

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**ANADOLU ARI SÜTLERİNDE ŞEKER VE ORGANİK ASİT İÇERİKLERİNİN
KAPİLER ELEKTROFOREZ İLE TAYİNİ VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTE
ARAŞTIRMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ülkü Nida ÇOLAK

Kimya Anabilim Dalı

Kimya Programı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Zeynep KALAYCIOĞLU

AĞUSTOS 2024

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**ANADOLU ARI SÜTLERİNDE ŞEKER VE ORGANİK ASİT İÇERİKLERİNİN
KAPİLER ELEKTROFOREZ İLE TAYİNİ VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTE
ARAŞTIRMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Ülkü Nida ÇOLAK
(509221276)**

Kimya Anabilim Dalı

Kimya Programı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Zeynep KALAYCIOĞLU

AĞUSTOS 2024

ISTANBUL TECHNICAL UNIVERSITY ★ GRADUATE SCHOOL

**DETERMINATION OF SUGAR AND ORGANIC ACID CONTENTS IN
ANATOLIAN ROYAL JELLIES BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS AND
INVESTIGATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY**

MASTER THESIS

**Ülkü Nida ÇOLAK
(509221276)**

Department of Chemistry

Chemistry Programme

Thesis Advisor: Doç. Dr. Zeynep KALAYCIOĞLU

AUGUST 2024

İTÜ, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü'nün 509221276 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Ülkü Nida ÇOLAK, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “ANADOLU ARI SÜTLERİNDE ŞEKER VE ORGANİK ASİT İÇERİKLERİNİN KAPİLER ELEKTROFOREZ İLE TAYİNİ VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTE ARAŞTIRMASI” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Doç. Dr. Zeynep KALAYCIOĞLU**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Doç. Dr. Nevin ÖZTEKİN**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Hakan KAYGUSUZ
Altınbaş Üniversitesi

Teslim Tarihi : **5 Ağustos 2024**
Savunma Tarihi : **16 Ağustos 2024**





Aileme ve sevdiklerime,



ÖNSÖZ

Bu tez çalışması, İstanbul Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü'ne sunulmak üzere hazırlanmıştır.

Kendisini tanıdığım ilk günden bu yana öğrencisi olmaktan onur duyduğum, akademik bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşarak beni daha donanımlı bir kimyager olarak yetiştiren, çalışmalarına desteğini esirgemeyen ve bu tezin ortaya çıkmasına imkan tanıyan saygıdeğer hocam Prof. Dr. F. Bedia ERİM BERKER'e,

Yüksek lisans eğitimim sürecinde tanıştığım ve beni çalışmalarımda her zaman motive eden, akademik ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, her konudaki bilgi ve tecrübesiyle yol göstericim olan, öğrencisi olmaktan mutluluk duyduğum değerli danışmanım Doç. Dr. Zeynep KALAYCIOĞLU'na,

Arı sütü örneklerinin teminini sağlayarak bu çalışmanın oluşmasına katkı sağlayan Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI'ya, tezdeki kapiler elektroforez analizlerinin tamamlanması için enstrümantal desteği sağlayan Doç. Dr. Nevin ÖZTEKİN'e,

Hayatım boyunca yanımda olmalarından mutluluk duyduğum, aldığım kararlara saygı göstererek bana her zaman destek olan, çocukluğumdan beri elde ettiğim tüm başarılarıma en büyük katkıyı sunan ve yoluma ışık tutan annem Sezin Hanife ÇOLAK ve babam Hızır ÇOLAK'a, bana ablalık duygusunu tattıran biricik kardeşim Duru Deniz ÇOLAK'a, beni her zaman çocuğu gibi sevmiş ve her türlü desteğiyle hep arkamda durmuş olan rahmetli amcam İlyas ÇOLAK'a,

Lisans eğitimimin başında tanıştığım ve o dönemde birlikte çalışma fırsatı bulduğum, sonrasında da bana gerek akademik yolculuğumda gerek özel hayatımda destek olan, tatlı rekabetlerimizle birbirimizi daha ileri taşığımız ve bu yolun başından beri hep yanımda olan değerli arkadaşım Elif YILMAZ'a; İstanbul Teknik Üniversitesi'nin bana kazandırdığı, fikirlerini her zaman önemsendiğim ve saygı duyduğum, benim için her şeyin en iyisini istediklerini bildiğim, sadece okul arkadaşı olarak görmediğim ve hayatıma girmelerinden mutluluk duyduğum sevgili arkadaşlarım Muhammed İkbâl GÜNDÜZ ve Gülşen MELTEM'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana maddi destek sağlayan TÜBİTAK-BİDEB birimine teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması İstanbul Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2023-45185 proje numarası ile desteklenmiştir. Desteklerinden ötürü İTÜ BAP birimine teşekkür ederim.

Ağustos 2024

Ülkü Nida ÇOLAK
(Kimyager)



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ	vii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR	xiii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xv
ŞEKİL LİSTESİ.....	xvii
ÖZET	xix
SUMMARY	xxi
1. GİRİŞ	1
2. KAPİLER ELEKTROFOREZ.....	7
2.1 Kapiler Elektroforezin Tarihçesi	9
2.2 Ayırma Parametreleri	9
2.2.1 Elektroosmotik akış.....	9
2.2.2 Elektroosmotik akışın kontrolü	11
2.2.2.1 Ayırma tamponunun pH değeri.....	11
2.2.2.2 Ayırma tamponunun derişimi	12
2.2.2.3 Elektrik alan	12
2.2.2.4 Sıcaklık.....	13
2.2.2.5 Kapiler iç duvarının kaplanması	13
2.2.2.6 Tampona ilave katkı maddeleri.....	13
2.2.3 Göç süresi.....	13
2.2.4 Pık genişlemesi	14
2.2.4.1 Difüzyon.....	15
2.2.4.2 Joule ısınması	16
2.2.4.3 Enjeksiyon bölgesi ve deteksiyon bölgesinin uzunluğu.....	16
2.2.4.4 Duvar adsorbsiyonu	16
2.2.4.5 Elektrodispersiyon.....	17
2.2.5 Rezolüsyon (Ayrım).....	17
2.3 Kapiler Elektroforezin Teorisi.....	17
2.4 Kapiler Elektroforezin Avantajları.....	18
2.5 Enstrümantasyon	19
2.5.1 Kapiler kolon.....	19
2.5.2 Ayırma elektroliti	20
2.5.3 Elektrotlar.....	21
2.5.4 Yüksek voltajlı güç kaynağı.....	21
2.5.5 Numune enjeksiyonu.....	22
2.5.5.1 Hidrodinamik enjeksiyon	22
2.5.5.2 Elektrokinetik enjeksiyon.....	23
2.5.6 Termostat	24
2.5.7 Dedektörler.....	24
2.5.7.1 UV/DAD absorbsiyon dedektörü	25
2.5.7.2 Floresans ve lazer indüklenmiş floresans (LIF) dedektör	25

2.5.7.3 Kütle dedektörü (MS).....	26
2.5.7.4 Temassız iletkenlik (kondüktivite) dedektörü (C ⁴ D)	26
2.5.7.5 Amperometrik dedektör	27
2.5.7.6 Potansiyometrik dedektör.....	27
2.6 Kapiler Elektrofrezin Modları	28
2.6.1 Kapiler zon elektrofrez (CZE).....	28
2.6.2 Misel elektrokinetik kromatografi (MEKC)	28
2.6.3 Kapiler elektrokromatografi (CEC)	30
2.6.4 Kapiler jel elektrofrez (CGE).....	31
2.6.5 Kapiler izoelektrik odaklama (CIEF).....	31
2.6.6 Kapiler izotakofrez (CITP).....	33
3. ARI ÜRÜNLERİ	35
3.1 Bal.....	35
3.2 Propolis.....	38
3.3 Erkek Arı Larvası (Apilarnil)	40
3.4 Arı Poleni.....	41
3.5 Arı Ekmeği	43
3.6 Arı Zehri (Apitoksin).....	44
3.7 Balmumu	46
3.8 Arı Sütü	47
3.9 Antioksidan Aktivite	51
3.9.1 Hidrojen atomunun transferine dayalı testler (HAT)	53
3.9.2 Elektron transferine dayalı testler (ET).....	53
3.9.2.1 Folin-Ciocalteu (FC) testi.....	54
3.9.2.2 Demir (III) iyonu indirgeme antioksidan kapasite (FRAP) testi.....	55
4. MALZEME VE YÖNTEM	59
4.1 Kullanılan Kimyasallar.....	59
4.2 Kullanılan cihazlar.....	59
4.3 Arı Sütü Örnekleri	61
4.3.1 Arı sütü örneklerinin temini	61
4.3.2 Arı sütü örneklerinin analize hazırlanması.....	61
4.4 Arı Sütü Örneklerinin Kapiler Elektroforetik Analizleri.....	61
4.4.1 Arı sütü örneklerinin şeker analizi	61
4.4.1.1 Glukoz ve fruktoz standart çözeltilerinin hazırlanması.....	61
4.4.1.2 Ayırma tamponunun hazırlanması	62
4.4.1.3 Yöntem geçerlilik (validasyon) testleri	62
4.4.2 Arı sütü örneklerinin organik asit analizi.....	63
4.4.2.1 Organik asit standartlarının hazırlanması.....	63
4.4.2.2 Ayırma tamponunun hazırlanması	64
4.4.2.3 Yöntem geçerlilik (validasyon) testleri	64
4.5 Antioksidan Aktivite Testleri	65
4.5.1 Total fenolik bileşen analizi	65
4.5.1.1 Standart çözeltilerin hazırlanması	65
4.5.1.2 Gallik asite ait kalibrasyon eğrisinin çizilmesi	65
4.5.1.3 Arı sütü örneklerinin total fenolik bileşen analizi.....	65
4.5.1.4 Hesaplama	66
4.5.2 FRAP analizi	66
4.5.2.1 Standart çözeltilerin hazırlanması	66
4.5.2.2 Demir sülfata ait kalibrasyon eğrisinin çizilmesi	67
4.5.2.3 Arı sütü örneklerinin FRAP analizi.....	67

4.5.2.4 Hesaplama	67
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	69
5.1 Arı Sütü Örneklerinin Şeker Analizi	69
5.1.1 Örnek ekstraksiyonu optimizasyonu	69
5.1.2 Yöntemin arı sütü örneklerine uygulanması	72
5.1.3 Metod validasyonu	75
5.1.3.1 Doğrusallık	75
5.1.3.2 LOD ve LOQ değerleri	76
5.1.3.3 Kesinlik	77
5.1.3.4 Geri kazanım	77
5.2 Arı Sütü Örneklerinin Organik Asit Analizi	78
5.2.1 Örnek ekstraksiyonu optimizasyonu	78
5.2.2 Metod optimizasyonu	78
5.2.3 Yöntemin arı sütü örneklerine uygulanması	79
5.2.4 Metod validasyonu	81
5.2.4.1 LOD ve LOQ değerleri	81
5.2.4.2 Kesinlik	81
5.2.4.3 Geri kazanım	82
5.3 Total Fenolik İçerikleri	82
5.4 FRAP Analizi	84
5.5 Tartışma	86
KAYNAKLAR	89
ÖZGEÇMİŞ	97



KISALTMALAR

10-HDA	: 10-hidroksi-2-dekanoik asit
10-HDAA	: 10-hidroksidekanoik asit
ABTS	: Azino-bis-3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit
C⁴D	: Temassız iletkenlik dedektörü
CAPS	: 3-1-propansülfonik asit
CAPSO	: 3-(sikloheksilamin)-2-hidroksi-1-propansülfonik asit
CE	: Kapiler elektroforez
CEC	: Kapiler elektrokromatografi
CGE	: Kapiler jel elektroforez
CIEF	: Kapiler izoelektrik odaklama
CITP	: Kapiler izotakoforez
CMC	: Kritik misel konsantrasyonu
CTAB	: Setil trimetilamonyum bromür
CZE	: Kapiler zon elektroforez
DAD	: Diyot dizisi dedektör
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EFSA	: Avrupa Gıda Güvenlik Otoritesi
EOA	: Elektroosmotik akış
ESI	: Elektrosprey iyonizasyon
FRAP	: Demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan güç
GAE	: Gallik asit eşdeğeri
GC	: Gaz kromatografisi
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IFIC	: Uluslararası Gıda Bilgi Konseyi
LIF	: Lazer indüklenmiş floresans dedektör
LOD	: Belirleme sınırı
LOQ	: Tayin sınırı
MALDI-MS	: Matris destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon kütle spektrometresi
MEKC	: Misel elektrokinetik kromatografi
MES	: 2-morfolinoetansülfonik asit; 2-etansülfonik asit

MS	: Kütle dedektörü
ORAC	: Oksijen radikal absorbands kapasitesi
PAD	: Darbeli amperometrik dedektör
PTFE	: Politetrafloroetilen
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SS	: Standart sapma
TAC	: Toplam antioksidan kapasite
TOSC	: Toplam oksiradikal giderme kapasitesi
TPTZ	: 2,4,6 tripidil-s-triazin
TRAP	: Toplam peroksil radikali yakalayıcı antioksidan parametresi
Tris	: Tris(hidroksimetil) aminometan
TSE	: Türkiye Standartları Enstitüsü
UV	: Ultraviyole

ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1 : CE’de kullanılan dedektörler ve tayin aralıkları.	28
Çizelge 3.1 : Arı sütünün kimyasal bileşimi.	50
Çizelge 5.1 : Arı sütü örneklerinin glukoz ve fruktoz içerikleri ile F/G oranları. ...	73
Çizelge 5.2 : Arı ekmeği, arı poleni ve arı sütündeki şeker miktarları arasındaki karşılaştırma.	75
Çizelge 5.3 : Glukoz ve fruktoza ait regresyon denklemleri ve regresyon katsayıları.	76
Çizelge 5.4 : Glukoz ve fruktoz için gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik değerleri.	77
Çizelge 5.5 : Glukoz ve fruktoz için geri kazanım yüzdeleri.	77
Çizelge 5.6 : Arı sütü örneklerinin glukonik asit içerikleri.	80
Çizelge 5.7 : Arı ekmeği, arı poleni ve arı sütündeki glukoz ve glukonik asit miktarları.	81
Çizelge 5.8 : Glukonik asit için gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik değerleri.	82
Çizelge 5.9 : Glukonik asit için geri kazanım yüzdeleri.	82
Çizelge 5.10 : Arı sütü örneklerine ait total fenolik içerikleri.	84
Çizelge 5.11 : Arı sütü örneklerindeki FRAP analiz sonuçları.	86



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1	: Kapiler elektroforezin temel şeması.	7
Şekil 2.2	: Anyon, katyon ve nötral türlerin kapiler kolon içerisindeki mobilitelerinin şematik gösterimi.	10
Şekil 2.3	: Kolon içi akış profilleri.	11
Şekil 2.4	: Eritilmiş silika kapiler kolonun şematik gösterimi.	19
Şekil 2.5	: Enjeksiyon sistemleri: a,b,c: Hidrodinamik enjeksiyon türleri, d: Elektrokinetik enjeksiyon.	24
Şekil 2.6	: CE’ de kullanılan dedektörler.	25
Şekil 2.7	: MEKC’de analit ve misellerin kolon içindeki hareket şeması.	29
Şekil 3.1	: a) Glukozun ve b) Fruktozun kimyasal yapıları.	37
Şekil 3.2	: Glukozun glukoz oksidaz ile parçalanma mekanizması.	37
Şekil 3.3	: Fenolik bileşikler ile fosfotungstik ve fosfomolibdik asit türevlerinin alkali ortamda reaksiyonu.	55
Şekil 3.4	: (A) Molibden (Mo) veya tungsten (W) için M’nin durduğu anyonik türev $[PM_{12}O_{40}]^{3-}$ ’ün α -Keggin yapısı; (B) Mavi kompleksin büyük tekerlek yapısı $[Mo_{126}^{6+}Mo_{285}^{+}O_{462}H_{14}(H_2O)_{70}]^{14-}$	55
Şekil 3.5	: FRAP’a ait reaksiyon mekanizması.	56
Şekil 3.6	: Fe^{3+} -TPTZ ve Fe^{2+} -TPTZ komplekslerinin kimyasal yapıları.	57
Şekil 5.1	: Ekstraksiyon yönteminin düzeltilmiş glukoz ve fruktoz pik alanlarına etkisi.	69
Şekil 5.2	: Ultrasonik banyo ile yapılan ekstraksiyonun süresinin düzeltilmiş glukoz ve fruktoz pik alanlarına etkisi.	70
Şekil 5.3	: Manyetik karıştırıcı ile yapılan ekstraksiyonun süresinin düzeltilmiş glukoz ve fruktoz pik alanlarına etkisi.	70
Şekil 5.4	: Arı sütü-su oranındaki artışın düzeltilmiş glukoz ve fruktoz pik alanlarına etkisi.	71
Şekil 5.5	: Ekstraksiyon süresindeki değişimlerin düzeltilmiş glukoz ve fruktoz pik alanlarına etkisi.	72
Şekil 5.6	: Kırklareli iline ait arı sütü ekstraktının elektroferogramı. Ayırma koşulları: kapiler kolon: 50 μm iç çap, 65 cm toplam uzunluk ve 57 cm etkin uzunluk; ayırma tamponu: 50 mmol L^{-1} glisilglisin, pH 12,52; voltaj: 25 kV. Pikler: EOA: Elektroosmotik akış, G: Glukoz, F: Fruktoz.	73
Şekil 5.7	: a) Glukoza ve b) Fruktosa ait kalibrasyon eğrileri.	76
Şekil 5.8	: A: 5×10^{-4} mol L^{-1} glukonik asit standardı eklenmiş olan Bingöl arı sütü örneği; B: Bingöl arı sütü örneği; C: 4×10^{-4} mol L^{-1} glukonik asit standardı. Ayırma koşulları: kapiler kolon: 50 μm iç çap, 60 cm toplam uzunluk; ayırma tamponu: 20 mmol L^{-1} MES/0,2 mmol L^{-1} CTAB, pH 6; voltaj: -28 kV.	80
Şekil 5.9	: Gallik aside ait kalibrasyon eğrisi.	83

- Şekil 5.10** : Farklı derişimdeki gallik asit standartlarının oluşturduğu renk şiddeti (A: $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, B: $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, C: $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, D: $7,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, E: $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, F: $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$). **83**
- Şekil 5.11** : $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 'a ait kalibrasyon eğrisi. **85**
- Şekil 5.12** : Farklı derişimdeki $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ standartlarının oluşturduğu renk şiddeti (A: $4 \times 10^{-3} \text{ mmol Fe}^{+2} \text{ L}^{-1}$, B: $6 \times 10^{-3} \text{ mmol Fe}^{+2} \text{ L}^{-1}$, C: $8 \times 10^{-3} \text{ mmol Fe}^{+2} \text{ L}^{-1}$, D: $1 \times 10^{-2} \text{ mmol Fe}^{+2} \text{ L}^{-1}$, E: $2 \times 10^{-2} \text{ mmol Fe}^{+2} \text{ L}^{-1}$, F: $3 \times 10^{-2} \text{ mmol Fe}^{+2} \text{ L}^{-1}$, G: $4 \times 10^{-2} \text{ mmol Fe}^{+2} \text{ L}^{-1}$, H: $5 \times 10^{-2} \text{ mmol Fe}^{+2} \text{ L}^{-1}$). **85**



ANADOLU ARI SÜTLERİNDE ŞEKER VE ORGANİK ASİT İÇERİKLERİNİN KAPİLER ELEKTROFOREZ İLE TAYİNİ VE ANTIOKSİDAN AKTİVİTE ARAŞTIRMASI

ÖZET

Sağlıklı ve besleyici fonksiyonel gıda ürünlerine olan ilgi ve bu ürünlerin tüketimi son yıllarda oldukça artmıştır. Fonksiyonel gıdalar, besin değerlerinin yanı sıra hastalıklara karşı koruyucu, büyüme ve gelişmeyi destekleyen biyoaktif unsurları içeren gıdalardır.

Fonksiyonel gıda olarak kabul edilen arı ürünleri sağlık üzerine olumlu etkileri nedeniyle geleneksel tıpta yüzyıllar boyunca kullanılmıştır. Kimyasal içeriği bakımından zengin olan arı ürünleri antioksidan, antibakteriyel, antikanser ve anti-inflamatuvar gibi biyoaktivitelere sahip olup doku yenilenmesinden kanser tedavisine kadar çok geniş bir yelpazede kullanılmaktadır. Arı ürünlerinin kullanımının artmasıyla birlikte arıcılık, dünyadaki en yaygın sosyoekonomik faaliyetlerden biri haline gelmiştir. Zengin bitki örtüsü sayesinde Anadolu, arıcılık faaliyeti için elverişli bir saha oluşturmakta ve birçok arı ürününe ev sahipliği yapmaktadır.

Arı sütü, işçi arıların hipofaringeal ve mandibular bezlerinden salgılanan bir arı ürünüdür ve kraliçe arının temel besin maddesidir. Larval ve ergin dönemleri boyunca arı sütü ile beslenen kraliçe arılar, yalnızca larval dönemin ilk üç günü arı sütü ile beslenen işçi arılara göre daha üstün özelliklere sahiptirler. Arı sütü su, proteinler, karbonhidratlar, lipitler, iz mineraller, suda çözünür vitaminler, serbest amino asitler ve henüz tanımlanmamış birçok diğer bileşeni içeren kompleks bir üründür. Besin içeriği bakımından zengin olan arı sütünün büyüme ve gelişmeyi hızlandırdığı ve yaşlanma sürecini yavaşlattığı bilinmektedir. Antioksidan, antikanser, antimikrobiyal, antihiperkolesterolemik ve anti-inflamatuvar aktiviteler gibi kanıtlanmış çeşitli farmakolojik aktivitelere sahiptir.

Bu tez çalışmasının amacı Anadolu arı sütünün besin içeriğinin ve antioksidan aktivitesinin aydınlatılmasına ve arı ürünlerine dair literatüre katkıda bulunmaktır. Bu kapsamda, Anadolu'nun 13 farklı ilinden toplanan toplam 15 adet arı sütü örneğinin şeker ve organik asit içerikleri basit ve hızlı kapiler elektroforez (CE) yöntemleri kullanılarak tayin edildi. Kapiler elektroforez, yüksek bir elektrik alan altında iyonların elektroforetik hareketliliklerine bağlı olarak ayrılımlarını sağlayan güçlü bir ayırma ve analiz tekniğidir.

Şekerler, biyolojik sistemler üzerindeki çeşitli rolleri sayesinde tıp, gıda bilimi ve biyokimya gibi birçok alanda önemli bileşiklerdir. Kromofor grupların eksikliği sebebiyle şekerler genellikle ultraviyole (UV) dedektör ile direkt olarak tespit edilemezler. Bu yüzden tez kapsamında arı sütü örneklerindeki şekerlerin analizi, CE-UV sistemi kullanılarak indirekt UV deteksiyon metodu ile gerçekleştirildi. Bu metotta ayırma elektrolitine kromofor bir madde eklenerek devamlı bir sinyal oluşturulur. Analit zonu dedektörden geçerken absorbans düşer ve elektroferogramda negatif bir pik oluşur. Böylelikle türevlendirme işlemine gerek kalmadan şekerlerin analizi gerçekleştirilir. Analit pikinin göç zamanı ve alanı kullanılarak kalitatif ve kantitatif

tayin yapılır. Negatif pik referans dalga boyu kullanılarak pozitif bir pike çevrilerek de piklerin analizi gerçekleştirilebilir.

Organik asitler, asidik özelliklere sahip organik bileşiklerdir. Doğal olarak gıdalarda bulunabileceği gibi gıda ürünlerinin raf ömrü süresince aynı kalitede kalmasını sağlamak ve besin kalitesini artırmak amacıyla gıdalara ilave katkı maddesi olarak eklenirler. Böylece ürünlerin tat, koku, renk, yumuşaklık gibi fiziksel özelliklerini ve besin değerlerini korurlar. Arı sütünde ise organik asitler doğal olarak bulunurlar. Arı sütünün kalitesinin ve besin değerinin bilinmesi için organik asitlerin analizi önemlidir. Küçük organik asitler de şekerler gibi kromofor gruplar içermez ve UV deteksiyon ile direkt olarak tespit edilemezler. İndirekt-UV deteksiyonları ise düşük hassasiyetle sonuçlanır. Bu yüzden tez kapsamında arı sütü örneklerinin organik asit içerikleri, küçük organik asitlerin direkt olarak tayin edilebilmesini mümkün kılan temassız iletkenlik dedektörü (C^4D) ve buna bağlı bir CE sistemi ile analiz edildi.

Arı ürünlerinin potansiyelini ortaya koyan bir diğer faktör ise antioksidan aktivitedir. Fizyolojik faaliyetler sırasında veya çevresel faktörler ile oluşan serbest radikaller ve reaktif bileşikler antioksidanlar sayesinde indirgenerek temizlenirler. Bu nedenle antioksidanların tüketimi sağlık açısından önemlidir. Çalışmanın son aşamasında arı sütü örneklerinin antioksidan aktiviteleri Folin-Ciocalteu testi ve demir iyonu indirgeyici antioksidan güç (FRAP) testi olmak üzere iki farklı yöntem ile tayin edildi.

DETERMINATION OF SUGAR AND ORGANIC ACID CONTENTS IN ANATOLIAN ROYAL JELLIES BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS AND INVESTIGATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY

SUMMARY

There are continuous changes in food production and consumption. The interest in and consumption of healthy, functional, balanced, and nutritious food products has increased significantly in recent years. The term functional food emphasizes the positive relationship between nutrition and health. They stand out among various product groups due to their positive effects on human health. Functional food products contain bioactive substances that protect against diseases and support growth and development in addition to their nutritional value. They are preferred more by modern consumers because they are safer compared to synthetic drugs.

Bee products are natural products with rich nutritional content and high bioactive components. For this reason, they are among the functional foods. They increase the nutritional value of foods by adding them to other food products or consuming them alone. Since ancient times, bee products such as honey, propolis, pollen, royal jelly, and bee venom have been among the most frequently used natural products in traditional medicine due to their potent healing properties and high bioactive molecule content. Despite their widespread use, the detailed chemical composition of bee products was determined only in the late 1900s.

Bee products are rich in bioactive and nutritional elements such as carbohydrates, phytosterols, minerals, proteins, vitamins, sugars, nucleic acids, amino acids, polyphenols, and minerals. Thanks to their components that contribute to biological activity, bee products strengthen the immune system, help the body fight bacteria, stimulate quality tissue regeneration, and protect and treat general body health. They prevent or treat conditions such as wounds, rheumatic diseases, immune and neurological conditions, and intestinal malabsorption. Scientific studies have proven that bee products have many bioactivities, including antioxidant, antibacterial, anti-inflammatory, antitumor, and antiviral properties.

With the increasing use of bee products, beekeeping has become one of the most widespread socio-economic activities in the world today. The most produced bee product among bee products is honey. China ranks first in world honey production. In addition to honey, bee products such as propolis, royal jelly, bee pollen, bee bread, bee venom, and beeswax are also produced and traded. Anatolia, which has a rich vegetation and plant diversity, provides a suitable ground for beekeeping activities and is home to many bee products.

Royal jelly has begun to be researched more extensively in recent years and is relatively newer than other bee products. Royal jelly is the primary nutrient of the queen bee. It is secreted from the hypopharynx and mandibular glands of worker bees. While all bee larvae are fed with royal jelly for the first three days of the larval period,

queen bee larvae are fed with royal jelly during their development in the larval and adult periods. In this way, the queen bee gains superior characteristics to worker bees in terms of physiological, morphological, and anatomical aspects. Royal jelly is a complex compound consisting of water (50-60%), proteins (18%), carbohydrates (15%), lipids (3-6%), trace minerals, water-soluble vitamins, free amino acids, and many other unidentified components. Royal jelly is collected by beekeepers using special techniques at certain times of the year and stored in cold environments. It has various proven pharmacological activities such as increasing growth rate, delaying aging, regulating the digestive system, and anticancer, antioxidant, antitumor, antimicrobial, antihypercholesterolemic, and anti-inflammatory effects. Due to their positive health effects, they are widely used in commercial medical products, food supplements, food and beverages, and cosmetic products.

This thesis aims to explain Anatolian royal jelly's nutritional content and antioxidant activity and contribute to the literature on bee products. In this context, the sugar and organic acid contents of 15 royal jelly samples collected from 13 different provinces of Anatolia were determined using simple and rapid capillary electrophoresis (CE) methods. Capillary electrophoresis (CE) is a robust separation and analysis technique that allows the separation of ions according to their electrophoretic mobility under high electric fields. Compared to other separation techniques, it has the advantages of low sample volume analysis, high sensitivity, and short analysis times.

Sugars are among the important compounds in many fields, such as medicine, food science, and biochemistry, due to their various roles in biological systems such as energy production and storage, cell signaling, and structural support. Due to the lack of chromophore groups, sugars generally have very low absorbance in ultraviolet (UV) detection, and their amounts cannot be determined. Therefore, direct detection of sugars with a UV detector is not possible. In this thesis, the analysis of sugars in royal jelly samples was carried out using an indirect UV detection method using the CE-UV system. In this method, a chromophore substance is added to the separation electrolyte, and the detector generates a continuous signal. As the analyte region passes through the detector, the absorbance decreases, and a negative peak is observed in the electropherogram. Thus, sugars are analyzed without any derivatization process. Qualitative and quantitative determination is made using the migration time and area of the analyte peak. The peaks can also be analyzed by converting the negative peak into a positive one using the reference wavelength.

Organic acids are organic compounds with acidic properties. These can be found naturally in foods and added to foods as additional additives to ensure that food products remain of the same quality throughout their shelf life and to increase the nutritional quality of food products. Thus, their antimicrobial effects in products delay lipid and protein oxidation and preserve products' physical properties and nutritional values, such as taste, odor, color, and softness. Organic acids are naturally found in royal jelly. Analyzing organic acids is important to know royal jelly's quality and nutritional value. Small organic acids do not have chromophore groups like sugars and cannot be directly detected by UV detection. Indirect UV detections result in low sensitivity. A long pre-derivatization step is required for detection with fluorescent detectors. On the other hand, direct detection of small organic acids is possible with a non-contact conductivity detector (C^4D). Therefore, within the thesis scope, the organic acid contents of royal jelly samples were analyzed with the CE- C^4D system.

