Mikro boyutlardaki partiküllerden (5µm) meydana gelen durağan faz kullanılır. Mikro boyuttaki partiküller çok daha geniş yüzey alanı oluşturarak iyi bir ayırım gerçekleştirir. HPLC kolonunun yoğun bir şekilde doldurulmuş olmasından kolondan hareketli fazı ve örneği geçirebilmek için basınç kullanılması gerekmektedir. Bu basıncı yaratmak için pompalar kullanılır. 1215,9 Bar’a kadar basınç uygulanabilir. Oldukça yüksek basınçların ve yüksek verimdeki kolonların kullanıldığı HPLC, materyal türlendirilmesinde en çok kullanılan kromatografi türüdür (Karagözlü ve Akbulut 2012).

### 1.3.2.1. HPLC' nin Kısımları



Şekil 1.4. Yüksek basınç sıvı kromatografisinin (HPLC) kısımları (Çetinkaya, 2014)

#### 1.3.2.1.1. Hareketli Faz (Çözücü) Rezervuarı

Mobil fazın konulduğu kabın ismidir. HPLC sisteminde mobil fazın gazı alınmadan analiz yapılması kolona zarar verir bu yüzden çalışılmadan önce mutlaka degassing yapılmalıdır. Bunun için mobil fazdan ultrason, vakum veya inert bir gaz geçirilebilir. Mobil faz şişelerinin ağzının kapalı olmasına kontrol edilmelidir. Mobil fazın buharlaşmasından dolayı fazın kompozisyonu değişebilir.

#### 1.3.2.1.2. Enjeksiyon Sistemi

İdeal enjeksiyon, kolonun ucunda hareketli faz akışını etkilemeden yapılmalıdır. Metot teorik olarak bunu gerçekleştirebilir, yani mobil fazı durdurmaksızın kromatografik materyal yatağının baş kısmına numuneyi verebilmelidir. Bunun için septum enjektörü kullanılabilir de yüksek basıncın etkisi ile oluşan sızıntı problemleri septum enjektörü için dezavantaj oluşturur (Hışıl 2015). HPLC sistemlerinde genellikle loop enjeksiyonlu valf sistemi kullanılır. Pompadan gelen mobil faz akışı, kolonun üst kısmına örneği hareket ettirmek için loop kısmına çevirir. Bu sayede pompadan gelen hareketli faz daha önceden enjekte edilmiş numuneyi iterek kolona yollar (Avcı 2014).

### 1.3.2.1.3. Dedektörler

Kolon içerisinde bulunan ve birbirinden ayrılabilen maddeler mobil faz ile etkileşerek dedektöre gelirler. Dedektör maddeyi derişimine göre orantılı bir şekilde ölçmelidir. HPLC’de kullanılan dedektörler: Floresans dedektörü, absorbands dedektörü, refraktif index dedektörü (kırılma indisi dedektörü), iletkenlik dedektörü ve elektrokimyasal dedektördür.

#### 1.3.2.1.3.1. Absorbans Dedektörler

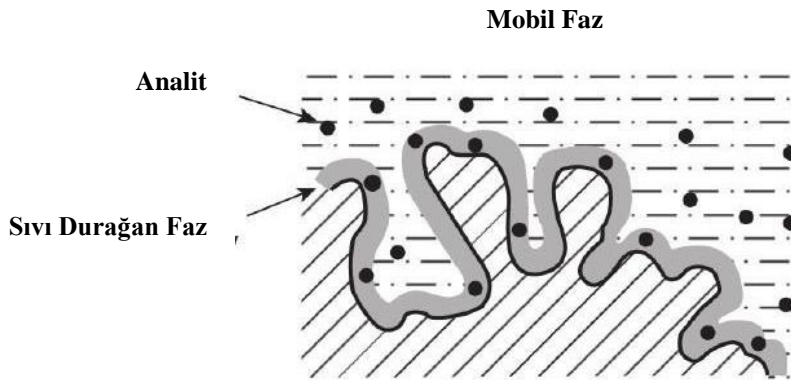
Sık kullanılan dedektörlerdendir. Maddelerin büyük bir kısmı UV/VIS bölgesinde görülebilecek dalga boylarında absorbandsa sahiptirler. Kantitatif ölçümlerin esası Lambert-Beer yasasıdır. Absorbans dedektörleri, akım bölgelerinden geçen sıvının, ışığın absorpsiyonunu istenilen değere ayarlanabilir dalga boyunda ölçerler. Görünür bölge (400-700nm) aralığında tungsten lambası, (200-400 nm) ise döteryum lambası kullanılmaktadır. Monokromatörler dalga boyu belirteci olarak kullanılmaktadır. Bazı dedektörler görünür bölge ve 200-800 nm UV bölgesini kapsayan geniş dalga boyu duyarlılığına sahiptir. Ayrıca çift ışına sahip cihazlar vardır (Diode array detector-Diyot dizinli dedektör, DAD). Diyet dizinli dedektör de ışın kaynağı olarak döteryum ve tungsten lambalar kullanılmaktadır. Geniş dalga boyu aralığında 195-950 nm arasında çalışılabilmektedir. Aynı anda birden fazla dalga boyunda kromatogramlar takip edilebilmektedir.

### 1.4. Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi (HILIC)

Hidrofilik etkileşim kromatografisi polar örneklerin analizine yönelik son yıllarda geliştirilmiş yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemidir. HILIC’in keşfi Dr. Andrew Alpert tarafından (J. Chromatogr. 499 (1990) 177) dergisinde 1990 yılında önerilmiş olup, polar analitlerin ayrımında kullanılır. Normal faz sıvı kromatografisinin bir çeşidi de sayılabilir. (Guo 2005; Jiang 2006). Özellikle ters faz ve normal faz kromatografi ayırımı yapılamayan bileşiklerin analizi bu teknik ile yapılabilmektedir. Hidrofilik etkileşim kromatografisinde, durağan faz, silika, diol ve amino gibi polar yapıdadır. Hareketli faz ise su oranı düşük ve polar çözelti oranı yüksektir ve sabit faza göre daha az polaritededir (Ikegami 2008). Az miktarda su ve polar çözelti içeren Asetonitril, HILIC yönteminde kullanılabilen klasik bir hareketli fazdır. Aynı zamanda dioksan ve THF gibi

su ile homojen karışan çözeltiler kullanılabilir. Hidrofilik Etkileşim Kromatografisinde düşük su ile yüksek hareketli faz oranı kullanıldığı zaman elektron iyonlaşma kütle spektrometrenin (ESI-MS) seçiciliğini analitler için arttırır. Bu sayede HILIC metot safsızlık analizlerinde kullanılabilir. Bunlara ilaveten güçlü organiklikte hareketli faz kullanıldığından kolonun basıncı düşüktür ve bu durum kolon içerisinde yüksek akış hızında çalışmasını sağlar ve dolayısıyla analiz süresini kısaltır.

Hidrofilik etkileşim kromatografisinde örneklerin ve sabit fazın polaritesinin artışı, analitlerin alıkonmasını arttırır ve hareketli fazın polaritesi azaltır. Hidrofilik etkileşim kromatografisinde önemli kriterler vardır. Bunlar; mobil faz pH'ı mobil faz kuvveti, akış hızı sabit faz türü gibi parametrelerdir. Hidrofilik etkileşim kromatografisinde mobil fazın su oranı %5-40 arasında olmalıdır. Hidrofilik etkileşim kromatografisinde sıklıkla kullanılan ACN oranı ise %60-95 oranı arasındadır. Bu yöntemde, hareketli fazdaki polar örneklerin yine polaritesi olan katı destek yüzeyindeki meydana gelen etkileşimler, örneklerin sabit fazda değişik zamanlarda ayrılmasına sebebiyet verir ve bu sayede kromatografik ayrımı sağlamaktadır. Polar sabit faz yüzeyi ile hareketli faz arasındaki uçta zengin bir faz yüzeyi oluşur. Bileşiklerin polaritesi arttıkça sabit sulu tabaka ile daha kuvvetli etkileşim gösterir. HILIC ayırım mekanizması çok komplekstir. HILIC mekanizması karışık olmasına rağmen yöntem pratikte basittir.

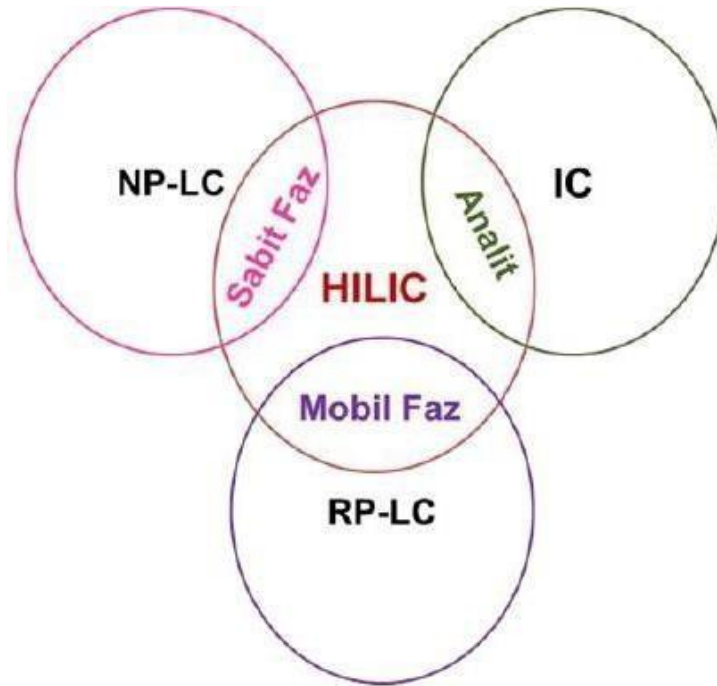


Şekil 1.5. HILIC sabit ve hareketli faz şematik gösterimi

HILIC'in diğer metotlara göre avantajlarını aşağıda verilmiştir;

1. MS gücü yüksektir, mobil faz içerisinde yoğun miktarda organik bileşen ile geliştirilmiştir.
2. Ters faz kromatografide kolon içerisinde yeterince tutunamayan yüksek polaritedeki örnekleri alıkoyar. Bu duruma örnek vermek gerekirse melamin ters faz kromatografide etkileşim vermeyen yapılar ile kolayca ayrılabilir (Alexander 2011).
3. Mobil fazın elüsyon sıralaması ters faz ayırımının tam zıttıdır ve bu farklı seçicilik kazandırmaktadır.
4. Yüksek derecede organik bileşenli mobil fazlardan kaynaklı yüksek akış hızları kullanımı mümkündür.

Yani özetlemek gerekirse HILIC ters faz sıvı kromatografisine göre daha iyi seçicilige ve alıkonmaya sahiptir. Bununla beraber normal faz sıvı kromatografisinde uygulanamayan polar örneklerin ayırımı için de kullanılabilir (Mccalley 2007).



Şekil 1.6. HILIC metodunun şematik gösterimi

HILIC yöntemi şekilde görüldüğü üzere NPLC, RPLC ve IEC metotları arasındaki boşluğu kapatmaktadır.



### 1.4.1. HILIC Kullanım Alanları

Hidrofilik etkileşim kromatografisi yöntemiyle aşağıda belirtilen yüksek polaritedeki maddelerin analizi yapılabilmektedir.

- Biyolojik aktif bileşikler
- Nükleotidler
- Suda çözünen vitaminler
- İlaç metabolitleri
- Nörotransmitterler
- Amino asitler
- Peptidler
- Oligosakkaritler
- Gıda analizleri
- RPLC’de arzu edilen alıkonma zamanı sağlanamayan ya da alıkonulamayan bileşikler.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

İspanyanın beş farklı bölgesinde tek botanik kökenli 31 İspanya balında bulunan amino asitler prolin, fenilalanin, tirozin ve lizin, ardından arginin, glutamik asit, histidin ve valindir. Çalışmasında Hermosin ve arkadaşları temel amino asit bileşen analizi ilk üç temel bileşim varyans analizi ile botanik varyansın %64'ünü açıkladı; Lavanta balları amino asitler sayesinde başarılı orijini analiz edilebilen tek gruptur. En iyi gruplandırılmış ballar portakal çiçeğinden olmasına rağmen okaliptüs balları ile orijin bazında üst üste gelme durumu yaşandı, diğer bir yandan da biberiye ve kekik ballarında orijin analizi yapılamadı. Student Newman-Keuls testi ile biberiye, kekik ve portakal çiçeği ballarının gruplanmasına izin verirken okaliptüs ve lavanta balları bu grupla karşılaştırıldığında ve kendi aralarında farklı kılan spesifik amino asit kompozisyonları gösterdi. Lavanta balları en yüksek tirozin konsantrasyonuna sahipti. Eski ballar için elde edilen sonuçlar, bir başka 17 numune seti için elde edilenler ile birlikte, İspanyol ballarının amino asit kompozisyonu için bir aralık oluşturmak üzere kullanılmıştır (Hermosín 2003).

İslam ve arkadaşları Bangladeş'in farklı bölgelerinden elde edilen beş farklı monofloral ve üç farklı multifloral bal örneğini inceledi. Ballardaki yüksek oranda L-Prolin buldular ( $2932,8 \pm 3,7$  mg/kg), Baldaki amino asit oranlarının yüksek olması balın antioksidan özelliğinin de iyi olduğu göstermektedir (İslam 2012).

Silva ve arkadaşları balda bulunan bileşiklerin kimyasal özelliklerini, uzun süre ısıtıldığında veya depolandığında kararlılıklarını ve özdeşlik ve kalite parametrelerini analiz etmişlerdir. Bu nedenle; bu bileşiklerin balda bulunan şekerler, proteinler, amino asitler, enzimler, organik asitler, vitaminler, mineraller, fenolik ve uçucu bileşikler gibi çeşitli özellikleri incelemişlerdir. Bu bileşiklerin, ısıtma ya da uzun süreli depolama ile meydana gelen kimyasal reaksiyonlarla ilgili olarak stabilitesi, balın kalite seviyesi tartışıldı. Ek olarak, Codex Alimentarius tarafından belirlenen minimum ve maksimum

sınırlar ile birlikte şekerler, nem, asitlik, kül ve elektriksel iletkenlik, renk, 5-HMF ve diastaz aktivitesi gibi kimlik ve kalite standartları tanımlanmıştır (Da Silva 2016).

Jelena Keckes tarafından balların botanik kökenlerine göre ayrıştırılması amacıyla yedi farklı çiçek türünde Sırp balı (akasya, ıhlamur, ayçiçeği, kolza, fesleğen, dev goldenrod ve karabuğday) bulunan 192 numunenin serbest amino asitleri profili analiz edildi. Ballar da tespit edilen ve en çok bulunan amino asitler prolin, alanin, fenilalanin, treonin ve arginindir. Oluşturulan amino asit profillerine göre, temel tanımlayıcı istatistik verilerine dayanan ve çok değişkenli kemometrik yöntemlerle doğrulanan çalışılan bal örnekleri arasında bazı önemli farklılıklar tespit edilmiştir. Temel bileşen analizi, fesleğen balı örneklerinin fenilalanin amino asidine sahip, iyi tanımlanmış bir küme oluşturduğunu göstermiştir. Doğrusal ayırma analizi ile elde edilen model, fesleğen balını numunelerin geri kalanından ayırmak için kullanılabilir ve amino asitler sayesinde akasya, ıhlamur, ayçiçeği ve kolza ballarını birbirinden ayırabilmektedir. Çalışmada dev goldenrod ve karabuğday balı örneklerinin amino asit profili için yeni veriler sunulmuştur. Balın çiçek orijini, kemometrik analiz ile birleştirilmiş amino asit profili ile başarılı bir şekilde değerlendirilebilir (Keckes 2013).

Amino asitlerin dansilasyonu yapılarak RP-HPLC sisteminde analiz edilmiştir (Tapuhi 1981). Geliştirilen metod yüksek oranda Dansil Amino Asit oluşması ile sonuçlanmıştır. Deneysel çalışmalarda sıcaklık ve kimyasal etkileşme süresi önemli etki oluşturmuştur. Çalışmada elde edilen sonuçlar gaz kromatografisi ile karşılaştırılarak türevlendirmenin avantajlı yönleri gösterilmiştir.

LC-UV sisteminde serbest amino asit analizi için yeni ve duyarlı bir metod geliştirilmiştir. (Rebane 2010). Bu çalışmada Dansil Klorür kullanılarak ön kolon derivatizasyonu sağlanmış ve bal analizinde kullanılmıştır. 23 farklı amino asit etkin olarak ayrılmış ve çalışmada metod analitik performans yönü ile optimize edilmiştir. Son olarak geliştirilen metod ile 200 farklı Estonya ballarındaki amino asit içeriği analiz edilmiştir.