Another factor that reveals the potential of bee products is their antioxidant activity. Free radicals and reactive compounds are formed during physiological activities or by environmental factors. These are cleaned by reducing antioxidants through electron or hydrogen transfer. In this way, the adverse effects of cardiovascular diseases, nervous system disorders, diabetes, and cancer are significantly reduced. Therefore, consuming antioxidants in a nutritious way is important for health. In the last stage of the study, the antioxidant activities of royal jelly samples were determined by two different methods: Folin-Ciocalteu test and iron ion reducing antioxidant power (FRAP) test.

Despite our country's rich vegetation and colony diversity, information on the chemical properties of royal jelly is not fully sufficient. However, considering the developing trade and competition between countries worldwide, the chemical composition, an important factor in evaluating quality, must be clarified. Therefore, the ultimate goal of this thesis is to contribute to the spread of Anatolian royal jelly as a product with beneficial properties for human health.





1. GİRİŞ

Günümüzde gıda üretim ve tüketiminde sürekli değişiklikler meydana gelmektedir. Son yıllarda ekolojik olarak sağlıklı, daha işlevsel, dengeli ve besleyici gıda ürünlerine olan ilgi büyük ölçüde artmıştır [1]. Fonksiyonel gıda ürünleri, insan sağlığı üzerindeki doğrudan etkileri nedeniyle çeşitli ürün grupları içinde öne çıkmaktadır [2]. Modern tüketiciler, sentetik ilaçlara kıyasla daha güvenli olmaları sayesinde, biyolojik kökenli biyoaktif maddeler içeren doğal fonksiyonel gıdaları daha fazla aramakta ve kullanmaktadırlar.

Uluslararası Gıda Bilgi Konseyi (IFIC), fonksiyonel gıdaları "temel beslenmenin ötesinde faydalar sağlayabilecek gıdalar ve gıda bileşenleri" olarak tanımlar [3]. Fonksiyonel gıdalar, Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) tarafından "yeterli beslenme faydalarının ötesinde, bir veya birden fazla vücut fonksiyonu üzerinde faydalı bir etkiye sahip olan, bu etkinin ya sağlık durumu ve refahı artırıcı ya da hastalık riskini azaltıcı şekilde ilişkili olduğu bir gıda" olarak tanımlanmaktadır [4]. Fonksiyonel gıda terimi, beslenmenin sağlıkla olan olumlu ilişkisini vurgular.

Arı ürünleri, diğer gıda ürünlerine eklenerek gıdanın besin değerini artırır ya da doğal ve zengin besin içeriği ve yüksek biyoaktif bileşenleriyle tek başına kullanılırlar. Bu nedenle arı ürünleri "fonksiyonel gıda" olarak kabul edilmektedir [5]. Bal, polen, arı ekmeği, arı sütü ve propolis, yüksek besin değeri ve insan sağlığına olumlu yönde etkileri olan faydalı özelliklere sahiptir. Antik çağlardan bu yana, bal, propolis, polen, arı sütü ve arı zehri gibi arı ürünleri, güçlü iyileştirici özellikleri ve yüksek biyoaktif molekül içeriği nedeniyle geleneksel tıpta en sık kullanılan doğal ürünler arasında yer almıştır [6]. İnsanoğlu arı ürünlerini birçok şekilde, örneğin arı mumunu çeşitli teknolojilerde, balı yiyecek olarak, tıpta ve tapındığı tanrılara sunmakta, arı polenini cilt tedavisinde kullanmıştır [6]. Ancak bu geleneksel tıp dalının bilimsel temelleri birkaç yüzyıl öncesine kadar bilinmemiş, detaylı kimyasal bileşimleri ise ancak 1900'lerin sonlarında belirlenmiştir.

Arı ürünleri proteinler, basit şekerler, temel amino asitler ve tekli doymamış yağ asitleri açısından zengindir [5]. Bu özellikler bağışıklığı güçlendirir, vücudun bakterilerle aktif olarak savaşmasına yardımcı olur, kaliteli doku yenilenmesini uyarır ve dolayısıyla genel vücut sağlığını korur ve tedavi eder. Yara, romatizmal hastalıklar, bağışıklık ve nörolojik durumlar ile bağırsakta emilim bozukluğu gibi çeşitli durumların önlenmesi veya iyileştirilmesi için kullanılmaktadır [7-9]. Bilimsel çalışmalar, arı ürünlerine antioksidan, antibakteriyel, anti-inflamatuar, antitümör, antiviral özellikler dahil olmak üzere geniş bir sağlık yararı yelpazesi atfetmektedir [10-12]. Araştırma bulgularına göre, arı ürünleri karbonhidratlar, fitosteroller, mineraller, proteinler, vitaminler, şekerler, nükleik asitler, amino asitler, polifenoller ve mineraller gibi biyoaktif ve besleyici elementler bakımından zengindir [5].

Arıcılık günümüzde tüm dünyada yapılan en yaygın tarımsal faaliyetlerden birisi haline gelmiştir. 2020 yılında dünya çapında yaklaşık 1,8 milyon ton bal üretimi gerçekleştirilmiştir. Çin 2020 yılı dünya bal üretiminde %25,9'luk paya sahip olmakla birlikte 458 bin ton üretimi ile dünyada ilk sırada yer almıştır. Bal üretiminde %5,9'luk paya sahip Türkiye 104 bin ton ile ikinci, %4,5'lik pay ile İran ise 80 bin ton üretimi ile üçüncü sırada yer almaktadır [13]. Dünya ticaretinde sadece bal değil, aynı zamanda propolis, arı sütü, polen ve balmumu gibi diğer arı ürünleri de yer almaktadır.

Arı ürünlerinin kullanımı Anadolu'da çok uzun süredir devam eden köklü bir gelenektir. Arıcılık da çok eski yıllardan bu yana süregelen sosyoekonomik bir faaliyettir. Anadolu, iklim ve zengin bitki örtüsü kaynakları çeşitliliği sayesinde arıcılık üretimi için büyük bir potansiyele sahiptir.

Anadolu arı ürünleri üzerine bilimsel araştırmalar ve faaliyetler de hızla artmaktadır. Erim ve grubunun Anadolu'nun farklı bölgelerinden toplanan bal, polen, arı ekmeği ve propolis örnekleri [14-19] ile apiterapide kullanılan arı zehri üzerine yayımlanan çalışmaları bulunmaktadır [20]. Bu çalışmalarda arı ürünlerinin önemli biyoaktif bileşenlerinin, makro ve mikro elementlerinin, nitrat ve nitrit gibi iyonların, majör proteinlerinin tayini gerçekleştirilmiştir. Antioksidan ve anti-inflamatuar aktiviteleri değerlendirilmiştir. İstatistiksel bir yöntem olan temel bileşenler analizi ile örnekler coğrafi kökenlerine göre sınıflandırılmıştır.

Arı sütü, son 20 yıldır kapsamlı bir şekilde araştırılmaya başlanmış diğer arı ürünlerine göre nispeten yeni bir arı ürünüdür. Arı sütü, işçi arıların hipofaringeal ve mandibular

bezleri tarafından üretilir. Tüm arı larvaları ilk üç gün arı sütü ile beslenirken, yalnızca kraliçe larvaları gelişimleri boyunca bu özel gıda ile yoğun bir şekilde beslenmeye devam eder. Arı sütü, su (%50–%60), proteinler (%18), karbonhidratlar (%15), lipitler (%3–%6), iz mineraller, suda çözünür vitaminler, serbest amino asitler ve tanımlanmamış birçok diğer bileşenden oluşan karmaşık bir bileşiktir [21]. Arı sütü, *in vitro*, *in vivo* ve klinik çalışmalar yoluyla kanıtlanmış çeşitli farmakolojik aktivitelere sahiptir. Bunlar arasında vazodilatatif ve hipotansif aktiviterler, büyüme oranının artışı, antitümör, antimikrobiyal, antihiperkolesterolemik ve anti-inflamatuar aktiviterler bulunur. Ayrıca, son zamanlarda immünmodülatör aktiviterler ve östrojen benzeri etkiler yayınlanmış olup, romatoid artritte eklem yıkımını engellemedeki potansiyel terapötik değeri de kanıtlanmıştır. Daha önceki biyolojik araştırmalar, arı sütünde insülin benzeri bir aktivite olduğunu göstermiştir ve bu bulgular son çalışmalarla da doğrulanmıştır. Bu nedenle, arı sütü, 35 yılı aşkın süredir birçok ülkede ticari tıbbi ürünlerde, gıdalarda ve kozmetiklerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Her yıl uluslararası literatürde yayınlanan çok sayıda ilginç bilimsel sonuç, arı sütünün gelecekte de uzun yıllar boyunca araştırılmaya devam edeceğini göstermektedir [21, 22].

Bu tez kapsamında Anadolu'nun 13 farklı ilinden toplanan toplam 15 adet arı sütü örneğinin şeker ve organik asit içeriği ile antioksidan aktiviterleri belirlendi. Şeker ve organik asit analizi için basit ve hızlı kapiler elektroforetik yöntemler kullanıldı. Kapiler elektroforez (İng: capillary electrophoresis, kısaltma: CE), yüksek bir elektrik alan altında iyonların elektroforetik hareketliliğine dayanarak ayrılmasını sağlayan güçlü bir ayırma ve analiz tekniğidir. Diğer ayırma teknikleriyle karşılaştırıldığında kapiler elektroforez (CE) çekici özellikleri nedeniyle aktif bir araştırma alanı olmaya devam etmektedir. Son 5 yılda Web of Science (WOS) veritabanında “capillary electrophoresis” başlığı ile 1411 makale yayınlanmıştır. Son 3 yıla ait literatür derlemesi Li ve arkadaşları tarafından ‘Analytical Chemistry’ dergisinde görülmektedir [23]. CE'nin geniş uygulama alanları içinde önemli yer tutan gıda uygulamaları son bir kitapta toplanmıştır [24]. Bu kitabın ilk bölümünde CE çalışma prensibi detaylı olarak açıklanmıştır [25]. Bu tez kapsamında arı sütü örneklerindeki şekerlerin analizi bir CE-indirekt UV deteksiyon metoduyla gerçekleştirildi. Şekerler, enerji kaynağı ve depolama, hücre sinyalleşmesi ve yapısal destek gibi çeşitli biyolojik süreçlerde önemli bir rol oynar. Biyolojik aktiviterler ve glikoproteinler ile

glikolipidlerin metabolizması üzerinde önemli bir etkiye sahiptirler. Biyolojik sistemlerdeki çeşitli rolleri nedeniyle, gıda bilimi, tıp ve biyokimya gibi birçok alanda analizleri üzerine artan bir ilgi bulunmaktadır. Şekerlerin UV dedektör ile direkt olarak tespiti genellikle mümkün değildir çünkü moleküllerdeki kromofor grubunun eksikliği çok düşük bir UV absorbansa sebep olur. CE ile indirekt UV metodunda ayırma elektrolitine güçlü bir kromofor madde eklenir. Analit zonu dedektörden geçerken absorbans düşer ve elektroferogramda negatif bir pik gösterir. Böylece herhangi bir türevlendirme işlemine gerek kalmadan şekerlerin analizi basit ve güvenilir bir şekilde gerçekleştirilir.

Organik asitler, asidik özelliklere sahip organik bileşiklerdir. Biyolojik süreçlerde, organik asitler metabolizma ve katabolizmanın birçok önemli yolunda ara veya son ürünler olarak yer alır ve ökaryotlarda hayati bir yol olan trikarboksilik asit döngüsü veya sitrik asit döngüsünde (Krebs döngüsü) ana rol oynar. Gıdalara ilave katkı maddesi olarak eklenen organik asitler ise gıda ürünlerinin güvenliğini sağlamak ve kalitesini artırmak için kullanılmaktadır. Potansiyel antimikrobiyal aktivitelerinin yanı sıra, organik asitler gıda ürünlerinde antioksidan olarak lipid ve protein oksidasyonunu geciktirmek, rengi stabilize etmek, kötü kokuyu engellemek ve lezzet, tat, yumuşaklık ve sulu olma gibi beslenme ve kalite özelliklerini artırmak için uygulanmaktadır. Organik asitler bazı gıda ürünlerinde doğal olarak bulunurlar. Arı ürünlerinin kalitesinin ve besin değerinin aydınlatılması için organik asitlerin analizi büyük önem taşımaktadır. Küçük organik asitler de şekerler gibi kromofor bir grup içermez ve UV dedeksiyon ile direkt olarak tespit edilemezler. İndirekt-UV dedeksiyonları düşük hassasiyet ile sonuçlanır. Floresans detektörler ile tayininde ise uzun ön-türevlendirme basamağına ihtiyaç duyulur. Bunlara karşılık temassız iletkenlik dedektörü (C^4D) ile küçük organik asitler direkt olarak tayin edilebilir. Bu tez kapsamında arı sütü örneklerinin organik asit içerikleri CE-temassız iletkenlik dedektörü (C^4D) ile analiz edildi.

Tez çalışmasının son basamağında ise arı sütü örneklerinin antioksidan aktiviteleri Folin-Ciocalteu testi ve demir iyonu indirgeyici antioksidan güç (FRAP) testi olmak üzere iki farklı yöntem ile tayin edildi. Antioksidan aktivitelerinin aydınlatılması bu fonksiyonel arı ürününün potansiyelini ortaya koymada önemli bir adımdır. Antioksidanlar normal fizyolojik faaliyetler sırasında ortaya çıkan veya çevresel faktörlerle oluşan serbest radikallere (SR) ve reaktif bileşiklere elektron veya hidrojen

vererek onları indirger. Böylece meydana gelebilecek kalp-damar rahatsızlıkları, kanser, diyabet, sindirim sistemi rahatsızlıkları gibi bazı hastalıkların olumsuz etkilerini önemli derecede azaltır. Dolayısıyla beslenme yoluyla antioksidan alımı ve antioksidan enzim savunma sisteminin desteklenmesi sağlık açısından önem taşır.

Ülkemizin zengin bitki örtüsü ve koloni çeşitliliğine rağmen arı sütünün kimyasal özellikleri hakkındaki bilgiler tam anlamıyla yeterli değildir. Oysa dünya çapında gelişmekte olan ticaret ve ülkeler arası rekabet düşünüldüğünde kaliteyi değerlendirmede önemli bir faktör olan kimyasal bileşimin aydınlatılması gerekir. Dolayısıyla bu tezin nihai amacı Anadolu arı sütünün insan sağlığına faydalı özelliklere sahip bir ürün olarak yayılmasına katkıda bulunmaktır.



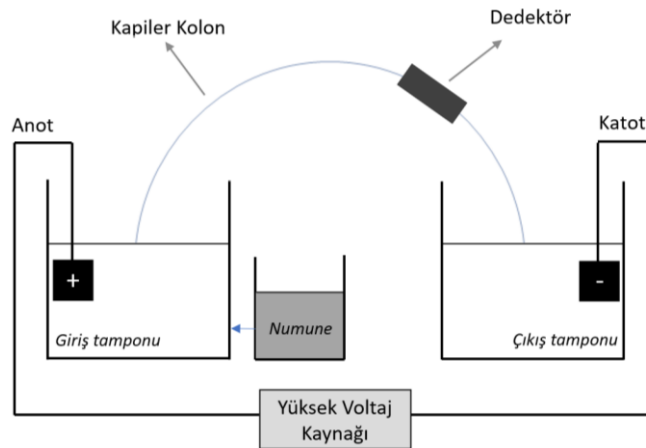


2. KAPİLER ELEKTROFOREZ

Kapiler elektroforez (CE), yüklü taneciklerin yüksek bir elektrik alan altında hız kazanarak kapiler kolon içinde yük/büyüklik oranlarına göre ayrılması prensibine dayanan bir ayırma ve analiz tekniğidir. Kapiler elektroforezin ayırma prensibi klasik elektroforeze dayanmakta olup cihaz tasarımı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve gaz kromatografisi (GC) gibi modern kromatografik tekniklerinkine benzerdir [26, 27].

Kapiler elektroforezde çok yüksek voltaj uygulanabilmesi ve ayırmanın çok küçük iç çaplı kolonlarda gerçekleşmesi ile analitler için kısa sürede yüksek ayırma etkinliğine ulaşılmaktadır. Ayrıca CE farklı ayırma modlarına sahiptir. Bu modlar sayesinde küçük taneciklerden büyük moleküllere kadar pek çok inorganik, organik ve polimerik moleküller cihaz tasarımı ve kapiler kolon değişmeden ayrılabilir. Bu avantajları sayesinde CE son yıllarda ilaç, adli tıp, gıda, çevre gibi birçok alanda kimyasal ve biyokimyasal analizlerde kullanılmıştır [28, 29].

Bir CE cihazının temel şeması Şekil 2.1'de verilmiştir.



Şekil 2.1 : Kapiler elektroforezin temel şeması [25].

Şekil 2.1’de görüldüğü üzere kapiler kolonun iki ucu, her biri yaklaşık 1 mL hacminde tampon çözelti ile doldurulmuş iki küçük kaba daldırılmıştır. Ayırma voltajı için

gerekli olan iki platin elektrot da bu tampon kapları içine yerleştirilmiş ve yüksek voltajlı bir güç kaynağına bağlanmıştır. Enjeksiyonlar genellikle anot tarafından yapılırsa da gerektiğinde polarite değiştirilerek katot tarafından da enjeksiyon yapılabilir. Anottan injekte edilen numune elektrik alan etkisiyle kolon boyunca analitlerin yüküne ve büyüklüğüne göre ayrılarak ilerler ve dedektöre ulaşır. Dedektöre ulaşan sinyaller bir bilgisayar sistemi ile piklere dönüştürülür ve elektroferogramlar elde edilir. CE’de en yaygın olarak kullanılan dedektörlerden biri UV dedektördür. UV dedektör CE cihazının içinde bulunmakta olup dedeksiyon hücresi kapiler kolon üzerindedir. Kapileri kaplayan koruyucu poliimid tabakası yakılarak, yaklaşık 0,5-1 cm kalınlığında bir dedektör penceresi oluşturulur ve bu sayede ayrılma sırasında dedeksiyon gerçekleşir. UV detektörün yanısıra floresans, lazer indüklenmiş floresans, temassız iletkenlik dedektörleri ve kütle dedektörleri gibi dedektörler de ticari CE cihazları ile uyumludur. Analitlerin kalitatif tayini piklerin göç zamanlarından, kantitatif tayini ise pik alanlarının hesaplanması ile gerçekleştirilir [24, 26, 27].

Kapiler elektroforezde enjeksiyonlar hidrodinamik veya elektrokinetik olarak gerçekleştirilebilir. Enjeksiyonun yapıldığı kapiler kolonun ucu, numune kabına daldırılır. Hidrodinamik enjeksiyonda, belirli bir zaman ve basınç uygulanarak analit, kapiler kolona dar bir numune bölgesi olarak giriş yapar. Elektrokinetik enjeksiyonda ise kapiler kolonun ucu yine numune çözeltisine daldırılır ve belirli bir süre için voltaj uygulanır. Her iki enjeksiyonda da kapiler tampon kabına geri döner ve elektroforezi başlatmak için iki elektrot arasında ayırma voltajı uygulanır. Tekrarlanırlığın daha yüksek olması nedeniyle genellikle hidrodinamik enjeksiyon tercih edilir [26].

Ayırma ortamının seçimi ve optimizasyonu CE ayırmalarında önemli parametrelerin arasındadır. CE’de kullanılan ayırma ortamı ayırmanın kalitesi açısından önemlidir. Ayırma ortamı olarak genellikle sulu tampon çözeltiler seçilir, fakat farklı kapiler elektroforez modlarında ayırma ortamı değişebilmektedir. Analitlerin fizikokimyasal özelliklerine ve istenen ayırma mekanizmasına göre bir ayırma ortamı seçildikten sonra analitler kapiler kolon boyunca yürütülerek ayırma gerçekleştirilir. Analitlerin ayırmasını iyileştirmek, hassasiyeti arttırmak, matriks etkilerini azaltmak ve tekrarlanabilirliği artırmak için tampona farklı katkı maddeleri eklenebilir. Yüzey aktif maddeler, kompleksleştirici maddeler, kiral seçiciler, organik çözücüler katkı maddeleri dahilindedir [23, 24, 26].

2.1 Kapiler Elektroferezin Tarihçesi

Klasik elektroferez ilk olarak İsveçli kimyager Arne Tiselius tarafından 1930'da tanıtılmıştır. Tiselius protein karışımı içeren bir çözeltiyi tampon çözeltiler arasına yerleştirip elektrik alan uygulamış ve protein çözeltisinin bileşenlerinin yüklerine ve mobilitelerine göre belirli yönlerde doğru kendilerine özgü hızlarla göç ettiğini gözlemlemiştir. Bu buluşu sayesinde Tiselius 1948 yılında Nobel Ödülü'ne layık görülmüştür [28].

Klasik elektroferez deneyleri, her iki ucuna elektrotlar bağlı olan ve içinde elektrolit bulunan U şeklindeki tüplerde başlamıştır. Serbest çözeltide göç eden taneciklerin hızlarının düşük tekrarlanabilirliği nedeniyle, ayırmanın jel ortamında gerçekleştiği bir yöntem olarak evrilmiştir. Bugün 'slab-jel elektroferezi' olarak bilinen bu yöntem, özellikle protein ayırmalarında biyokimya laboratuvarlarının vazgeçilmez bir aracıdır [26, 28].

1967'de Hjertén 1-3 mm çapında kolonları kullanarak inorganik iyonların, organik moleküllerin ve virüslerin ayrılmasını sağlamıştır. 1974 yılında ise Virtanen, ardından Mikkers ve Everaerts, sırasıyla cam ve politetrafloroetilenden (PTFE) yapılmış yaklaşık 200 µm iç çaplı kapiler kolonları kullanmışlardır [28].

Mikrometre çaplı dar silika kapiler kolonların kullanıldığı kapiler elektroferez metodu 1980'lerin başında Jorgenson ve Lukacs tarafından geliştirilmiştir. Jorgensen ve Lukacs, 1981'de Analytical Chemistry'de yayınlanan bir makaleyle CE tekniğini tanıtmışlardır. Yöntem ilk olarak araştırma laboratuvarlarında el yapımı cihazlarla gelişmiş ve daha sonra modern CE cihazları piyasaya sürülmüştür [28].

2.2 Ayırma Parametreleri

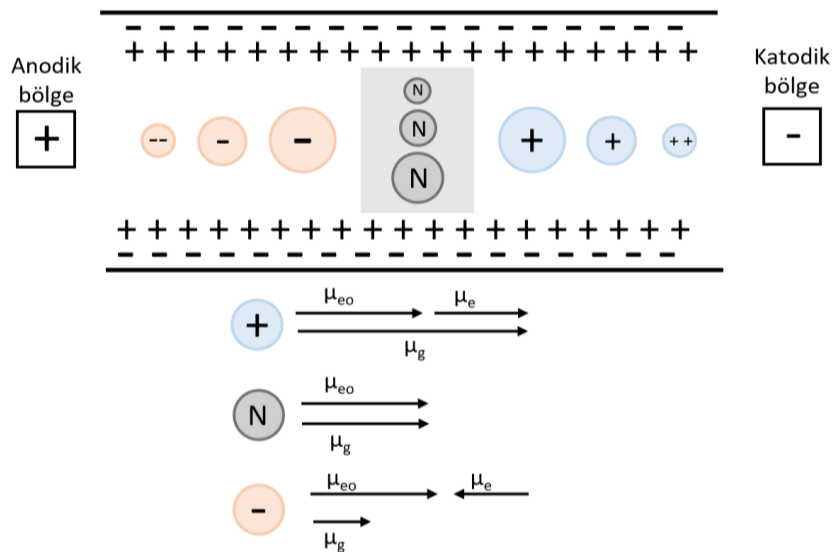
2.2.1 Elektroosmotik akış

Klasik jel elektroferezde sisteme elektrik alan uygulandığında negatif iyonlar anoda yani pozitif (+) kutuba, pozitif iyonlar ise katoda yani negatif (-) kutuba doğru ilerler. Fakat kapiler elektroferezde pozitif, negatif hatta nötral iyonların tümü, elektroosmotik akış (EOA) sayesinde anottan katoda doğru ilerler [28].

CE'de kapiler kolonlar camdan üretilir. Bu nedenle kolonun iç çeperi silanol (-SiOH) grupları ile kaplıdır. Kapiler kolon içindeki ortamın pH değeri 2'den büyük olduğunda

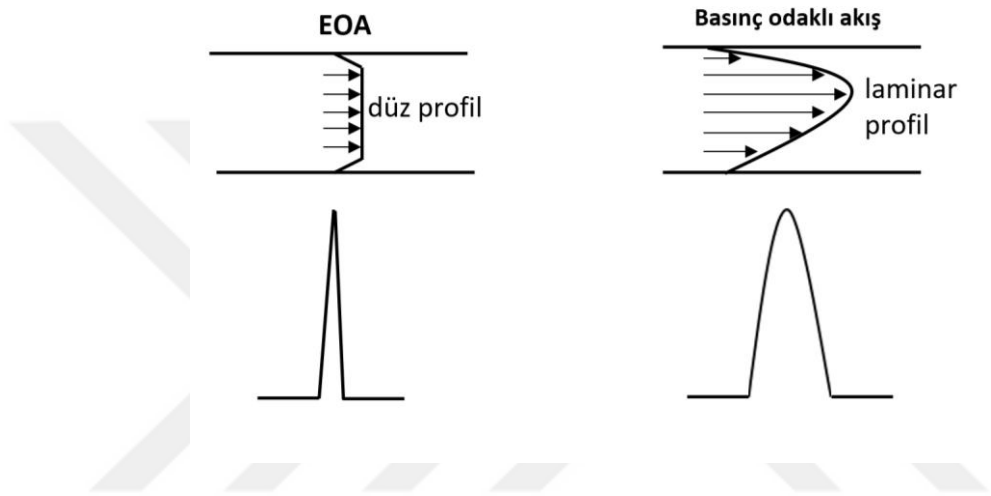
silanol grupları ($-\text{SiO}^-$) iyonlaşır ve silika iç duvarı negatif yüklü olur. Yük dengesini korumak amacıyla pozitif yükler de kolon içindeki elektrostatik çekim ile duvara yakın lokalize olur ve dağınık bir elektriksel çift tabaka oluşur. Sisteme elektrik kuvveti uygulanmaya başlandığında çift tabakanın katyonları katoda doğru ilerlemeye başlar. Katyonlar sulu ortamda hidratize olduklarından kolon içindeki çözücüyü de beraberinde sürükler. Böylece kolon içerisinde bir çözelti akışı meydana gelir. Kapiler kolon içinde tampon veya örnek fark etmeksizin tüm sıvının dedektöre doğru toplu akışına elektroosmotik akış adı verilir. Elektroosmotik akışın hızı, kolonda ayrılan ve ilerleyen maddelerin kolon içinde kaldığı süreyi belirler [24, 28].

Klasik bir CE metodunda kapiler duvarı negatif yüklüdür ve akış anottan (pozitif elektrot) katoda (negatif elektrot) doğrudur. Yükü ne olursa olsun tüm türler katoda doğru hareket eder. Ancak iyonların yüklerine göre kolonda ilerleme hızları değişir. Şekil 2.2’de görüldüğü üzere anyon, katyon ve nötral türlerin bulunduğu bir karışımda, dedektöre önce katyonlar, ardından nötral türler ve en son anyonlar ulaşır. Katyonlar pozitif yüklerinden dolayı katoda çekilme eğilimidir. EOA mobilitesine katyonun mobilitesi de eklendiğinde en hızlı ilerleyen tanecikler katyonlardır. Nötral türler EOA ile birbirlerinden ayrılmadan ilerlerler. Nötral türlerin ayrımını sağlamak için kapiler elektroforezin bir modu olan misel elektrokinetik kapiler kromatografi (MEKC) kullanılır. Anyonlar ise kendi elektroforetik mobiliteleri ile anoda doğru ilerleme eğilimindedirler. Ancak kuvvetli EOA ile katot yönüne yani dedektöre doğru hareket ederler [26, 28].



Şekil 2.2 : Anyon, katyon ve nötral türlerin kapiler kolon içerisindeki mobilitelerinin şematik gösterimi [25].

CE'nin diğer metodlara göre üstünlüklerinden biri de, EOA'nın düz bir akış profili göstermesidir. Akış tüm kolon boyunca düzgün biçimde dağıtıldığından kolon içindeki hız, kolonun çeperine yakın bölgelerinde de ortasında da aynıdır. Düz akış, ayrılan maddelerin piklerinin genişlemesine engel olduğu için dik ve ince piklerin oluşumunu mümkün kılar. Laminar akış ise EOA'nın tersine parabolik bir akış profili gösterir. Kolon çeperine yakın bölgelerde akış hızı düşerken kolonun ortasında akış hızlıdır. EOA'nın hız profili kapiler çapından bağımsızdır. Ancak çapın 200-300 μm 'den geniş olması durumunda düz akış profili bozulacaktır [24, 28].



Şekil 2.3 : Kolon içi akış profilleri [25].

2.2.2 Elektroosmotik akışın kontrolü

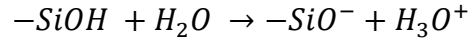
Elektroosmotik akış (EOA), bazı deneysel değişkenlerle kolayca ayarlanabilir. Ancak EOA değiştirilirken, değişkenlerin ayırma üzerindeki olumlu ve olumsuz etkileri dikkate alınmalıdır. EOA hızını etkileyen deneysel parametreler, ayırma tamponunun pH değeri, konsantrasyonu, elektrik alan, sıcaklık, tampona ilave edilen maddelerin cinsi ve konsantrasyonu ve kapiler kolonun iç duvarının kaplanmasıdır [28].

2.2.2.1 Ayırma tamponunun pH değeri

CE'de EOA hızını en kolay ve etkin şekilde kontrol etmenin yolu ayırma tamponunun pH değerinin değiştirilmesidir. Tampon çözeltinin pH değeri arttıkça kapiler iç duvarındaki iyonizasyon artar. Böylece duvarın negatif yükü artar ve EOA hızlanır [26].

Silanol grupları başta protonlu ve yüksüz iken kolonda herhangi bir akış yoktur. Fakat kolon içindeki tampon çözeltinin pH değeri 2'den büyük olduğunda ve voltaj altında

çözücü ortamıyla karşılaştığında silanol grupları iyonlaşarak hidronyum (H_3O^+) iyonlarını açığa çıkarır (negatif iyonlar çepere yapışır). EOA'nın mobilitesi, aşağıdaki reaksiyon sonucu meydana gelen pozitif iyonların miktarına bağlıdır [26, 28].



Pozitif yüklerin artması dedektöre doğru daha yavaş bir akış anlamına gelir. Bu dengeye asit (düşük pH) ilave edildiğinde H_3O^+ miktarı artacağından reaksiyon dengesi sola kayar ve EOA yavaşlar. Dengeye baz (yüksek pH) ilavesi ise reaksiyonun sağa kaymasını sağlar ve EOA hızlanır. Bu durumda yüksek pH değerine sahip bir tampon kullanmak daha avantajlı gibi görünse de EOA ile artan iyon mobilitesinden ötürü yük/büyükölük oranı yakın olan tanecikler kolondan ayrılmadan çıkabilir. Düşük pH değerinde ise azalan EOA mobilitesi iyonun mobilitesini de düşürür, bu da pik genişlemesine sebep olabilir. Ayrıca değişen pH, analitin yükünü ve yapısını da değiştirebilir. Bu olumsuzlukların önüne geçmek için çalışmaya başlamadan önce tamponun çalışılabilecek pH aralığına karar verirken analitin asitlik sabitinin (K_a) bilinmesi gereklidir [26].

2.2.2.2 Ayırma tamponunun derişimi

Yüksek derişimli tampon çözeltiler sahip oldukları yüksek iyonik kuvvet nedeniyle kapiler duvarındaki etkin yükü perdeleyerek duvar yükünü azaltır ve analitin duvarla kulombik etkileşimlerini sınırlandırır. Bu durum EOA'nın mobilitesini azaltır. Bunun yanında, yüksek iyonik kuvvet kolon içinde Joule ısınmasına neden olacağından kullanımı bir noktaya kadar kısıtlanır. Literatürde kullanılan optimum tampon derişimleri 10 ila 50 mmol L⁻¹ arasındadır [26].

2.2.2.3 Elektrik alan

Elektrik alan, Eşitlik 2.1 ile verilir [28]: analitin

$$E = \frac{V}{L} \quad (2.1)$$

Bu eşitlikte V , uygulanan voltaj; L ise kolonun toplam uzunluğudur.

Dolayısıyla voltajda yapılan değişiklik elektrik alanda meydana gelecek değişiklik ile doğru orantılıdır. Yüksek voltaj yüksek bir elektrik alan oluşturarak EOA hızını artırır, fakat Joule ısınmasına sebebiyet verebilir. Düşük elektrik alan ise ayırım gücünü azaltabilir. Elektrik alanda yapılacak değişiklikler analiz süresi ve ayırımın kalitesi

bakımından önemli olduğu için uygulanan voltajda büyük değişimlere gidilmemelidir [26, 28].

2.2.2.4 Sıcaklık

Kolon sıcaklığının artması viskozitenin azalmasına neden olduğu için EOA'ı hızlandırır. Sıcaklığın kolon içindeki kontrolsüz değişimi pik genişlemesine neden olur. Kapiler sıcaklığını kontrol altında tutmanın yolu iyi bir termostat kullanmaktır [28].

2.2.2.5 Kapiler iç duvarının kaplanması

Kapiler iç duvarının geçici veya kalıcı olarak polimerik bir malzeme ile kaplanması, EOA kontrolü için etkili bir yöntemdir [26].

2.2.2.6 Tampona ilave katkı maddeleri

Tampona eklenen organik çözücüler, katkı maddeleri ve özellikle yüzey aktif maddeler EOA hızını önemli ölçüde etkiler. Organik çözücüler zeta potansiyelini ve tampon viskozitesini değiştirebilir. Genellikle EOA hızını azaltırlar. Analitlerin geliş sırasını da değiştirebilmektedirler. Tampona ilave edilen yüzey aktif maddeler EOA'nın büyüklüğünü ve yönünü değiştirebilmektedirler. Yüzey aktif maddeler uzun bir karbon zincirine sahip hidrofobik yapılardır, uçlarında ise pozitif veya negatif hidrofilik gruplar bulunur. Hidrofilik grupların özelliğine göre bunlar katyonik ve anyonik yüzey aktif maddeler olarak adlandırılır. Katyonik yüzey aktif maddelerin pozitif yükleri, iç duvarda bulunan negatif yükler sebebiyle iyonik veya hidrofobik etkileşimler ile duvara adsorbe olurlar. Böylelikle EOA hızını yavaşlatır veya yönünü değiştirirler. Anyonik yüzey aktif maddeler ise iç duvardaki negatif yüklenmeyi artırır ve EOA'ı hızlandırır [24, 26, 28].

2.2.3 Göç süresi

Analizi yapılacak olan analitin kolonda dedektöre doğru göç etmesi için gereken süreye göç süresi denir. Göç süresi göç mesafesi ile göç hızının oranlanması ile bulunur. Dedektöre ilerleyen maddelerin mobilitesi görünür mobilite olarak adlandırılır ve μ_g olarak kısaltılır. μ_g , Eşitlik 2.2 ile ifade edilir:

$$\mu_g = \frac{l}{t \times E} \quad (2.2)$$

Bu eşitlikte l , enjeksiyon noktasından dedektör bölgesine kadar olan etkin uzunluk; t , iyonun göç süresi ve E elektrik alanıdır. Eşitlik 2.1 ile Eşitlik 2.2 birleştirildiğinde Eşitlik 2.3 elde edilir:

$$\mu_g = \frac{l \times L}{t \times V} \quad (2.3)$$

Bu eşitlikte L , kolonun toplam uzunluğu; V , uygulanan voltajdır.

Etkin uzunluk, kolon üzerinde yapılan dedeksiyonlarda kolonun toplam uzunluğundan birkaç cm daha kısadır.

Kasyon, anyon ve nötral türlerin görünür mobiliteleri, EOA'nın mobilitesi (μ_{EOA}) ve iyonun kendi mobilitelerinin (μ_e) toplamına eşittir (Eşitlik 2.4):

$$\mu_g = \mu_{EOA} + \mu_e \quad (2.4)$$

Kasyonlar dedektöre doğru elektrostatik çekimle ilerlediği için kationun kendi mobilitesi pozitifdir:

$$\mu_{g_{kasyon}} = \mu_{EOA} + \mu_{kasyon} \quad (2.5)$$

Anyonların elektroforetik mobilitesi anoda doğrudur. Ancak güçlü EOA ile birlikte katoda yani dedektör yönüne doğru hareket ederler:

$$\mu_{g_{anyon}} = \mu_{EOA} - \mu_{anyon} \quad (2.6)$$

Nötral türler ise yüklü olmadığından elektrik alan altında herhangi bir hareket göstermezler. Yani mobiliteleri sıfırdır. Dolayısıyla nötral türlerin görünür mobilitesi EOA mobilitesine eşittir [26]:

$$\mu_{g_{nötral}} = \mu_{EOA} \quad (2.7)$$

2.2.4 Pik genişlemesi

CE'nin yüksek ayırma verimliliğinin nedenlerinden biri EOA'nın düz profilidir.

Basınçla yönlendirilen akış ise laminar bir akıştır ve daha geniş piklere yol açar. Laminar akış ile oluşan pik içinde pik içinde birden fazla analit pikinin gizli olabileceği durumlar söz konusu olabilir. Öte yandan, düz akışta oluşan pikler keskin piklerdir ve birkaç saniye içinde iki pik arasındaki ayırım sağlanabilir. Pik genişlemesi, tüm kromatografik yöntemlerde ayırma verimliliğini azaltır [26, 28].

CE’de ayırım, kolon içinde göç eden analitlerin mobiliteleri arasındaki farklılıklara dayanır. Örnek bölge zonu farklı sebeplerden ötürü genişleyebilir. Bu durumun sebebi, o bölge içinde örnek maddenin taneciklerinin hızındaki farklılıklardır. Pik genişlemesi ise örnek zonunun genişlemesinin bir sonucudur. Pik genişlemesi piki oluşturan faktörlerin standart sapmasına bağlıdır. Standart sapma azaldığında pikler daha dar ve daha dik, ayırım daha iyidir. Standart sapma arttığında ise geniş ve yayvan olan ve iyi ayrılmayan pikler gözlenir. CE’de piklerin dar olması istenir. Uzaktan tek gibi görünen geniş bir pike yaklaşıldığında içinde birden fazla pik olduğu görülebilir. İyi ayrılmayan piklerin üst üste gelerek tek bir pik gibi görünme ihtimali de vardır. Bu sebepler yüzünden pik genişlemesi istenmeyen bir durumdur. Pik genişlemesine etki eden her bir faktörden ileri gelen standart sapmaların karelerinin toplamı pik genişlemesini verir [24, 26, 28].

$$\sigma_T^2 = \sigma_{dif}^2 + \sigma_{temp}^2 + \sigma_{inj}^2 + \sigma_{det}^2 + \sigma_{ads}^2 + \sigma_{elektrodispersiyon}^2 + \dots \quad (2.8)$$

Alt simgeler sırasıyla difüzyon, sıcaklık gradyanları, enjeksiyon, dedeksiyon, adsorpsiyon ve elektrodispersiyondan gelen sapmaları ifade eder. Her bir faktörden gelen sapmaların toplamı, sistemin standart sapmasını daha iyi ifade eder [24].

2.2.4.1 Difüzyon

Pik genişlemesinin bir diğer nedeni, enjekte edilen bölgenin göç esnasında difüzyonudur. Ancak, kapiler çok küçük çaplı olduğundan enjeksiyon bölgesinin kapiler duvarları yönünde difüzyonu ihmal edilebilir düzeydedir. Gauss eğrisi şeklindeki bir pikin standart sapması ne kadar küçükse pik o kadar dar olur. Pik genişlemesine boyuna difüzyonun etkisi pikin varyansı (σ_L^2) olarak aşağıdaki eşitlik ile verilir [24, 28]:

$$\sigma_L^2 = 2 \times D \times t \quad (2.9)$$

Bu eşitlikte D , türün difüzyon katsayısı; t ise göç süresidir.

CE yönteminde uygulanan çok yüksek elektrik alan, kısa göç sürelerine neden olur. 't' azaldıkça, uzunlamasına pik genişlemesinin etkisi azalacaktır. Protein ve DNA gibi makromoleküllerin 'D' değerleri düşük olduğundan, bu moleküller için pikler çok dar olacak ve yüksek ayırma verimlilikleri sağlanacaktır [28].

2.2.4.2 Joule ısınması

Kapilerden geçen elektrik akımı çok düşük olsa da Joule ısısı olarak adlandırılan bir ısınma meydana gelebilir. Kapilerde oluşan Joule ısısı, elektrolit viskozitesinin kapilerin merkezinde kenarlara göre daha düşük olmasına neden olur ve kapiler içindeki düz akış laminar akışa dönüşür, bu da pik genişlemesine sebep olur. Joule ısını azaltmanın yolu, voltajı ve tampon konsantrasyonunu düşürmektir. Ancak düşük bir elektrik alanı, ayırma verimliliğini ve çözünürlüğü azaltacaktır. Diğer yandan, tampon konsantrasyonunu veya iyonik gücünü düşürmek, tampon kapasitesini azaltacak ve olası örnek duvarına adsorpsiyon riskini artıracaktır. Joule ısını kontrol etmenin başka bir yolu, kapiler iç çapını azaltmaktır. Ancak kapilerin iç çapının azaltılması özellikle UV tespitinde düşük molar absorptiviteye sahip analitler için duyarlılığı azaltacaktır. CE cihazında aktif sıcaklık kontrolü varsa, Joule ısısı kapiler duvarı aracılığıyla dağıtılır [24, 26, 28].

2.2.4.3 Enjeksiyon bölgesi ve deteksiyon bölgesinin uzunluğu

CE’de numune kolona dar bir zon şeklinde injekte edilir. Enjeksiyon bölgesinin uzunluğunun artması, bu ince zonun dağılmasına sebep olur. Difüzyon katsayısı azaldıkça seçilmesi gereken enjeksiyon bölgesi uzunluğu azalır. Örneğin makromoleküller düşük difüzyon katsayısına sahip olduğu için daha küçük enjeksiyon uzunluğu gerektirir. Pratikte enjeksiyon uzunluğu, kapilerin toplam uzunluğunun %1-2’sinden daha az olmalıdır [28].

Analit zonu aynı analite ait iyonların farklı zamanlarda ilerlemesiyle genişlediği için, dedeksiyon bölgesine gelen genişlemiş analit zonu geniş bir pik oluşturur [28].

2.2.4.4 Duvar adsorbsiyonu

Örneklerin kapiler duvarına adsorpsiyonu, pik kuyruklanmasına neden olabilir. Bu etki genellikle pozitif yüklü analitler ile negatif yüklü kapiler duvarı arasındaki elektrostatik etkileşimden kaynaklanır. Tampon konsantrasyonunun artırılması, duvar yükünü azaltarak adsorpsiyonu önler. Ancak, CE’de ayırım çok hızlı olduğundan küçük partiküller için duvar adsorpsiyonu sorunu yoktur. Adsorpsiyon, birçok yük taşıyan proteinler için bir sorundur. Protein ayırımlarında, kapiler iç duvarının protein tipine göre yüksüz veya pozitif yüklü bir polimer ile kaplanması, duvar adsorpsiyonunu önlemek için uygulanan bir yöntemdir [26, 28].

2.2.4.5 Elektrodispersiyon

Örnek bölgesi ile ayırma tamponunun iletkenliği birbirinden çok farklı ise pik şekillerinde bozulma ve kuyruk oluşması meydana gelir. Ayırma tamponu ve enjeksiyon bölgesi arasındaki iletkenlik farkına ‘elektrodispersiyon’ denir. Bu etki, pik genişlemesine neden olan diğer etkilere göre daha küçüktür, ancak düşük rezolüsyonlu ayırmalarda etkili olabilir [26, 28].

2.2.5 Rezolüsyon (Ayrım)

Rezolüsyon, yan yana iki pikin birbirinden ayrımını tanımlar:

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2} = \frac{t_2 - t_1}{4\sigma} \quad (2.10)$$

Bu eşitlikte t , göç süresi; w , pikin taban genişliği; σ , göç süresinin standart sapması; 1 ve 2 ise ayrımı incelenen iki piki ifade eder. Burada pay diferansiyel göç açısından ayırma süresini, payda ise buna karşı etki eden zon genişlemesini tanımlar. CE’de pikler çok dar olduğundan iki pikin ayrılması için mobilitelerinde çok küçük bir fark bile yeterli olur [26, 28].

2.3 Kapiler Elektrofrezin Teorisi

Elektrofrezde ayrım, bir elektrik alanda ayrılan maddenin bileşenleri arasındaki hızların farklılıklarına dayanır. Bir iyonun hızı (V) Eşitlik 2.11 ile verilebilir [28]:

$$V = \mu_e \times E \quad (2.11)$$

Bu eşitlikte μ_e elektroforetik mobilité, E elektrik alandır. Elektroforetik mobilité, iyonun kolon içindeki hareketlilik kabiliyetidir ve iyonun karakteristik bir sabitidir [28].

Elektrik kuvveti (F_e) şu şekilde verilebilir:

$$F_e = q \times E \quad (2.12)$$

Bu eşitlikte q , iyon yüküdür. Sürtünme kuvveti (F_f), kolon içinde taneciklerin hareketine engel olmaya çalışır:

$$F_f = -6 \times \pi \times \eta \times r \times V \quad (2.13)$$

Denklemden η viskozite, r tanecik yarıçapını ifade eder. Tanecik kolonda elektrik kuvvet etkisiyle ilerlerken, sürtünme ona engel olur ve sürtünme kuvveti ile elektrik kuvvet eşitlenir [28]:

$$F_e = -F_f \quad (2.14)$$

$$q \times E = 6 \times \pi \times \eta \times r \times V \quad (2.15)$$

Eşitlik 2.11 ve Eşitlik 2.15 birleştirdiğimizde Eşitlik 2.16 elde edilir:

$$q \times E = 6 \times \pi \times \eta \times r \times \mu_e \times E \quad (2.16)$$

Bu eşitlikten elektroforetik mobilitiyeyi türettiğimizde Eşitlik 2.17 ortaya çıkar:

$$\mu_e = \frac{q}{6 \times \pi \times \eta \times r} \quad (2.17)$$

Bu eşitlikte önemli olan q/r oranıdır. Ayrım bu oranın büyüklüğü ile sağlanır. Denklemden küçük yarıçaplı ve yükü fazla olan türlerin yüksek mobiliteye, büyük yarıçaplı ve yükü az türlerin ise düşük mobiliteye sahip olduğu çıkarılmaktadır [26].

2.4 Kapiler Elektroforezin Avantajları

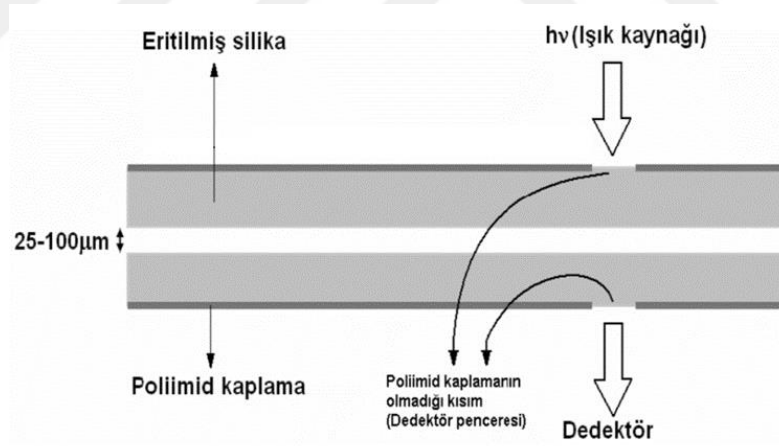
Kapiler elektroforez günümüzde genellikle 25-150 μm iç çapa (i.d.) sahip ve tampon çözelti ile doldurulmuş bir kapiler kolon içerisinde gerçekleştirilir. Kapiler kolonun, analiz esnasında karşılaşılabilecek olumsuz durumlara karşı çok sayıda avantajı vardır. Kapilerin yüksek elektrik direnci sayesinde çok yüksek elektrik alanın uygulanması halinde bile kolonda minimum düzeyde bir ısı üretimi gerçekleşir. Kapilerin sahip olduğu geniş yüzey alanı/hacim oranı, üretilen ısıyı kolonun her bölgesine eşit olarak verimli bir şekilde dağıtır. Yüksek elektrik alanın uygulanması, kısa analiz süreleri, yüksek verimlilik ve güçlü ayrımı mümkün kılar. Kapiler elektroforez, çok sayıda ayırma metoduna ve farklı ayırma mekanizmalarına sahiptir. Analiz için gerekli numune hacmi minimum 1-50 nL olduğundan çok az numune ile çalışmak mümkündür. Metodun uygulama alanı oldukça geniştir. Çalışılmaya başlandığı ilk dönemde biyolojik makromoleküller için düşünülse de sonrasında amino asitler, kiral ilaçlar, vitaminler, pestisitler, inorganik iyonlar, organik asitler, boyalar, yüzey aktif maddeler, peptidler ve proteinler, karbonhidratlar, oligonükleotidler, DNA ve virüsler gibi tanecik boyutu açısından geniş spektrumdaki maddelerin ayrılmasında da kullanılabildiği keşfedilmiştir. CE’de, diğer kromatografik metodlara göre yöntem

geliştirmek daha basittir. Metodun performansının artırılması için yıllar içinde önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu ilerlemeler arasında göç süresi ve pik alan tekrarlanabilirliği üzerindeki iyileştirmeler, EOA'nın kontrolünü sağlamak ve ayrılacak analit-duvar etkileşimini sınırlandırmak için kapiler kaplamaların geliştirilmesi bulunmaktadır [28, 29].

2.5 Enstrümantasyon

2.5.1 Kapiler kolon

CE'de kullanılan kapiler kolonlar eritilmiş silika kolonlardır. İdeal bir kapiler kolon kimyasal ve elektriksel olarak inert, esnek ve sağlam olmalıdır [26, 32]. Silika kapiler kolonların dış katmanını, kırılmayı önlemek ve kullanım sırasında esneklik sağlamak için ince bir polimer tabakası ile kaplanmıştır. Polimer tabakası yaklaşık 0,5 cm uzunluğunda yakılarak deteksiyon penceresi açılır. CE'de kapiler kolonların iç çapı 25-100 μm , dış çapı 350-400 μm , boyu ise çalışmaya göre seçilir ve genellikle 75 cm'yi geçmez [28].



Şekil 2.4 : Eritilmiş silika kapiler kolonun şematik gösterimi [26].

Güvenilir bir CE yöntemi geliştirmek için kapilerin şartlandırılması gerekir. Bunun için kapiler NaOH, su ve çalışılan tampon ile belirli bir süre yıkanır. NaOH ile yıkama sonucunda kapiler iç duvarındaki silanol grupları aktive olarak duvar negatif yüklenir. Kapiler kolonlar, her çalışmadan sonra kolonu bir yıkama çözeltisi ile durulayarak tekrarlanabilir sonuçlar sağlar. Sodyum hidroksit (NaOH), hidroklorik asit (HCl) ve metil alkol gibi bazı organik çözücüler standart yıkama solüsyonlarıdır. Bazı analizler

için yalnızca çalışma tamponuyla yıkamak yeterli olurken, diğerleri için özel yıkama stratejileri geliştirilmelidir [26, 28].

2.5.2 Ayırma elektroliti

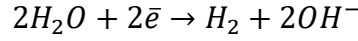
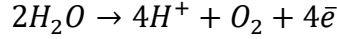
CE'de numunedeki analit zonları farklı hızlarla göç eder. Elektrik alanın etkisiyle meydana gelen ayırım için iletken bir ortam gerekir. Bu ortam, ayırma elektroliti olarak adlandırılan, akımı geçirebilen iyon yüklü bir çözelti ile sağlanır. Tamponlar zayıf asit ile zayıf asidin konjuge bazı ya da zayıf baz ile zayıf bazın konjuge asidinin karıştırılması ile hazırlanır. Tamponun çalışma aralığı asidin pK_a değeri ile belirlenir. Tamponun ortamı tamponlayabilme kabiliyetine “tampon kapasitesi” denir. Elektroosmotik mobilite ortamın pH değerine çok duyarlı olduğundan, tampon kapasitesi, tekrarlanabilir göç süreleri elde etmek için kritik bir faktördür. Tamponun konjuge asit-baz çiftinin başlangıç konsantrasyonları birbirine eşit olduğunda, tampon kapasitesi maksimum olur. Tampon, pH değeri konjuge asidin pK_a değerinin ± 1 birimi civarında olduğunda etkili bir şekilde çalışır. İyi bir tampon kapasitesi için yüksek tampon konsantrasyonu da gereklidir. Ancak, olası Joule ısınması nedeniyle CE'de tampon konsantrasyonu sınırlıdır. Akım sınır değeri aşıldığında CE cihazı otomatik olarak voltajı keser veya düşürür. Bu bağlamda, zwitteriyonik tamponlar avantajlıdır. Bu tamponlarla, iyonik gücü artırmadan yüksek konsantrasyonlara ulaşılabilir. Tris, 2-morfolinoetansülfonik asit, 2-etansülfonik asit (MES), 3-1-propansülfonik asit (CAPS) ve 3-(sikloheksilamin)-2-hidroksi-1-propansülfonik asit (CAPSO), CE'de en çok kullanılan zwitteriyonik tamponlardır [26, 28].

Çalışılan dalga boyunda düşük absorbans göstermesi, tamponun istenen bir özelliğidir. Fosfat ve borat tamponları, düşük absorbansları ve yüksek tampon kapasiteleri ile kapiler elektroforetik ayrımlarda en çok kullanılan tamponlardır [28].

Tampon yüksek kapasiteye sahip olsa bile, tampon kapları ara sıra yenilenmelidir. Tampon organik bir çözücü içerdiğinde, kapiler ucundaki polimer tabakası sünerek kapiler girişini kısmen kapatabilir ve bu da enjeksiyon hacmi tekrarlanabilirliğini etkiler. Bu sorun, kapiler ucundaki polimer tabakasını yaklaşık 0,5 cm yakarak çözülebilir [26].

2.5.3 Elektrotlar

CE’de platin elektrotlar kullanılır. Elektrot bölgelerinde suyun elektrolizi ile anotta indirgenme ile H^+ iyonları, katotta ise yükseltgenme ile OH^- iyonları oluşur [26].



Bu iyonların oluşumu çalışma tamponunun pH değerini değiştirebilir ve dolayısıyla EOA’ı etkiler. Göç zamanının tekrarlanabilirliğini düşüren elektrolizden gelecek olumsuz etkinin önüne geçmek için birkaç enjeksiyonda bir tampon yenilenmelidir. Tamponun yenilenme sıklığına karar vermek için göç zamanındaki kaymanın kaç enjeksiyondan sonra başladığı gözlemlenmelidir [28].

Kapiler içindeki akım μA mertebesinde olduğu için elektrot bölgesinde oluşan H^+ ve OH^- iyonlarının konsantrasyonları da $\mu mol L^{-1}$ mertebesinde [28].

2.5.4 Yüksek voltajlı güç kaynağı

İki elektrot, yüksek voltaj (HV) kaynağına bağlıdır. CE cihazlarında 30 kV'a kadar voltaj sağlanabilir. CE’de yüksek voltaj uygulaması, kısa ayırma süresinin temel nedenidir. Voltajın sabit tutulması ile bir analitin iyonları için göç zamanı aynı tutularak ayırmanın tekrarlanabilirliği sağlanır [26]. Enstrümantal olarak çift kutuplu (DC) bir güç kaynağı kullanılarak 5-30 kV aralığında uygulanan voltaj ile 200-300 mA akım seviyelerine çıkılmaktadır [28].

Katyonik duvar kaplaması ile EOA tersine çevrildiğinde (anottan katoda yerine katottan anoda doğru) elektrotların polaritesi ters çevrilmelidir. Bu yüzden voltaj kaynağının polariteyi değiştirebilmesi gerekmektedir. Bu sayede katod deteksiyon bölgesinden enjeksiyon ucuna geçer [26].

Güç kaynağının sabit akımda veya sabit güç modunda çalışabilmesi gerekir. Sabit voltaj analizleri yaygın olmasına rağmen kolon içinde kontrol edilemeyen sıcaklık gradyanları bulunduğunda sabit akım veya sabit güç modlarının kullanılması daha faydalıdır. Sabit voltaj modunda sıcaklık değişiklikleri tampon viskozitesini ve dolayısıyla göç sürelerini değiştirebilir. Fakat sabit akım modunda meydana gelen viskozite değişiklikleri, uygulanan voltajdaki orantısal değişikliklerle göç süresinde meydana gelecek farklılıklar telafi edilebilir [28].

2.5.5 Numune enjeksiyonu

CE'de kapilere çok küçük miktarda numune injekte edilir. Bunun sebebi kapiler kolonun küçük bir iç çapa sahip olmasıdır. Enjeksiyon bölgesinin uzunluğu kapilerin toplam uzunluğunun %1 ila %2'sinden az olmalıdır. Bu da kapilerin iç çapına bağlı olarak birkaç mm'lik veya 1-50 nL'lik bir enjeksiyon uzunluğuna karşılık gelmektedir. Dar ve kısa olan enjeksiyon bölgesi, çok küçük numune hacimleri ile çalışmaya olanak kılar. Öyle ki 5 µL kadar küçük numune hacimleri ile analiz yapmak mümkündür. Bu durum az miktarda numune mevcut olduğunda çok sayıda enjeksiyon gerçekleştirme olanağı tanır [28].

Kapilere yüksek konsantrasyonlarda numune injekte etmek rezolüsyonu olumsuz etkilemektedir. Pik genişlemesinin bir sebebi olan difüzyon, artan analit iyonları sebebiyle daha fazla meydana geleceğinden analit piklerinin tepe genişliği artarak düşük bir ayırım verimi gözlenebilir. Ayrıca fazla sayıdaki analit iyonları çalınma tamponunun iletkenliğini etkileyerek elektrik alanda dengesizlikler meydana gelebilir ve bu da ayırım açısından istenmeyen bir durumdur [28].

Kantitatif numune enjeksiyonu için kullanılan en yaygın yöntemler hidrodinamik ve elektrokinetik enjeksiyondur.

Bir numunedeki analit iyonlarının ayrılması için hareket edecekleri bir ortam gerekir. Kapiler kolon analit iyonlarına bu ortamı sağlar. Dolayısıyla deteksiyon kapilerin sonunda ve deteksiyon bölgesinde yapılır. Herhangi bir yüzey kaplaması yapılmamış silika kapiler kolonlarda EOA yönü katoda doğru olacağından, deteksiyon bölgesi genellikle katot ucunda yer alır. Bu durumda kapilerin girişi anot haline gelir ve buradan numune enjeksiyonu yapılır [26].

Kaplı olmayan erimiş silika kapiler kolonlar kullanıldığında bazı analitlerin kapilerin iç duvarına adsorbe olma ihtimali yüksektir. Bu da piklerin rezolüsyonunu ve genişlik, yükseklik ve göç süresi açısından tekrarlanabilirliğini olumsuz etkiler. Duvar adsorbsiyonunu önlemek için kapiler kolon kaplamaları kullanılır [30].