Farklı numunelerde amino asitler ve biyojenik aminler yine Dansil Klorür kullanılarak ön kolon derivatizasyonu ile RP-HPLC sisteminde analiz edilmiştir (Minocha 2004). 10 cm

uzunluklu ters faz kolon kullanılmış ve 15 dakikada analiz gerçekleştirilmiştir. Eş zamanlı olarak numunelerde biyojenik aminler ve amino asitler analiz edilmiştir.

Bölgesel orjinle değişik numuneler kullanarak amino asit kompozisyonları araştırılmıştır (Iglesias, 2004). Çiçek ve çam ballarının amino asitlerinin farklılığı gözlenmiş ve küçük bir alan içerisinde bile aynı tür balların amino asit miktarlarındaki farklılıklar tespit edilmiştir.

V. Pereira, M. Pontes, J.S. Camara, J.C. Marques balda türevlendirilmiş amino asitleri ve biyojenik aminleri eş zamanlı olarak tespit etmişlerdir. Ayrıca balda yüksek miktarda serbest amino asit içeriği tespit edilmiştir. Toksikolojik etkilere neden olduğundan şüphelenilen biyojenik aminlerin (histamin, tiramin ve feniletilamin) yetersiz olduğu sayısal bal analizlerinden ortaya çıkmıştır (Pereira 2008).

Ana M. Gonzalez Paramas, J. Alfonso Gomez Barez, Carlos Cordon Marcos, Rafael J. Garcia-Villanova, Jose' Sanchez geliştirdikleri metod ile bal içeriğindeki amino asitleri HPLC sistemi ile tespit etmişlerdir. Çalışmada bal içinde yirmi iki serbest amino asit bulundu ve L-Prolin en çok bulunan amino asitler arasındadır. L-Prolin ortalama 20,27 mg/g miktarında tespit edilmiştir. Serbest GABA ortalama 0,53 mg/g olarak tespit edilmiştir. Farklı türler barındıran alanların farklı oranlarında serbest ve toplam amino asitler içeriği tespit edilmiştir (Paramás 2006).

Silici ve Karaman'ın yaptıkları çalışmada balda amino asit kompozisyonunu dikkate alarak geliştirdikleri kemometrik yöntemle balın karakterizasyonu üzerine çalışmışlardır. Farklı coğrafi ve botanik orijinli iki bal çeşidinde 19 serbest amino asit tayini için basit, güvenilir ve hızlı bir yöntem olan LC-MS yöntemi kullanılmıştır. Türkiye'de üretilen ormangülü ve çam balı ballarının serbest amino asit kompozisyonu ilk defa tespit edilmiştir. Bu veriler, balın besin değerinde önemli rol oynaması nedeniyle bal endüstrisi için büyük önem taşıyan balın besleyiciliğinin tanımlaması için kullanılabilir. Sonuçlar balcılık ile ilgili çalışmalarda alternatif bir yöntem olarak kullanılabilir. Amino asitlerin konsantrasyonunun ve özellikle aspartik asit, glisin, sistein, prolin, metionin, histidin ve arginin içeriğinin, ormangülü (çiçekli) ve çam balları arasında bulunan miktar farkları

tespit edilmiştir. Aynı çeşit ballar arasında da asit farklılığı tespit etmiştir (Silici 2014).

J. F. Cotte ve arkadaşları çalışmalarında bal özgünlüğünü belirlemek için HPLC sisteminde amino asit profillemesi yöntemini kullanmışlardır. Ticari örneklerin analizi günümüzde orijin tayinin ve balın kalitesinin tespit edilmesi için zorunlu kılınmaktadır. Amino asit analizi, bir bal örneğinin doğallığını onaylamak için etkili bir teknik olup, herhangi bir bal örneğinin tatmin edici düzeyde sınıflandırılmasını sağlamıştır (Cotte 2004).

İ. Kivrak çalışmasında 17 farklı serbest amino asitin üretilen ballarında içeriğini incelemiştir. Lavanta, vitex, kekik ve ayçiçeği ballarında çok yüksek oranda amino asit tespit edilmiştir daha sonra miktar bazında sıra ile akasya, okaliptüs, çam, yonca, kestane ve siderit balları gelmektedir. Fenilalanin, prolin, tirozin, izolösin ve lösin temel amino asitler olarak tanımlanmaktadır. Esansiyel amino asitler, fenilalanin, treonin, izolösin, lösin, triptofan, valin ve lizin (metionin hariç) analizi yapılan ballarda yüksek seviyelerde bulundu (Kivrak 2015).

P. M. Cometto, P F. Faye, R. D. P. Naranjo, M. A. Rubio ve Mario ve A. J. Aldao'nun çalışmasında Arjantinde üretilen balların amino asit içeriğini incelemiştir. RP-HPLC yöntemi ile UV 254nm dalga boyunda çalışarak Aspartik asit, serin, glisin, arginin, treonin, alanin, prolin, tirozin, valin, metiyonin, izolösin, lösin, norlösin, fenilalanin, triptofan, ornitin ve lisin olmak üzere 15 adet amino asit tespit edilmiştir. Bölgesel farklılıkların protein miktarındaki değişiklikler bu çalışmayla ispatlanmış olmaktadır (Cometto 2003).

### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

Balda amino asit içeriği ile balın orjini arasında güçlü bir bağlantı mevcuttur. Ayrıca amino asit içeriği balın kalitesi ile ilgili önemli bilgiler vermektedir. Dolayısı ile ballar da amino asit içeriğini tespit etmek için etkin yöntem geliştirme önem arz etmektedir. Bu bağlamda yeni bir HILIC metodu geliştirilmiş ve uygulanmıştır. Geliştirilen ve uygulanan teknik aşağıda verildiği gibi 7 farklı aşamadan oluşmuştur.

- 1- Literatür araştırması.
- 2- Balda amino asit içeriği belirlemek için aromatik amino asitler ve aromatik olmayan amino asitler için metod oluşturulması.
- 3- HPLC kalibrasyonu.
- 4- Standartların ve numunelerin hazırlanması.
- 5- Aromatik amino asitlerin analizi.
- 6- Aromatik olmayan amino asitler için türevlendirme ve analiz.
- 7- Bazı bal numunelerinde amino asit içeriği.
- 8- Bulguların değerlendirilmesi.

#### **3.1. Literatür Araştırması**

Bal numunelerinde amino asit analizleri yapılmış literatür araştırma çalışmaları yapılarak ilk olarak değerlendirmeler yapılmıştır. İlgili literatürlerde özellikle HPLC sisteminde yapılan amino asit analizleri ve metod geliştirme basamakları dikkatlice incelenmiştir. Ayrıca HILIC metodu kullanılarak yapılan amino asit analizleri ve performansları ile ilgili farklı makaleler değerlendirilmiştir.

## 3.2. Aromatik ve Aromatik Olmayan Amino Asitler İçin Metod Geliştirilmesi

### 3.2.1. Materyal ve Kromatografik Analizler

Ultra su cihazı: (GFL 2004/ Human Power 1): Analizler için gerekli olan Ultra saf su için kullanılmıştır.

Analitik terazi (Denver Instrument S1-234): Analizi yapılan amino asitlerin, Dansil Klorid'in, Sodyum Karbonatın, bal numunelerinin tartımı için kullanılmıştır.

Ultrasonik banyo(Elma S60H Elmasonic): Mobil faz degaze işlemi için, çözünmesi güç amino asitlerin daha rahat çözünebilmesi ve oluşturulan çözeltilerin homojen hale getirilmesi için kullanılmıştır.

Shimadzu marka L20224606065 seri numaralı HPLC: Bu çalışmada yapılan tüm kromatografik analizlerde kullanılmıştır.

Ecopipette marka mikropipetler (10-100 $\mu$ l), (100-1000 $\mu$ l), (5-10ml): Deneysel çalışmalarda kullanılmıştır. Ayrıca balın çözünmesi için uygun miktarda çözgenin hassas olarak eklenmesi için kullanılmıştır. Aynı zamanda Amino asit ve Dansil Klorid'in stok çözeltilerinin hazırlanmasında kullanılmıştır.

Farklı boyutlarda steril otomatik pipet uçları: Standartların ve balların ekstraksiyonu ve seyreltirmesinde kullanılmıştır.

J.P. Selectra marka 4120600 seri nolu pH Metre: Hareketli fazın pH değişimini sağlarken ve pH tespit ederken kullanılmıştır.

IKA C-MAG marka magnetik karıştırıcı: Dns-Cl ile standart amino asit ve balın türevlendirmesinde kullanılmıştır. 25 ml' lik beher: Dns-Cl ile amino asidin ve balların türevlendirilmesi esnasında kullanılmaktadır. Küçük boy manyetik balık: Dns-Cl ile amino asidin ve balların türevlendirilmesi esnasında kullanılmıştır.

15 ml'lik steril falcon tüpü: Dansil Klorid ve bazı amino asitleri (1000 ppm) stok çözelti olarak saklanması için kullanıldı. 50 ml'lik steril falcon tüpü: Çözünmesi diğerlerine göre daha zor olan bazı amino asitler (Örneğin tirozin) 200 ppm miktarında stok çözelti olarak saklanması için kullanıldı.

1,5 ml' lik vial: HPLC sisteminde sıvı halde bulunan analitin analizi için bulunan kabıdır.

Ultra saf su: Amino asit ve balın çözünmesinde kullanıldığı gibi çalışmanın en temel hareketli fazlıdır.

Asetonitril (Sigma-Aldrich, LC grade): Hareketli faz olarak ve Dansil Klorid'in çözünmesi için kullanıldı. Formik Asit (Sigma-Aldrich): Hareketli faz ve analitlerin daha iyi etkileşim oluşturmasını sağlamak amacı ile kullanıldı.

Etil Asetat, Diklorometan (Sigma-Aldrich LC-Grade): Aminoasitlerin geri kazanım (Recovery) çalışmasında kullanıldı. Dansil Klorid (Sigma-Aldrich) aromatik olmayan amino asitlerin UV dedektörde tanımlayabilmek için Dansil Klorid ile türevlendirme yapıp UV dedektörde tanımlanabilir hale getirilmesi amaçlanmıştır.

Standart amino asitler (Sigma Aldrich, LC grade) : Amino asitlerin metod geliştirme ve optimizasyon basamaklarında kullanıldı.

HILIC kolon (Amino-NH<sub>2</sub> HILIC, 4,6 mm i.d. 15cm) HILIC metod geliştirilmesi ve amino asitlerin analizi için kullanılmıştır.

İlletich Zentrifugen marka Universal 320 model santrifüj cihazı: Bal ekstraksiyon yönteminde büyük molekülleri çöktürüp küçük moleküllerin analizi için kullanıldı.

HCl: Dns-Cl türevlendirmesi ve mobil fazda kullanılan tamponun daha asidik oluşturabilmek için kullanılmıştır.

Na tamponu: Metod oluşturma yönteminde alternatif olarak kullanılmıştır.



Çeker ocak (Biochem): Solüsyonları solumamak ve daha güvenli çalışmak için kullanılmıştır.

Kapaklı cam şişe (1 Litrelik): Mobil Fazın içine konulduğu şişelerdir. Kapaklı cam şişe (250ml Litrelik): Türevlendirme için hazırlanan tamponu ve HCl çözeltisinin hazır olarak tutulması için kullanılmıştır.

Aseton (Teknik): türevlendirmede kullanılan beherlerin temizliğinde kullanılmıştır.

Altus marka buzdolabı: Hazırlanan stok çözeltilerin bozulmaması ve standartların belli bir sıcaklık prosedüründe tutulması gerekliliğinden dolayı kullanılmıştır.

Arçelik marka salon tipi klima: HPLC analizleri sıcaklıktan etkilenmemesi adına laboratuvar sıcaklığını 25°C dereceye sabitlenerek için kullanılmıştır.

Etüv (Mettler): Temizlenen cam malzemeleri kurutma için kullanılmıştır.

Bulaşık makinası (Labcanco Steamstrubber): Kullanılan cam malzemenin temizlenmesi için kullanıldı. Spatül: 1 mg miktarında standart tartabilmek için kullanıldı.

Tüp sporları: Kullanılan Falcon tüplerin düz durması için kullanılmaktadır.

Gerhard Marka RO500 model shaker: Balın HPLC'ye uygun hale getirmemizi sağlayan ekstrasyon metodunda kullanılmaktadır.

İka Marka MS3 model 3000 devirlik vortex: Çözünme, karıştırma işlemlerinin çok daha hızlı ve basit bir şekilde yapılmasını sağlar.

Pasteur pipeti: Ölçüm yapmadan yapılan aktarımlarda örneğin ekstraksiyon sonucu oluşan üst fazın vial aktarılması gibi işlemlerde kullanılmıştır.

### 3.2.2. Aromatik Amino Asitler ve Histidin Amino Asidi İçin Standart ve Türevlendirme Çözeltilerin Hazırlanması

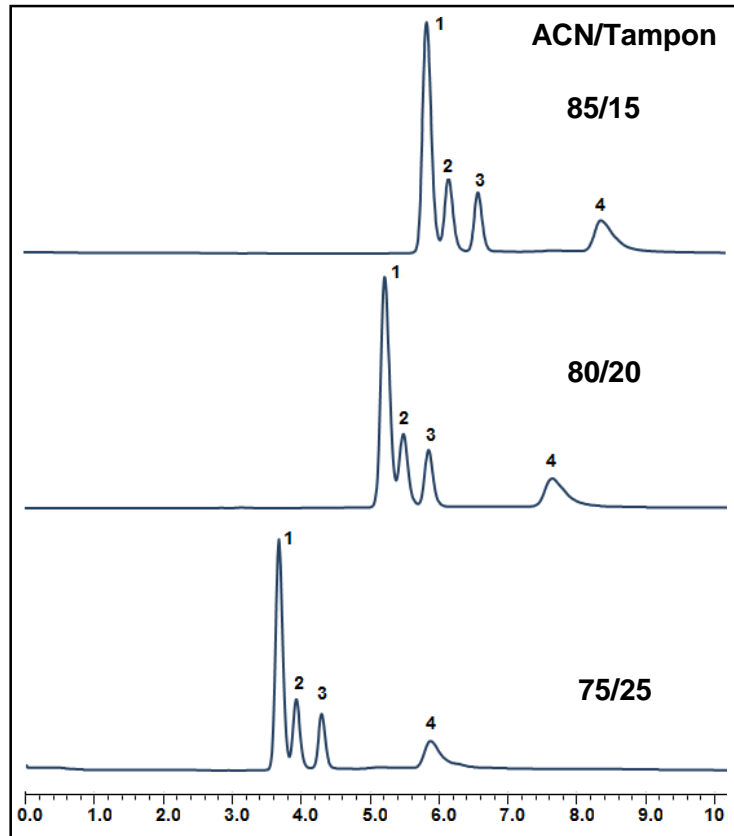
İlk olarak aromatik amino asitlerin (L-Fenilalanin, L-Triptofan, L-Tirozin) ve Histidinin 1000 ppm'lik standart çözeltileri hazırlandı. Bunun için 10mg'lık amino asit standartları ayrı ayrı ölçüldü. Hassas tartı yardımı ile ölçülen standart 15 ml'lik steril falcon tüplerine aktarıldı. Daha sonra 1000 ppm'lik çözelti oluşturabilmek için üstlerine otomatik pipet yardımı ile 10 ml'lik ultra saf su konuldu. Amino asitlerin suda çözünmesi için vortex ile falcon tüpleri içerisinde çalkalanmıştır. Fenilalanin, triptofan ve histidin amino asitleri steril falcon tüpleri içerisinde tamamen çözülebilmiştir fakat L-Tirozin amino asidi çözünmemiştir. Bu nedenle L-Tirozin amino asidinin stok konsantrasyonunu düşürmek için 50 ml'lik steril falcon tüpü falcon tüpü içerisine eklenen 10mg'lık L-Tirozin amino asidinin üstüne 50 ml'lik ultra saf su konulmuştur. Vortex kullanılarak çözünme işlemi hızlandırıldı ve 200 ppm'lik tirozin çözeltisi hazırlandı. İlk olarak teker teker amino asitlerin alıkonma süreleri tespit edildi. Bunun için fenilalanin ve triptofanın 1000 ppm'lik tirozinin ise 200 ppm'lik stok çözeltisinden ayrı ayrı 3 adet tek kullanımlık Pasteur pipeti yardımı ile 3 steril vial amino asit standartları aktarıldı.