2.5.5.1 Hidrodinamik enjeksiyon

Hidrodinamik enjeksiyon, yüksek tekrarlanabilirlik gösterdiği için en yaygın kullanılan enjeksiyon yöntemidir. Kapilerin enjeksiyon ucuna basınç uygulanması, kapilerin çıkış ucuna ise vakum uygulanması ya da enjeksiyon rezervuarının çıkış

rezervuarına göre yükseltilmesiyle elde edilen sifonlama hareketi ile gerçekleştirilebilir. Sifonlama mekanizmasında, numune rezervuarı çıkış rezervuarına göre 10-30 sn süresince 5-10 cm yükseltilir. Genellikle hidrodinamik enjeksiyon özelliği olmayan sistemlerde kullanılır. Hassasiyet de göz önünde bulundurularak, mümkün olan en küçük enjeksiyon uzunlukları kullanılmalıdır [24, 26].

Kapilere yüklenen numune hacmi Hagen-Poiseuille denklemi kullanılarak hesaplanabilir [26, 28]:

$$V_{inj} = \frac{\Delta P \cdot \pi \cdot d^4 \cdot t}{128 \cdot \eta \cdot L} \quad (2.18)$$

Bu eşitlikte V , kapilere yüklenen örnek hacmi (nL); ΔP , kapiler boyunca oluşan basınç farkı (dyn/cm²); d , kapiler iç çapı (cm); t , enjeksiyon süresi (s); η , elektrolit çözeltisinin viskozitesi (dyn.s/cm²); L , kapilerin total uzunluğu (cm)'dur.

Bir hidrodinamik enjeksiyonda enjeksiyon basınç ve süreleri sırasıyla 25-100 mbar ve 0,5-5 sn arasında değişmektedir [28].

2.5.5.2 Elektrokinetik enjeksiyon

Enjeksiyon ucundaki tampon rezervuarının numune viali ile değiştirilmesi ve voltaj uygulanması ile gerçekleştirilir. Uygulanan voltaj ayırma için kullanılan 3-5 kat daha düşüktür ve 10-30 saniyelik enjeksiyon süreleri uygulanır. Numune kapilere hem EOA hem de iyon göçü ile alınmış olur. Kapilere alınan analitin miktarı analitin elektroforetik mobilitesine bağlıdır; mobilitesi yüksek iyonlar kapilere daha fazla, mobilitesi düşük iyonlar ise daha az oranda alınır [26, 28].

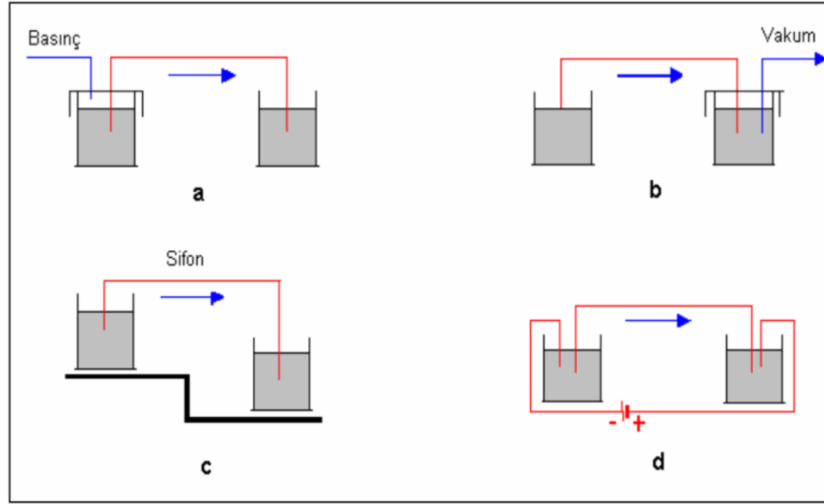
Elektrokinetik enjeksiyon ile kapilere injekte edilen analit miktarı şu şekilde hesaplanabilir [26, 28]:

$$Q = \frac{(\mu_e + \mu_{eo}) \cdot \pi \cdot r^2 \cdot V \cdot C \cdot t_{inj}}{L} \quad (2.19)$$

Bu eşitlikte Q , kolona injekte edilen örnek miktarı (g veya mol); r , kapilerin yarıçapı; μ_e , iyonun elektroforetik mobilitesi; μ_{eo} , EOA'nın mobilitesi; V , uygulanan voltaj; C , örnek konsantrasyonu; t , voltajın uygulanma süresi; L , kapilerin toplam uzunluğudur.

Elektrokinetik enjeksiyonun tekrarlanabilirliği hidrodinamik enjeksiyona göre daha düşüktür. Bunun sebebi kolona yüklemenin sadece enjeksiyon süresine değil; EOA, analit konsantrasyonu ve analit mobilitesine de bağlı olmasıdır. Fazla analit

konsantrasyonları kolon içi iletkenliği etkileyebileceğinden tekrarlanabilirlik hidrodinamik enjeksiyona göre düşüktür. Bu sınırlamalara rağmen, kapiler viskoz bir ortam veya jel ile doluysa basınçla enjeksiyon zor olacağından elektrokinetik enjeksiyonun kullanılması daha avantajlıdır [26, 28].



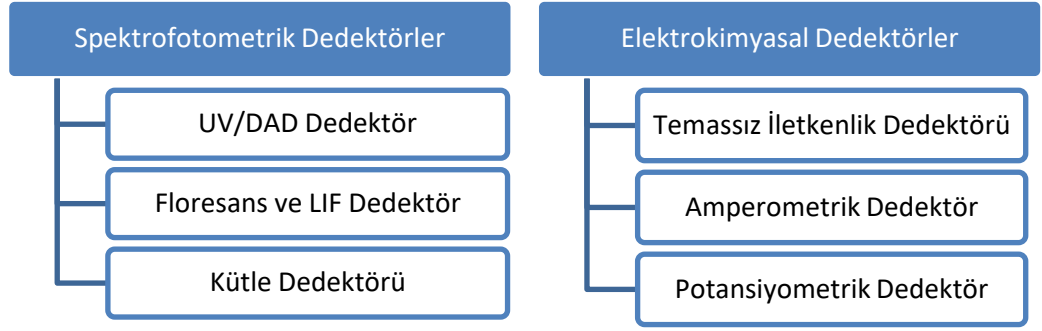
Şekil 2.5 : Enjeksiyon sistemleri: a,b,c: Hidrodinamik enjeksiyon türleri, d: Elektrokinetik enjeksiyon [31].

2.5.6 Termostat

Çalışmanın tekrarlanabilirliği açısından özellikle Joule ısınmasına karşı, kapilerde sıcaklık kontrolü çok önemlidir. Her 1°C’de tampon viskozitesi %2-3’lük bir değişim gösterdiğinden, $\pm 0,1$ °C’ye kadar sıcaklık kontrolü çalışmanın verimi ve göç zamanının tekrarlanabilirliği açısından faydalıdır. Kapilerin ortam sıcaklığındaki değişimlerden izolasyonu sağlanmalıdır. Sıvı termostatlanması daha iyi bir seçenek olsa da CE’de meydana gelen ısıyı kontrol altında tutmak için yaklaşık 10 m/s hızda basınçlı hava termostatu yeterli olmaktadır. Basit enstrümantasyon ve kullanım kolaylığı sebebiyle de hava termostatları daha avantajlıdır [28].

2.5.7 Dedektörler

Dedektörler konsantrasyon değişimlerinden kaynaklanan kimyasal sinyalleri algılayarak elektrik sinyallerine dönüştürür. Bir bilgisayar sistemine bağlanarak, analit piklerini gösteren elektroferogramlar elde edilir [26].



Şekil 2.6 : CE’ de kullanılan dedektörler [25].

2.5.7.1 UV/DAD absorbsiyon dedektörü

CE uygulamalarında en yaygın kullanılan detektör, değişken dalga boylu ultraviyole (UV) - diyot dizisi (DAD) dedektörlerdir. UV aktif fonksiyonel gruplara sahip analitler, elektroforetik ayırım sırasında bu dedektörlerle tespit edilebilir. Kromofor grup içermeyen türler için CE’de kullanışlı ve yaygın bir uygulama dolaylı UV dedeksiyon yöntemidir. Bu yöntemde, ayırma tamponuna güçlü bir kromofor grup içeren bileşik eklenir. Dedektörün dalga boyu, kromoforun maksimum dalga boyuna ayarlanır. Dedektör, kromoforun temel sinyalini görür. Analit iyonları kromofor iyonlarının yerini alır ve analit bölgesi dedektörden geçtiğinde absorbansda bir azalma meydana gelir. Bu negatif pik alanı, analit konsantrasyonuna bağlıdır. Dolaylı UV deteksiyonda piklerin oluşumu ve simetrisi, kromoforun konsantrasyonu ve mobilitesine bağlıdır. Dolaylı UV deteksiyonda, analitin mobilitesi ve kromoforun mobilitesi birbiriyle uyumlu olmalıdır [26, 28].

2.5.7.2 Floresans ve lazer indüklenmiş floresans (LIF) dedektör

Floresans ışınları güçlü bir uyarıcıdır. Elektronlar temel halden bir uyarıcı etkisiyle uyarılarak uyarılmış seviyelere çıkarlar. Fakat uyarılmış seviyeler kararlı olmadığı için, daha kararlı olan temel hale dönmek isterler. 10^{-6} saniye boyunca enerjisini tuttukten sonra temel hale dönerken soğurdıklarından daha büyük dalga boyunda ışıma yaparak floresans ışımasını oluştururlar [28].

CE’de doğal olarak floresans özellikler gösteren veya floresans bir boyaya ile türevlendirilebilen analizler için floresans veya lazer indüklenmiş floresans (LIF) dedektörler kullanılır. Floresans dedektör, UV dedektöründen daha düşük bir dedeksiyon limiti (LOD) sağlar. Diğer yandan, LIF dedektörlerle çok düşük LOD değerlerine ulaşılabilir. Yoğun bir ışın kaynağı olan lazer ile 10^{-13} M mertebesinde

analiz yapılabilir. Bu tip dedektörlerde Ar, He-Cd, He-Ne gibi lazer kaynakları kullanılır [28]. LIF dedektörde lazer ışını, bilyeli bir mercek vasıtasıyla kapiler üzerine odaklanır. Işığın analit ile etkileşmesi gerektiğinden kapiler kolon üzerinde poliimid tabakasının LIF dedektörde de yakılması gerekmektedir [26].

2.5.7.3 Kütle dedektörü (MS)

CE'nin MS ile birleştirilmesi, birçok bileşiğin yüksek ayırma verimliliği ile ayrılmasını ve ayrılan analizlerin moleküler kütle bilgilerini elde etmeyi sağlamaktadır. CE'de ayrılan maddelerin MS'te kimliklendirilebilmesi için sıvı fazdan gaz fazlı iyonlara dönüştürülmesi gerekir. İyonizasyon işlemi ile bu amaca ulaşılır. Bugüne kadar CE-MS uygulamalarında en çok kullanılan ara yüz elektrosprey iyonizasyon (ESI) olsa da CE'nin MALDI-MS ve bazı diğer iyonizasyon teknikleriyle birleştirildiği çalışmalar da bulunmaktadır. CE-MS kombinasyonu, çoğunlukla proteomik, farmasötik ve klinik araştırmalarda kullanılmıştır [28, 32].

2.5.7.4 Temassız iletkenlik (kondüktivite) dedektörü (C⁴D)

Kapiler elektroforez için temassız iletkenlik dedektörü (C⁴D) ilk kez 1998 yılında tanıtılmıştır. O zamandan beri, yöntem elektroforezde inorganik ve organik iyonların tespiti için uygulanmıştır [26]. C⁴D, ticari CE cihazları ile basit bir kombinasyon sağlar. Dedektör, silika kapiler kolonun polimid kaplamasının etrafına yerleştirilen iki elektrottan oluşur. İki elektrot arasındaki çözeltinin elektriksel iletkenlik değişimleri ölçülür [28].

Deteksiyon bölgesinde kapiler kolonu belirli mesafeden saran paslanmaz yapıda çelik boru şeklinde, sırasıyla aktüatör elektrot ve toplama elektrodu olarak adlandırılan iki adet elektrot bulunur. Aktüatör elektroda bir 30-600 kHz aralığında bir salınım frekansı uygulanarak elektrot ile kapiler içindeki sıvı arasında elektriksel bir geçiş meydana gelir. Elektrotlar arasındaki algılama aralığı geçildikten sonra, kapilerdeki sıvı ve toplama elektrodu arasında ikinci bir elektriksel geçiş meydana gelir. Analitlerin bu iki elektrot arasındaki boşluktan geçmesi ile boşlukta oluşacak iletkenlik toplama elektrodu tarafından algılanır [28]. Oluşan bu iletkenlik analitin konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak değişir [33].

Dedektörden optimum verimi alabilmek için analit çözeltisi ile tampon çözelti arasındaki iletkenlik farkı belirgin, hatta mümkün olduğunca yüksek olmalıdır. Fakat

tampon sıcaklığında oluşacak gradyanlar, bu noktada sınırlayıcı faktördür. Tamponun yüksek iletkenliği nedeniyle yüksek bir gürültü oluşur ve istenen düşük deteksiyon limitlerine inmede zorluk yaşanır. Düşük tampon konsantrasyonu ise numunenin kolonda yığılmasına ve zon genişlemelerine neden olur. Bu yüzden yüksek konsantrasyonlardaki amfoterik tamponlar olan MES, CAPS gibi tamponların kullanımı ile bu noktada bir çözüm bulunabilir [28].

2.5.7.5 Amperometrik dedektör

Doğru akım voltajının etkisi altındaki bir elektrot yüzeyinde analite ya da analitten bir elektron transferine dayanır. Elektron transferi sonucunda elektrotta analit konsantrasyonu ile ilişkili bir akım üretilir ve redoks tepkimesi gerçekleşir [28].

Amperometrik deteksiyonun en büyük dezavantajı redoks tepkimelerindeki ara reaksiyon ürünlerinin elektrot yüzeyine adsorbe olması ve sonrasında elektron transferini azaltarak deteksiyonu olumsuz etkilemesidir. Bu sorun, darbeli amperometrik dedektör (PAD) ile elektrot yüzeyinin anodik temizliği ve yeniden aktivasyon adımlarını kullanılarak çözülmektedir [28, 34].

2.5.7.6 Potansiyometrik dedektör

Potansiyometrik dedektörler, klasik iyon seçici mikroeletrotlar kullanılarak küçük numune hacimlerinde inorganik ve organik iyonları detekte ederken kullanılır. Analit dedektörün lipofilik membran fazına aktarıldığında sinyal üretilir. Analitin varlığı, sensörün dahili dolum çözeltisi ile numune akışı arasındaki potansiyel farkta bir değişiklik yaratır. Potansiyel fark iyon konsantrasyonu ile doğrudan ilişkilidir. Potansiyometrik dedektörlerin dezavantajları arasında zahmetli sensör hazırlama, sensörün sınırlı ömrü ve devamlı kalibre edilmesi bulunur [33].

Yukarıda (Bölüm 2.5.7 kapsamında) anlatılan dedektörlerin derişim aralıkları Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1 : CE’de kullanılan dedektörler ve tayin aralıkları [35].

Dedektör	Tayin Sınırı (mol L ⁻¹)
UV absorpsiyon dedektörü	10 ⁻⁷ - 10 ⁻⁴
Floresans dedektörü	10 ⁻⁹ - 10 ⁻⁴
Lazer indüklenmiş floresans dedektörü	10 ⁻¹³ -10 ⁻⁷
Kütle dedektörü	10 ⁻¹¹ -10 ⁻⁸
İletkenlik detektörü	10 ⁻⁷ - 10 ⁻⁵
Amperometrik dedektör	10 ⁻⁸ - 10 ⁻⁶
Potansiyometrik detektör	10 ⁻⁸

2.6 Kapiler Elektroforezin Modları

2.6.1 Kapiler zon elektroforez (CZE)

Kapiler zon elektroforez (CZE), CE’nin en basit ve en yaygın kullanılan modudur. Kapiler bir çalışma tamponu ile doldurulur, enjeksiyon ucundan numune çözeltisi verilir. Elektrik alan uygulandığında numune bileşenleri kolon boyunca ilerleyerek dedektöre ulaşır. Yüklü parçacıklar, kapilerde katot yönünde göç ederken yük/büyükölük oranlarında bir değışiklik olduğunda birbirlerinden ayrılırlar. Ancak, enjekte edilen yüksüz türlerin tamamı, birbirinden ayrılmaksızın, elektroosmotik akış ile birlikte dedektöre doğru hareket eder [28, 35, 36].

Diğer tüm ayırma modları, CZE cihaz sistemini kullanarak analit türlerine göre değıştirilmiş ayırma yöntemleridir.

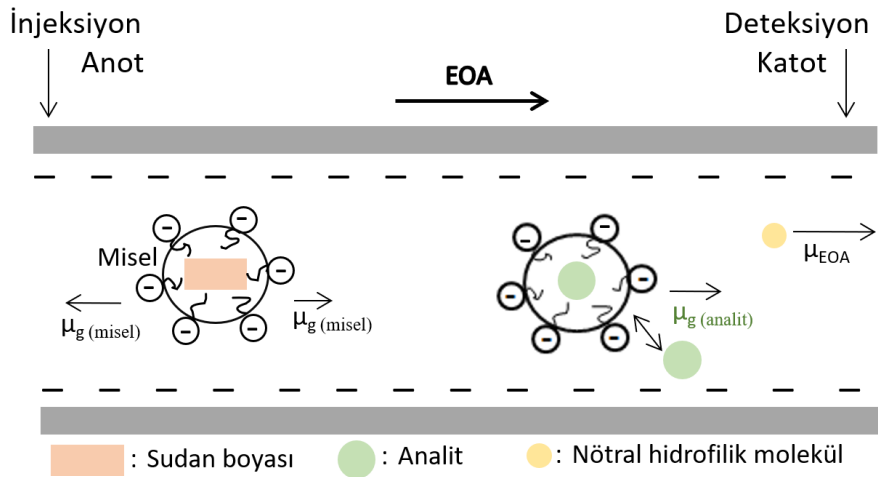
2.6.2 Misel elektrokinetik kromatografi (MEKC)

Ayırma esas olarak analitler ile bazı ayırma ortamı katkı maddeleri arasındaki etkileşime dayanıyorsa, CE'deki bu tür ayırmalar genellikle elektrokinetik kromatografi veya elektrokinetik kapiler kromatografi olarak adlandırılır. Misel elektrokinetik kromatografi (MEKC), elektrokinetik kromatografinin yaygın olarak kullanılan formudur [26].

MEKC ilk olarak Terabe ve arkadaşları tarafından tanıtılmış olup yüksüz türlerin ayrılmasında yaygın olarak kullanılan bir CE yöntemi haline gelmiştir [25]. MEKC'de, ayırma tamponuna kritik misel konsantrasyonunun (CMC) üzerinde bir yüzey aktif madde eklenir. Yüzey aktif maddeler, baş ve kuyruk olmak üzere iki kısımdan oluşur. Baş grup polar ve hidrofilik yapıdadır; alkol, eter, sülfat, amin, karboksilat, sülfonat, fosfat ve amonyum gibi fonksiyonel gruplar bağlı olabilir. Kuyruk ise apolar ve

hidrofobik yapıdadır ve uzun bir hidrokarbon zincirinden oluşur. Yüzey aktif maddeler karakteristik kritik misel konsantrasyonlarına (CMC) sahiptir. CMC değerlerinin üzerinde bir konsantrasyonda kapiler içinde misel adı verilen agregatlar oluşur ve bu agregatlar sıvı kromatografideki sabit faz gibi davranır. Ancak misellerin de elektroforetik hareketliliği olduğundan, kapiler içinde hareket ederler. Bu faz, psödo-sabit faz olarak adlandırılır [26, 27, 37].

MEKC'nin şematik ayırma şeması Şekil 2.7'de verilmiştir. Bu örnekte verilen sodyum dodesil sülfat (SDS), MEKC uygulamalarında en yaygın kullanılan anyonik bir yüzey aktif maddedir. Sulu tampon ortamında oluşan misellerin hidrofilik uçları sulu faza, hidrofobik kuyrukları ise miselin ortasına doğru yönelir. Anot tarafından enjekte edilen küçük nötr hidrofilik bir molekül, elektroosmotik akışla (t_0) dedektöre doğru sürüklenir. Pik, elektroferogramda t_0 zamanında görünür. Bu amaçla, aseton, formamid, mesitil oksit gibi nötral işaretleyiciler hem MEKC hem de CZE'de elektroosmotik akışın hareketliliğini belirlemek için kullanılır [37]. Bu örnekteki negatif yüklü miseller, elektroforetik hareketlilikleriyle anodik tarafa yönelirler. Ancak, EOA ile birlikte katot tarafına, yani dedektör yönüne doğru sürüklenirler. Çok hidrofobik bir boyar madde bu ortama enjekte edildiğinde tüm zamanını miselin hidrofobik çekirdeğinde geçirir ve bu sayede misel dedektöre ulaştığında elektroferogramda bir pik olarak görünür (t_m). Sudan III boyar maddesi, bu amaç için yaygın olarak kullanılan bir işaretleyicidir [26, 36].



Şekil 2.7 : MEKC’de analit ve misellerin kolon içindeki hareket şeması [25].

MEKC ayırmalarında, türlerin misellerin hidrofobik çekirdeği ile tampon fazı arasında dağılımı gerçekleşir. Tüm yüksüz analitler, t_0 ile t_m arasında göç ederler. Daha

hidrofilik yapıya sahip olanlar t_0 'a daha yakın bölgede, daha hidrofobik olanlar ise t_m 'ye yakın bölgede görünürler. Tüm hidrofobik analitler zamanlarının çoğunu misel fazında geçirme eğilimindeyse, bu analitlerin sulu faza ilgisini artırmak için tampona belirli bir oranda suyla uyumlu organik çözücü eklenebilir. Alkol ve asetonitril, çalışmalarda en yaygın kullanılan organik çözücülerdir. Ancak misellerin organik çözücü ortamında dağılabileceği düşünülerek MEKC'de eklenen organik çözücünün konsantrasyonu %20-30'u geçmemelidir [26, 28].

Misel içinde çözünen maddenin toplam mol sayısının çözelti fazındakilere oranı kapasite faktörü (k') ile verilir:

$$k' = \frac{(t_r - t_0)}{t_0 \left(1 - \frac{t_r}{t_m}\right)} = K \left(\frac{V_s}{V_m}\right) \quad (2.20)$$

Bu eşitlikte t_r , çözünen maddenin alıkonma zamanı; t_0 , EOA'nın alıkonma zamanı; t_m , miselin alıkonma zamanı; K , dağılım katsayısı; V_s , misel fazın hacmi; V_m ise mobil fazın yani tampon çözeltinin hacmidir [28].

MEKC'de iki türün rezolüsyonu ise şu ifadeyle verilir [28].

$$R = \left(\frac{N^{1/2}}{4}\right) \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right) \left(\frac{k'_2}{k'_2 + 1}\right) \left(\frac{1 - t_0/t_m}{1 + (t_0/t_m)k_1}\right) \quad (2.21)$$

Kapasite faktörü, yüzey aktif maddenin konsantrasyonu ile orantısal olarak artırılabilir. Fakat konsantrasyon çok fazla artılırsa kolonda üretilen akım da artar. Özellikle 25-50 μm iç çapa sahip kapiler kolonlarda yüksek elektrik alan oluşumundan kaçınılmalı ve iyi bir kapiler termostatı gerekir [28].

2.6.3 Kapiler elektrokromatografi (CEC)

CEC, CE ve sıvı kromatografinin birleştirilmesiyle oluşturulmuş hibrit bir ayırma yöntemi olup diğer CE modlarına göre daha yenidir. CEC ile yüklü ya da nötral tanecikler ayrılabilir. Normalde kolon içindeki ayırma ortamı sıvı çözeltiyken, CEC'de kapiler kolon kromatografik dolgu maddesi doldurularak bir sabit faz oluşturulur. Bunun için 50-200 μm 'lik erimiş silika kapiler kolonlar polimer veya büyük moleküller ile doldurulur. Mobil faz ise genellikle organik çözücü ve sulu tampon karışımlarıdır. Kapiler boyunca bir elektrik alanı uygulanarak EOA oluşturulur ve çözünen maddeler ile hareketli fazı yürütür. Akışı hızlandırmak için basınç takviyesi

de kullanılmaktadır. Kolondaki tutunma süresi elektroosmotik göç ve kromatografik tutunmanın bir bileşimidir [24, 26].

2.6.4 Kapiler jel elektroforez (CGE)

Kapiler jel elektroforez (CGE), çoğunlukla proteinler ve DNA'nın büyüklük farklarına göre ayrılması için kullanılan bir CE türüdür. DNA, fosfat grupları nedeniyle negatif yüklüdür, proteinler ise SDS ile muamele edilerek negatif yük kazanır. DNA ve SDS ile muamele edilmiş proteinler gibi makromoleküllerin büyüklükleri çok büyük olduğundan, bunların yük/büyüklük farklarına dayalı elektroforetik ayrımı mümkün değildir. Bu moleküller, sadece jel ortamında büyüklük farklarına göre ayrılırlar [26, 27].

CGE tekniğinde, kapiler içine monomer çözeltisi veya önceden hazırlanmış polimer çözeltisi verilerek kapilerin içinde jel ortamı oluşturulur. Oluşturulan jel içinde farklı büyüklükteki porlar ve bu heterojen porların içinde sıvı bulunur. Analit molekülleri bu porların içinden geçerek dedektöre ilerler. Küçük moleküller porlardan daha kolay sıyrılarak daha hızlı ilerlerken büyük moleküller kendi boyutlarına uygun porları aradığı için kolon içerisinde daha fazla zaman geçirir. CGE'de, türlerin hareketi 2 farklı şekilde gerçekleşebilir. Bunlardan biri elektroforetik mobilite ve elektroosmotik akışın (EOA) birleşimidir. Diğerinde ise kapiler duvarı yüksüz bir polimerle kaplanarak EOA baskılanır ve göç sadece elektroforetik mobilite ile gerçekleşir. Poliakrilamid jeller CGE'de en yaygın kullanılan jeldir ve genellikle DNA ve diğer proteinlerin ayrılmasında kullanılır. Kullanılacak jelin konsantrasyonu geniş bir skaladadır. Gerekli konsantrasyon analitin boyutuna göre belirlenir [26].

CGE'de jel yerine karmaşık polimer çözeltisi de kullanılmaktadır. Bu, jel kadar yoğun olmayan fakat yine de viskoz bir maddedir. Kapiler içine basınçla itilebilir ve yine basınçla çıkarılabilir, fakat jelin basınçla kolondan çıkarılması söz konusu değildir [28].

2.6.5 Kapiler izoelektrik odaklama (CIEF)

CIEF, çoğunlukla proteinleri ve peptitleri izoelektrik noktalarına (pI) göre ayırmak için kullanılır. İzoelektrik nokta (pI), bir aminoasidin nötr olduğu pH değeridir. Yani bu noktada molekül ne pozitif ne de negatif yüklüdür. Pozitif ve negatif yükleri içerse de net yük 0'dır. Her aminoasit kendine özgü bir pH noktasında izoelektriktir. Bu

noktada aminoasit yüksüz ve hareketsizdir. CIEF'te ayırma ortamının tampon olmasına gerek yoktur. pI değerleri farklı olan aminoasitleri ayırmak için pH değeri farklı olan bölgelerde farklı olan bir çözelti gerekir. Bu yüzden CIEF, bir pH gradiyentinde yapılan CE modudur [24, 26, 27].

Anolit ve katolit diye adlandırılan iki tip çözelti kullanılır. Kapilerin anot ucu anolite, katot ucu katolite daldırılır. Anolit asidik, katolit bazik çözelti içerir. Kapiler içinde oluşturulacak pH gradiyenti oluşturmak için düşük molekül ağırlıklı amfolit çözeltisi kullanılır. Amfolit çözeltiler hem asidik hem bazik gruplar içeren, farklı pI değerlerinde ya da civarlarında zwitteriyonik olan maddelerdir. Ek olarak kolon içinde anodik ve katodik dengeleyiciler kullanılır. Anodik dengeleyici, pI değeri amfolitlerden daha düşük olan ancak anolitin pH değerinden daha yüksek olan maddedir. Yüksek iletkenliğe sahiptir. Anot bölgesindeki pH gradiyentinde meydana gelebilecek bozulmaları önlemek için kullanılır. Katodik dengeleyicinin ise tam tersi biçimde pI değeri amfolitten yüksektir ama katolitin pH değerinden düşük pH değerine sahiptir. Kapilerde dedektörden çıkış ucuna kadar olan kısmı doldurur. Numunenin ve amofilitin dedektörden önce odaklanmasını sağlar [26].

Amfolit, stabilizerler, pI belirteçleri ve protein numunesi kapilere doldurulduktan sonra anolit ve katolite daldırılan kapilere voltaj uygulanır. pH gradiyentini amfolite voltaj uygulandıktan sonra meydana gelir. Voltaj sonucu anolitte H^+ ve katolitte OH^- iyonları oluşur ve kapilere girer. Bu şekilde anottan katoda doğru farklı pH değerlerine sahip bölgeleri bulunan bir ortam elde edilir. Amfolitler bu gradiyent doğrultusunda hareket eder, en asidik amfolitler katoda yakın olacak biçimde izoelektrik noktalarına kadar sıralanır. Numune kapilerde yürütüldüğünde her protein kendi izoelektrik noktasında yüksüzleşerek o noktada hareketsiz kalır. Bu olaya odaklanma denir. Çözünen madde odaklanma noktasında maksimum konsantrasyonda bulunur. Odaklanma tamamlandığında kolonda kararlı bir durum oluşur ve akım sıfırlanır [26].

Odaklanan bölgelerin deteksiyonu için iki farklı mobilizasyon tekniği kullanılır. Hidrokinamik mobilizasyonda voltaj uygulanmaya devam ederken kapilere basınç uygulanır. Basınç pH gradiyentini dedektöre sürükler ve deteksiyon yapılır. Kimyasal mobilizasyonda ise katolit asetik asit gibi zayıf bir asit ile değiştirilir. Bu durumda katolitten OH^- iyonları yerine CH_3COO^- iyonları alınmış olur ve kapilerdeki pH gradiyenti bozulur. Odaklanan analitler pozitif yüklenir ve EOA ile katoda doğru

ilerlemeye başlar. Eğer odaklanan analitlerin pI değeri 4'ten düşükse asetik asitten daha kuvvetli bir asit kullanılmalıdır [26, 28].

2.6.6 Kapiler izotakoforez (CITP)

CITP'de tüm analitler ayrı bantlar şeklinde ama birbirine bağlı halde ve aynı hızda hareket eder. Aynı anda hem katyonları hem anyonları ayırmak ve analiz etmek mümkündür. Bu ortamı oluşturmak için iki tampon sisteminin bir kombinasyonu kullanılır. Başlatıcı ve sonlandırıcı olmak üzere iki elektrolit bulunur. Başlatıcı elektrolit yüksek mobiliteye, sonlandırıcı elektrolit düşük mobiliteye sahip iyonları içerir. Enjeksiyon bu iki tampon çözeltinin arasına yapılır. Küçük iyonların ayrılması için uygun bir CE modudur [26, 27].

Sisteme voltaj uygulandığında analitlerin mobilitelerine uygun olan elektrolite doğru yürümesiyle ayırım gerçekleştirilir. Yani ayırım analitlerin mobilitelerindeki farklılıklara dayanır. Numune çözeltisindeki en yüksek mobiliteye sahip olan analit başlatıcı elektrolitin hemen önünde konumlanır, en düşük mobiliteye sahip analit ise sonlandırıcı elektrolitin önüne yerleşir. Mobilitelerine göre analit bantlarının oluşumu tamamlandıktan sonra tüm bantlar aynı hızda hareket eder. Bu durumun sebebi elektrik alanının her bölgede değişmesidir. Hız, mobiliteler ve alanın çarpımı olduğu için, elektrik alan yüksek mobilitelere sahip bantlarda azalarak sabit hızı korur. Ters biçimde düşük mobilitelere sahip alanlarda ise elektrik alan artar. Bu durum bantların keskin sınırlar ile ayrılmasını sağlar. Ayrılan analit zonu bir şekilde komşu banda yayılırsa hızı elektrik alan tarafından dengelenir ve hemen kendi bandına döner [26].

CITP'de UV ve potansiyel gradyan dedektörü olmak üzere iki tip dedektör kullanılır. Potansiyel gradyan dedektörü bir kondüktivite dedektörüdür. Ayrılan bantlar arasındaki potansiyel farkı ölçer [26].



3. ARI ÜRÜNLERİ

Arı ürünleri sağlıklı ve dengeli beslenme açısından değerli olup arıcılık, insan sağlığının korunması ve beslenme amaçları doğrultusunda uzun yıllardır gerçekleştirilen önemli bir ekonomik faaliyettir [38]. Arıcılık kapsamında bal, propolis, apilarnil (erkek arı larvası), arı poleni, arı ekmeği, arı zehri, balmumu, arı sütü ve ana arı larvası gibi arı ürünleri üretilmektedir. Anadolu zengin bitki örtüsüne sahip olduğu için geçmişten bugüne birçok arı ürününe ev sahipliği yapmıştır ve yapmaya devam etmektedir [18]. Üretimi hızlandıracak ve artıracak yeni metodlar geliştirmesiyle arıcılık sektörü hız kazanarak ilerlemiştir. Arı ürünleri hem geleneksel hem de modern tıpta kullanım alanı bulmuştur. Sekiz bin yıl öncesinde bile arı ürünlerinin tedavi amacıyla kullanıldığı, farklı toplum ve medeniyetlere ait parşömen, kil tabletler, papirüsler gibi kaynaklardan bilinmektedir. Arının ve arı ürünlerinin bazı hastalıkların tedavisinde ya da bu hastalıklardan korunmak için tamamlayıcı tedavi yöntemi olarak kullanılmasına apiterapi denir. Apiterapi uygulamalarının başarılı biçimde yapılabilmesi için arı ürünlerinin kimyasal ve biyolojik özellikleri iyi bilinmelidir. Yıllar içinde arı ürünleri üzerinde yapılan çalışmalar arı ürünlerinin ne kadar değerli olduğunu ortaya koymuştur ve apiterapinin önünü açmıştır. Arı ürünlerinin yüksek besin değerine sahip olması ve biyoaktif bileşenler içermesi nedeniyle terapötik etkileri vardır. Bu yüzden arı ürünlerinin piyasada doğrudan ya da birkaç arı ürününün karışımı ürünler olarak sprey, tablet, kapsül formlarında ya da saf halde satışı yapılmaktadır [22, 39].

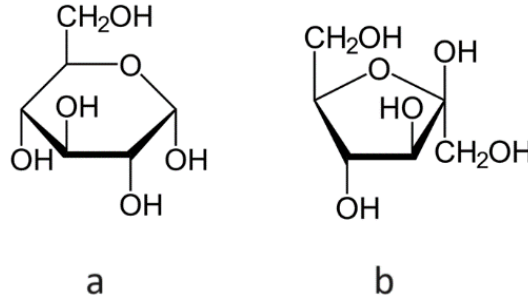
3.1 Bal

Bal, bal arılarının (*Apis mellifera*) bitki nektarlarının, bitkilerin canlı kısımlarının salgılarının ya da bitkilerin canlı kısımları üzerinde yaşayan bitki emici böceklerin salgılarının toplayıp işleyerek elde ettikleri doğal bir üründür. Bal arıları balın su içeriğini azaltarak viskoz yapılı olmasını ve balda bakteri gelişimini önleyerek ve petekte uzun süre depolanabilmesini sağlarlar [21].

Dünyada birçok ülkede bal üretimi yapılmaktadır. Balın biyokimyasal, fizyolojik ve farmakolojik etkileri iyi bilinmektedir [40]. Yüksek besin değeri ve insan sağlığına faydalı bileşenleri içerdiği için gerek gıda gerek ilaç olarak dünyada en fazla tüketilen/kullanılan arı ürünüdür [22].

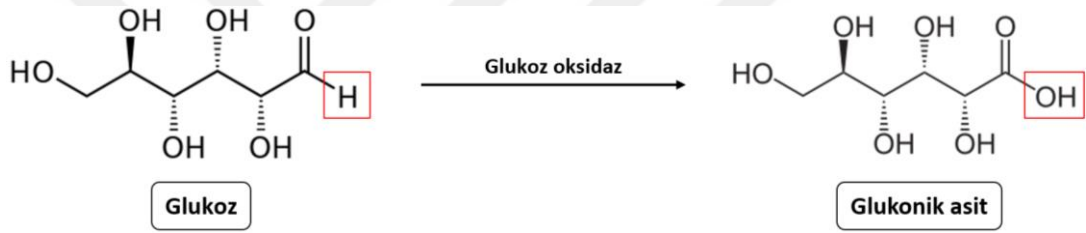
Tarihte milattan öncesi dönemlere ait yazılı kaynaklar veya resimler, balın o yıllarda dahi ilaç olarak kullanıldığını göstermektedir. Romalılar, Mısırlılar ve Çinliler ise balı genellikle bağırsak yaralarını iyileştirmek, mide ülserinin etkilerini azaltmak, öksürük, boğaz ağrısı ve kulak ağrısını tedavi etmek için harici veya dahili olarak kullanılmıştır. Günümüzde ise balın terapötik (tedavi edici) amaçla kullanımı devam etmektedir. Bal bakterilerin yanı sıra mantar, virüs ve parazitlere karşı da inhibe edici özellik göstermektedir [21, 41]. Geleneksel tıpta ise göz hastalıkları, astım, boğaz enfeksiyonları, tüberküloz, farenjit, hıçkırık, yorgunluk, baş dönmesi, hepatit, kabızlık, solucan istilası, basur, egzama, gastrit, ülser ve yaraların tedavisi, gastrointestinal bozukluklar, karaciğer ve pankreas hastalıkları, diyabet, kardiyovasküler rahatsızlıklar gibi çeşitli hastalık durumlarında kullanım alanı bulmuştur [22, 42].

Balın günümüzde bilinen 300 farklı türü vardır. Bal arıları tarafından toplanan farklı nektar türleri sebebiyle farklı türde ballar oluşur. Balın kalitesini, içerdiği glukoz, fruktoz, flavonoid, polifenoller ve organik asitler gibi aktif bileşenleri belirler. Balın kuru ağırlığının %95-97'sini oluşturmakla birlikte ana bileşeni karbonhidratlardır. Bal, %82,4 karbonhidrat, %38,5 fruktoz, %31 glukoz, %12,9 diğer şekerler, %17,1 su, %0,5 protein, organik asitler, multimineraler, amino asitler, enzimler, vitaminler, fenoller, flavonoidler, askorbik asit, karotenoidler, polifenoller, alkaloidler, glikozitleri içermektedir [22, 43]. Glukoz ve fruktoz başta olmak üzere monosakkaritler balın en önemli şekerleridir. Besin içeriği ve fizikokimyasal etkilerin çoğuna katkıda bulunurlar [22]. Örneğin akasya balı gibi daha yüksek fruktoz içeriğine sahip olan ballar, glukoz içeriği yüksek ballara göre daha tatlıdır [21]. Şekerler genellikle balın olgunlaşması sırasında oluşur. Glukoz ve fruktozun kimyasal yapısı Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1 : a) Glukozun ve b) Fruktozun kimyasal yapıları.

Glukozun glukoz oksidaz enzimi ile oksidasyona uğraması sonucu oluşan glukonik asit ise balda bulunan ana organik asittir. Glukonik asidin oluşum reaksiyonu Şekil 3.2’de verilmiştir. Organik asitler balın tat karakteristiğine katkıda bulunmanın yanı sıra balın asidik karakterini (pH 3,2 ile 4,5 arası) ve mikroorganizmalara karşı stabilitesini sağlamaktadır [21, 22].



Şekil 3.2 : Glukozun glukoz oksidaz ile parçalanma mekanizması [22].

Bal, asparajin ve glutamin hariç dokuz esansiyel amino asidi ve esansiyel olmayan tüm amino asitleri içerir. Diyastaz, invertazlar, glukoz oksidaz, katalaz ve asit fosfataz balda bulunan enzimlerdir ve bunlar balın ana protein bileşenlerini oluştururlar [22]. Glukozdan glukonik oluşumunu sağlayan glukoz oksidaz, bal arısının tükürüğünde önemli oranda bulunmaktadır. Bu reaksiyonun bir yan ürünü olan hidrojen peroksit ise balın antibakteriyel aktivitesinin sağlayan en önemli bileşiktir [21]. Baldaki vitamin seviyesi ise önerilen günlük alım miktarından çok düşüktür. Buna rağmen balda en yaygın olarak bulunan C vitaminidir, suda çözünen diğer vitaminlerin tümü (B vitaminleri) balda bulunur. Biyoaktif bileşenler açısından da bal oldukça zengin olmakla birlikte bunlardan flavonoidler ve polifenoller ana biyoaktif bileşenlerdir ve bu bileşenler fenol kaynaklıdır. Biyoaktif bileşenlerin baldaki varlığı ve miktarı çiçeğin kaynağına, iklimsel ve coğrafi koşullara bağlıdır [44]. Balın antioksidan aktivitesinden fenolik bileşikler sorumludur. Balda bulunan antioksidan bileşenler, serbest radikallerin verebileceği zararlara karşı koruyucudur [22, 45]. Ayrıca sahte balların antioksidan aktivitesi doğal ballara göre çok düşüktür [21].

Bal, antibakteriyel ve antioksidan etkilerin yanı sıra antimikrobiyal, apoptotik, antiinflamatuar, antidiyabetik ve antihipertansif etki de göstermektedir [22].

3.2 Propolis

Bitkiler yaprak, çiçek, meyve ve tomurcuklarını korumak için antimikrobiyal özelliğe sahip, su geçirmez ve ısı yalıtımına sahip reçineli bir bileşik olan propolisi üreterek organlarını korur. Aynı zamanda propolis, Yunanca'da şehrin koruması anlamındaki bir sözcüktür. Propolis, bir Avrupa bal arısı türü olan *Apis mellifera* tarafından toplanabilirken Asya bal arısı türleri tarafından toplanamaz [46].

Propolis toplama işlemi yaz aylarında saat 08.00-19.00 aralığında, bahar aylarında ise havanın güzel olduğu günlerde yapılmaktadır. İşçi bal arıları, bitkilerin farklı kısımlarından ya da ağaçların kozalak kabuklarından arka ayakları ve üst çeneleri ile propolisi toplar. Topladıkları propolisi, polen ve tükürük salgısı ile karıştırarak yapışkan bir pelet haline getirirler. Sonrasında pelet halindeki propolisi arka bacaklarındaki polen sepetçisine ön ve orta bacakları yardımıyla yerleştirerek kovana taşırlar. Kovan içindeki arılar, polen sepetçisine depolanan propolisi ısırp çekme hareketi ile küçük parçalar şeklinde koparırlar. Propolisi balmumu ile karıştırarak kullanacakları yere (kovanın duvarlarına veya larvaların yetiştiği petek gözlerine) bir tabaka şeklinde kaplarlar [46]. Bu nedenle arı tutkalı olarak da adlandırılır [22]. İşçi arı kovana tek seferde 10 mg propolis taşıyabilir. Topladığı propolisi ise kovan içinde ortalama 30 dakikada boşaltmaktadır [46].

Arılar kovanın içini propolis ile kaplayarak kovayı ve kendilerini zararlı dış etkenlere karşı korumaktadırlar [21, 46]. Bu kaplamalar sayesinde hijyenik bir habitat sağlarlar ve arı kolonisini hastalıklara ve mikrobiyal enfeksiyonlara karşı korurlar. Bunun dışında kovan içerisinde ölen canlıların koloniye enfeksiyon yaymasını önlemek için ölen canlıyı kaplamak, kovana koloni dışındaki canlıların girme ihtimalini azaltmak amacıyla kovanın giriş deliğini küçültmek, kovanda oluşan çatlakları kapatmak, kovanın iç sıcaklığını 35°C'de ve nemini %40-65 aralığında tutmak gibi amaçlarla da kullanılmaktadır [21, 22, 46]. Ayrıca nektar ve polen toplamakla görevli işçi arılar kovan dışında zararlı mikroorganizmalara maruz kalabilmektedir. Kovana enfeksiyon girme ihtimaline karşı kovan içinde görev yapan arılar, dışarıdan gelen işçi arıları kovan deliğinde propolisle fırçalamaktadır [46].

Propolisin insanlar tarafından kullanımı çok eski yıllara dayanmaktadır. Yunan ve Romalı doktorlar propolisi antiseptik, antibiyotik ve yara iyileştirici ilaç olarak kullanırken, Mısırlılar ölülerin mumyalanması işleminde kullanmıştır [46]. İlk olarak 17. yüzyılda Londra’da resmi bir ilaç olarak kaydedilmiştir. Saf ya da diğer doğal ürünlerle karıştırılarak kozmetik ve sağlık ürünlerinde kullanılan propolisin kullanımı günümüze kadar sürmüş ve halen devam etmektedir. Son yıllarda propolis üzerinde yapılan çalışmaların artmasıyla propolisin kimyasal ve terapötik etkileri daha iyi anlaşılmıştır [47].

Propolis üretimi başta Çin olmak üzere Arjantin, Uruguay, Şili, Brezilya, Kanada ve Doğu Avrupa ülkelerinde yaygın olarak yapılmaktadır. Üretimin ardından propolis soğuk, sert ve katı halde iken ezilerek cam bir kavanoza koyulur ve üzerine ılık su eklenerek karıştırılır. İçerisindeki yabancı maddeler dibe çökerek propolis temizlenmiş olur. Temizlenen propolis plastik torba içinde kuru bir ortamda biyolojik değerini kaybetmeden 1 yıldan fazla saklanabilir. Elde edilen propolis verimi kovan başına ortalama 50-250 g arasında değişmektedir [46].

Propolis fiziksel olarak karakteristik hoş bir kokuya sahiptir ve kırmızı, yeşil, kahverengi gibi farklı renklerde olabilir. Arılar tarafından işlendikten sonra oldukça yapışkan bir hal alır ve bu özelliği sayesinde ciltteki yağ ve proteinlerle etkileşime girer. 15-25°C aralığında propolis mum kıvamında elastik bir yapıya sahiptir. 30-40°C’de yumuşayıp yapışkan bir hal almakta, 80°C’de ise kısmen erimektedir [46]. 15°C’nin altında ise kırılgan ve sert bir yapıdadır [21]. Propolis eter, aseton, kloroform ve diğer organik çözücülerde kısmen çözünmekle birlikte alkolde büyük ölçüde çözünür. Suda ise ya çok az çözünür ya da hiç çözünmez [46].

Propolisin kimyasal bileşimi, toplandığı bitkiye ve bölgesel floraya göre değişiklik göstermekle birlikte [47], doğal yapısında genellikle %30 mum, %50 reçine ve bitkisel balsam, %10 esansiyel ve aromatik yağlar, %5 polen, polifenoller, flavonoidler, aminoasitler, vitaminler ve mikro besinler gibi birçok organik bileşik barındırmaktadır [22]. Arılar için çam, huş, kavak, at kestanesi, söğüt, kızılâğaç, köknar, erik, kara ağaç, meşe ve dişbudak türleri önemli propolis kaynaklarındandır [46].

Antifungal, antimikrobiyal, antioksidan, antikarsinogenik, yara iyileştirici, bağışıklık sistemini dengeleyici ve güçlendirici etkileri sayesinde propolisin oldukça geniş bir kullanım alanı vardır. Bu özellikler daha çok propolisin içeriğindeki flavonoidler ve

hidroksisinnamik asit türevleri gibi fenolik bileşenlerden ileri gelmektedir. Flavonoidler propoliste bulunan en önemli bileşik grubu olarak nitelendirilmektedir ve güçlü antioksidan aktivitenin kaynağıdır [21]. Propolisin flavonoid içeriği %6,2-18,8 aralığında değişmektedir [22].

Propolis her ne kadar toksik olmayan bir bileşik olsa da propolisin bilinçsiz kullanımı sağlık açısından zararlı olabilmektedir. Bu nedenle günlük alınması gereken propolis dozu iyi bilinmelidir [46].

3.3 Erkek Arı Larvası (Apilarnil)

Bal arısı kolonilerindeki döllenmemiş yumurtadan gelişen 3-7 günlük erkek arı larvaları toplanarak (hasat edilerek) elde edilen arı ürününe apilarnil adı verilir. Fiziksel olarak sütümsü-boza kıvamında, sarı-gri renkte, viskoz ve homojen yapıdadır ve karakteristik bir yumurta kokusuna sahiptir. Hasat işlemi, işçi arılar petek (larva) gözlerini kapamadan yapılır çünkü bu evrede apilarnil en kaliteli ve en yüksek besin değerine sahip olmaktadır. Petek gözleri kapandıktan sonra yavru arı pupa evresine geçer ve bu evrede besin kompozisyonu değişmektedir. Hasat işlemi sonrasında larva yaşamına devam etmez. Hasattan sonraki ilk yarım saat içerisinde soğuk ortamda saklanmadığında yapısındaki proteinler bozulmaya başlar ve besin değerini kaybetmeye başlar. Bu yüzden apilarnil hasat işleminden sonra saf halde oda koşullarında uzun süre depolanmaya uygun değildir. Kısa süre içinde tüketilmeli ya da uzun vadede taze olarak tüketilmek isteniyorsa dondurularak saklanmalıdır. Taze apilarnil, hasattan sonra -15°C'de 1 yıl boyunca besin değerini kaybetmeden saklanabilir. Homojenleştirme, öğütme, liyofilizasyon, filtrasyon gibi işlemlerin uygulanmasıyla apilarnilin soğukta saklanmasına gerek kalmamaktadır. Liyofilizasyon apilarnilin depolanmasında kullanılan en yaygın koruma işlemidir [21, 48].

Apilarnilin kimyasal bileşimi %65-71 su, %6,61-12 protein, %3,44-8,38 lipid, %6-10 şeker, %0,88-3,18 asidite ve %2 kül, pH değeri ise 6,49 olarak belirlenmiştir. Şeker içeriğini ise %0,11-0,60 fruktoz, %3,40-6,74 glukoz, %0,00-0,14 sükroz oluşturmaktadır. Protein ve dolayısıyla aminoasit bakımından oldukça zengin olan apilarnil tüm esansiyel aminoasitleri içermektedir [21, 48]. A, B1, B6 ve kolin vitaminlerini ve Ca, Na, P, Zn, Mn, Fe, Cu, K gibi mineralleri içermektedir. Zengin vitamin ve mineral içeriğine ek olarak bal arılarının polen topladığı bitki kaynaklarının

çeşitliliği ve zenginliği, apilarnilin kalitesini artırmaktadır. İçerdiği polifenollerin zenginliği, apilarnile yüksek antioksidan aktivite kazandırmaktadır [49].

Apilarnil erkek arı larvası olduğu için özellikle testosteron gibi erkek eşeye özgü hormonlar bakımından zengindir ve erkek eşey özelliklerini güçlendiren androjenik etkiye sahip olduğunu kanıtlayan çalışmalar mevcuttur. Vücutta kas inşasına katkıda bulunarak özellikle sporcu erkek bireylerde kas ağırlığını artırdığı için doğal bir anabolizan maddedir [50]. Vücutta oksidatif faaliyetleri uyararak kaslarda glikojen tüketimini artırdığı için apilarnil vücutta katabolik etki gösterir. Böylelikle vücuttaki enerji üretimine katkıda bulunur [21, 48].

Kas gelişimi ve enerji üretimi dışında apilarnilin hücre yenileyici, metabolizmada glukoz etkinliğini düzenleyici, kolesterolü dengeleyici, sperm hareketliliğini artırıcı, kas gelişimini artırıcı, kırışıklık oluşumunu engelleyici ve bilişsel fonksiyonları destekleyici etkisi de bilinmektedir. Bu özellikleri sayesinde apilarnil sağlığı korumak ya da terapötik olarak kullanımının yanı sıra apiterapide de talep görmektedir. Gastrointestinal hastalıklar, solunum yolu hastalıkları, diyabet, vertigo, diş ağrısı, kas yorgunluğu, yaraların iyileştirilmesi, yanıkların tedavisi, sırt ağrıları, karaciğer problemleri, göz hastalıkları, meme ve rahim kanseri, çeşitli psikolojik rahatsızlıklar ve erkek kısırlığında doğrudan ya da işlenmiş gıda olarak kullanılmaktadır [21, 48, 51].

3.4 Arı Polen

Polen, çiçekli bitkilerin erkek organlarında bulunan gametofit (üreme) birimleridir. Arılar çiçeklere yaklaştığında bu birimler arının vücuduna yapışır ve arı, çiçekten polen toplamış olur. Bu yapışmanın sebebi, negatif yükle yüklü çiçek ve pozitif yükle yüklü arı arasında oluşan zayıf elektrostatik çekimlerdir. Daha sonra arı topladığı polenleri tükürük salgıları ile ıslatarak, yapışkan bir pelet (topçuk) haline getirir. Polen peletleri genellikle 7,50-8,0 mg ağırlığındadır. Arı, ürettiği poleni arka bacaklarında bulunan polen sepetine (korbikül) doldurarak kovana getirir ve kovandaki genç işçi arılar tarafından boşaltılır. Bu polen, artık çiçek poleninden daha farklı olan, arı tarafından işlenmiş arı polenidir. Arı poleni kovandaki arıların larva ve pupa dönemlerinden sonraki gençlik evresinde dokularının, salgı bezlerinin, kaslarının ve organların gelişmesi için kullanılan bir besin maddesidir [38, 53, 54].

Arıların temel besin kaynakları polen, nektar ve sudur. Arılar için nektar başlıca karbonhidrat kaynağı iken polen protein, lipit ve vitamin kaynağıdır [55]. İçeriğindeki su, protein, aminoasit, karbonhidrat, lipit, yağ asitleri, fenolik bileşenler, enzimler, vitaminler ve mineraller ile genç arılar için önemlidir [38]. Bir işçi arı, larvadan ergin döneme kadar yaklaşık 120-145 mg polene ihtiyaç duyar [55].

Arı poleni üretimi arıların kovanların ön kısmına taktığı polen tuzakları sayesinde daha kovana girmeden arılardan toplanması ile gerçekleştirilir. Arının taşıdığı polenler ızgara şeklindeki bir tuzaktan geçmesiyle arıdan ayrılarak alt kısımda bulunan çekmeceye düşer ve arıcı tarafından toplanır. Daha sonra kurutularak ya da dondurularak saklanır [38].

Fizikokimyasal ve biyoaktif özellikleri açısından da arı poleni, çiçek poleninin toplandığı bölgedeki bitki kaynağı ve çeşitliliğine, coğrafik konuma ve iklime göre farklılık göstermektedir. Arıcının arı polenini toplama şekli, muhafaza etme metodu ve ambalajlama biçimi de arı poleninin kimyasal bileşimini değiştirebilmektedir. Biyoaktif içerikteki bu farklılıklara göre arı poleni farklı renklerde oluşabilir [21]. Renk, arı poleninin kalitesinin bir göstergesi olan fiziksel bir parametredir. Genellikle sarı, altın sarısı, sarımsı kahve, açık ya da koyu mor, siyah, turuncu, kırmızımsı kahve, açık ya da koyu yeşil, kahverengi ya da pembe tonlarında olması gerekmektedir [38].

Arı poleninin çok eski yıllardan beri gıda olarak tüketildiği, Babillerin kutsal kitabında, diğer dini kitaplarda ve Çin yapıtlarında yer almaktadır [21]. Günümüzde ise arı poleni diğer arı ürünleri veya besinler ile karıştırılarak piyasaya sürülen gıda takviyeleri olarak ya da doğrudan polen peletleri şeklinde tüketilmektedir [38].

Arı poleninin kimyasal bileşimi %21-30 su, %10-40 protein, %15-50 karbonhidrat, %1-20 lipit, %0,02-0,70 vitamin, ortalama %1,60 fenolik bileşenleri içermektedir [38, 55, 56].

Arı polenindeki nem içeriğinin yüksek olması mikroorganizmaların oluşması ve gelişmesi için uygun bir ortam oluşturacağı için, TS 10255 Polen Standardı'na göre arı poleni, su içeriği %10'un altına düşürülene kadar kurutulmalıdır [38, 56]. Polen arılar için birincil protein kaynağıdır. TS 10255 Polen Standardı'na göre arı polenindeki protein içeriği %7'nin üstünde olmalıdır [38]. Arı poleninin protein içeriği %35,40 albümin, %18,60 globulin, %21,80 prolamin ve diğer proteinler ve %5,30 enzimlerden oluşmaktadır. Karbonhidratlar arı poleninde en yüksek miktardaki bileşen

olup, karbonhidrat içeriğinin %7,20-22,40'ını fruktoz, %6,40-21,90'ını glukoz, %0,60-19,80'ini sakkaroz oluşturur. Arı polenin lipit içeriği yağ asitleri, karotenoidler ve sterollerden oluşur. TS 10255 Polen Standardı'na göre lipit içeriği arı poleninde %1,2'den fazla olmalıdır. Arı poleni suda çözünen B12 hariç B grubu ve C vitaminlerini %0,60 ve yağda çözünen A, D, E vitaminlerini %0,10 oranında içerir [38].

Arı poleni, insan vücudunda adrenalın ve nöradrenalin gibi metabolizmayı etkileyen hormonlara sahip olduğu için atletlerin kondisyonu için gerekli gıdalar arasında yer alır. İçerdiği fenolik bileşenler, arı polenine başta antioksidan özellik olmak üzere antimikrobiyal (antibakteriyel, antifungal, antiviral), antialerjenik, antikanser, antiobezite ve antiinflamatuvar özellikleri kazandırmakta, bağışıklık ve sinir sistemi üzerinde olumlu etkiler göstermektedir [21, 38, 57]. Bu biyolojik etkilerinden dolayı arı poleni göğüs kanseri, alerjik hastalıklar, cilt hastalıkları, prostat rahatsızlıkları, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve mikrobiyal enfeksiyonların tedavisinde gıda, gıda takviyesi ya da kozmetik ürünler halinde kullanılmaktadır [56].

3.5 Arı Ekmeği

Bal arılarının kovana taşıdıkları arı poleni, kovanda petek gözlerinde arı ekmeği şeklinde depolanmaktadır. Arı ekmeği, polen ve balın bir karışımıdır. Polen ve balı karıştıran ergin arı, salgılarını da bu karışıma ekler ve ardından petek gözüne yerleştirip bal ve balmumu ile sabitler [56]. Bu şekilde oluşturduğu karışımı laktik asit fermantasyonuna maruz bırakır. Bu ürün iki haftanın sonunda arı ekmeğine dönüşür. Polen fermente edilmiş hali olan arı ekmeği, kovanda uzun süre depolanabilmektedir. Kovandaki arılar için önemli bir besin kaynağıdır [21].

Arı ekmeği üretiminin yıllık 1,36 milyon kg olduğu tahmin edilmekle birlikte en önemli üreticiler Çin, Avustralya ve Arjantin'dir [58]. Arı ekmeği arı üreticileri tarafından kovandan özel hasat makineleriyle ya da cımbız ve spatulayla yapılmaktadır [59].