### 3.2.3. Hareketli Faz ve Tamponların Hazırlanması

Hareketli faz hazırlanırken steril kapaklı 2 farklı şişenin bir tanesine asetonitril diğerine GFL 2004/ Human Power 1 marka saf su cihazından elde edilen saf su ile hazırlanan 5,0 mM Fosfat tampon çözeltisi konulmuştur. Bu izokratik çalışmada tek bir şişede hareketli fazların konulmamasının sebebi HPLC cihazı sayesinde an hareketli faz üzerinde oransal değişiklik yapılabilmesidir. Nötral 5,0 mM fosfat tamponu ise sodyum fosfat dibazik ile sodyum fosfat monobazik karışımından oluşturulmuştur. İlk olarak hesaplamaların kolay olması için 10,0 mM'lık fosfat tampon çözeltisi hazırlanmıştır. Bunun için kapaklı cam şişeye 800 ml ultra saf su konulur daha sonra üstüne sodyum fosfat dibazikten 2,209 gr sodyum fosfat monobazikten ise 0,3394 gr tartılıp şişenin içine atılır ve çözünmesi sağlanır. Daha sonra şişe ultra saf su ile 1 L'ye tamamlanır.

### 3.2.4. Hareketli Faz İçeriği Optimizasyonu

İlk olarak ayrı ayrı ilgili amino asitlerin alıkonma süreleri tespit edildi. Bunun için L-Fenilalanin ve L-Triptofanın 1000 ppm'lik L-Tirozinin ise 200 ppm'lik stok çözeltisinden ayrı ayrı 3 adet tek kullanımlık Pasteur pipeti yardımı ile 3 steril vial amino asit standartları aktarıldı. 60:40 (v/v) ACN: 5mM fosfat tampon 1ml/dk akış hızında ve enjeksiyon hacmi: 20 µl olarak ayarlandı. Kromatografide kullanılan hidrofilik etkileşimlerde ACN içeriği önemli etki oluşturduğundan, ilk olarak farklı oranlarda 60:40 (v/v) ACN:5mM fosfat tamponu kullanılmıştır ancak 75/25 (ACN: 5mM Fosfat Tamponu) oranı kullanıldığında etkin amino asitlerin etkin ayırımı gözlenmiştir. Daha sonra ACN içeriği artırılarak Hareketli faz içeriği 85/15 (ACN:5mM fosfat) olarak optimize edilmiştir. Şekil 3.1'den de görüldüğü gibi hareketli fazda artan ACN içeriğine bağlı olarak ayırım kapasitesinin önemli oranda arttığı görülmüştür.



Şekil 3.1. Farklı hareketli faz oranlarında amino asitlerin HILIC modunda gösterdikleri alıkonma zamanları. Kromatografik koşullar: Kolon: 4,6 mm i.d. NH<sub>2</sub> kolon UV: 214 nm tampon: 5mM fosfat pikler: 1) Triptofan, 2) Fenilalanin, 3) Tirozin 4) Histidin

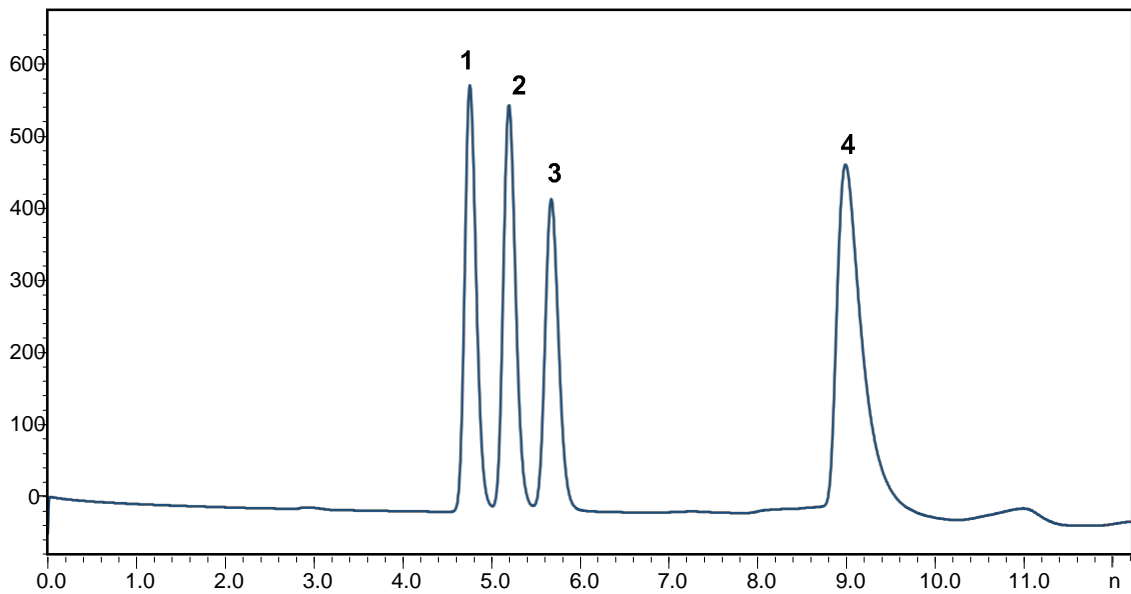
Yapılan analizlerde neticesinde Triptofan ve Fenilalanin arasındaki alıkonma sürelerini çok yakın olmasına rağmen geliştirilmiş HILIC modunda 6 dakikada amino asitler için etkin ayırım ve resolüsyon sağlanmıştır. Histidin amino asidi aromatik olmadığından UV bölgede düşük absorbands vermiş ancak HILIC modunda yine ayırımı sağlanmıştır.

### 3.2.5. pH Etkisi

HILIC modunda pH da önemli etki oluşturmaktadır. Çalışma kapsamında 5 mM fosfat tamponu düşük pH larda (3,4 ve 5 pH derecelerinde) ayarlanarak analiz çalışmaları yapılmış ancak etkin sonuç alınamamıştır. Bunun nedeni amino asitlerin düşük pH lardaki elektroforetik hareketliliği ve kolonun amino gruplarının elektriksel olarak yüklenmesinden kaynaklandığı öngörülmüştür.

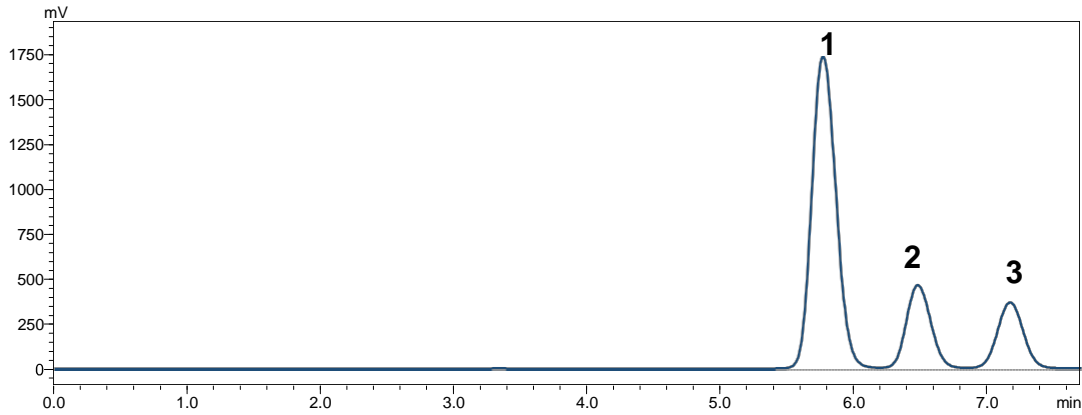
### 3.2.6. Su Etkisi

Hidrofilik etkileşimlerde hareketli fazda tampona göre daha çok düşük oranlarda su kullanılmaktadır. 5mM fosfat tamponuna göre optimize edilen yöntemde tampon yerine su kullanılarak amino asitler analiz edilmiştir.



Şekil 3.2. %30 su ve %70 ACN'den oluşan hareketli faz oranlarında amino asitlerin HILIC modunda gösterdikleri alıkonma zamanları. Kromatografik koşullar: Kolon: 4,6 mm i.d. NH<sub>2</sub> kolon UV: 214 Hareketli faz ACN:Su Pikler 1) Triptofan, 2) Fenilalanin, 3) Tirozin 4) Histidin

Yapılan analizde su kullanımının alıkonma zamanını, pik etkinliği ve rezolüsyonu arttırdığı gözlenmiştir.

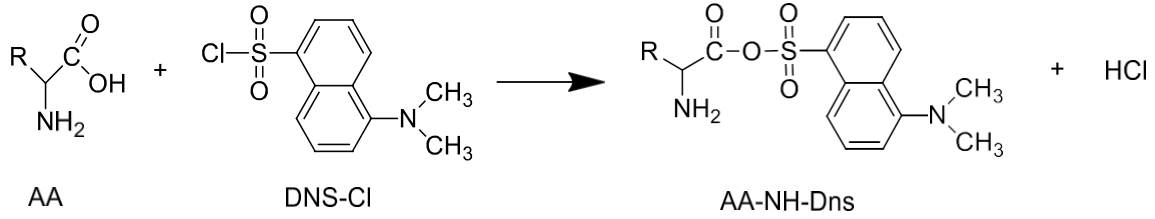


Şekil 3.3. Kalibrasyonda kullanılan amino asitlerin HILIC modunda gösterdikleri alıkonma zamanları. Kromatografik koşullar: Kolon: 4,6 mm i.d. NH<sub>2</sub> kolon UV: 214 Hareketli faz ACN:Su Pikler 1) Triptofan, 2) Fenilalanin, 3) Tirozin

Aromatik amino asitlerin ve histidinin seçiciliği çok farklıdır. Amino asitlerin analizlerinde kolaylık sağlamak amacıyla standartların optimize edilmesi düşünüldü. Daha önce yapılan analizlerde L-Triptofanın UV dedektörde absorbanısı diğer analizi yapılan amino asitlerden daha fazladır. Bu yüzden standart amino asit çözeltisi hazırlanırken L-Triptofandan bir birim alınırken L-Fenilalanin ve L-Tirozin amino asitlerinden ise dört birim L-Histidinden sekiz birim olarak alınmıştır. Bu analizden elde edilen diğer bir sonuç ise L-Histidinin etkin absorbanı verememesidir. Bunun nedeni tampon kullanımı ile L-histidin yapısındaki imidazol grupları farklı pH larda pozitif ya da negatif yüklenmektedir. Dolayısıyla farklı etkileşim göstereceğinden UV bölgede absorbanısı düşmesi yüksek olasılıktır.

### 3.2.7. Aromatik Olmayan Amino Asitler İçin Standart ve Türevlendirme Çözeltilerin Hazırlanması

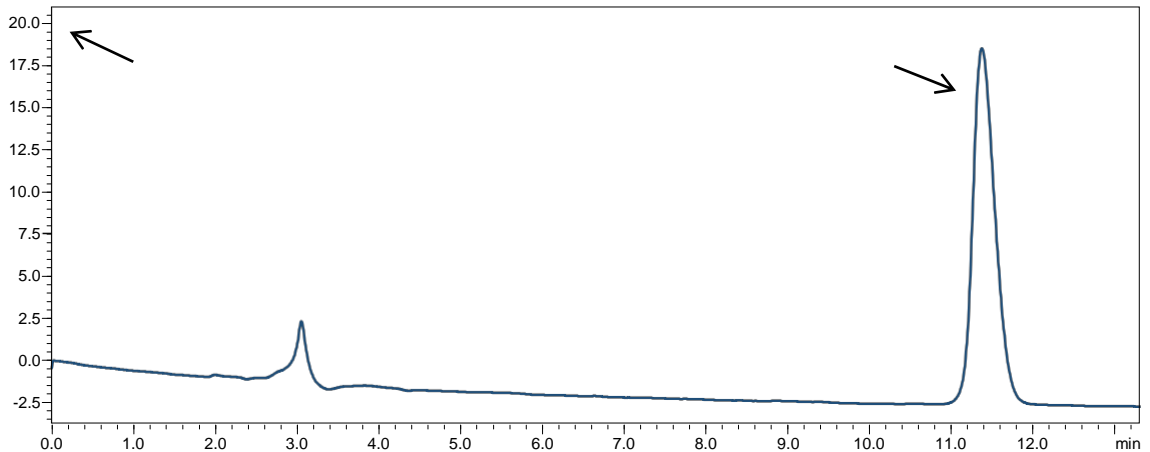
L-Prolin, L-Aspartik asit, L-Histidin gibi amino asitler aromatik halka içermediğinden UV dedektörlü HPLC ile analizi yapılamamaktadır. Amino asit türevlendirmelerinde Dns-Cl yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışma kapsamında da Dns-Cl kullanılmıştır. İlgili reaksiyon aşağıda şekil 3.4'te verilmiştir.



Şekil 3.4. Amino asitlerin Dns-Cl ile türevlendirme reaksiyonu

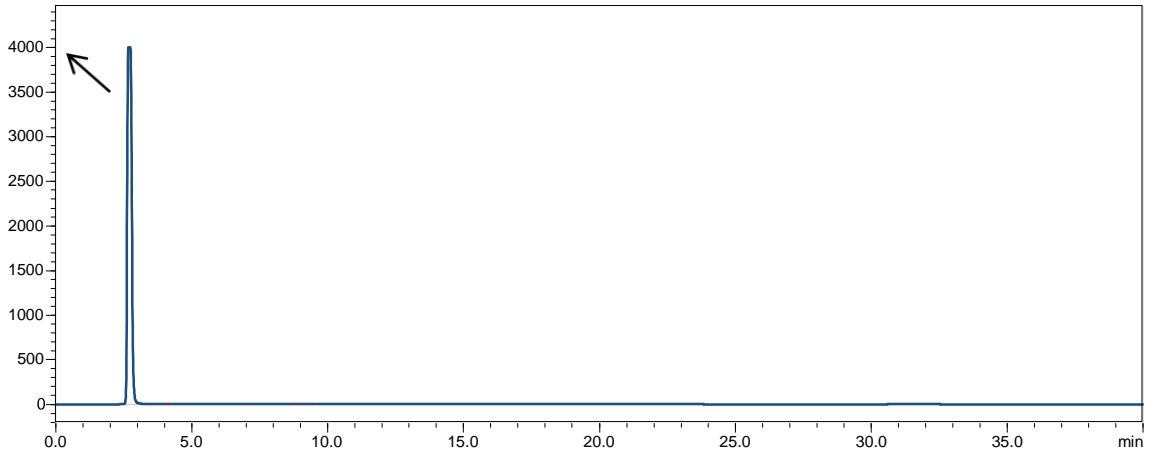
Türevlendirme çalışmalarında L-Prolin, L-Aspartik asit, L-Histidin kullanıldı ve ilk olarak L-Prolin amino asidi için uygulanmıştır. İlk olarak L-Prolin ve Dansil Klorid'in alıkonma süreleri görülmesi için yüksek konsantrasyonlarda (1000 ppm) HPLC sistemine verilmiştir. Bunun için 10 mg'lık L-Prolin ve Dansil Klorid standartları ayrı ayrı analiz edildi. Hassas tartı yardımı ile ölçülen standart 15 ml'lik steril falcon tüplerine aktarıldı. Daha sonra 1000 ppm'lik çözelti oluşturabilmek için üstlerine otomatik pipet yardımı ile 10 ml'lik ultra saf su konuldu. İlk yapılan analizde 1000 ppm'lik Dansil Klorid ve 1000 ppm'lik L-Prolin ve 0,5mM pH 9,1 Sodyum karbonat çözeltisi hazırlanmıştır. Yapılan analizlerin türevlendirmesi bir beher ve manyetik balık yardımı ile 2,5 saat homojenize edilerek yapılmıştır.

Türevlendirme çalışmasının ilk aşamasında L-Prolin amino asidine yoğunlaştırılmıştır. İlk olarak L-Prolin ve Dansil Klorid'in alıkonma süreleri görülmesi adına yüksek konsantrasyonda cihaza verilmiştir.