Arı ekmeğinin kimyasal bileşimi %20 protein, %24-35 karbonhidrat, %3 lipit, %6-9 su, %3 vitamin ve mineral içerir. Aynı zamanda içerisinde enzimler, flavonoidler ve hormonlar da bulunmaktadır [55, 59]. Çiçek poleni, arı poleni ve arı ekmeğinin kimyasal profilleri, farklı aşamalardan geçtikleri için farklıdır. Fermantasyon işlemi

ile arı ekmeği, arı polenine göre farklı bir kimyasal bileşim kazanır. İçerik olarak arı polenine göre daha düşük protein ve lipit içeriğine, daha yüksek nem, karbondhidrat ve şeker içeriğine sahiptir. Arı polenin aksine arı ekmeğinde nişasta bulunmaz ya da çok düşük miktarlardadır [59]. Arı ekmeğinin içerdiği proteinlerin sindirimi ve emilimi arı polenindekilere göre daha kolaydır.       polenin “ekzin” denen sert ve sindirilmesi zor olan koruyucu tabaka fermantasyon sırasında parçalanır [21, 55]. Arı ekmeği, arı polenine kıyasla 6 kat fazla (yaklaşık %3 oranında) laktik asit içerir [56]. Bu özelliği ile arı ekmeği k f, mantar gibi mikroorganizmaların üremesine ve toksinlere karşı daha iyi korunur [21, 56]. Arı ekmeği arı polenine göre daha asidiktir. Arı polenin arı ekmeğine dönüşümü ile pH değeri 4,7’den 3,97’ye düşer [60].

Fermantasyon sayesinde fenolik bileşik miktarı arı ekmeğinde artar. İçeriğindeki fenolik bileşenler sayesinde arı ekmeği antioksidan, antiinflamatuvar, antifungusit, antibakteriyel, antiviral, antidiyabetik ve anti-aterosklerotik etkileri sebebiyle terapötik amaçlarla kullanılabilir [59].

Arı ekmeği,  i ek ve polen türüne göre farklı tada sahip olamkla birlikte genellikle ekşidir. Bu yüzden bal ile karıştırılmak ya da vitaminlere eklenmek suretiyle piyasaya sürülür [59].

3.6 Arı Zehri (Apitoksin)

Arı zehri, arının karın boşluğunda bulunan zehir bezlerinde üretilmekte ve zehir kesesinde depolanmaktadır. Depolanan zehrin miktarı yaklaşık 0,3 mg’dır. Arıların iğneleri onların en önemli savunma ve saldırı organlarıdır. Sokma esnasında iğneleri ile zehri insan ya da hayvan vücuduna enjekte ederler. Arı iğnesi, “ovipositor” adlı yumurtlama organının yapısal olarak değişikliğe uğramış şeklidir. *Apis mellifera* bal arısı türünde, kraliçe ve işçi arılarda bulunur, erkek arıların iğnesi yoktur. İğne, zehir kesesinin bir uzantısıdır. Çıplak gözle tek parça olarak görünse de mikroskopla bakıldığında stylet adlı üst parça ve lanset adlı iki alt parçadan oluştuğu görülmektedir. İğnenin ucuna doğru gidildikçe parçalar incelirken arının vücuduna doğru gidildikçe kalınlaşır. Arının sokması sırasında kasların yardımıyla lansetler, iğnenin sokulduğu canlının derisinden içeri doğru ilerletilir. Bu sırada zehir kesesinde depolanan zehir, iğnenin içindeki zehir kanalından geçerek sokulan canlının derisinden içeri enjekte edilir. Arının pupadan çıkmasından sonra zehir bezleri aktif hale gelir. Pupadan çıktıktan 3 gün sonra zehir salgılayabilir. İlkbahar ve yaz aylarında arının zehir üretme

performansı en üst seviyededir. Arının zehir kesesindeki tüm zehri boşaltması imkansızdır. Birden fazla kez iğneleme yapsa bile zehrin tümü boşalmaz [61].

Arı zehri, zehir bezinin cerrahi yollarla çıkarılması ile yada arının zehrini boşaltana kadar sıkılmasıyla toplanır. Bir başka metod, arıya elektrik şoku uygulamaktır. Temeli 1950'lere dayanan bu metod günümüzde kovana yerleştirilen tel bir ızgara ile yapılmaktadır. Bu ızgaranın altına genellikle steril bezden oluşan geçirgen bir yüzey ve zehrin toplanacağı bölme yerleştirilir. Zehri toplamak için kovana genellikle 30 dakikada bir elektrik akımı verilir. Arı elektrik akımını bir tehlike olarak görür. Tel ızgaraya temas ettiğinde geçirgen yüzeye iğnesini batırır ve zehrini bırakır. Zehir buradan toplama bölgesine akar. Bu işlem arılara fazla zarar vermemektedir. Kovan başına kaybedilen arı sayısı yaklaşık 10 tanedir. Toplama bölgesine biriken zehir kurutulur. Başta sıvı haldeyken berrak bir görünüme sahip olan zehir kurutulduktan sonra beyaz renkli bir toz haline gelir [61, 62].

Bir arıdan yalnızca 0,5-1,0 pL zehir toplanabilir. Arı zehrinin kimyasal bileşiminin %88'ini su oluşturur. Bu miktar kurutulduğunda ise yalnızca 0,1 pg kuru zehir elde edilmektedir. Bir kovanda 10 bin arının olduğu varsayıldığında 30 dakikalık bir seans sonunda elde edilen zehir miktarı ancak 1 g kadar olacaktır. 1 g toz arı zehri, kullanılacağı zaman 1 L serum içerisinde çözdürülür. Arı zehri kurutulmayacaksa dondurularak saklanmalıdır, çünkü oda sıcaklığında taze haldeyken nemden dolayı bozulabilir [61, 62].

Arı zehri fiziksel olarak açık renkli, berrak, kokusuz, keskin ve acı tada sahip bir sıvıdır. pH değeri 5,0-5,5 arasında değişir. Kimyasal içeriği %88 su ve %12 peptit, enzim ve aminoasitlerden oluşmaktadır [20]. Arı zehrinin ana etken maddesi melittin adlı peptittir. Melittin arı zehrinin içerdiği biyoaktif maddelerin %50-55'ini oluşturur ve güçlü bir antiinflamatuvar bileşendir [61, 62].

Arı zehrinin antibakteriyel, antifungal, antiviral, antiinflamatuvar, antikanser, metabolizma düzenleyici, yara iyileştirici, sinir sistemi düzenleyici, bağışıklık destekleyici ve güçlendirici, analjezik ve kardiyovasküler sistemi düzenleyici etkileri bulunmaktadır. Hipertansiyon, epilepsi, migren, artrit, bağışıklık sistemi hastalıkları, ekrem ve romatizma ağrıları, gribal enfeksiyonlar, arterit, doku sertleşmesi, deri veremi, deri sertleşmesi, kronik yorgunluk sendromu, yara tedavisi, deri kanseri, kolesterol, sinüzit, ülser, astım, egzama gibi hastalıklarda tedavi amacıyla kullanılır.

Tedavilerde kullanılan arı zehri krem, merhem, solüsyon ya da tablet formunda kullanılabilmektedir [61].

3.7 Balmumu

Balmumu, bal arılarının (*Apis mellifera* ve *Apis cerana*) ürettiği, peteklerin yapı malzemesi olarak kullanılan mumdur. Arılar balmumunu yaşamlarının 10 ila 16. günleri arasında üretir. Balmumunun ana bileşenleri fruktoz, glukoz ve sükrozdur. Arının karnında bulunan bezler, arının bal olarak tükettiği şekeri pul haline getirir. Bu pullar gözeneklerden çıkarılır ve arıların tükürük salgılarıyla karıştırıldıktan sonra beyazlaşıp şeffaflaşır. Arılar tarafından daha sonra petek yapı malzemesi olarak kullanılır [63]. 1 kg balmumu üretebilmek için arılar 6-10 kg bal tüketir [52].

Balmumunun kalitesi için üretim yöntemi önemlidir. Balmumu üretimi arıcılar tarafından iki aşamada yapılır. İlk olarak balmumu kovandan çıkarılıp temizlenir, ardından saflaştırılır. En çok tercih edilen yöntem peteklerin eritilmesidir. Eritme işlemi suda buharla, elektrik veya güneş enerjisiyle ısıtılarak kaynatmayı içerir. Çok uzun süre çok yüksek sıcaklıklarda ısıtma işlemi balmumuna zarar vererek kalitesini düşürür ve rengini koyulaştırır. Balmumunun çelik, alüminyum, çinko veya bakırdan yapılmış kaplarda ısıtılması balmumunun koyulaşmasına neden olmaktadır. Koyulaşmayı önlemek amacıyla kullanılabilecek en uygun kap paslanmaz çeliktir. Koku oluşumunu önlemek için fermente bal içeren peteklerin eritilmesi tercih edilmez. Arı larvasında bulunan patojenik oluşumlar olan *Paenibacillus* larvaları ısıya dayanıklı sporelere sahiptir ve balmumunun normal biçimde kaynatılmasıyla öldürülemezler. 120°C’de 30 dakika boyunca basınç altında ısıtma (1400 hPa) ile tüm sporeler öldürülebilir. Eritme işleminde sert su yerine düşük mineralli suyun kullanılması ile su-mum emülsiyonlarının oluşumu önlenmektedir. Eritme işleminden sonra balmumu blokları kurutulur. Karanlık ve serin bir ortamda saklanırlar. Eritme ve temizleme işleminden sonra balmumu sarı bir renk alır. Renk ve aromanın iyi biçimde korunması için ambalaj kağıdında ya da paslanmaz çelik, cam ya da plastikten yapılmış kaplarda saklanmalıdırlar. Balmumunun renginde meydana gelen koyulaşma kimyasal yollar ile giderilebilir. En basit parlatma yöntemi okzalik asitle kaynatmaktır [52, 64].

Balmumunun kimyasal bileşimi, arının genetiği ve beslenmesi ile ilişkilidir. Farklı arı ırklarının ürettiği balmumlarının içerdiği bileşenlerin yüzdesi arasında farklılıklar

olabilmektedir. Balmumunun kimyasal bileşimi %67 ester, %14 hidrokarbon, %12 serbest asitler, %1 alkoller ve %6 diğer bileşenleri içermektedir [64].

Balmumunun kullanımı antik çağlara uzanmaktadır. MS 4. yüzyıldan itibaren Roma Katolik Kilisesi'nde yalnızca balmumundan yapılan mumun kullanılması zorunlu hale gelmiştir. Ayrıca balmumunun eski mühürlerde kullanıldığı dahi bilinmektedir. Başta mühürlerde saf balmumu olarak kullanılsa da sonrasında reçine ve renkler eklenerek kullanılmıştır. Romalıların balmumunu heykel yapmak için kullandığı da bilinmektedir. Eski Mısır'da ise balmumu firavunların mumyalanmasında, tablet yazımında, papirüs parşömenlerinin ve resimlerin korunmasında, kadınlarda kozmetik amaçlı buklelerin kalıcılığını sağlamada ve iki yüzeyi birleştirmek için yapıştırıcı olarak kullanılmıştır. Balmumunun tedavi amaçlı kullanımı da eski çağlara dayanmaktadır. Yunan-Romalı doktor Galen, balmumunu MS 2. yüzyılda soğutucu merhem olarak kullanmıştır. İbn-i Sina'nın da balmumunun iyileştirici etkisi sebebiyle tedavilerde kullanılabileceğini anlatmıştır. Eski Çin tıbbında ise balmumunun kullanımı, "The Shen Nong Book of Herbs" adlı ünlü tıp kitabında anlatılmıştır [52].

Balmumunun geçmişte terapötik amaçla kullanımının günümüzde halen devam etmesinin birçok sebebi vardır. Balmumu antibakteriyel özellik gösterir. Cilt elastikiyetini artırıp pürüzsüzleştirerek cildin güzelleşmesini sağlar. İlaçla karıştırıldığında ise ilacın vücutta daha uzun sürede salınmasını sağlar. Diş etlerini güçlendirme, kas, sinir ve eklem iltihaplarını tedavi etme amaçlarıyla da kullanılır [63].

3.8 Arı Sütü

Arı sütü, 5-15 günlük işçi bal arılarının (*Apis mellifera*) hipofaringeal (yutak) ve mandibular (alt çene) bezlerinden salgıladıkları, viskoz yapılı, jel kıvamında, akıcı, kremi ve beyaz renkli bir arı ürünüdür. Ekşi bir tada ve keskin fenolik yapıda bir kokuya sahiptir. Yoğunluğu 1,1 g/cm³ olup suda kısmen çözünabilmektedir. Memeli hayvanların ürettiği süte benzememesine rağmen, kovanda başta kraliçe arının ve kısmen işçi arıların larval dönemde beslenmesi için kullanıldığından ve görünüş itibarıyla süte benzemesinden dolayı Türkçede "süt", İngilizcede ise kraliyet jeli anlamına gelen "royal jelly" olarak isimlendirilir. İngilizcedeki bu isimlendirmenin sebebi, işçi arıların arı sütünü asıl olarak kraliçe arı için üretmesinden kaynaklanmaktadır [21].

Kraliçe arı pupadan çıktıktan 7 gün sonra, hayatı boyunca bir kez olmak üzere kovandaki erkek arılar ile çiftleşme uçuşuna çıkar. Kovana dönen kraliçe arı döllenmiş ve döllenmemiş yumurtalarını larva çukurlarına bırakır. Erkek arılar döllenmemiş yumurtadan gelişirken (n=1), kraliçe arı ve işçi arılar döllenmiş yumurtadan gelişen (n=2) dişi bireylerdir. Dişi bireyler başta aynı genetik yapıya sahiptirler. Bu yumurtalar arasından en sağlıklı olanı, kraliçe arı olarak yetiştirilmek üzere işçi arılar tarafından tespit edilir ve daha iyi gelişebilmesi için 5,5 mm'lik klasik larva yüksüklerinden daha büyük boyutlardaki “ana arı yüksüğü” adı verilen yapı oluşturulur. İşçi yavru arılar larval dönemde yalnızca 3 gün arı sütü ile beslenirken kraliçe arılar larval dönemde 15 gün boyunca ve tüm hayatları boyunca arı sütü ile beslenirler. Bu beslenme farklılığı, her ikisi de dişi bireyler olan işçi ve kraliçe arılar arasında fizyolojik ve morfolojik farklılıkları oluşturur. Arı sütünde bulunan royalaktin adlı protein, larvanın kraliçe arıya dönüşmesini sağlayan ana bileşendir [22, 39]. Kraliçe arı, arı sütü sayesinde hastalıklara karşı direnç kazanır, günde 3000'e kadar yumurta üretebilir, 5-6 yıla kadar yaşayabilir ve işçi arılardan daha büyük boyutlardadır. Fakat işçi arılar düşük bağışıklık sistemleri sebebiyle çok kolay hasta olurlar, dişi olmalarına rağmen çiftleşemez ve yumurta üretemezler ve 2-3 aya kadar yaşayabilirler [21]. Bir kovanda arı sütünün üretiminin sezon boyunca yüksek verimde yapılması için kraliçe arının iyi ve yeterli olması, koloninin büyük ve güçlü olması, işçi arılar için yeterli besin kaynağı, uygun sıcaklık (20-30°C) ve deneyimli arıcılar gerekmektedir [39].

Klasik arı sütünün üretimi, kovana yapay larvaların aşılama ile gerçekleştirilir. Larvalar yumurtadan çıktıktan 12-18 saat sonrasında aşılama kalemi kullanılarak larvalar yapay kraliçe arı yüksüklerine yerleştirilir. Koloni ise bu larvaları beslemek için arı sütü üretmeye teşvik edilir. Larvalar 68-72 saat sonra yerleştirildikleri yerden cımbızla çıkarılır ve işçi arıların ürettiği arı sütü toplanır. Arı sütünün toplanma işlemine sağımlık denir ve yılın Nisan ve Eylül ayları arasında yapılmaktadır. Larva aşılama ve arı sütü toplamayı içeren bu süreç oldukça zaman alıcıdır ve fazla emek istemektedir [39]. Fakat bu süreci kolaylaştıran başka üretim metodları da literatürde yer almaktadır [65]. Normalde beyazımsı bir renge sahip olan arı sütü, depolanma sırasında sarı renge dönme eğilimi gösterir. Uygun olmayan koşullarda depolandığında arı sütünün viskozitesinde artış, renginde koyulaşma ve tadında bozulma meydana gelir. Bu yüzden arı sütünün kalitesini korumak adına donmuş olarak saklanması önerilmektedir [39].

Arı sütünün ekonomik değeri diğer arı ürünlerinden fazladır. Bu yüzden ticari olarak üretimi dünya çapında önemlidir. Çin, yıllık yaklaşık 4000 ton arı sütü üretimi ile dünyadaki toplam arı sütü üretiminin ortalama %90'ını sağlamaktadır. Vietnam, Tayvan, Kore, Japonya, Yunanistan, İspanya, Fransa, İtalya ve Meksika'da da arı sütü üretimi gerçekleştirilmektedir [39].

Arı sütünün besin değeri oldukça yüksektir. Taze arı sütünün bileşimi %60-70 nem, %12-15 protein, %3-6 lipit, %10-16 karbonhidrat, %1,5 mineral tuzlar ve diğer bileşenleri içermektedir. Arı sütü depolanmadan direkt larva çukurlarına bırakıldığı için su miktarının düşük olmasına ihtiyaç duyulmaz, bu yüzden nem oranı yüksektir. İçeriğindeki nem oranına ve tazeliğine göre viskozitesi değişir [39]. Liyofilize arı sütü örneklerinde ise su içeriği %5'ten azdır ve %27-41 protein, %22-31 karbonhidrat ve %15-30 lipit içerirler. Arı sütü ayrıca bağışıklık sistemi düzenleyici, anti bakteriyel protein, yağ asitleri, peptitler gibi çok sayıda biyoaktif maddeler, antioksidan ve antibakteriyel bileşenler de içermektedir. Bunlardan en önemlisi 10-HDA (10-hidroksi-2 dekanoyik asit) olarak bilinen kısa zincirli hidroksi yağ asididir. A, D, E, K vitaminleri arı sütünde bolca bulunmasına rağmen C vitamini eser miktardadır. Arı sütünde ortalama 7,30 mg g⁻¹ serbest amino asit vardır. Prolin, lizin, β-alanin, fenilalanin, aspartik asit ve serin en fazla bulunan serbest aminoasitlerdir. İçeriğindeki en önemli protein ise royalaktindir [22]. Arı sütünün lipit içeriği %80-85 yağ asidi, %4-10 fenoller, %5-6 vakslar, %3-4 steroller ve %0,4-0,8 fosfolipitler olarak bilinmektedir. Arı sütünün sağlık sorunları üzerindeki terapötik etkisini yağ asitleri sağlamaktadır. Arı sütündeki yağ asidi içeriği %32 10-hidroksi-2-dekanoik asit (10-HDA), %24 glukonik asit, %22 10-hidroksidekanoik asit (10-HDAA), %5 dikarboksilik asitler ve diğer yağ asitleri olarak bilinmektedir. 10-HDA ve HDAA, arı sütünün özel bileşenleridir. Arı sütünden başka hiçbir arı ürünü 10-HDA içermez. Arı sütünün kalitesi ise 10-HDA oranı ile ilişkilidir ve 10-HDA miktarı arı sütünün toplandığı bölgeye göre değişir. Uluslararası standartlara göre arı sütündeki 10-HDA içeriği en az %1,4 olmalıdır. %1,8'den fazla 10-HDA içeren arı sütleri "yüksek kalite" olarak belirtilir. Türkiye'de ise Türk Standartları Enstitüsü (TSE) tarafından bu değerler kabul edilmiştir [21]. Tağşiş (hilelendirme) ile piyasaya sürülen arı sütleri 10-HDA içermemekte ya da belirlenen standarttan çok düşük olmaktadır. Bu yüzden 10-HDA'nın arı sütündeki kantitatif tayini, arı sütünün orijinalliğini belirlemek açısından önemlidir.

Arı sütündeki başlıca şekerler glukoz ve fruktozdur. Glukoz içeriği %4-8 aralığında iken fruktoz içeriği %3-13 aralığındadır. Ayrıca arı sütündeki şeker içeriği, işçi arıların daha fazla arı sütü üretmesi için uyarıcı etki göstermektedir. Balda olduğu gibi, arı sütündeki glukonik asidin oluşumu da glukozun glukoz oksidaz enzimi ile parçalanmasına dayanır (Şekil 3.2) ve en çok bulunan organik asittir [16, 21]. Arı sütünde organik asitlerin varlığı asiditenin yüksek olmasına (pH 3,4-4,5) neden olur [21, 39].

Arı sütündeki fenolik bileşiklerin çoğu flavonoid yapıdadır. Flavonoidler, biyoaktif yağ asitleri ve proteinler ile birlikte arı sütünün biyolojik özelliklerinin başlıca kaynağıdır. Arı sütündeki fenolik madde miktarı bal, polen ve propolis gibi diğer arı ürünleri ile karşılaştırıldığında daha düşük seviyededir [21, 39].

Arı sütünün içeriği Çizelge 3.1’de özetlenmiştir.

Çizelge 3.1 : Arı sütünün kimyasal bileşimi [21].

Bileşen	Miktar Aralığı (% , a/h)
Su	60-70
Ham protein	12-15
Toplam karbonhidrat	10-16
Fruktoz	3,0-13,0
Glukoz	4,0-8,0
Sakkaroz	< 3,0
Diğer şekerler	7,0-18,0
Toplam yağ asidi	3,0-6,0
10-HDA	1,4-1,8
Mineral	1,5

Arı sütü yüksek besin değeri ve içeriği sayesinde biyolojik olarak önemli etkilere sahiptir. Antioksidan, antitümöral, hipoglisemik, antiinflamatuvar, antibakteriyel, antiviral, bağışıklık sistemi düzenleyici, yorgunluk giderici, hipertansif, diyabet önleyici, sinir ve sindirim sistemi düzenleyici, kolajen artırıcı etkilerinden dolayı tıptaki kullanım potansiyeli yüksektir [21, 22]. Bu aktivitelerin çoğundan 10-HDA sorumludur. Cilt beyazlatıcı ve yaşlanmayı geciktirici etkileri sebebiyle kozmetik ürünlerde kullanım alanı bulmuştur. Gıda olarak kullanımının yanı sıra gıdalara katkı maddesi olarak da kullanılmaktadır [21]. Ticari olarak arı sütü saf halde ya da bal, polen, propolis gibi diğer arı ürünleriyle karıştırılarak piyasaya sürülmektedir. Arı

sütünün doğrudan tüketimi ise sıvı, toz kapsül, draje, tablet, jel ya da liyofilize (dondurulmuş kurutulmuş) formlarında olabilmektedir [39, 66].

Arı sütü üretimi yapan işletmeler aynı zamanda ana arı larvası üretimi de yapabilir. Bunun için arı sütü üretiminin yapıldığı sırada, arı sütü toplanmadan önce cımbızla çıkarılan kraliçe arı larvaları toplanarak ana arı larvası üretimi sağlanmaktadır. Apilarnil gibi ana arı larvaları da hasat sonrasında hemen soğutulmazsa bozulmakta ve besin değerinin bir kısmını kaybetmektedir. Ana arı larvası da arı sütü gibi 10-HDA içermektedir. Fakat apilarnilde 10-HDA'ya rastlanmamıştır. Ana arı larvası ve apilarnilin esansiyel aminoasitler bakımından arı sütünden zengin olduğu bilinmektedir. Karbonhidrat içeriği ise arı sütünden düşüktür [67]. Ana arı larvasının kimyasal bileşimi, Margaoan ve arkadaşları tarafından 2017'de gerçekleştirilen bir çalışmada %75,17 su, %12,03 protein, %10,30 yağ, %0,09 10-HDA, %1,25 fruktoz, %2,10 glukoz %0,08 sükroz olarak belirlenmiştir [67].

3.9 Antioksidan Aktivite

Reaktif oksijen türleri (ROS), canlı organizmalar tarafından hücresel metabolizma sonucu üretilir. Düşük ila orta konsantrasyonlarda, fizyolojik hücre süreçlerinde işlev görürler, ancak yüksek konsantrasyonlarda, lipitler, proteinler ve DNA gibi hücre bileşenlerinde olumsuz değişikliklere neden olurlar. ROS, atomik yada moleküler yapılarda çiftlenmemiş tek elektron bölümlerine verilen isimdir. Başka moleküller ile çok kolayca elektron alışverişine giren bu moleküllere serbest radikaller de denmektedir. Serbest radikaller, hücresel metabolizmanın doğal bir yan ürünü olarak üretilirler, ancak çevresel faktörler, kirlilik, radyasyon ve sigara gibi etkenlerden de kaynaklanabilirler [68].

Antioksidan maddeler, kimyasal yapılarını değiştirerek hücrelere, proteinlere ve DNA'ya zarar verebilen kararsız moleküller olan serbest radikalleri nötralize edebilirler. Böylece antioksidanlar, bir canlı sistemde bulunan bazı metabolitlerin kararsızlığı nedeniyle diğer maddelerin/makromoleküllerin geri döndürülemez hasarını geciktirir ve hatta önleyebilir. Oksidan/antioksidan dengesinin oksidanlar lehine değişmesine oksidatif stres denir [68]. Oksidatif stres kanser, nörolojik bozukluklar, ateroskleroz, hipertansiyon, iskemi/reperfüzyon, diyabet, akut solunum sıkıntısı sendromu, idiyopatik pulmoner fibrozis, kronik obstrüktif akciğer hastalığı ve astım dahil olmak üzere birçok patolojik duruma sebep olur [69].

Antioksidan tüketiminin gıda yoluyla artırılmasının önemi, gıdaların antioksidan içeriğini değerlendiren ölçüm tekniklerinin geliştirilmesine büyük ilgi çekmiştir [70]. Doğal antioksidanlar, biyolojik olarak aktif bileşikler olarak kabul edilebilir ve özellikle gıda ve tıbbi bitkilerden, meyveler, sebzeler, tahıllar, baharatlar ve geleneksel bitkilerden türetilirler. Gıdalarda bulunan fenolik fitokimyasallar gibi doğal antioksidanlar, metabolik faydalar sağlar ve çeşitli sağlık sorunlarının gelişme riskinin daha düşük olmasıyla ilişkilidir.

Antioksidan aktivite testleri farklı yaklaşımlar gerektirir [70]. Çünkü örneğin antioksidan özelliği iyi bilinen C vitamini gibi maddelerden, hayvansal veya bitkisel kaynaklardan türetilen peptidlere kadar birçok farklı madde sınıfları antioksidan aktivite gösterebilir. Antioksidan kapasitesi doğrudan ölçülemediğinden, değerlendirme yöntemleri oksidasyonun kapsamını kontrol etmek için antioksidanların etkilerini değerlendirmeye yardımcı olur. Oksidasyon reaksiyonu bir substrat, bir oksidan, bir başlatıcı, ara ürünler ve nihai ürünler içerir. Antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesi, bu öğelerin herhangi birinin ölçülmesiyle gerçekleştirilebilir. Meyveler, sebzeler, bitki ekstraktları veya ticari antioksidanlardan gelen örneklerin antioksidan özelliklerini incelemek için çeşitli yöntemler kullanılır [71]. Temel olarak, iki tür yaklaşım kullanılır:

1. Hidrojen atomu transferine (HAT) dayalı yöntemler
2. Elektron transferine (ET) dayalı yöntemler

Bununla birlikte, toplam antioksidan kapasiteyi (TAC) veren analizler, örneğin 2,20-azino-bis-3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit (ABTS) analizi, genellikle rekabetçi olmayan ET ve karma mod (ET/HAT) ölçüm yöntemlerini kullanır.

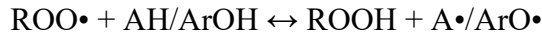
Hidrojen atomunun transferi veya antioksidanlardan serbest radikallere elektron transferinin doğrudan ölçümü için çok sayıda test mevcuttur. Bu yöntem grubunda rapor edilen antioksidan aktiviteler, genellikle belirli türdeki radikal türlerini nötralize etme kapasiteleri ile ilişkilidir. Bu yöntemlerle elde edilen hidrojen atomu transferine ilişkin veriler veya elektron transfer kapasitesine ilişkin veriler, minimum çevresel etki ile antioksidan potansiyelleri hakkında önemli bilgiler sağlar.

Antioksidan aktivitenin tek bir yöntemle test edilmemelidir. İlgili örneğin antioksidan aktivitelerini belirlemek için birkaç antioksidan prosedürün *in vitro* olarak

gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bu durum göz önüne alındığında, bir yöntemi tamamen başka bir yöntemle karşılaştırmak zordur.

3.9.1 Hidrojen atomunun transferine dayalı testler (HAT)

Hidrojen atomunun transferine dayalı testler, bir antioksidanın hidrojen atomunu serbest radikale vererek onu inhibe etme yeteneğini ölçer. Antioksidan etkinliğin HAT mekanizmaları, bir fenolün (ArOH) hidrojen atomunun (H) bir peroksil radikale transfer edildiği aşağıdaki reaksiyonda verilmiştir [71]:

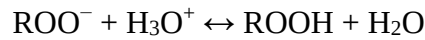
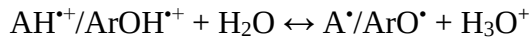
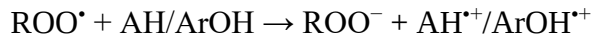


Burada fenolün (bir antioksidan olan ArOH) bir peroksil radikal (ROO•) ile reaksiyonu sonucu oluşan aryoksil radikal (ArO•) rezonans ile stabilize edilir ve AH korunan biyomoleküllerdir.

HAT tabanlı testlerin tipik örnekleri, oksijen radikal absorbans kapasitesi (ORAC), toplam peroksil radikali yakalayıcı antioksidan parametresi (TRAP) ve toplam oksiradikal giderme kapasitesi (TOSC) analizleridir.

3.9.2 Elektron transferine dayalı testler (ET)

Bu testler, bir antioksidanın metal iyonlarını, karbonil gruplarını ve serbest radikalleri azaltmak için bir elektron transfer yeteneğini tespit eder. Antioksidanın ET mekanizmaları, aşağıdaki reaksiyonlarla özetlenebilir [71].



ET yöntemlerindeki göreceli reaktivite, öncelikle reaktif fonksiyonel grubun deprotonasyon ve iyonizasyon potansiyeline dayanmaktadır. Bu nedenle, ET reaksiyonları ortamın pH değerine bağlıdır. Aryoksil radikali (ArO•), ona karşılık gelen kinona (Ar = O) oksitlenir. Aryoksil radikali ne kadar stabil ise, ArOH'dan Ar = O'ya oksidasyon o kadar kolay olur çünkü redoks potansiyeli azalır. Bu testlerde antioksidan etki genellikle peroksil radikalleri yerine uygun bir floresan veya renkli bir numune ile simüle edilir.