Şekil 3.5. Türevlendirilmeden yapılan L-Prolin(1000 ppm) analizi Kolon: 4,6 mm i.d. NH<sub>2</sub> kolon UV: 214 Hareketli faz: ACN, Su

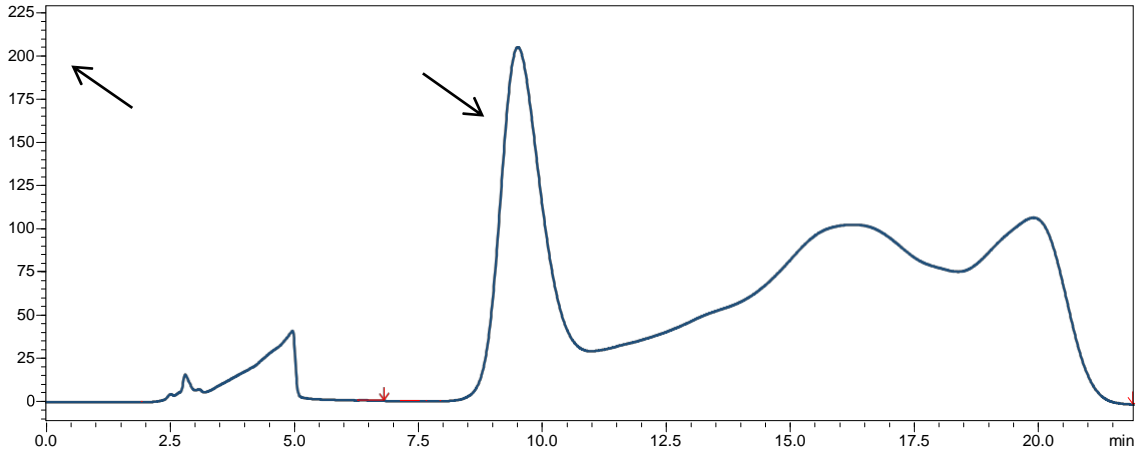
Şekil 3.5'te türevlendirilmeden L-Prolin (1000 ppm) analizi yapılmış ancak absorban değeri 20 civarında gözlenmiştir. Gerçek numune uygulamasında bu baskılanma durumu ve matriks etkisi gibi sebeplerden dolayı L-Prolin analizi türevlendirilmeden yapılmasını önemli oranda zorlaştıracaktır. UV görünür bölgede daha yüksek absorban vermesi için türevlendirme yapılması gerekmektedir. Şekil 3.6'da Dansil Klorid'in HPLC-UV kromatogramını göstermektedir.



Şekil 3.6. Dansil Klorid(1000 ppm) HPLC-UV kromatogramı

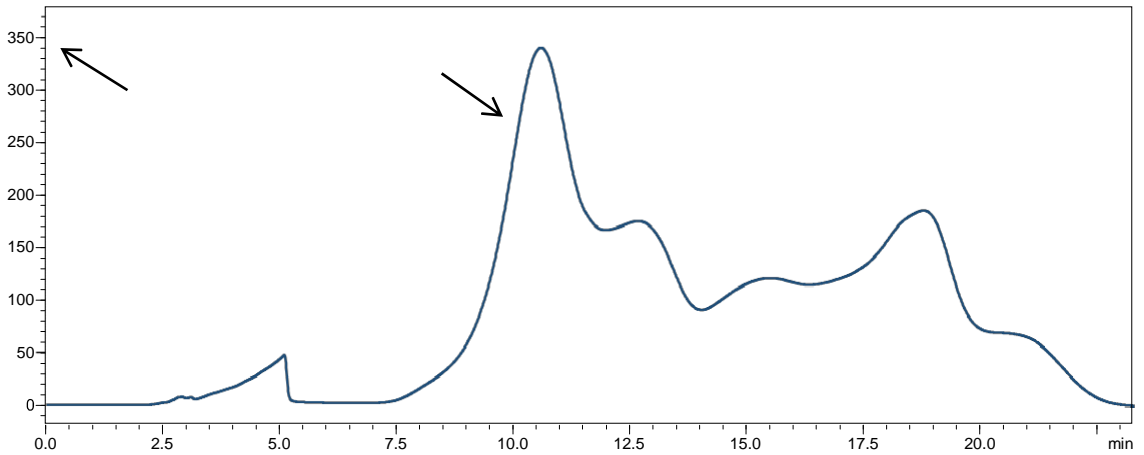
Şekil 3.6'da gösterilen analiz L-Prolin ile Dansil Klorid'in (1000 ppm) etkileşip etkileşmediğini göstermek için yapılmıştır. Yukarıdaki analiz ayrıca Dansil Klorid'in 4000 lerede yüksek absorban göstermesi amino asitlerin türevlendirilmesinde kullanımının oldukça isabetli olduğunu göstermektedir.

Türevlendirme çalışmaları ilgili literatüre göre yapılmıştır (Tapuhi, 1981). Daha sonra değişen miktarlarda L-Prolin ile Dansil Klorid ile 2 saat ön kolon derivatizasyonu sonrasında analizler yapılmıştır.



Şekil 3.7. Dansil Klorid ile tüvlelendirilmiş L-Prolinin (84 ppm) HILIC-HPLC kromatogramı

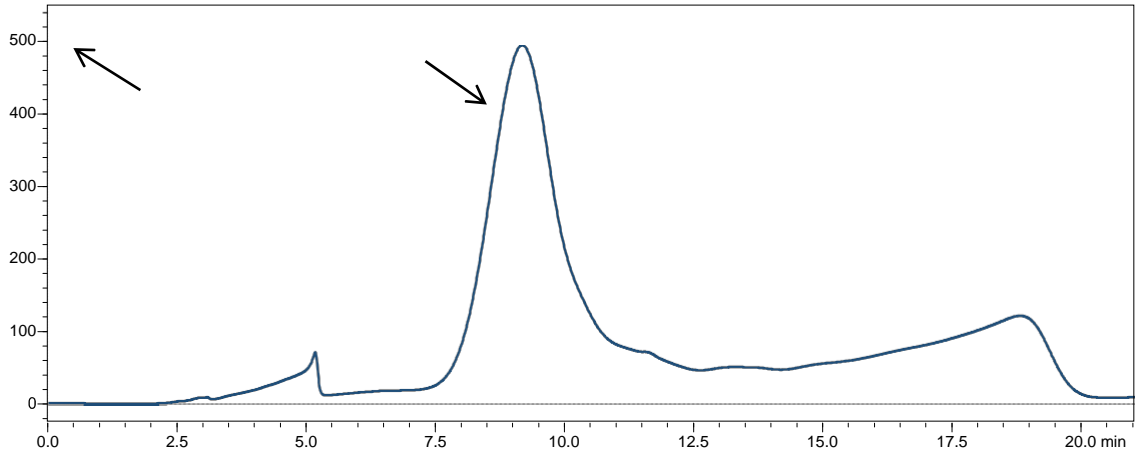
Şekil 3.7’te görüldüğü gibi 200 absorbans değerine karşılık 84 ppm L-Proline 200 üzerinde absorbansa ulaşılmıştır. Daha sonra L-Prolin miktarı orantılı olarak (84ppm, 165ppm, 372ppm) arttırılmış ve sonuçlar analiz edilmiştir.



Şekil 3.8. Dansil Klorid ile tüvlelendirilmiş L-Prolinin (165 ppm) HILIC-HPLC kromatogramı

Şekil 3.8’te görüldüğü gibi 165 ppm L-Proline 350 düzeylerinde absorbansa ulaşılmıştır. Elde edilen sonuç L-Proline tekrar orantılı konsantrasyon uygulanması gerektiği şeklinde değerlendirilerek L-Prolin konsantrasyonu orantılı olarak 372 ppm olarak ayarlanmış ve Dansil Klorid ile etkileştirilerek kromatografik analiz yapılmıştır.





Şekil 3.9. Dansil Klorid ile türevlendirilmiş L-Prolinin (372 ppm) HILIC-HPLC kromatogramı

Yapılan kromatografik analizde türevlendirilmiş L-Prolin için 372 ppm düzeyinde 500 üzerinde UV absorbansa ulaşıldığı Şekil 3.9'dan görülmektedir. Balda L-Prolin düzeyleri ilgili konsantrasyonlarda tespit edilebilmesi gibi sebeplerden dolayı bu daha yüksek konsantrasyonlarda türevlendirme yapılmamıştır. Sonuç olarak, Şekil 3.7, 3.8. ve 3.9. lerden L-Prolin miktarı artışı ile orantılı olarak 200, 350 ve 500 düzeylerinde absorbans vermektedir.

Benzer türevlendirmeler L-Aspartik asit ve L-Histidin için de yapılmış ancak kromatogramlardan iyi sonuç alınamamıştır.

### 3.2.8. HPLC Metodunda Analiz Şartları

Tablo 3.1. 1ml/dk akış hızı pH:7'de aromatik ve L-Histidin amino asitlerinin alıkonma süreleri

Numara	Amino asitler	Alıkonma Süresi
1	L-Triptofan	4,8 dakika
2	L-Fenilalanin	5,3 dakika
3	L-Tirozin	5,7 dakika
4	L-Histidin	9,1 dakika

### Otosampler: SIL 20A (Shimadzu Model)

Tablo 3.2 Otosampler Optimize Değerleri

<b>Parametreler</b>	<b>Optimal Değerler</b>
Tabla Kapasitesi	200 vial
Vial Kapasitesi	1,5 mL
Rinsing Hacmi	200 mL
Purge Zamanı	15 dakika
Rising modu	Her enjeksiyondan önde ve sonra.
Enjeksiyon Hacmi	20µL

### Pompa LC-20AT

Tablo 3.3. Pompa Optimize Değerleri

<b>Parametreler</b>	<b>Optimize Değerler</b>
Hareketli Faz Modu	İzokratik akış
Controlled by:	Kolon üzerinden sürekli akış.
Analitik Akış	1 ml/dk
Basınç	37 bar

### Oven CTG-10ASvp

Tablo 3.4. Firin Optimize Değerleri

<b>Parametreler</b>	<b>Optimize Değerler</b>
Çalışma Modu	İzotermal
Sıcaklık	25° C

Detector SPD-20A

Tablo 3.5. Dedektör Optimize Değerleri

Parametreler	Optimize Değerler
Lamba	Deuterium D2
Hücre Sıcaklığı	25°C
Dalga Boyu	214 nm
Çalışma Zamanı	40 dakika

HILIC -Kolon

Tablo 3.6. Kolon Optimize Değerleri

Parametreler	Optimize Değerler
Kolon Markası	Kromasil
Özellikleri	250 mm × 4,6 mm I.D.
Hareketli Faz	Su + Fosfat Tamponu + Asetonitril

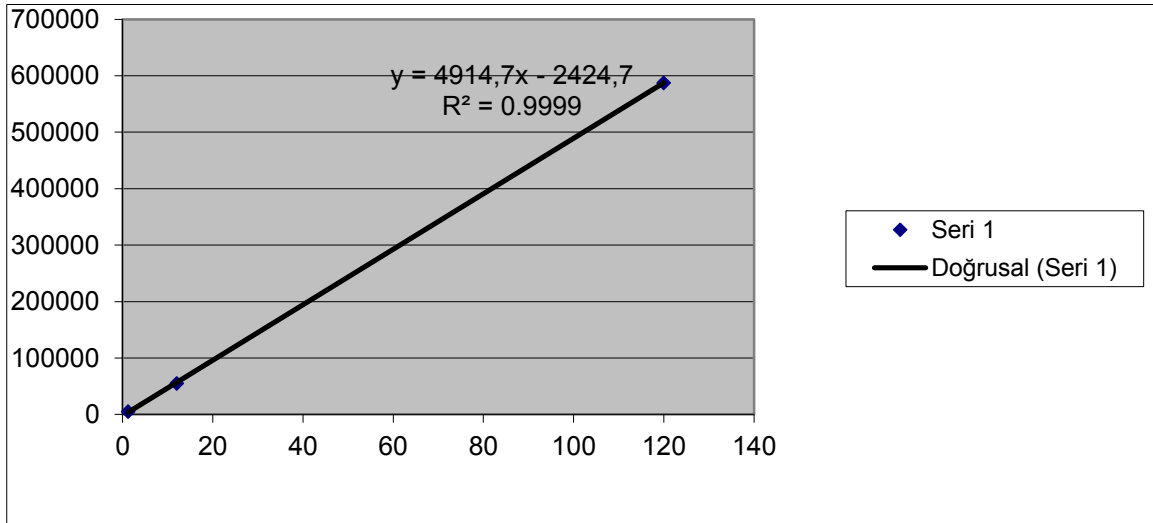
### 3.2.9. Kalibrasyon

Bu çalışmada analit üç konsantrasyon ile kalibre edilmiştir.

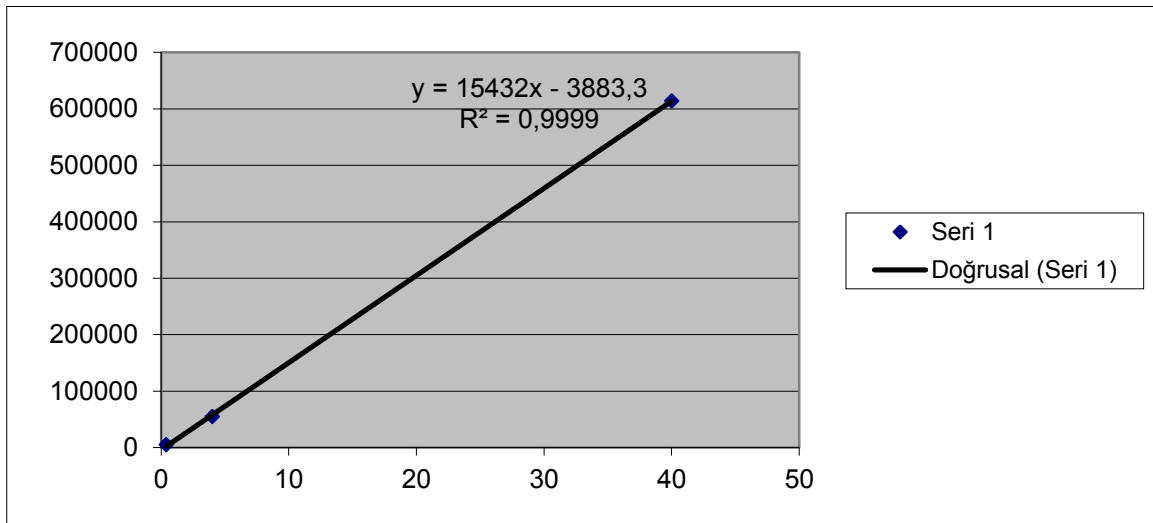
Tablo 3.7. Analitlerin kalibrasyon listesi

Analitler	Hazırlanmış Konsantrasyon (ppm)
Trp	40-4-0,4
Phe	121-12,1-1,21
Tyr	121-12,1-1,21

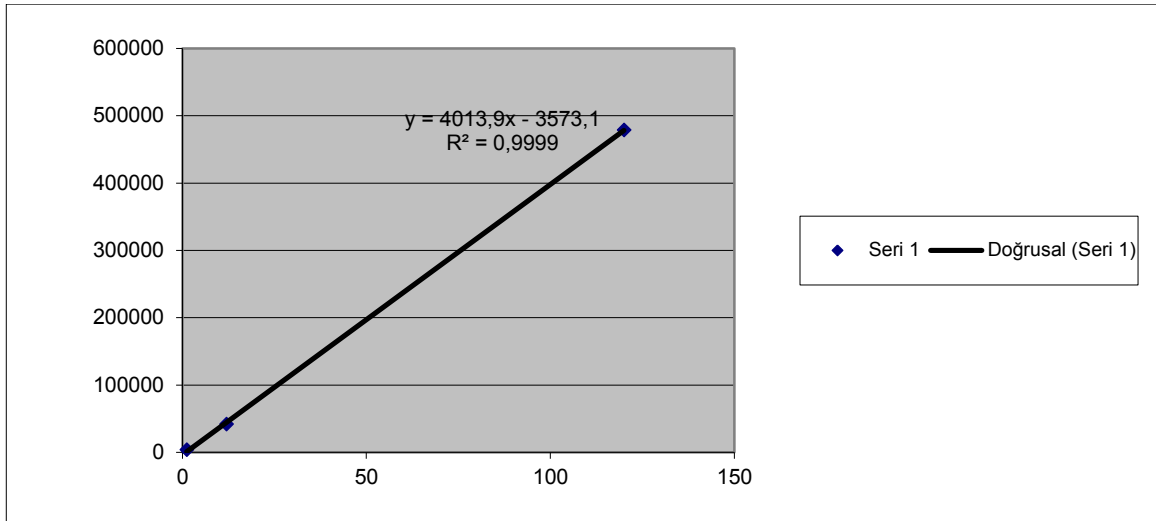
Sırasıyla L-Triptofan L-Fenilalanin ve L-Tirozin amino asitlerinin kalibrasyon grafiği çizdirildi. UV absorbanslarına bakılarak L-Fenilalanin ve L-Tirozin için ilk olarak 120, 12 ve 1,2 ppm kalibre edilmiştir. L-Triptofan UV absorbansı diğer amino asitlerden iyi olduğundan 40, 4 ve 0,4 ppm seviyelerinde kalibre edildi.