Spektroskopik ET testleri, Folin-Ciocalteu (FC) testi, demir iyonu indirgeyici antioksidan güç (FRAP) ve bakır(II) iyonu indirgeme esaslı antioksidan kapasite dahil

olmak üzere, bir antioksidanın bir oksidantı indirgeme kapasitesini ölçer. İndirgenince renk değişir. Renk değişimi derecesi, toplam antioksidan kapasitesinin konsantrasyonu ile ilişkilidir. Ayrıca, elektrokimyasal ve nanoteknolojik yöntemler de ET temelli testler kategorisine dahildir [71].

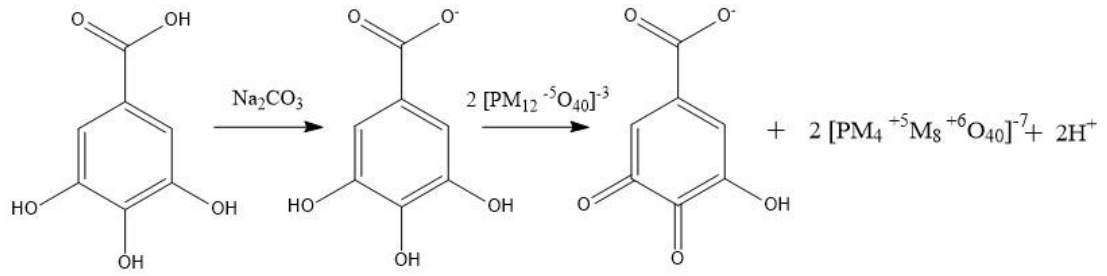
Bu tez kapsamında arı sütü örneklerinin antioksidan aktivitesini belirlemede Folin-Ciocalteu (FC) testi ve FRAP testi kullanıldığı için bu bölümde sadece ilgili testler detaylı olarak açıklanacaktır.

3.9.2.1 Folin-Ciocalteu (FC) testi

Folin–Ciocalteu testi, toplam fenolik içeriği (TPC) belirlemeye yönelik bir yöntemdir. Bu test, bitkisel gıda ve biyolojik örneklerdeki toplam polifenolik içeriği ölçmek için klinik ve beslenme çalışmalarında geniş ölçüde kullanılmıştır. Aslen proteinleri analiz etmek için geliştirilmiş olmasına rağmen Singleton, Orthofer ve Lamuela-Raventos (1999) tarafından şarapta fenolik bileşiklerin analizi için adapte edilmiş ve bu sayede gıda ve bitki ekstraktlarının antioksidan değerlendirmesinde rutin bir test haline gelmiştir [72].

Günümüzde, Folin–Ciocalteu testi birkaç önemli kuruluş tarafından bitki kaynaklı ekstraktlardaki, gıdalarda ve içeceklerdeki polifenollerin nicel analizinde geniş ölçüde kullanılmaktadır. Farmakope de Folin–Ciocalteu testini içermekte olup Avrupa ülkeleri şaraptaki toplam fenol içeriğini ölçmek için resmi bir prosedür olarak benimsemiştir.

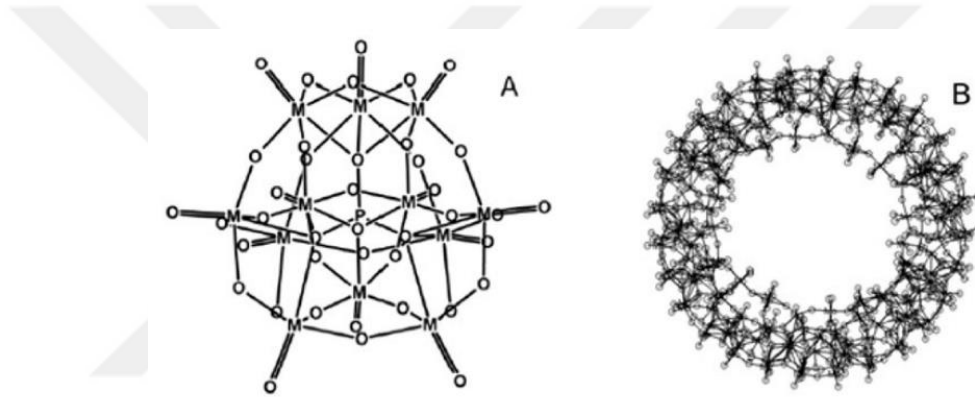
Folin–Ciocalteu testinin temeli fenolik bileşiklerle alkali ortamda Folin–Ciocalteu reaktifinin indirgenmesine dayanır. Folin–Ciocalteu reaktifinin tam kimyasal yapısı net olarak tanımlanmamış olmasına rağmen, bu reaktifin fosfomolibdat/fosfotungstat asit kompleksi içerebileceği düşünülmektedir. Merkezindeki Mo(VI)’dan dolayı sarı renge sahiptir. Bu kompleks, fenolik antioksidan tarafından verilen bir elektron ile Mo^{6+} iyonundan Mo^{5+} iyonuna indirgenerek mavi renkli bir kromofor oluşturur. Bu kromoforun maksimum dalgaboyu 760 nm’dir [73].



M = Mo veya W

Şekil 3.3 : Fenolik bileşikler ile fosfotungstik ve fosfomolibdik asit türevlerinin alkali ortamda reaksiyonu [73].

Fosfotungstik ve fosfomolibdik asitlerin anyonik türevleri α -Keggin yapısına sahiptir ve mavi kompleks büyük bir tekerlek yapısında Mo154 küme bileşiğidir [74].



Şekil 3.4 : (A) Molibden (Mo) veya tungsten (W) için M'nin durduğu anyonik türev $[\text{PM}_{12}\text{O}_{40}]^{3-}$ 'ün α -Keggin yapısı; (B) Mavi kompleksin büyük tekerlek yapısı $[\text{Mo}_{126}^{6+}\text{Mo}_{285}^{+}\text{O}_{462}\text{H}_{14}(\text{H}_2\text{O})_{70}]^{14-}$ [74].

Gallik asit bu testte yaygın olarak kullanılan bir referans standarttır ve TPC (Toplam Fenolik Bileşen) sonuçları genellikle Gallik asit eşdeğeri olarak ifade edilir.

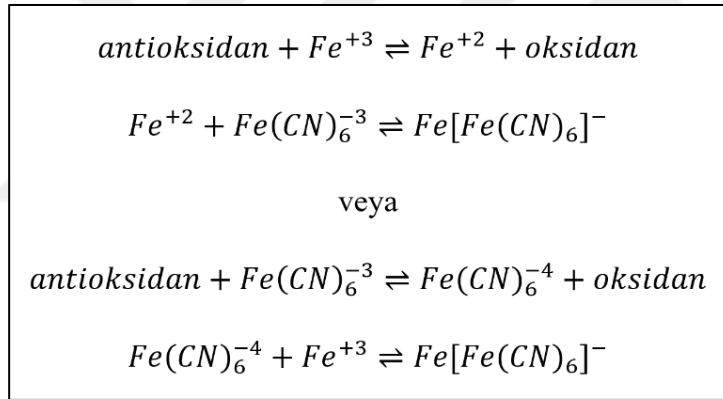
3.9.2.2 Demir (III) iyonu indirgeme antioksidan kapasite (FRAP) testi

FRAP testi, asidik ortamda (pH = 3,6) antioksidanlar tarafından demir (Fe^{3+})-ligand kompleksinin şiddetli mavi-mor ferrik komplekse (Fe^{2+}) indirgenmesini ölçen tipik bir ET tabanlı bir yöntemdir. Antioksidan aktivite, kompleksin maksimum dalga boyu olan 593 nm'de absorbans artışı olarak belirlenir ve sonuçlar Fe^{2+} mikromolar eşdeğerleri olarak veya bir standart antioksidanla ilişkilendirilerek ifade edilir. Diğer ET tabanlı yöntemlerin aksine, FRAP testi demirin çökmemesi adına düşük pH koşullarında gerçekleştirilir. Düşük pH'da reaksiyon, elektron transferini yönlendiren

iyonlaşma potansiyelini azaltıp redoks potansiyelini artırarak baskın reaksiyon mekanizmasında bir değişikliğe neden olur.

FRAP testinin orijinalinde demir iyonuna bağlanmak için tripiridiltriazin (TPTZ) kullanılırken, alternatif ligandlar olarak demir iyonunu bağlamak için ferrozin gibi ligandlar da kullanılmıştır.

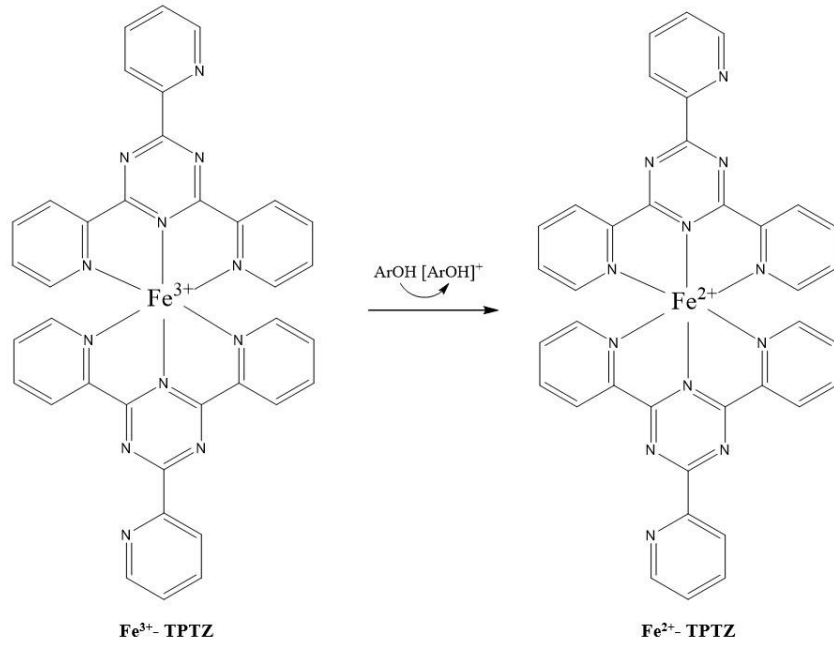
Son zamanlarda, potasyum ferrisiyanür FRAP testlerinde en yaygın olarak kullanılan ferrik reaktifi olmuştur. Bu durumda, Prusya mavisi spektrofotometrik olarak ölçülebilen ve test edilen antioksidanların indirgeme gücünü gösteren son ürün olarak elde edilir. Prusya mavisi oluşumu iki farklı şekilde gerçekleşebilir: Antioksidanlar çözeltideki Fe^{3+} iyonunu Fe^{2+} iyonuna indirgeyebilir, bu da ferrisiyanür ile bağlanarak Prusya mavisi oluşturur veya ferrisiyanürü ferrosiyanüre indirgeyebilir, bu da çözeltideki serbest Fe^{3+} iyonuna bağlar ve Prusya mavisi oluşturur [71]. Şekil 3.5, her iki reaksiyonun da basitleştirilmiş şemasını göstermektedir:



Şekil 3.5 : FRAP'a ait reaksiyon mekanizması [71].

FRAP testi gıdalardaki antioksidan içeriğinin tahmin edilmesi ve antioksidanların sağladığı katkının yanı sıra depolama, büyüme, kuraklık, güneş radyasyonu, işleme, genetik modifikasyon ve besin takviyeleri etkilerinin araştırılması, gıdalardaki antioksidan içeriğinin karşılaştırılması, kalite kontrolü ve geliştirme amaçlı baharatlar, çaylar ve şaraplarda ürün farklılaşması için yaygın bir şekilde kullanılır.

Tepkimede yer alan komplekslerin kimyasal yapısı ise Şekil 3.6'da görüldüğü gibidir:



Şekil 3.6 : Fe^{3+} -TPTZ ve Fe^{2+} -TPTZ komplekslerinin kimyasal yapıları [71].



4. MALZEME VE YÖNTEM

4.1 Kullanılan Kimyasallar

Arı sütü örneklerinin;

- Şeker analizinde kullanılan glukoz ve fruktoz Sigma-Aldrich'ten (Steinheim, Almanya), glisilglisin (Gly-Gly) Fluka'dan (Buchs, İsviçre), sodyum hidroksit (NaOH) Merck'ten (Darmstadt, Almanya) temin edildi.
- Organik asit analizinde kullanılan 2-Morfolin etansülfanik asit (MES) ve Tris(hidroksimetil) aminometan (Tris) Fluka (Buchs, İsviçre)'dan, setil trimetilamonyum bromür (CTAB) ve NaOH Merck'ten (Darmstadt, Almanya), glukonik asit, malik asit, süksinik asit ve tartarik asit Supelco firmasından (Bellefonte, Pensilvanya, ABD) temin edildi.
- Total fenolik bileşen tayininde kullanılan Folin-Ciocalteu reaktifi ve gallik asit Sigma-Aldrich'den (Steinheim, Almanya), sodyum karbonat (Na_2CO_3) ise Merck'ten (Darmstadt, Almanya) temin edildi.
- Demir (III) iyonu indirgeme antioksidan kapasite (FRAP) tayininde kullanılan sodyum asetat ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$), asetik asit (CH_3COOH), demir(III) klorür hekzahidrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), demir (II) sülfat heptahidrat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ve hidroklorik asit (HCl) Merck (Darmstadt, Almanya), 2,4,6 tripridil-s-triazin (TPTZ) ise Sigma-Aldrich (Steinheim, Almanya) firmasından temin edildi.

4.2 Kullanılan cihazlar

Tez kapsamında; kimyasal maddelerin tartılması için Mettler Toledo marka MS204S NewClassics model analitik terazi (Columbus, Ohio, ABD), çözeltilerin hazırlanmasında Elga marka Purelab Option-7/15 model ultrasaf su cihazı (Buckingham, Birleşik Krallık), kimyasal maddelerin kolaylıkla çözünebilmesi için Bandelin Sonorex marka ultrasonik banyo (Berlin, Almanya), tampon çözeltilerin hazırlanmasında ve diğer çözeltilerin pH değerinin belirlenmesinde Thermo Scientific

marka Orion Dual Star model pH-metre (Waltham, Massachusetts, ABD), örneklerin analize hazırlanmasında Heidolph MR Hei-Standart (Schwbach, Almanya) marka manyetik karıştırıcılı ısıtıcı, Velp Scientifica marka Tx4 model vorteks karıştırıcı (Usmate Velate, İtalya), FRAP testinde reaktif sıcaklığını ayarlama Nüve marka S432 model su banyosu (Ankara, Türkiye) ve UV absorbans ölçümlerinde Shimadzu marka UV-1800 model spektrofotometre (Kyoto, Japonya) kullanılmıştır.

Arı sütündeki şekerlerin CE ile ayrımı Agilent marka 1600 model kapiler elektroforez sistemi (Waldbronn, Almanya) ile gerçekleştirildi. Ayrılan pikler CE sistemine bağlı UV-DAD detektör ile indirekt yolla dedekte edildi. Veri eldesi ve değerlendirmesi Agilent ChemStation programında yapıldı. Ayrımlar 50 µm iç çapa, 65 cm toplam uzunluğa ve 57 cm etkin uzunluğa sahip bir eritilmiş silika kapiler kolonda (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, Amerika) gerçekleştirildi. Yeni silika kapiler ilk kullanımda 1 mol L⁻¹ NaOH ile 30 dk, deiyonize su ile 10 dk süreyle muamele edildi. Her çalışma gününün başında kapiler kolon 0,1 mol L⁻¹ NaOH ile 15 dk, deiyonize su ile 10 dk ve çalışma tamponu ile 10 dk süreyle yıkandı. Her iki enjeksiyon arasında 2 dk deiyonize su ve 2 dk çalışma tamponu ile yıkama yapıldı. Arı sütü örnekleri hidrodinamik enjeksiyon ile 50 mbar basınç ile 6 saniye süre ile anodik uçtan injekte edildi. Ayrımlar 25 kV voltajda ve 25°C sıcaklıkta gerçekleştirildi. Pikler 200 nm dalga boyunda dedekte edildi ve negatif pikler 350 nm referans dalgaboyu ile pozitif çevrildi.

Örneklerdeki organik asitlerin ayırım ve analizi için kapiler elektroforez-temassız iletkenlik dedektörü kullanıldı. Prince Technologies (Emmen, Hollanda) marka CE ve Trace Dec marka bir dedektör kullanıldı. Veri analizi Dax 8.0 Data Acquisition and Analysis programı (Hollanda) ile gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan silika kapiler kolonun (Polymicro Technologies, Phoenix, ABD) toplam uzunluğu 60 cm olup iç çapı 50 µm idi. Kapiler kolon ilk kullanımdan önce 30 dk boyunca 1 mol L⁻¹ NaOH ile şartlandı ve ardından 10 dk deiyonize su ile yıkandı. Her çalışma gününün başında 15 dk boyunca 0,1 mol L⁻¹ NaOH, 10 dk boyunca deiyonize su ve ardından 10 dk boyunca çalışma tamponu ile yıkandı. Enjeksiyonlar arasındaki ara yıkamalar sırasıyla 2 dk deiyonize su ve 2 dk çalışma tamponu ile yapıldı. Her 10 enjeksiyonda bir sırasıyla 5 dk 0,1 mol L⁻¹ NaOH, 2 dk deiyonize su ve 2 dk çalışma tamponu ile kolon temizlenip yeniden şartlandırıldı. Arı sütü örnekleri hidrodinamik enjeksiyon ile 60 mbar basınç ile 6 saniye süre ile katodik uçtan injekte edildi. Ayırma voltajı

olarak -28 kV seçildi ve sıcaklık 20°C’de sabit tutuldu. Temassız iletkenlik dedektörünün uyguladığı çalışma voltajı -6 Db ve sinyal dönüştürücü %200 gain olacak şekilde ayarlandı.

4.3 Arı Sütü Örnekleri

4.3.1 Arı sütü örneklerinin temini

Arı sütü örnekleri Türkiye’de üretim yapan tecrübeli arıcılardan temin edildi. Kırklareli, Çanakkale, Bilecik, Amasya, Ordu, Kastamonu, Gaziantep, Konya, Karaman, Çankırı, Iğdır, Elazığ ve Bingöl olmak üzere toplam 13 şehirden 15 adet arı sütü numunesi temin edildi. Arıcılardan toplanan örnekler liyofilize edildi ve analiz yapılmaya kadar -18°C’ de bekletildi.

4.3.2 Arı sütü örneklerinin analize hazırlanması

Arı sütü örnekleri oda sıcaklığına gelene kadar bekletildi. Ardından her örnekten ayrı ayrı 0,25 g olacak şekilde tartıldı. Ekstraksiyon işlemi için 10 mL yaklaşık 80°C’ye ısıtılmış deiyonize su behere eklendi ve manyetik karıştırıcı ile oda sıcaklığında 1 saat boyunca karıştırıldı. Süre sonunda örnekler farklı tüplere aktarıldı ve 3 dk boyunca 3000 rpm’de vortekslendi. Daha sonra 0,45 µm’lik mikrofilteler kullanılarak filtrelendi. Bu şekilde hazırlanan arı sütü örnekleri hem kapiler elektroforez çalışmalarında hem de antioksidan aktivite tayinlerinde kullanıldı. Örnekler bütün analizlerde seyreltme olmaksızın doğrudan kullanıldı.

4.4 Arı Sütü Örneklerinin Kapiler Elektroforetik Analizleri

4.4.1 Arı sütü örneklerinin şeker analizi

4.4.1.1 Glukoz ve fruktoz standart çözeltilerinin hazırlanması

Glukoz ve fruktoz stok standart çözeltileri, derişimleri 20 mmol L⁻¹ olacak şekilde deiyonize suda hazırlandı. Bunun için 36 mg glukoz standardı 10 mL’lik balonjojeye tartıldı. Deiyonize su ile ultrasonik banyoda 5 dk tutularak çözünmesi sağlandı ve deiyonize su ile hacmine tamamlandı. Fruktoz standardı da aynı şekilde 36 mg olacak şekilde 10 mL’lik balonjojeye tartıldı ve glukoz standardı ile aynı şekilde hazırlandı. Hazırlanan stok çözeltiler analize kadar buzdolabında saklandı.

4.4.1.2 Ayırma tamponunun hazırlanması

Glukoz ve fruktozun CE analizinde ayırma tamponu olarak Gly-Gly kullanıldı. Stok Gly-Gly çözeltisi derişimi $1 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ olacak şekilde deiyonize suda hazırlandı. Bunun için 0,661 g Gly-Gly standardı 50 mL'lik balonjojeye tartıldı. Deiyonize su ile ultrasonik banyoda 5 dk tutularak çözünmesi sağlandı ve deiyonize su ile hacmine tamamlandı. Hazırlanan bu stok çözeltiden 5 mL alınarak, 10 mL'lik balonjojeye aktarıldı. Daha sonra pH değeri $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH çözeltisi kullanılarak 12,52'ye ayarlandı. Deiyonize su ile hacmine tamamlanarak 50 mmol L^{-1} derişimde Gly-Gly tamponu elde edildi. Hazırlanan bu tampon çözelti günlük olarak taze hazırlandı.

4.4.1.3 Yöntem geçerlilik (validasyon) testleri

Geçerlilik testi (validasyon), kalitatif ve/veya kantitatif analizlerde seçilen yöntemin yöntemlerin uygulanabilirliğini göstermek için yapılan testlerin tümüdür. Gıda ürünlerinde etkin madde miktarlarının tayini için kullanılan yöntemlerin validasyonu yapılmış olmalıdır. Arı sütü örneklerinin fruktoz ve glukoz tayini için seçilen analitik yöntemin validasyon parametreleri doğrusallık, gözlenebilme sınırı (LOD), miktar tayin alt sınırı (LOQ), kesinlik ve doğruluktur.

a) Doğrusallık: Stok çözeltilerin seyreltilmesi ile hazırlanan 20 mmol L^{-1} konsantrasyondaki glukoz çözeltisinden 5, 10, 15, 20, 25 mmol L^{-1} konsantrasyonlarda ve 20 mmol L^{-1} konsantrasyondaki fruktoz çözeltisinden 5, 10, 15, 20, 25 mmol L^{-1} konsantrasyonlarında 10 mL'lik balon jojelerde hazırlandı. Kapiler elektroforeze enjeksiyon yapılarak pik alanları hesaplandı. Pik alanlarının, piklerin göç zamanına bölünmesiyle düzeltilmiş pik alanları hesaplandı. Konsantrasyona karşı düzeltilmiş pik alanları grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri çizildi. Kalibrasyon eğrisinin regresyon analizi yapılarak standart eğrinin doğru denklemi ve regresyon katsayısı hesaplandı.

b) LOD ve LOQ: Bir örnekte incelenen maddenin gözlemlenebilen en düşük miktarıdır. Bu derişim kantitatif tayin için tam olarak kesinlik ifade eden bir değer olmayıp sadece bir sınır değeridir. Uygulanan analitik yöntemin LOQ değeri ise numune içindeki analitin uygun doğruluk ve kesinlik ile tayin edilebildiği en düşük derişimdir. Glukoz ve fruktozun LOD ve LOQ değerleri, Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu (ICH)'nin belirlemiş olduğu standartlara göre hesaplanmıştır [75].

c) Doğruluk: Bir analitik yöntemde elde edilen sonuçların gerçek değere veya gerçek olarak kabul edilen değere yakınlığı doğruluğun bir ifadesidir. Glukoz ve fruktoz tayini

için uygulanan CE yönteminin doğruluğu geri kazanım testleri ile belirlendi. Yöntemin geri kazanımını belirlemek için seçilen bir arı sütü örneğine standart glukoz ve fruktoz ilavesi yapıldı. Örnek ekstraktında bulunan glukoz ve fruktoz derişiminin yarısı kadar (%50), kendisi kadar (%100) ve iki katı kadar (%200) olacak şekilde üç farklı derişimde standart glukoz ve fruktoz eklendi. Geri kazanım analiz sonucunda bulunan değerin gerçekte bulunması gereken değere oranı olarak ifade edilir. Bu çalışmada geri kazanım, % cinsinden, aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:

$$\text{Geri Kazanım}(\%) = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad (4.1)$$

Bu eşitlikte C_1 , standart ilave edilen numunede belirlenen analit derişimini; C_2 , standart ilavesi yapılmamış numunenin içerisindeki analit derişimini; C_3 , örneğe ilave edilen standartın derişimini ifade eder.

d) Kesinlik: Uygulanan analitik yöntem için belirlenmiş koşullar altında aynı örnekten birçok bir seri ölçüm alınır. Kesinlik, bu ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığı olarak ifade edilir. Arı sütü örneklerindeki glukoz ve fruktoz tayini için uygulanan CE yönteminin kesinliği gün içi ve günler arası zaman ve düzeltilmiş alan tekrarlanabilirlikleri ile hesaplandı. Gün içi tekrarlanabilirlik, glukoz ve fruktoz standartlarının aynı gün içinde 7 kez art arda enjeksiyonu şeklinde yapıldı. Günlerarası tekrarlanabilirlik ise her iki standartın üç farklı gün boyunca 7'şer defa enjeksiyonu (3 gün $\times$ 7 enjeksiyon) ile belirlendi. Glukoz ve fruktozun düzeltilmiş pik alanlarının (A/t) ve göç zamanlarının (t) % bağıl standart sapma (% BSS) değerleri hesaplandı. Bu çalışmayla elde edilen değerler aynı zamanda yöntemin uygulanabilirliğinin de bir ölçüsüdür.

4.4.2 Arı sütü örneklerinin organik asit analizi

4.4.2.1 Organik asit standartlarının hazırlanması

Glukonik asit, malik asit, süksinik asit ve tartarik asit standart çözeltileri, derişimleri sırasıyla $2,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, $3,7 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, $4,2 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ ve $3,3 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ olacak şekilde deiyonize suda hazırlandı. Bunun için glukonik asit, malik asit, süksinik asit ve tartarik asit standartları ayrı ayrı 25 mg olacak şekilde tartılarak 10 mL'lik 4 farklı balonjojeye tartıldı. Deiyonize su ile ultrasonik banyoda 5 dk tutularak çözünmesi sağlandı ve deiyonize su ile hacmine tamamlandı. Hazırlanan stok çözeltiler analize kadar buzdolabında saklandı.

4.4.2.2 Ayırma tamponunun hazırlanması

Organik asitlerin CE-C⁴D sistemi ile analizinde ayırma ortamı olarak MES tamponu kullanıldı. Tampona katkı maddesi olarak CTAB yüzey aktif maddesi ilave edildi. MES stok çözeltisi 2×10^{-1} mol L⁻¹ olacak şekilde 4,265 g MES tartılıp deiyonize suda çözüldü. Deiyonize su ile 100 mL hacme tamamlandı. CTAB stok çözeltisi 10 mmol L⁻¹ derişimde olacak şekilde deiyonize suda hazırlandı. Bunun için 91 mg CTAB standartı 25 mL'lik balonjojeye tartıldı. Deiyonize su ile ultrasonik banyoda 5 dk tutularak çözünmesi sağlandı. Deiyonize su ile hacmine tamamlandı. Stok çözeltiler analize kadar buzdolabında saklandı. Ayırma tamponun hazırlanması için stok MES çözeltisinden 5 mL ve stok CTAB çözeltisinden 1 mL alınarak karıştırıldı. Bu çözelti karışımının pH değeri tris ile 6,00'a ayarlandı. Hacmi deiyonize su ile 50 mL hacme tamamlanarak 20 mmol L⁻¹ MES – 0,2 mmol L⁻¹ CTAB tamponu elde edildi. Hazırlanan bu tampon çözelti günlük olarak taze hazırlandı.

4.4.2.3 Yöntem geçerlilik (validasyon) testleri

Kalitatif ve kantitatif tayinlerde seçilen analitik yöntemin uygulanabilirliğini göstermek amacıyla validasyon testleri gereklidir. Arı sütü örneklerindeki glukonik asit miktarının tayini için validasyon parametreleri belirleme sınırı (LOD), tayin sınırı (LOQ), kesinlik ve doğruluktur.

a) LOD ve LOQ: Glukonik asit için seçilen CE metodunda LOD ve LOQ, tayin limitini ifade eden iki farklı parametredir. LOD değeri, pik yüksekliğinin gürültü yüksekliğine oranın 3 olduğu derişim olarak ifade edilir. Glukonik asit için LOD değeri iki farklı baseline alanından alınan ortalama gürültünün üç katı olarak hesaplandı. LOQ değeri ise, pik yüksekliğinin gürültü yüksekliğine oranın 10 olduğu derişim olarak belirlenir. Glukonik asit için LOQ değeri iki farklı baseline alanından alınan ortalama gürültünün on katı olarak hesaplanmıştır.

b) Doğruluk: Glukonik asit tayini için uygulanan CE yönteminin doğruluğu geri kazanım testleri ile belirlendi. Bu çalışmada geri kazanım testinin uygulanması ve sonuçların hesaplanması, şekerlerin analizindeki doğruluk çalışması ile aynı şekilde Bölüm 4.4.1.3'te anlatıldığı gibi gerçekleştirildi.

c) Kesinlik: Arı sütü örneklerindeki glukonik asit tayini için uygulanan CE yönteminin kesinliği gün içi ve günler arası zaman ve düzeltilmiş alan tekrarlanabilirlikleri ile hesaplandı. Deneysel çalışma ve hesaplamalar şekerlerin

analizindeki kesinlik çalışması ile aynı şekilde Bölüm 4.4.1.3'te anlatıldığı gibi gerçekleştirildi.