Şekil 3.10. L-Fenilalanin kalibrasyon grafiği



Şekil 3.11. L-Triptofan kalibrasyon grafiği



Şekil 3.12. L-Tirozin kalibrasyon grafiği

Kalibrasyon grafiklerinde  $R^2 = 0,9999$  olması numunelerin miktar analizlerinde kullanılması için ideal olduğunu göstermektedir.

### 3.2.10. Örnek Hazırlanması

Aşağıdaki bulunan tablo 3.8'de gösterildiği gibi Bingöl ili ve çevresindeki farklı yerlerde on bal örneği alınmıştır.

Tablo 3.8. Örnek isim listeleri

Örnek Yerleri	Örnek İsim Kodu
Kavar Köyü (Genç)	S1
Kayapınar Köyü Karliova	S2
Tavuz Köyü (Solhan)	S3
Metan Köyü (Yedisu)	S4
Kiği	S5
Bingöl Merkez	S6
Kestane Balı 1	K1
Kestane Balı 2	K2
Bölgesel Market	A1
Bölgesel Market	A2

Numuneler, 4 °C' de buzdolabında saklandı (amino asitlerin fotodegradasyonu önlemek için).

### 3.2.11. Kromatografik Piklerin Değerlendirilmesi

#### Alıkonma zamanı

Bir numunenin cihaza enjekte edildikten sonra kolon içerisinde geçirdiği süreye alıkonma zamanı olarak tanımlanmıştır. Enjeksiyonun başladığı andan numune pikinin en yüksek olduğu yere kadar geçen sürenin ölçülmesi ile tespit edilir. Alıkonma süresi dakika cinsi ile verilmektedir. Sembol olarak RT olarak gösterilmektedir. Alıkonma zamanını kolon sıcaklığı, basınç, kolon boyutu ve akış hızı gibi faktörler etkilemektedir (Üstün 2018).

#### Kapasite faktörü(k)

Maddelerin bağlı alıkonmasına kapasite faktörü denilmektedir, Maddelerin alıkonma zamanlarına ilaveten ölü zamanın da ( $t_0$ ) belirlenmesi ile kapasite faktörü hesaplanmaktadır.  $T_0$  kolonda tutunamayan maddenin alıkonma zamanını ifade eder. Kbr, Urasil gibi maddeler ölü zamanı tespit etmek amacı ile kullanılabilir. Hareketli faz ve sabit faz Kapasite faktörünü etkiler (Hışıl 2015).

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad (3.1)$$

Kapasite faktörü formülü

#### Etkin tabaka sayısı (N)

Etkin tabaka sayısı daha keskin, hızlı ve simetrik piklerin elde edileceğini gösterir. Kolonun uzunluğuna, kolonun dolgu partiküllerine ve kolonun dolgusu kolonun etkinliğini belirlemektedir (Hışıl 2015). Etkin tabaka sayısı, dar ve keskin piklerin oluşmasını, bileşenlerin birbirinden ayrılmasını ve daha iyi bir tayin ile analizleri sonuçlaştırmayı hedefler.

$$N = 16 \left( \frac{t_r}{Wb} \right)^2$$

$$N = 5.54 \left( \frac{t_r}{W_{1/2}} \right)^2 \quad (3.2)$$

**Tabaka;**

$$R_s \sim \frac{1}{4} \sqrt{N} \quad (3.3)$$

$$R_s \sim \frac{1}{4} \sqrt{\frac{L_c}{H}} \sim \frac{1}{4} \sqrt{\frac{L_c}{h \cdot d_P}}$$

Etkin tabaka sayısı formülü

$L_c$ : kolon uzunluğu;

$d_P$ : partikül büyüklüğü;

$h$ : bir tabanın yüksekliğini ifade eder.

**Seçicilik ( $\alpha$ )**

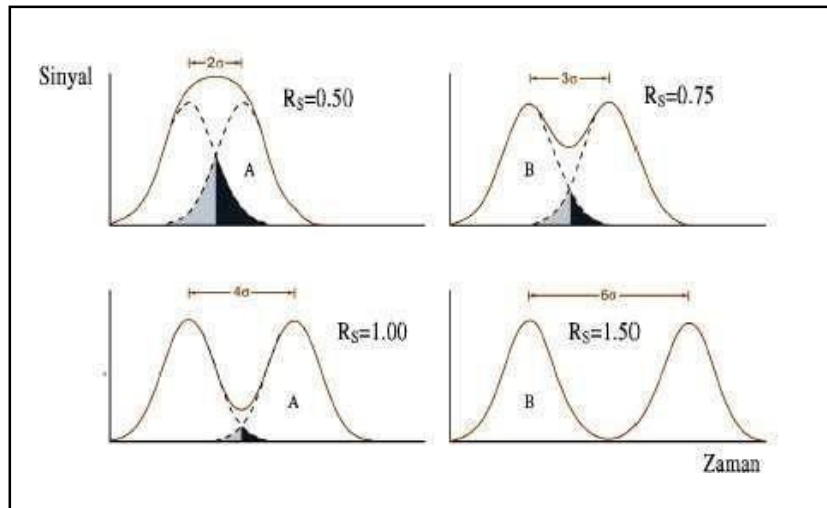
$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (3.4)$$

Seçicilik Formülü

$\alpha$ , seçicilik; iki farklı pik arasındaki ayrımın ifadesidir.  $\alpha=1$  olduğu zaman pikler birbirinden ayrılamaz tek bir pikmiş gibi kolondan çıkarlar. Sıcaklık, sabit faz ve hareketli faz  $\alpha$ 'yı etkileyen faktörlerdir.  $k_1$  ilk bileşenin alıkonma zamanı;  $k_2$  de ikinci bileşenin alıkonma zamanıdır (Skoog 1998).

### Ayırma gücü ( $R_s$ )

Ayırma gücü ( $R_s$ ), ayırma kapasitesini kolonun pikleri belirler. Ayırma gücünü kapasite faktörü, etkin tabaka sayısı ( $N$ ) ve seçicik ( $\alpha$ ) etkiler.



Şekil 3.13. Piklerde rezolüsyonu gösteren  $R_s$  değeri

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left( \frac{\alpha-1}{\alpha} \right) \left( \frac{k}{1+k} \right)$$



Şekil 3.14.  $R_s$  değerinin etkinlik, seçicilik ve kapasite faktörü ile ilişkisi

Ayırma gücünün aşağıdaki koşullar etkilemektedir:

- Bu koşulların en kritiği seçiciliktir. Seçicilikte meydana gelen değişimin ayırma gücüne etkisi güçlü olmaktadır.
- $k$  değeri küçük olduğu zaman alıkonma zamanının önemi artar.
- Kolonun yeni olduğu ve ayırma gücünün iyi olduğunu ise etkinlik ifade eder (Henden 2009).



## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

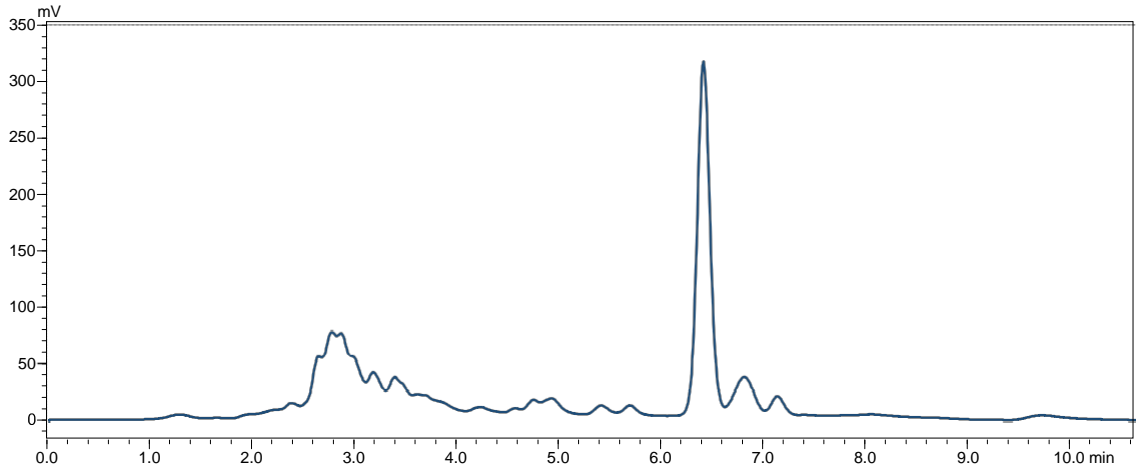
Bal; karbonhidrat, fenolik asit, amino asit, protein, kalıntı ilaç rezidüleri gibi pek çok bileşen içermektedir. Balın yapısında bulunan amino asitler özellikle L-Prolin balın kalitesi ve coğrafik orjini ile ilgili önemli bilgiler vermektedir. Çalışmamızda amino asitler aromatik ve aromatik olmayan şeklinde iki sınıfa ayrılarak analizler yapılmıştır. İlk olarak aromatik amino asitler daha sonra ise aromatik olmayan amino asitler için türevlendirme ve analiz çalışmaları yapılmıştır. Türk gıda kodekste yer alan uygulamada L-Prolinanalizi UV spektrofotometre ile yapılabilmektedir. Ancak böyle bir analizin spekülatif olabilme ihtimali yüksek olması dolayısı ile çalışmamızda L-Prolin ve aromatik olmayan bazı amino asitler için Dns- Cl ile türevlendirilerek analiz yapılması yoluna gidilmiştir.

### 4.1. Aromatik Amino Asitler ve L-Histidin için Validasyon Sonuçları

HILIC tekniği son yıllarda geliştirilmiş önemli bir kromatografik tekniktir. Literatürde şimdiye kadar bal numunelerinde amino asit analizi için ters faz kromatografi kullanılmıştır. Bu çalışmamızda yeni bir yaklaşımla yani HILIC tekniği uygulanarak amino asitler analiz edilmiştir. Geliştirilen analitik metod optimize edilerek bazı farklı numunelere uygulanmıştır. Validasyon çalışmalarında geri kazanım, hassasiyet ve doğruluk oranları dikkate alınarak yapılmıştır. Amino asit analizleri 214 nm dalga boyunda yapılmıştır. Her numune ayrı ayrı sisteme verilmiş ve standartlar farklı konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. HILIC tekniğinde hareketli faz olarak yüksek oranda ACN ve düşük oranlarda su kullanılmıştır. LOD (minimum deteksiyon değeri) ve LOQ (belirleme sınırları) aşağıdaki formüllere göre hesaplanmıştır.

$$LOD = 3 * \frac{S.D.}{Slope} \quad (4.1)$$

$$LOQ = 10 * \frac{S.D.}{Slope} \quad (4.2)$$



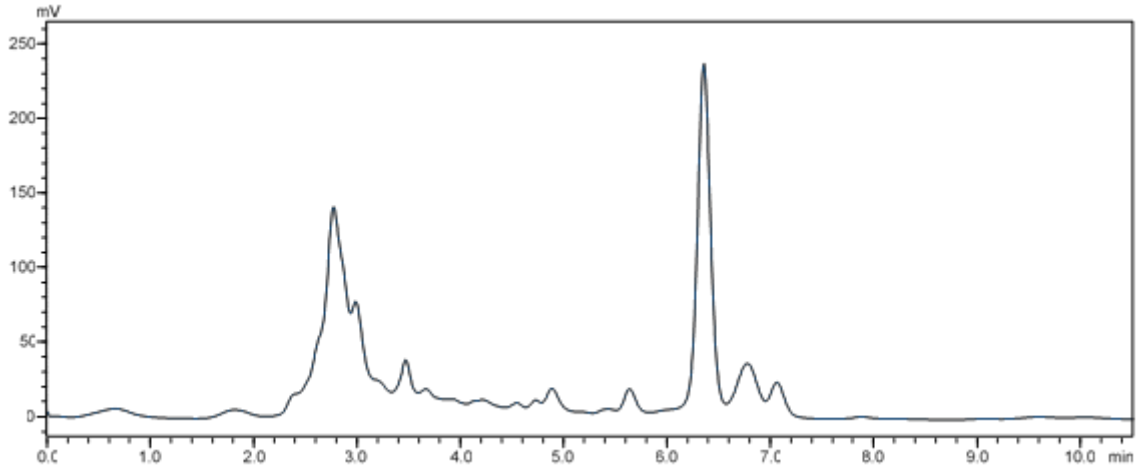
Şekil 4.1. A1 numunesi kullanılarak elde edilen kromatogram

Yukarıda şekil 4.1’de verilen kromatogram A1 numunesi kullanılarak analiz edilmiştir. İlgili kromatogram için aromatik amino asitler için validasyon sonuçları aşağıda verilen Tablo 4.1’de gösterilmiştir. Yapılan analizde mobil faz olarak %70 ACN ve %30 su kullanılmıştır.

Tablo 4.1. A1 numunesi için aromatik amino asit sonuçları

A-1	Sonuç mg/kg	LOD mg/kg	LOQ mg/kg	SS%	GK%
L-Trp	20,19	0,029	0,097	+/- %3	79,76
L-Phe	7,18	0,24	0,79	+/- %3	76,56
L-Tyr	4,17	0,27	0,88	+/- %3	24,71

L-Trp amino asidinin A1 numunesinde daha yüksek olduğu gözlenmiştir. L-His analiz edilememiştir. Bu durumun L-His amino asidinin aromatik halka içermediğinden kaynaklandığı değerlendirilmiştir.

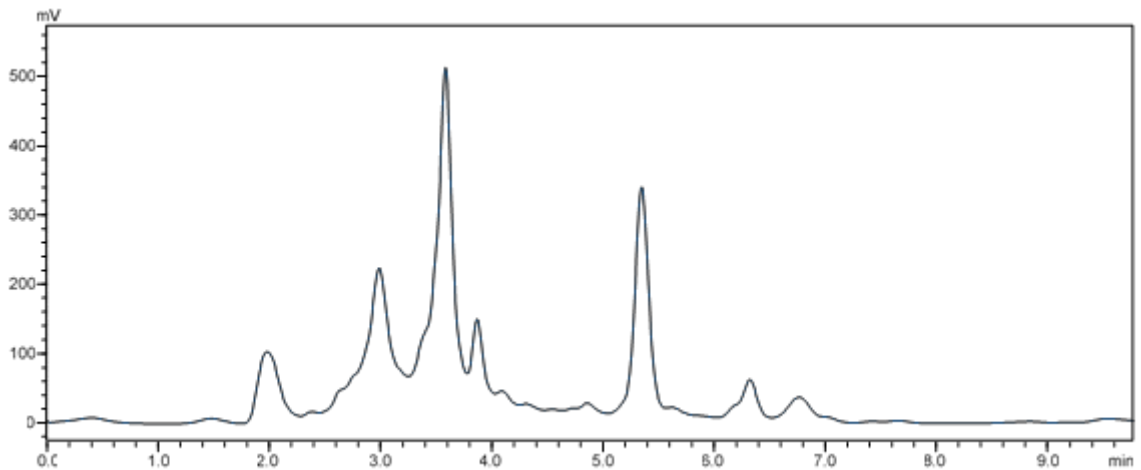


Şekil 4.2. A2 numunesi kullanılarak elde edilen kromatogram

Yukarıda verilen A2 numunesinde ilgili bölgede kısmen düşük oranda amino asit varlığı gözlenmiştir.

Tablo 4.2. A2 numunesi için aromatik amino asit sonuçları

A-2	Sonuç mg/kg	LOD mg/kg	LOQ mg/kg	SS%	RC%
Trp	15,07	0,029	0,097	+/- %3	79,76
Phe	6,78	0,24	0,79	+/- %3	76,56
Tyr	4,84	0,27	0,88	+/- %3	24,71

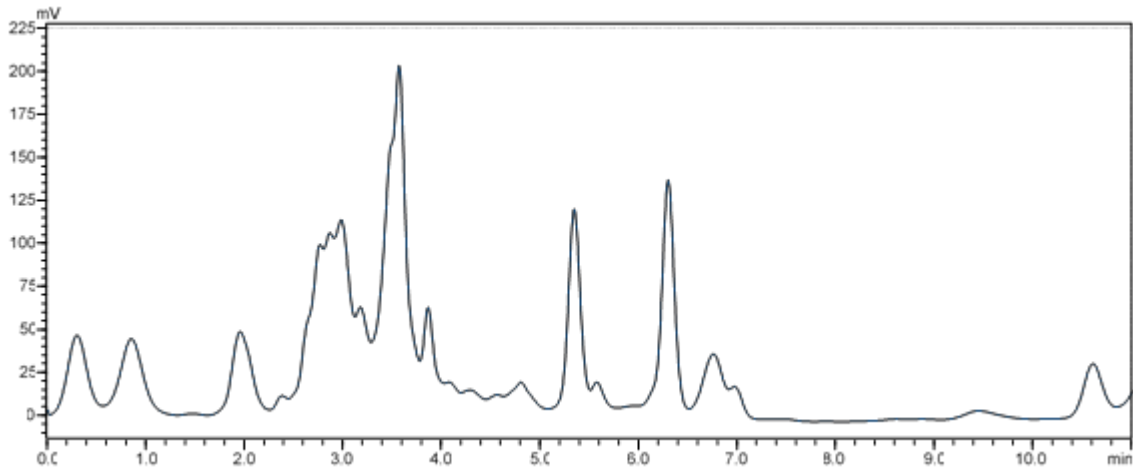


Şekil 4.3. K1 numunesi kullanılarak elde edilen kromatogram

Yukarıda şekil 4.3’de verilen kromatogram K1 numunesi kullanılarak analiz edilmiştir. İlgili kromatogram için aromatik amino asitler için validasyon sonuçları aşağıda verilen Tablo 4.3’te gösterilmiştir.

Tablo 4.3. K1 numunesi için aromatik amino asit sonuçları

K1	Sonuç ppm	LOD ppm	LOQ ppm	SS%	RC%
Trp	3,76	0,029	0,097	+/- %3	79,76
Phe	7,02	0,24	0,79	+/- %3	76,56
Tyr	Tespit Edilemedi	0,27	0,88	+/- %3	24,71

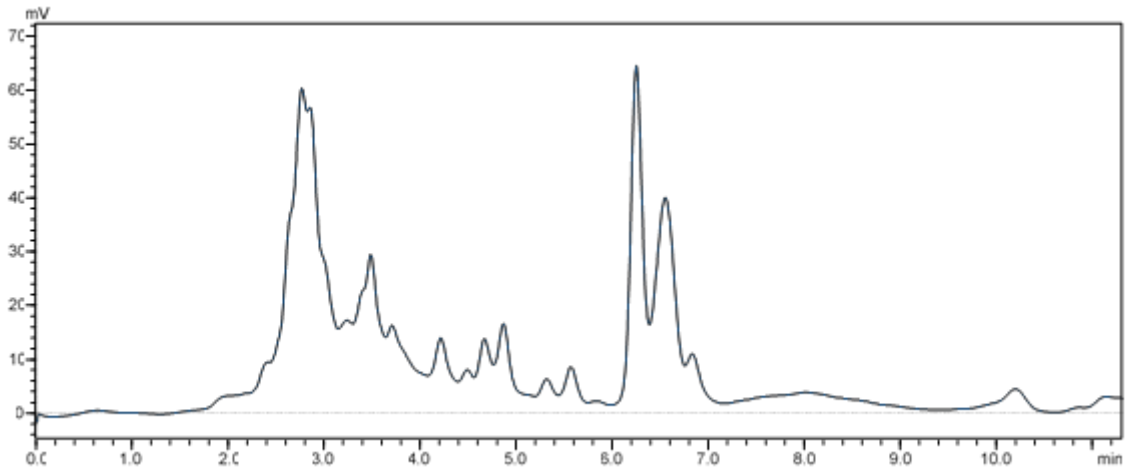


Şekil 4.4. K2 numunesi kullanılarak elde edilen kromatogram

Yukarıda şekil 4.4’de verilen kromatogram K2 numunesi kullanılarak analiz edilmiştir. İlgili kromatogram için aromatik amino asitler için validasyon sonuçları aşağıda verilen Tablo 4.4’de gösterilmiştir.

Tablo 4.4. K2 numunesi için aromatik amino asit sonuçları

K2	Sonuç ppm	LOD ppm	LOQ ppm	SS%	RC%
Trp	8,63	0,029	0,097	+/- %3	79,76
Phe	6,77	0,24	0,79	+/- %3	76,56
Tyr	3,37	0,27	0,88	+/- %3	24,71

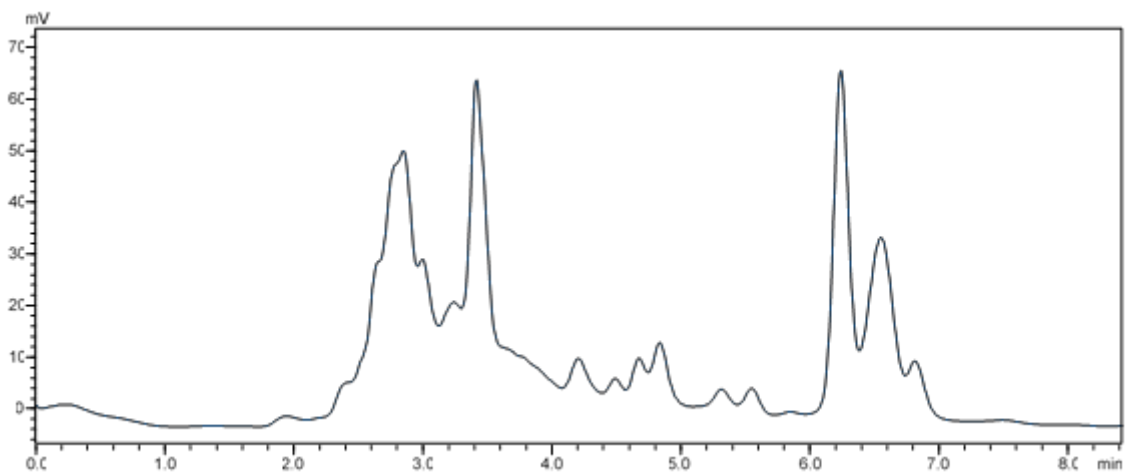


Şekil 4.5. S1 numunesi kullanılarak elde edilen kromatogram

Yukarıda şekil 4.5’de verilen kromatogram S1 numunesi kullanılarak analiz edilmiştir. İlgili kromatogram için aromatik amino asitler için validasyon sonuçları aşağıda verilen Tablo 4.5’de gösterilmiştir.

Tablo 4.5. S1 numunesi için aromatik amino asit sonuçları

S1	Sonuç ppm	LOD ppm	LOQ ppm	SS%	RC%
Trp	3,93	0,029	0,097	+/- %3	79,76
Phe	7,66	0,24	0,79	+/- %3	76,56
Tyr	1,86	0,27	0,88	+/- %3	24,71

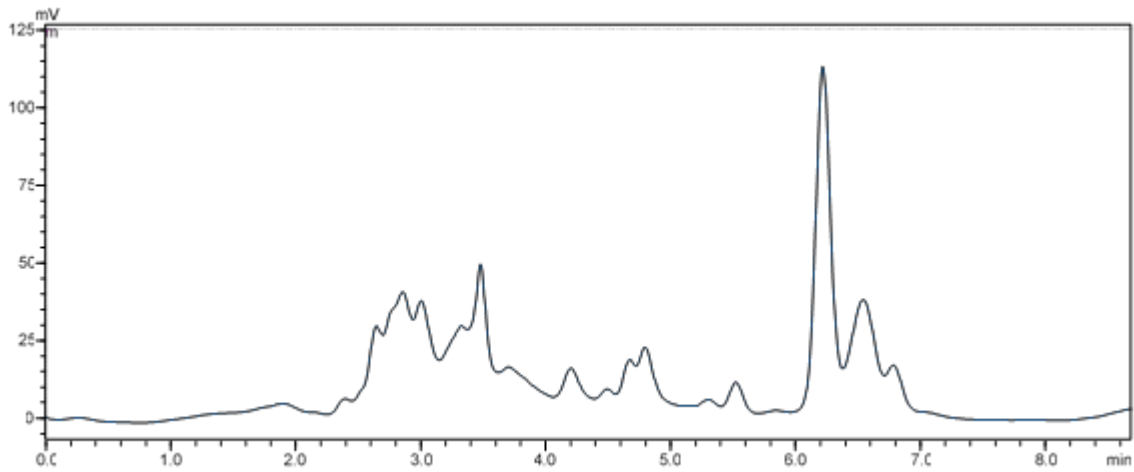


Şekil 4.6. S2 numunesi kullanılarak elde edilen kromatogram

Yukarıda şekil 4.6’de verilen kromatogram S2 numunesi kullanılarak analiz edilmiştir. İlgili kromatogram için aromatik amino asitler için validasyon sonuçları aşağıda verilen Tablo 4.6’de gösterilmiştir.

Tablo 4.6. S2 numunesi için aromatik amino asit sonuçları

S2	Sonuç ppm	LOD ppm	LOQ ppm	SS%	RC%
Trp	4,01	0,029	0,097	+/- %3	79,76
Phe	6,24	0,24	0,79	+/- %3	76,56
Tyr	1,42	0,27	0,88	+/- %3	24,71

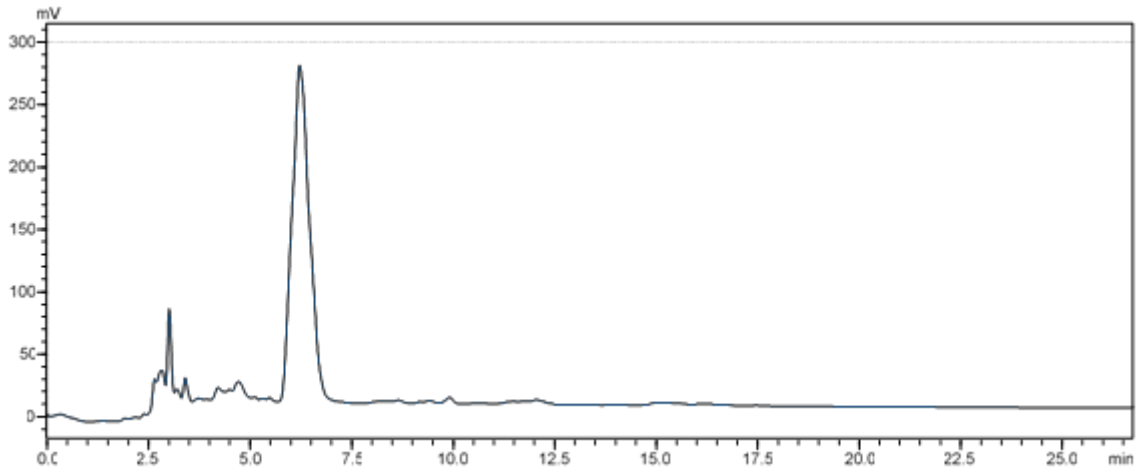


Şekil 4.7. S3 numunesi kullanılarak elde edilen kromatogram

Yukarıda şekil 4.7’de verilen kromatogram S3 numunesi kullanılarak analiz edilmiştir. İlgili kromatogram için aromatik amino asitler için validasyon sonuçları aşağıda verilen Tablo 4.7’de gösterilmiştir

Tablo 4.7. S3 numunesi için aromatik amino asit sonuçları

S3	Sonuç ppm	LOD ppm	LOQ ppm	SS%	RC%
Trp	7,1	0,029	0,097	+/- %3	79,76
Phe	7,24	0,24	0,79	+/- %3	76,56
Tyr	3,4	0,27	0,88	+/- %3	24,71

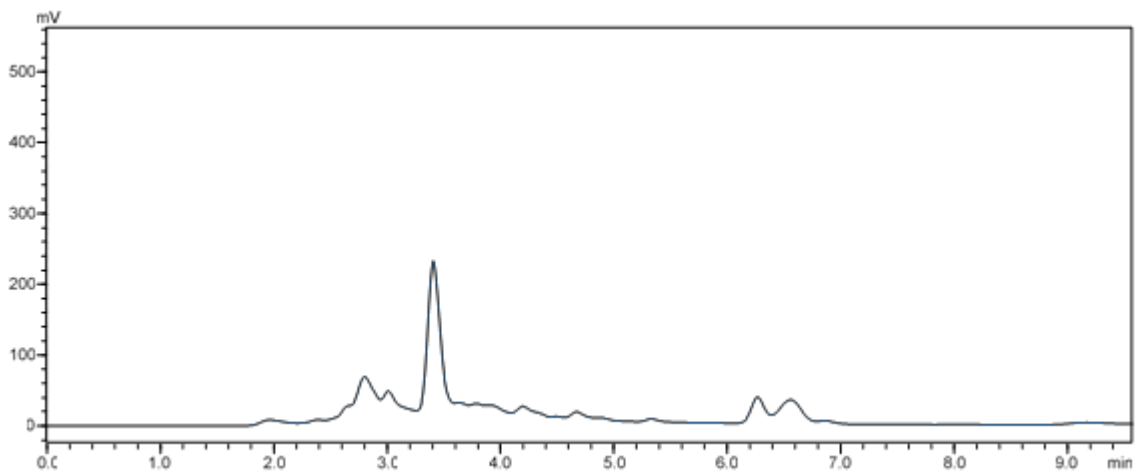


Şekil 4.8. S4 numunesi kullanılarak elde edilen kromatogram

Yukarıda şekil 4.8’de verilen kromatogram S4 numunesi kullanılarak analiz edilmiştir. İlgili kromatogram için aromatik amino asitler için validasyon sonuçları aşağıda verilen Tablo 4.8’de gösterilmiştir

Tablo 4.8. S4 numunesi için aromatik amino asit sonuçları

S4	Sonuç ppm	LOD ppm	LOQ ppm	SS%	RC%
Trp	17,99	0,029	0,097	+/- %3	79,76
Phe	Tespit Edilemedi	0,24	0,79	+/- %3	76,56
Tyr	Tespit Edilemedi	0,27	0,88	+/- %3	24,71

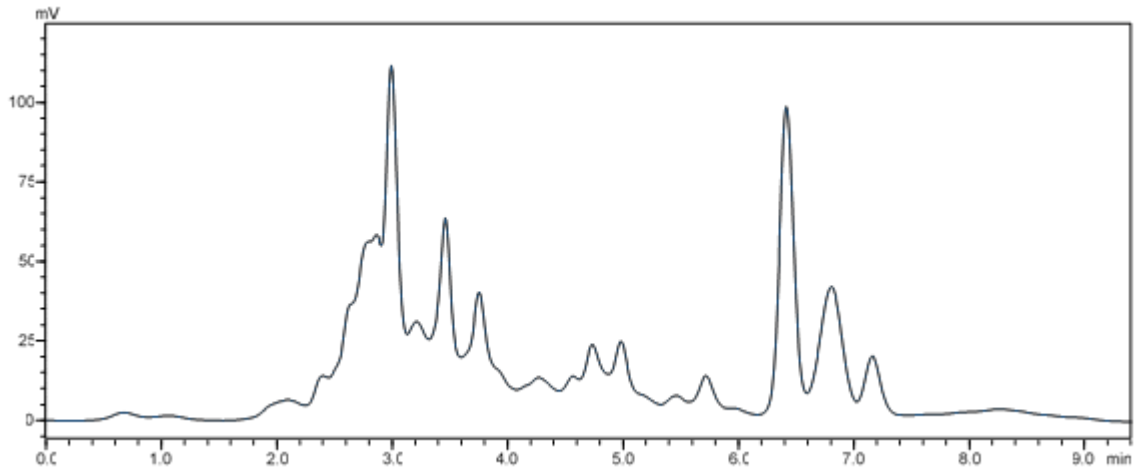


Şekil 4.9. S5 numunesi kullanılarak elde edilen kromatogram

Yukarıda şekil 4.9’da verilen kromatogram S5 numunesi kullanılarak analiz edilmiştir. İlgili kromatogram için aromatik amino asitler için validasyon sonuçları aşağıda verilen Tablo 4.9’da gösterilmiştir

Tablo 4.9. S5 numunesi için aromatik amino asit sonuçları

S5	Sonuç ppm	LOD ppm	LOQ ppm	SS%	RC%
Trp	2,36	0,029	0,097	+/- %3	79,76
Phe	6,98	0,24	0,79	+/- %3	76,56
Tyr	0,91	0,27	0,88	+/- %3	24,71



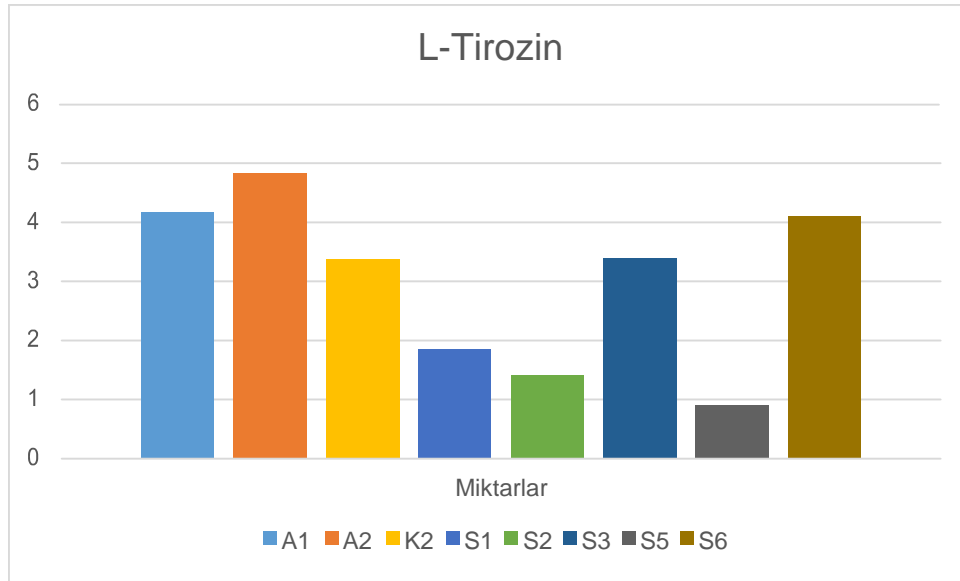
Şekil 4.10. S6 numunesi kullanılarak elde edilen kromatogram

Yukarıda şekil 4.10’da verilen kromatogram S6 numunesi kullanılarak analiz edilmiştir. İlgili kromatogram için aromatik amino asitler için validasyon sonuçları aşağıda verilen Tablo 4.10’da gösterilmiştir

Tablo 4.10. S6 numunesi için aromatik amino asit sonuçları

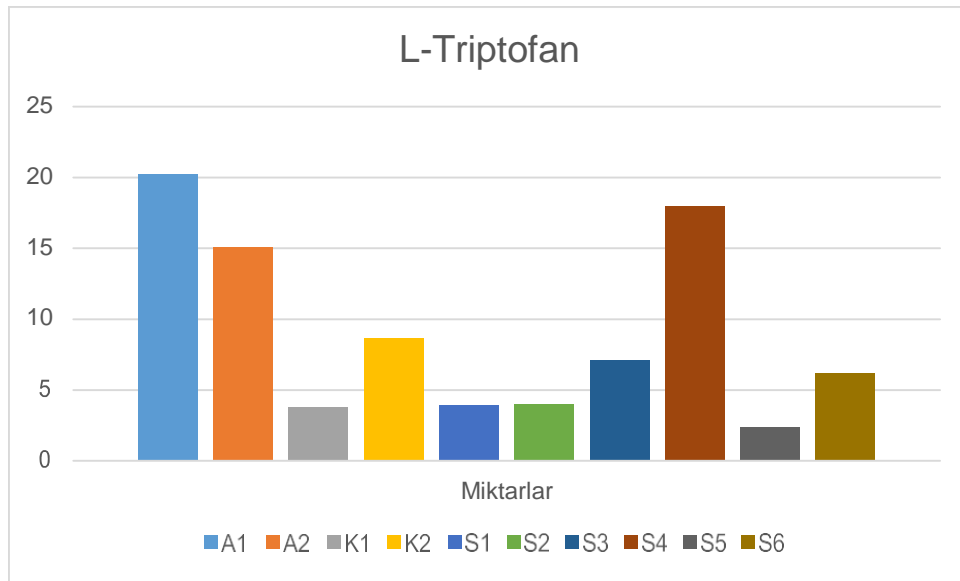
S6	Sonuç ppm	LOD ppm	LOQ ppm	SS%	RC%
Trp	6,14	0,029	0,097	+/- %3	79,76
Phe	8,05	0,24	0,79	+/- %3	76,56
Tyr	4,11	0,27	0,88	+/- %3	24,71





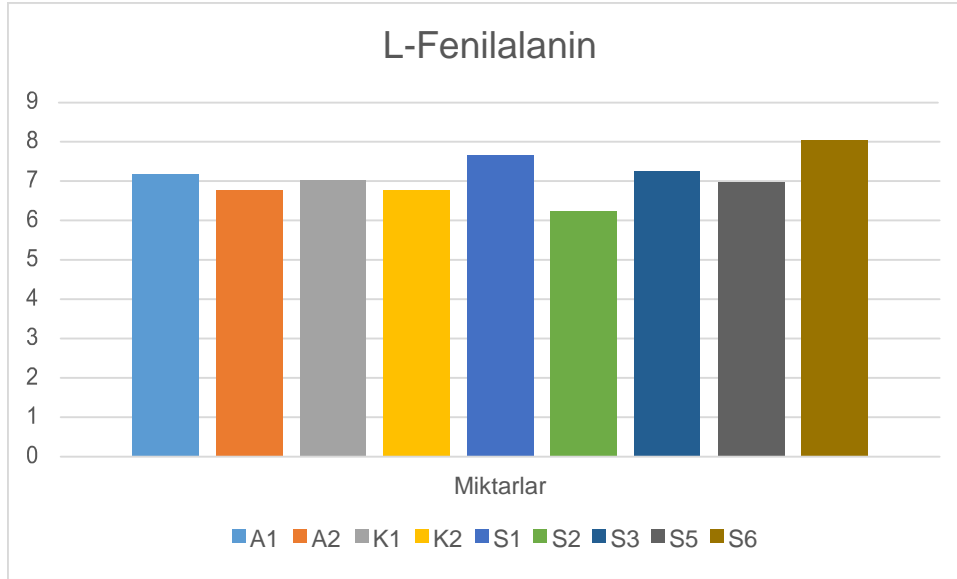
Şekil 4.11. Bal örneklerinde ppm cinsinden L-Tirozin miktarları

Şekil 4.11’de görüldüğü üzere A2 numunesinde L-Tirozin oranı en yüksek iken K1 ve S4 numunelerinde L-Tirozin tayin edilememiştir.



Şekil 4.12. Bal örneklerinde ppm cinsinden L-Triptofan miktarları

Şekil 4.12’de görüldüğü üzere A1 numunesinde L-Triptofan oranı en yüksek iken S5 numunesinde L-Triptofan miktarı en azdır.

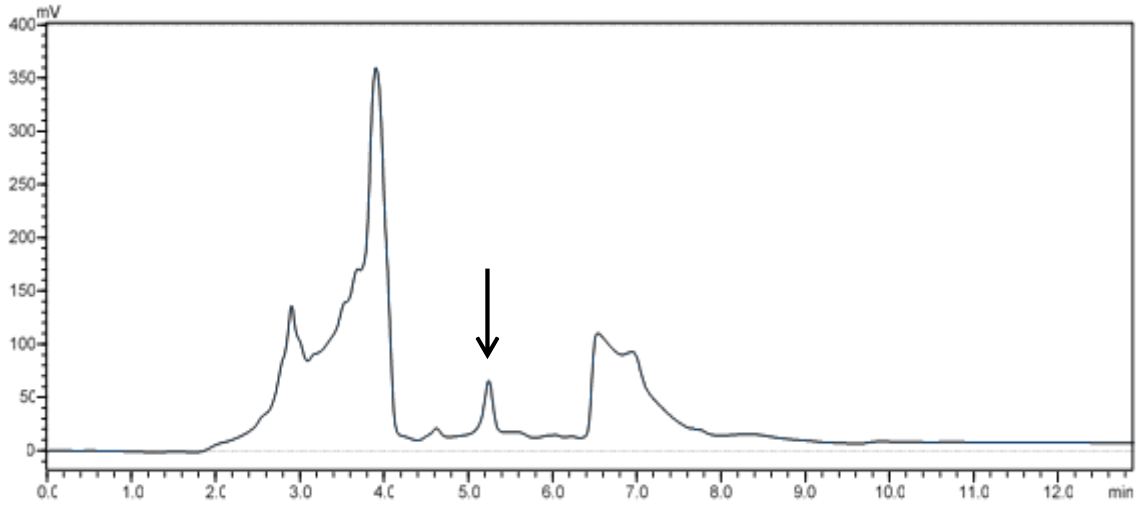


Şekil 4.13. Bal örneklerinde ppm cinsinden L-Fenilalanin miktarları

Şekil 4.13’de görüldüğü üzere S6 numunesinde L-Fenilalanin oranı en yüksek iken S4 numunesinde L-Fenilalanin tayin edilememiştir.

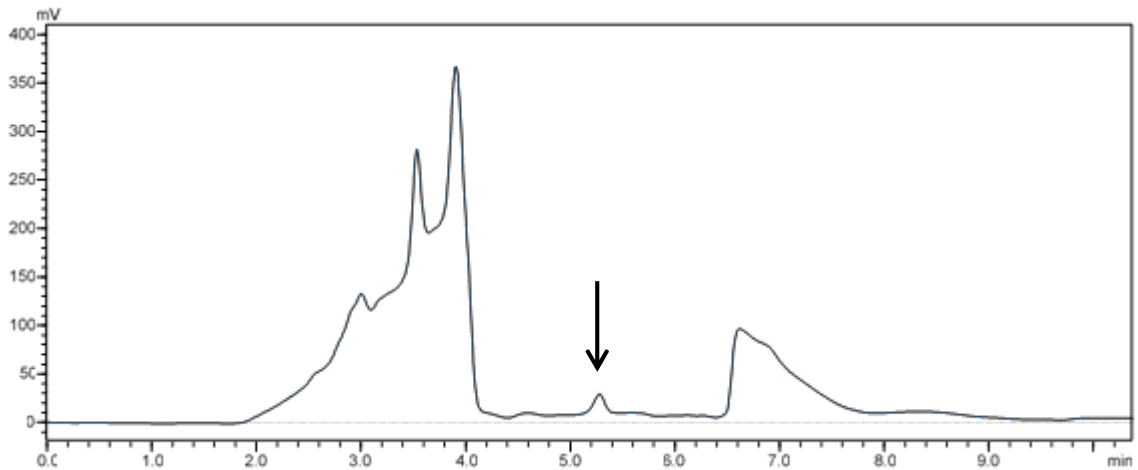
#### 4.2. Aromatik Olmayan Amino Asitler ve L-Histidin için Validasyon Sonuçları

Balda L-prolin analizi farklı RP kromatografi teknikleri kullanılarak yapılmıştır. Aromatik amino asit olmayan L-Prolin yapısı kısmi hidrofilik olduğu için HILIC tekniği ile etkin analiz edilmesi olanaklıdır. Bu çalışmamızda yeni bir yaklaşımla yani HILIC tekniği uygulanarak L-Prolin için metod geliştirilmiştir. Geliştirilen analitik metod türevlendirme ve optimize basamaklarını içermektedir. Validasyon çalışmalarında geri kazanım, hassasiyet ve doğruluk oranları dikkate alınarak yapılmıştır. L-Prolin analizleri 214 nm dalga boyunda yapılmıştır. Her numune ayrı ayrı sisteme verilmiş ve standartlar farklı konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Hareketli faz olarak HILIC tekniği olduğundan yüksek oranda ACN ve düşük oranlarda su kullanılmıştır.



Şekil 4.14. S3 numunesi kullanılarak elde edilen L-Prolin kromatogram

Çalışma kapsamında LC-HRMS sisteminde analizlerin yapılması planlanmıştır. Ancak ilgili sistemin arızalanması nedeni ile çalışma HPLC'ye aktarılmıştır. Aromatik olmayan amino asitlerin UV dedektörde analiz edebilmek için Dansil Klorid türevlendirmesi düşünülmüştür. Dansil Klorid temin edilmesindeki süreç bal numunelerinin beklemesine neden olmuştur. Yukarıda şekil 4.14'te verilen pikten (5,2 dakika) L-Prolin değeri düşük gözlenmiştir. Daha sonra birçok farklı numune denenmiş ancak benzer sonuç alınamamıştır.



Şekil 4.15. S5 numunesi kullanılarak elde edilen L-Prolin kromatogram

Şekil 4.15'te görüldüğü gibi L-Prolin düzeyi düşük çıkmıştır. Bu sonuçları doğrulamak için aromatik amino asitlerin için tekrar geri kazanım çalışması yapılmış ancak geri kazanımda balın uzun süreli beklemesinden ve sıcaklık etkilenmelerine bağlı olarak aromatik amino asit düzeylerinin de düştüğü görülmüştür. Dolayısıyla diğer aromatik olmayan amino asitler için türevlendirme yapılamamıştır.

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Naval ve arkadaşları 2006 yılında yaptıkları çalışmada glisin, GABA, aspartic asit ve glutamik asidi Dansil Klorid ön kolon türevlendirmesi ile ters faz yöntemi ile analizini yapmıştır. Çalışmamızın bu çalışmadan avantajı türevlendirme esasında karanlık odaya ihtiyaç duymamasıdır. Farklı bir yöntem olan HILIC'in kullanılması bu çalışmadan farklı ve özgün olduğumuz kısımlardır. Yüksek miktarda şeker barındıran bir numune kullanmamızdan kaynaklı Naval ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadan farklı olarak ekstraksiyon metodu denenmiştir. İlgili çalışmaya göre, bu çalışmamızda bal numunelerimizin beklemesinden kaynaklı türevlendirme yapılan amino asitlerde kantitatif analiz yapılamamıştır.

Gökmen ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptığı çalışmada ise HRMS kullanarak bazı amino asitlerin kalitatif ve kantitatif analizini yapmışlardır. İlk olarak çalışmamızda, Gökmen ve arkadaşlarının yaptığı yöntem geliştirilerek HRMS sisteminde HILIC yaklaşımı ile aminoasit tayini yapılması amaçlanmıştır. Ancak Üniversitemiz Merkezi Laboratuvar Uygulama ve Araştırma Merkezi bünyesinde bulunan Thermo Orbitrap HRMS cihazı arızalanmış ve uzun süreli kullanılamamıştır.

Zhang ve arkadaşları 2012 yılında yaptığı çalışmada prolin, valin, metiyonin, izolösin, lösin, triptofan fenilalanin ve lisin amino asitlerinin analizini ters faz kolon ve floresans dedektör ile yapmıştır. Türevlendirmede metilamin hidroklorid kullanılmıştır. Zhang ve arkadaşlarının yaptığı türevlendirme metodu uygulama açısından zordur. Çünkü 60 °C' de amino asitlerin yapısının bozulma ihtimali vardır. Bu çalışmada yapılan türevlendirme metodu 25 °C' de yapılmıştır.

Elde edilen sonuçlardan solhan balında amino asit içeriğinin daha yüksek olduğu görülmekte ancak numunelerin uzun zaman beklemiş olması amino asit içeriğinde düşme olabileceği değerlendirilmiştir. Amino asitlerin gerçek numunelerden ekstraksiyon

alışmalarında bazı kimyasallar temin edilemediğinden (bütçe yetersizliği) geri kazanım çalışmalarında deneysel hata öngörölmüştür. Ekstraksiyon çalışmalarında ayrıca biyojenik aminler yeterli düzeyde görölmeydiğinden (bal için) metod geliştirilmemiştir.

## **KAYNAKLAR**

Akbulut N, Karagözlü C (2012) Gıda Bilimi ve Teknolojisi. Sidas Medya, Yayın (017-1B)

Alpert AJ (1990) Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *Journal of Chromatography A* 499: 177-196

Anklam E (1998) A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chemistry* 63: 549-562

Bargańska Z, Ĺebioda M, Namieśnik J (2016) Honey bees and their products: Bioindicators of environmental contamination. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 46: 235-248

Bernal J, Ares AM, Pól J, Wiedmer SK (2011) Hydrophilic interaction liquid Chromatography in food analysis. *Journal of Chromatography A* 1218: 7438-7452

Can Z, Yildiz O, Sahin H, Akyuz Turumtay E, Silici S, Kolayli S (2015) An investigation of Turkish honeys: Their physico-chemical properties, antioxidant capacities and Phenolic profiles. *Food Chemistry* 180: 133-141

Codex Alimentations (2001) Draft revised standard for standard for honey (at step 10 of the Codex procedure). *Codex Stan 12*: 1981

Cometto PM, Faye PF, Di Paola Naranjo RD, Rubio MA, Aldao MAJ (2003) Comparison of free amino acids profile in honey from three Argentinian regions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 5079-5087

Cotte JF, Casabianca H, Giroud B, Albert M, Lheritier J, Grenier-Loustalot MF (2004) Characterization of honey amino acid profiles using high-pressure liquid Chromatography to control authenticity. In *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378: 1342-1350

Gökmen V, Serpen A, Mogol B A (2012) Rapid determination of amino acids in foods by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry* 403(10): 2915-2922

Guo, Y (2015) Recent progress in the fundamental understanding of hydrophilic interaction chromatography (HILIC). *Analyst* 140(19): 6452-6466

Hermosín I, Chicon RM, Cabezudo MD (2003) Free amino acid composition and botanical origin of honey. *Food Chemistry* 83(2): 263-268

Horvath C, Melander W (1977) Liquid chromatography with hydrocarbonaceous bonded phases; theory and practice of reversed phase chromatography. *Journal of Chromatographic Science* 15(9): 393-404

Jiang W, Fischer G, Girmay Y, Irgum K (2006) Zwitterionic stationary phase with covalently bonded phosphorylcholine type polymer grafts and its applicability to separation of peptides in the hydrophilic interaction liquid chromatography mode. *Journal of Chromatography A* 1127(1-2): 82-91

Kivrak I (2015) Free amino acid profiles of 17 Turkish unifloral honeys. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 38: 855-862

Lee YW, So MS, Lee JW, Chung S T, Row KH (1996) Retention models of capacity factor with different compositions of organic modifier in RP-HPLC. *Korean Journal of Chemical Engineering* 13(6): 578-584

Liu YM, Schneider, M, Sticha CM, Toyooka T, Sweedler JV (1998) Separation of amino acid and peptide stereoisomers by nonionic micelle-mediated capillary electrophoresis after chiral derivatization. *Journal of Chromatography A* 800: 345-354

LoBrutto R, Kazakevich YV (2000) Retention of ionizable components in reversed phase HPLC *Practical Problem Solving in HPLC*, Wiley VCH 122-158

McCalley DV (2007) Is hydrophilic interaction chromatography with silica columns a viable alternative to reversed-phase liquid chromatography for the analysis of ionisable compounds? *Journal of chromatography A* 1171(1-2): 46-55

Meyer V R (2006) *Practical high-performance liquid Chromatography: Fourth edition. Practical High-Performance Liquid Chromatography. Fourth Edition*, John Wiley and Sons Ltd 234-253

Minocha R, Long S (2004) Simultaneous separation and quantitation of amino acids and polyamines of forest tree tissues and cell cultures within a single high-performance liquid Chromatography run using dansyl derivatization. *Journal of Chromatography A* 1035: 63-73



Minocha R, Long S (2004) Simultaneous separation and quantitation of amino acids and polyamines of forest tree tissues and cell cultures within a single high-performance liquid chromatography run using dansyl derivatization. *Journal of Chromatography A* 1035(1): 63-73

Mulu A, Diro E, Tekleselassie H, Belyhun Y, Anagaw B, Alemayehu M, Isogai E (2010) Effect of Ethiopian multiflora honey on fluconazole-resistant *Candida* species isolated from the oral cavity of AIDS patients. *International Journal of STD and AIDS* 11: 741-745

Mutlu C, Erbaş M, Arslan Tontul S (2017) Bal ve Diğer Arı Ürünlerinin Bazı Özellikleri ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri. *Akademik Gıda* 15: 75-83

Nuijs AL, Tarcomnicu I, Covaci A (2011) Application of hydrophilic interaction chromatography for the analysis of polar contaminants in food and environmental samples. *Journal of Chromatography A* 1218(35): 5964-5974

Paramás AMG, Bárez JAG, Marcos CC, García-Villanova RJ, Sánchez JS (2006) HPLC-fluorimetric method for analysis of amino acids in products of the hive (honey and bee-pollen). *Food Chemistry* 95: 148-156

Pereira V, Pontes M, Câmara JS, Marques JC (2008) Simultaneous analysis of free amino acids and biogenic amines in honey and wine samples using in loop orthophthalaldehyde derivatization procedure. *Journal of Chromatography A* 1189: 435–443

Persano Oddo L, Piazza MG, Sabatini AG, Accorti M (1995) Characterization of unifloral honeys. *Apidologie* 26: 453-465

Pyrzynska K Biesaga M (2009) Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 28(7): 893-900

Rebane R, Herodes K (2010) A sensitive method for free amino acids analysis by liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection using precolumn derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate: Application to the honey analysis. *Analytica Chimica Acta* 672: 79-84

Sato T, Miyata G (2000) The nutraceutical benefit, Part III: Honey. *Nutrition* 16: 468-469

Semerci A (2017) Türkiye arıcılığının genel durumu ve geleceğe yönelik beklentiler. *Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 22(2): 107-118

Šesták J, Moravcová D, Kahle V (2015) Instrument platforms for nano liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1421: 2-17

Silici S, Karaman K (2014) Chemometric approaches for the characterization of turkish rhododendron and honeydew honeys depending on amino acid composition. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 37(6): 864-877

Swartz ME (2005) Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): An Introduction. *Separation Science Redefined* 33: 8-14

Tapuhi Y, Schmidt DE, Lindner W, Karger BL (1981) Dansylation of amino acids for high-performance liquid chromatography analysis. *Analytical Biochemistry* 115: 123-129

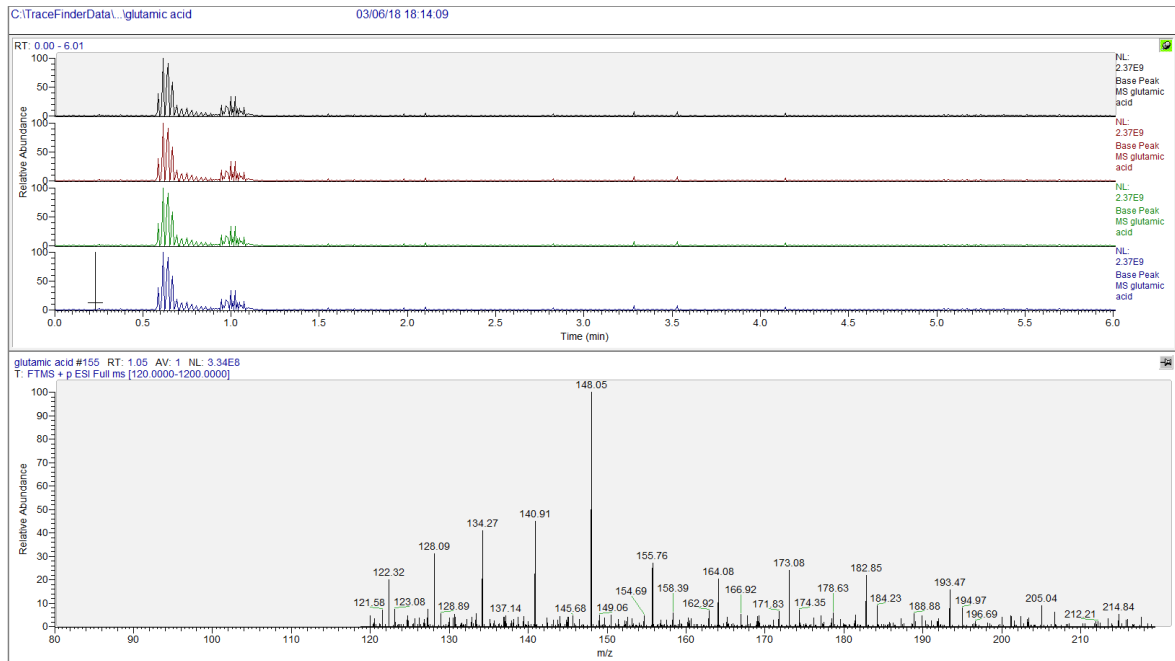
Truzzi C, Annibaldi A, Illuminati S, Finale C, Scarponi G (2014) Determination of proline in honey: Comparison between official methods, optimization and validation of the analytical methodology. *Food Chemistry* 150: 477-481

Ulusoy E (2012) Bal ve Apiterapi-Honey and Apiterapy. *Uludağ Arıcılık Dergisi*

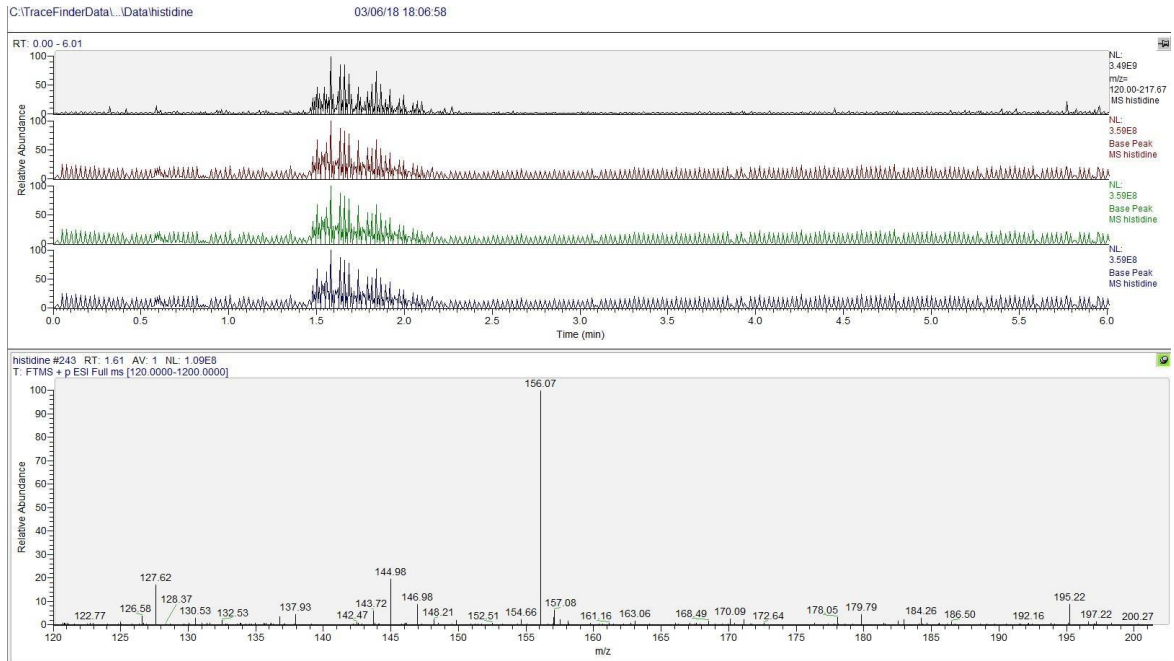
Won SR, Li CY, Kim JW, Rhee HI (2009) Immunological characterization of honey major protein and its application. *Food Chemistry* 113: 1334-1338

Yılmaz H, Küfrevioğlu I (2001) Composition of honeys collected from Eastern and South-Eastern Anatolia and effect of storage on hydroxymethylfurfural content and diastase activity. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*

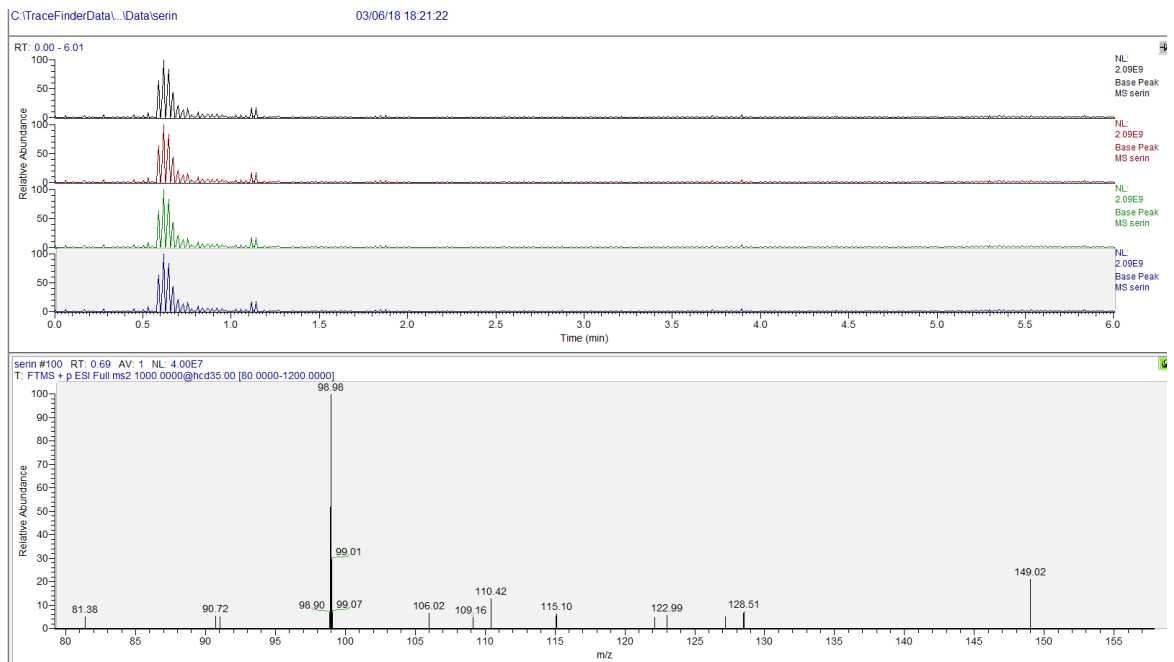
## EKLER



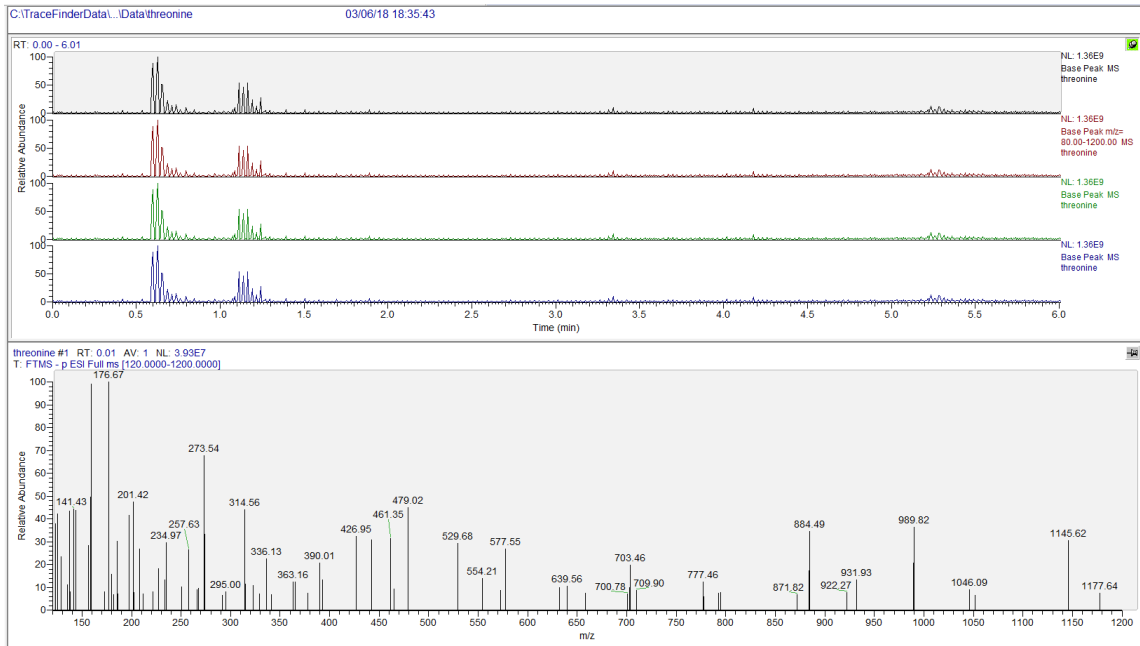
Şekil A.1. LC-HRMS'de 1 ppm'lik L-Glutamik Asit kromatogramı



Şekil A.2. LC-HRMS'de 1 ppm'lik L-Histidin kromatogramı



Şekil A.3. LC-HRMS'de 1 ppm'lik L-Serin kromatogramı



Şekil A.4. LC-HRMS'de 1 ppm'lik L-Treonin kromatogramı

## ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında İzmir’de doğdu. İlkokulu Müdafaa-i Hukuk İlkokulu, orta okulu Misaki Milli İlköğretim okulunda ve liseyi Selma Yiğitalp Anadolu Lisesinde tamamladı. 2009 yılında Ege Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünü kazandı ve 2014 yılında mezun oldu. Anadolu Üniversitesinde 2011 yılında Laborant Veteriner Sağlık önlisans bölümünü, 2014 yılında Sağlık Kurumları İşletmeciliği önlisans bölümünü, 2019 yılında ise Sağlık Yönetimi lisans bölümünlerinden mezun olmuştur. Bingöl Üniversitesi İngiliz Dili ve Edebiyatı bölümünde öğrenciliği sürmektedir. 2006 yılı itibari ile özel sektörde çalışma hayatına başlamıştır. 2012-2015 yılları arasında İzmir Özel Ege Laboratuvarında Laboratuvar Teknikeri olarak çalışmıştır. 2015 yılında KPSS sınavından aldığı 91 puan ile Kamu Personeli olarak atanmış ve halen atandığı kurumda çalışmaktadır. Temmuz ayı itibari ile Bingöl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programından başarıyla mezun olmuştur.