4.5 Antioksidan Aktivite Testleri

4.5.1 Total fenolik bileşen analizi

4.5.1.1 Standart çözeltilerin hazırlanması

- **Gallik asit stok ve çalışma çözeltilerinin hazırlanması:** 50 mg gallik asit 10 mL deiyonize suda çözülerek 5 mg mL⁻¹ derişimde stok gallik asit çözeltisi hazırlandı. Stok gallik asit çözeltisinden 1 mL alınarak deiyonize su ile 25 mL'lik bir balonjojede seyreltildi ve 0,2 mg mL⁻¹'lik bir ara stok hazırlandı. Daha sonra 0,01 mg mL⁻¹, 0,025 mg mL⁻¹, 0,050 mg mL⁻¹, 0,075 mg mL⁻¹, 0,1 mg mL⁻¹ ve 0,125 mg mL⁻¹ derişimde gallik asit çalışma çözeltilerinin hazırlanması için 5 mL'lik balon jöleri kullanarak uygun seyreltmeler yapıldı.
- **1:10 (h/h) Folin-Ciocalteu reaktifinin hazırlanması:** 5 mL Folin-Ciocalteu reaktifi 45 mL deiyonize su ile seyreltilerek 50 mL'lik balon jöjede hazırlandı. Reaktif günlük olarak taze hazırlandı ve analize kadar karanlık bir ortamda tutuldu.
- **%7,5 (a/h) Na₂CO₃ çözeltisinin hazırlanması:** 7,5 g Na₂CO₃ deiyonize su ile çözüldükten sonra 100 mL'lik hacme deiyonize su ile tamamlandı.

4.5.1.2 Gallik asite ait kalibrasyon eğrisinin çizilmesi

6 ayrı vial içerisine, hazırlanan gallik asit standartlarından 0,3 mL eklendi. Kör (blank) çözelti için ayrılan vial 0,3 mL deiyonize su koyuldu. Viallere sırasıyla 1,5 mL 1:10 (h/h) Folin-Ciocalteu reaktifi ve 1,2 mL %7,5'luk (a/h) Na₂CO₃ çözeltisi eklendi ve karıştırıldı. Vialler karanlıkta 30 dk bekletildi. 30 dk sonunda UV-VIS spektrofotometre 760 nm dalga boyuna ayarlandı. Kör çözelti ile sıfırlanarak standartların absorbansı belirlendi.

4.5.1.3 Arı sütü örneklerinin total fenolik bileşen analizi

Vialler adlandırılarak içerisine hazırlanan örnek çözeltilerinden 0,3 mL eklendi. Üzerlerine 1,5 mL 1:10 (h/h) Folin-Ciocalteu reaktifi eklendi ve karıştırıldı. Her bir vial üzerine 1,2 mL %7,5'luk (a/h) Na₂CO₃ çözeltisi eklendi ve karıştırıldı. Vialler

karanlıkta 30 dk bekletildi. 30 dk sonunda spektrofotometre 760 nm dalga boyuna ayarlandı. Kör çözelti ile sıfırlanarak örneklerin absorbansı ölçüldü.

4.5.1.4 Hesaplama

Gallik asit için alınan absorbanslara karşılık derişim değerlerinin regresyon eşitliği Excel ile belirlendi. Regresyon eşitliği $y=80,288x-0,0086$ olarak, regresyon katsayısı ise 0,995 olarak bulundu. Bu eşitlik kullanılarak absorbansı ölçülen örneklerin derişimleri hesaplandı. Her bir örneğin seyreltme oranı dikkate alınarak arı sütü örneklerindeki fenolik bileşik miktarı “ μg gallik asit eşdeğeri (GAE) 100g^{-1} arı sütü” olarak ifade edildi.

4.5.2 FRAP analizi

4.5.2.1 Standart çözeltilerin hazırlanması

- **FeSO₄.7H₂O stok ve çalışma çözeltilerinin hazırlanması:** 0,139 g FeSO₄.7H₂O 10 mL deiyonize suda çözülerek 50 mmol L⁻¹ derişimde FeSO₄.7H₂O stok çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltiden 2 mL alınarak 10 mL’ye seyreltilmesiyle 10 mmol L⁻¹ ara stok; bu ara stoktan da 2 mL alınarak 10 mL’ye seyreltilmesiyle 2 mmol L⁻¹ ikinci bir ara stok çözeltisi hazırlandı. Bu ara stok çözeltisinden uygun seyreltmelerle 5 mL’lik balon jojelerde 4x10⁻³ mmol L⁻¹, 6x10⁻³ mmol L⁻¹, 8x10⁻³ mmol L⁻¹, 1x10⁻² mmol L⁻¹, 2x10⁻² mmol L⁻¹, 3x10⁻² mmol L⁻¹, 4x10⁻² mmol L⁻¹ ve 5x10⁻² mmol L⁻¹ derişimde FeSO₄.7H₂O çalışma çözeltileri hazırlandı.
- **20 mmol L⁻¹ FeCl₃.6H₂O çözeltisinin hazırlanması:** 54 mg FeCl₃.6H₂O deiyonize su ile çözüldükten sonra 10 mL’lik hacme deiyonize su ile tamamlandı.
- **10 mmol L⁻¹ derişimde TPTZ çözeltisinin hazırlanması:** 31 mg TPTZ, 40 mmol L⁻¹’ye seyreltilmiş HCl ile çözüldükten sonra 10 mL’lik hacme 40 mmol L⁻¹’ye seyreltilmiş HCl ile tamamlandı.
- **0,3 mol L⁻¹ (pH: 3,6) asetat tamponunun hazırlanması:** 0,31 g C₂H₃O₂Na tartıldı ve deiyonize suda çözüldü. Üzerine 1,6 mL derişik asetik asit eklendi. Ardından deiyonize su ile hacmi 100 mL’ye tamamlandı. pH metre ile pH değeri kontrol edildi.

- **FRAP reaktifinin hazırlanması:** 0,3 mol L⁻¹ asetat tamponu, 10 mmol L⁻¹ TPTZ ve 20 mmol L⁻¹ FeCl₃.6H₂O stok çözeltilerinden sırasıyla 83,34 mL, 8,34 mL ve 8,34 mL hacminde alınarak 100 mL’lik bir balon jöjede karıştırıldı.

4.5.2.2 Demir sülfata ait kalibrasyon eğrisinin çizilmesi

8 ayrı vial içerisine, hazırlanan FeSO₄.7H₂O standartlarından 0,1 mL eklendi. Kör (blank) çözelti için ayrılan vial 0,1 mL su koyuldu. FRAP reaktifi kullanılmadan önce 37°C’ye ısıtıldı. Viallere 1,8 mL FRAP reaktifi ve 0,1 mL su eklendi ve karıştırıldı. Vialler su banyosunda 37°C’de 1 saat bekletildi. 1 saat sonunda UV-VIS spektrofotometre 593 nm dalga boyuna ayarlandı. Kör çözelti ile sıfırlanarak standartların absorbansı belirlendi.

4.5.2.3 Arı sütü örneklerinin FRAP analizi

Vialler adlandırılarak içerisine hazırlanan örnek çözeltilerinden 0,1 mL eklendi. Üzerlerine 37°C’ye ısıtılmış FRAP reaktifinden 1,8 mL ve 0,1 mL su eklendi ve karıştırıldı. Vialler karanlıkta 1 saat bekletildi. 1 saat sonunda spektrofotometre 593 nm dalga boyuna ayarlandı. Kör çözelti ile sıfırlanarak örneklerin absorbansı ölçüldü.

4.5.2.4 Hesaplama

FeSO₄.7H₂O için alınan absorbanslara karşılık derişim değęrlerinin regresyon eşitliği Excel ile belirlendi. Regresyon eşitliği $y=0,5296x+0,0376$ olarak, regresyon katsayısı ise 0,999 olarak bulundu. Bu eşitlik kullanılarak absorbansı ölçülen örneklerin derişimleri hesaplandı. Her bir örneğin seyreltme oranı dikkate alınarak arı sütü örneklerindeki fenolik bileşik miktarı “mg Fe⁺² g⁻¹ arı sütü” olarak ifade edildi.



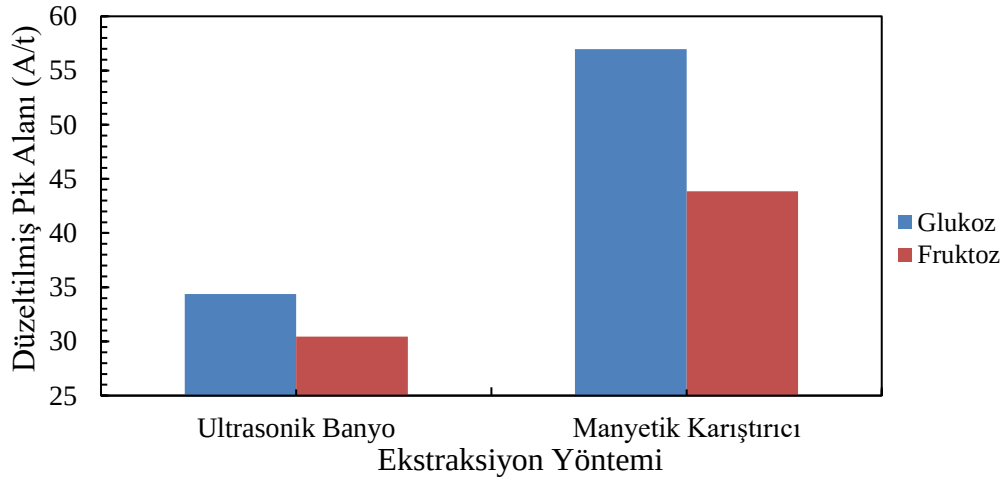
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

5.1 Arı Sütü Örneklerinin Şeker Analizi

5.1.1 Örnek ekstraksiyonu optimizasyonu

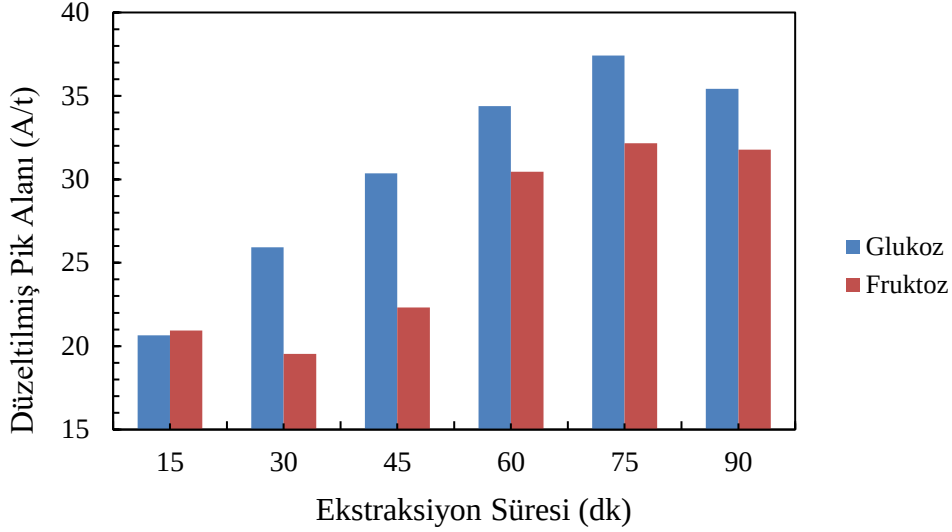
Örneklerden ultrasonik banyo ile ultrases destekli ekstraksiyon ve manyetik karıştırıcıda ekstraksiyon gerçekleştirilerek ekstraksiyon yönteminin glukoz ve fruktoz miktarına etkisi belirlendi. Ekstraksiyon koşulları olarak süre (15, 30, 45 ve 60 dk) ve arı sütü-su ekstraksiyon yöntemi seçildi. Şeker ve organik asitler suda çözünebildikleri için ekstraksiyon çözücüsü olarak su seçildi.

Arı sütü numuneleri için yapılan ekstraksiyon işleminde ilk olarak, Bingöl'e ait bir arı sütü numunesinden 0,1 g tartılarak deiyonize su ile 10 mL'de çözündü ve 60 dk ekstraksiyon süresi uygulanarak ekstraksiyon yönteminin glukoz ve fruktoz pik alanlarına etkisi Şekil 5.1'de görülmektedir.



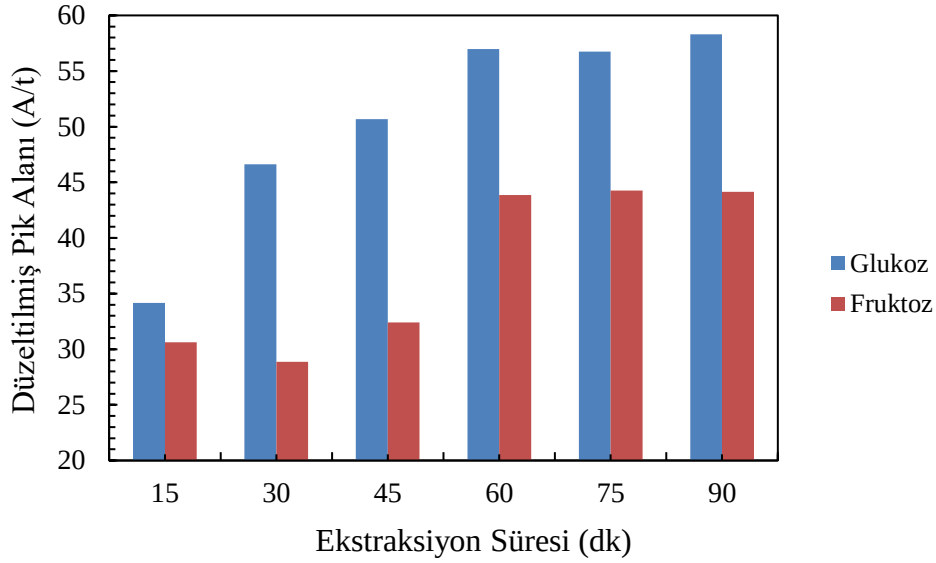
Şekil 5.1 : Ekstraksiyon yönteminin düzeltilmiş glukoz ve fruktoz pik alanlarına etkisi.

Ultrasonik banyo ile gerçekleştirilen ekstraksiyon işleminde 0,1 g arı sütü numunesi deiyonize su ile 10 mL'de çözündürüldü ve ekstraksiyon süresinin glukoz ve fruktoz pik alanlarına etkisi Şekil 5.2'deki gibi gözlendi.



Şekil 5.2 : Ultrasonik banyo ile yapılan ekstraksiyonun süresinin düzeltilmiş glukoz ve fruktoz pik alanlarına etkisi.

Manyetik karıştırıcı ile gerçekleştirilen ekstraksiyon işleminde 0,1 g arı sütü numunesi deiyonize su ile 10 mL’de çözüldü ve ekstraksiyon süresinin glukoz ve fruktoz pik alanlarına etkisi Şekil 5.3’teki gibi gözlemlendi.

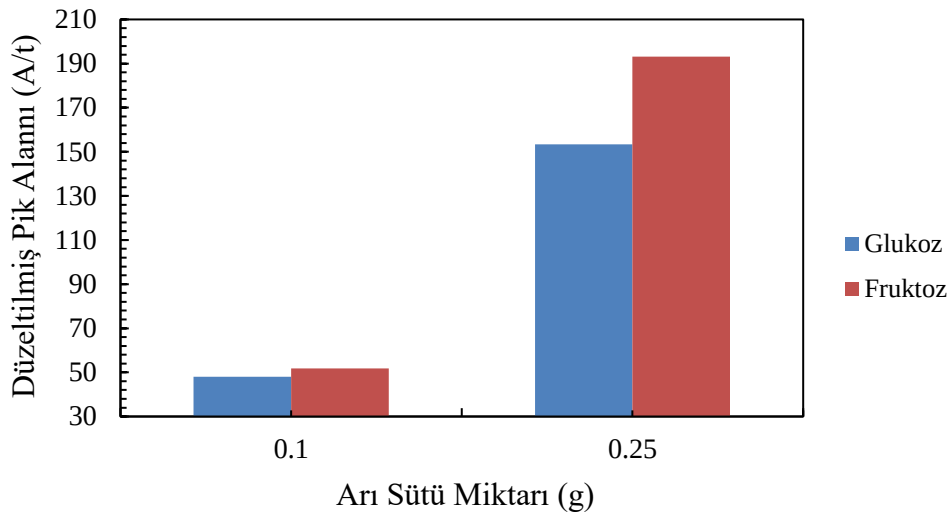


Şekil 5.3 : Manyetik karıştırıcı ile yapılan ekstraksiyonun süresinin düzeltilmiş glukoz ve fruktoz pik alanlarına etkisi.

Bu çalışmada ekstraksiyon süresinin artışıyla pik alanlarında artış görüldü. Glukoz ve fruktoz için en yüksek pik alanı değerleri manyetik karıştırıcı ile 60 dk’da elde edildi. Pik alanları glukoz ve fruktoz için sırasıyla 56,96 ve 43,86’dır.

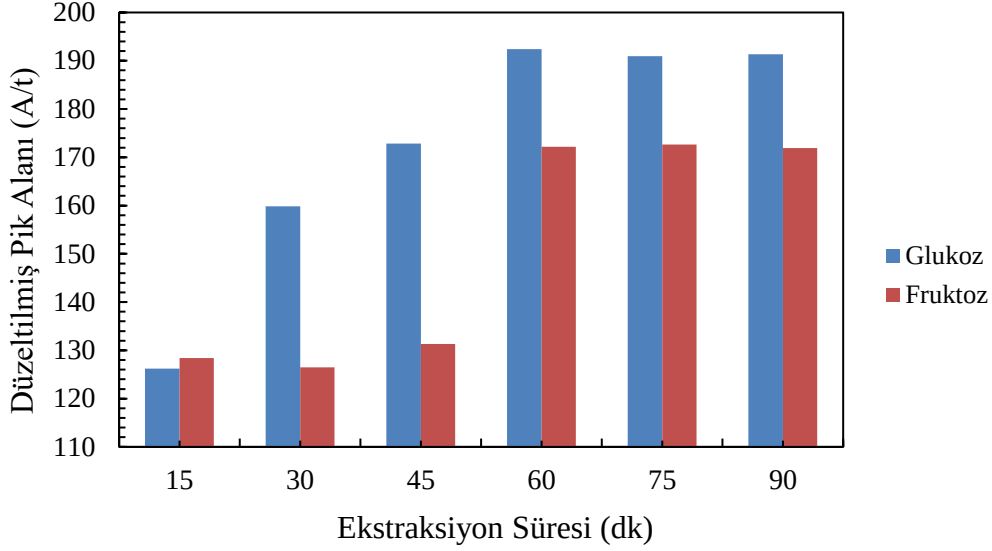
Manyetik karıştırıcı ile 60 dk ekstraksiyon sonucunda elde edilen pik alanları ultrasonik banyo ile ekstraksiyon sonucunda elde edilenlerden glukoz için 1,66 kat, fruktoz için 1,44 kat daha fazla bulundu. Bu sebeple ekstraksiyon yöntemi olarak manyetik karıştırıcı seçildi.

Ardından örnek miktarı-su oranının manyetik karıştırıcıda optimizasyonu çalışıldı. Arı sütü numunesinin miktarı 0,10 g'dan 0,25 g'a çıkarıldı ve manyetik karıştırıcı ile 60 dk ekstrakte edildi. Beklendiği gibi örnek miktarındaki artış ile daha yüksek pik alanları elde edildi. Örnek miktarındaki artışın glukoz ve fruktoz piklerine etkisi Şekil 5.4'te verilmiştir.



Şekil 5.4 : Arı sütü-su oranındaki artışın düzeltilmiş glukoz ve fruktoz pik alanlarına etkisi.

Arı sütü numunelerinin ekstraksiyonu için yapılan tüm optimizasyonların sonunda, 0,25 g arı sütü numunesinin deiyonize su ile 10 mL'de çözündükten sonra manyetik karıştırıcı ile 60 dk boyunca ekstrakte edilmesine karar verildi. 0,25 g arı sütünün deiyonize su ile 10 mL'de çözünmesi ile manyetik karıştırıcıda 15, 30, 45 ve 60 dk boyunca yapılan ekstraksiyon işlemlerinin glukoz ve fruktoz pik alanlarına etkisi Şekil 5.5'te verilmiştir.



Şekil 5.5 : Ekstraksiyon süresindeki değişimlerin düzeltilmiş glukoz ve fruktoz pik alanlarına etkisi.

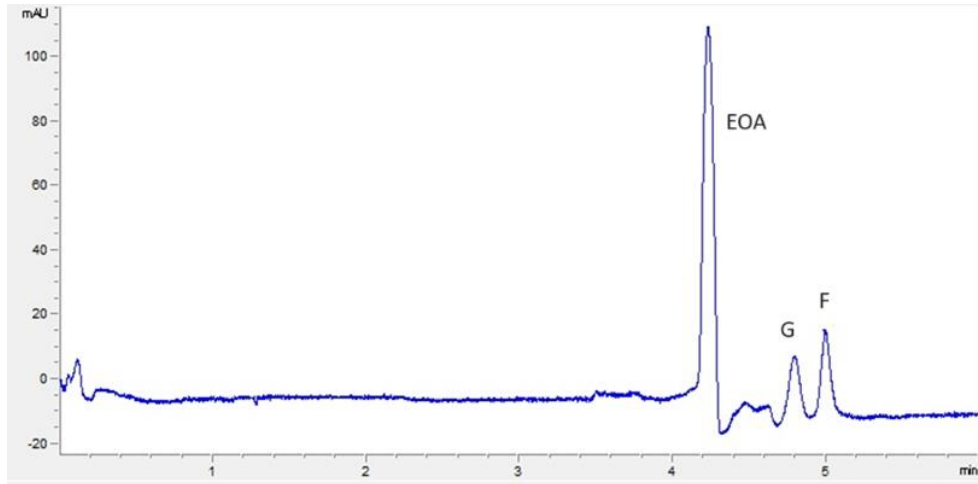
Bu çalışmada glukoz ve fruktoz için en yüksek pik alanı değerleri sırasıyla 192,41 ve 172,15'tir.

Manyetik karıştırıcı ile 60 dk ekstraksiyon sonucunda elde edilen pik alanları ultrasonik banyo ile ekstraksiyon sonucunda elde edilenlerden glukoz için 1,89 kat, fruktoz için 1,66 kat daha fazla bulundu.

5.1.2 Yöntemin arı sütü örneklerine uygulanması

Arı sütü örneklerindeki basit şekerlerin analizi için Gürel ve arkadaşları (2006) tarafından geliştirilen bir kapiler elektroforez yöntemi uygulandı [76]. Bu yöntemde ayırma elektroliti olarak bir dipeptit olan glisilglisin kullanıldı. Glisilglisin, türevlendirme veya tampon katkı maddesi olmadan şekerlerin ayırımı ve indirekt tespitini sağlamaktadır. Glisilglisin için optimum derişim 50 mmol L⁻¹, pH değeri ise 12,52 olarak seçildi.

Şeker bileşimi, gıdaların enerji seviyesi için en önemli parametrelerden biridir. Şekil 5.6, Kırklareli'ye ait bir arı sütü ekstraktının elektroferogramını göstermektedir. Tüm arı sütü örneklerinde glukoz ve fruktoz tespit edilmiştir. Arı sütü örneklerinin glukoz (G) ve fruktoz (F) içerikleri ile F/G oranları Çizelge 5.1'de verilmiştir. Örneklerin glukoz içerikleri 2,05 ile 7,69 g 100 g⁻¹ arasında, fruktoz içerikleri ise 3,15 ile 7,09 g 100g⁻¹ arasındadır. F/G indeksleri ise 0,61 ile 1,70 arasında değişmekte olup ortalama 1,004'tür.



Şekil 5.6 : Kırklareli iline ait arı sütü ekstraktının elektroferogramı. Ayırma koşulları: kapiler kolon: 50 µm iç çap, 65 cm toplam uzunluk ve 57 cm etkin uzunluk; ayırma tamponu: 50 mmol L⁻¹ glisilglisin, pH 12,52; voltaj: 25 kV. Pikler: EOA: Elektroosmotik akış, G: Glukoz, F: Fruktoz.

Çizelge 5.1 : Arı sütü örneklerinin glukoz ve fruktoz içerikleri ile F/G oranları.

Arı Sütü Örnekleri	Glukoz (g 100g ⁻¹ ± SS)*	Fruktoz (g 100g ⁻¹ ± SS)*	F/G
Kırklareli	4,39 ± 0,01	4,88 ± 0,05	1,11
Çanakkale	4,33 ± 0,05	4,02 ± 0,07	0,93
Bilecik	3,04 ± 0,26	3,85 ± 0,06	1,26
Amasya	4,67 ± 0,20	4,40 ± 0,06	0,94
Ordu	3,81 ± 0,21	4,69 ± 0,18	1,23
Kastamonu	3,71 ± 0,01	3,21 ± 0,19	0,86
Konya	2,05 ± 0,07	3,48 ± 0,12	1,70
Karaman	4,52 ± 0,23	3,28 ± 0,05	0,72
Çankırı	4,32 ± 0,07	5,07 ± 0,04	1,17
Elazığ-1	4,78 ± 0,12	4,04 ± 0,09	0,85
Iğdır	4,17 ± 0,04	3,62 ± 0,10	0,87
Elazığ-2	6,51 ± 0,09	3,99 ± 0,15	0,61
Bingöl	7,69 ± 0,14	7,09 ± 0,04	0,92
Gaziantep-1	6,07 ± 0,05	6,61 ± 0,23	1,09
Gaziantep-2	3,91 ± 0,01	3,15 ± 0,01	0,80

*n=3, SS: Standart Sapma

Şeker bileşimi, arı sütü kalitesini belirlemek için en yaygın kullanılan kriterlerden biridir. Literatürdeki çalışmalar genellikle başlıca şekerler olan fruktoz, glukoz ile nadiren süktroz gibi diğer şekerlerin de içeriklerini incelemiştir. Bu çalışmaların içinde kapiler elektroforez tekniğine rastlanmamıştır. Farklı arı sütü örnekleri için rapor edilen fruktoz ve glukoz değerleri bu tez çalışmasında bulunan sonuçlar ile uyumludur.

Daniele ve Casabianca (2012) 400 adet İtalyan ve Fransız arı sütündeki başlıca ve ikincil şekerleri analiz etmek için bir GC yöntemi geliştirmiştir [77]. Fruktoz ve glukoz içerikleri, sırasıyla %2,3–7,8 ve %3,4–7,7 aralığında bulunmuştur. Tayin edilen ikincil şekerler ise sükroz, erloz, maltoz ve maltotriozdur.

Farklı orijinlerden (İtalya ve Çin) toplam 97 arı sütü örneğinin şeker tayini için bir HPLC-kırılma indeksi detektörü (RID) yöntemi geliştirilmiştir [78]. Ortalama fruktoz miktarı 4,6 g 100g⁻¹ ve glukoz miktarı ise 5,8 g 100g⁻¹ olarak bulunmuştur.

Zhu ve arkadaşları 100 adet Çin arı sütündeki şekerlerin analizini iyon kromatografidarbili amperometrik yöntem ile gerçekleştirmiş, glukozu %3,15-8,60 ve fruktozu %2,88-7,73 aralığında bulmuştur [79]. Sükroz içeriği ise %0,03 ila %2,21 arasındadır. Bunların dışında daha az miktarlarda maltoz, trehaloz, melibioz, melezitoz, gentiobioz, turanoz, füköz gibi şekerler de bulunmuştur.

Güney Kore'deki bir arılıkta mevsimsel değişikliklere göre yapay yem ile özel olarak beslenen arı kolonileri tarafından üretilen 60 arı sütü örneğinin şeker analizi bir UPLC yöntemi ile gerçekleştirilmiştir [80]. Fruktoz %1,9–6,1, glukoz %2,8–5,5 ve sükroz için %0,7–7,7 aralığında bulunmuştur.

Türkiye'den toplanan arı sütlerinin şeker içeriklerine dair ise literatürde sadece iki adet çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmaların birinde dokuz adet arı sütü örneğinin şeker analizi bir HPLC-kırılma indeksi dedektörü ile belirlenmiş, başlıca fruktoz ve glukoz tespit edilmiştir [81]. Fruktoz miktarı %4,19–6,29, glukoz ise %3,79–5,40 aralığında bulunmuştur. Diğerinde ise Kolaylı ve arkadaşları (2016) 18 adet arı sütünün şeker içeriklerini HPLC-kırılma indeksi dedektörü ile analiz etmiştir [82]. Örneklerdeki glukoz miktarı %3,5 ila %10,2 arasında, fruktoz ise %3,0 ila %7,3 arasında tespit edilmiştir.

Önceki yıllarda laboratuvarımızda diğer arı ürünlerinden olan arı ekmeği ve arı poleninde kapiler elektroforez ile basit şekerlerin analizi gerçekleştirilmiştir [14, 16]. Bu tez kapsamında analiz edilen arı sütündeki glukoz ve fruktoz miktarları ile F/G oranı, Çizelge 5.2'de arı ekmeği ve arı polenindeki sonuçlarla karşılaştırılmıştır. Çalışmalarda Anadolu'nun farklı bölgelerinden temin edilen 7 farklı arı ekmeği, 10 farklı arı poleni ve 15 farklı arı sütü örneği kullanılmıştır. Arı ekmeği, arı poleni ve arı sütündeki glukoz miktarları sırasıyla 6,2-21,5 g 100g⁻¹, 2,4-4,9 g 100g⁻¹ ve 2,1-7,7 g 100g⁻¹ aralığında değişmektedir. Fruktoz içeriği ise arı ekmeği, arı poleni ve arı sütü için sırasıyla 11,6-32,1 g 100g⁻¹, 5,5-6,2 g 100g⁻¹ ve 3,2-7,1 g 100g⁻¹ aralığında

bulunmuştur. Arı ekmeği, bal ve polenin karışımı olan bir arı ürünüdür. Glukoz ve fruktoz içeriği bu nedenle arı ekmeğinde beklendiği gibi en fazla bulunmuştur. Arı ekmeği, arı poleni ve arı sütü için F/G oranları ise sırasıyla 1,7-2,2, 1,1-2,5 ve 0,6-1,7 aralığında değişiklik göstermektedir.

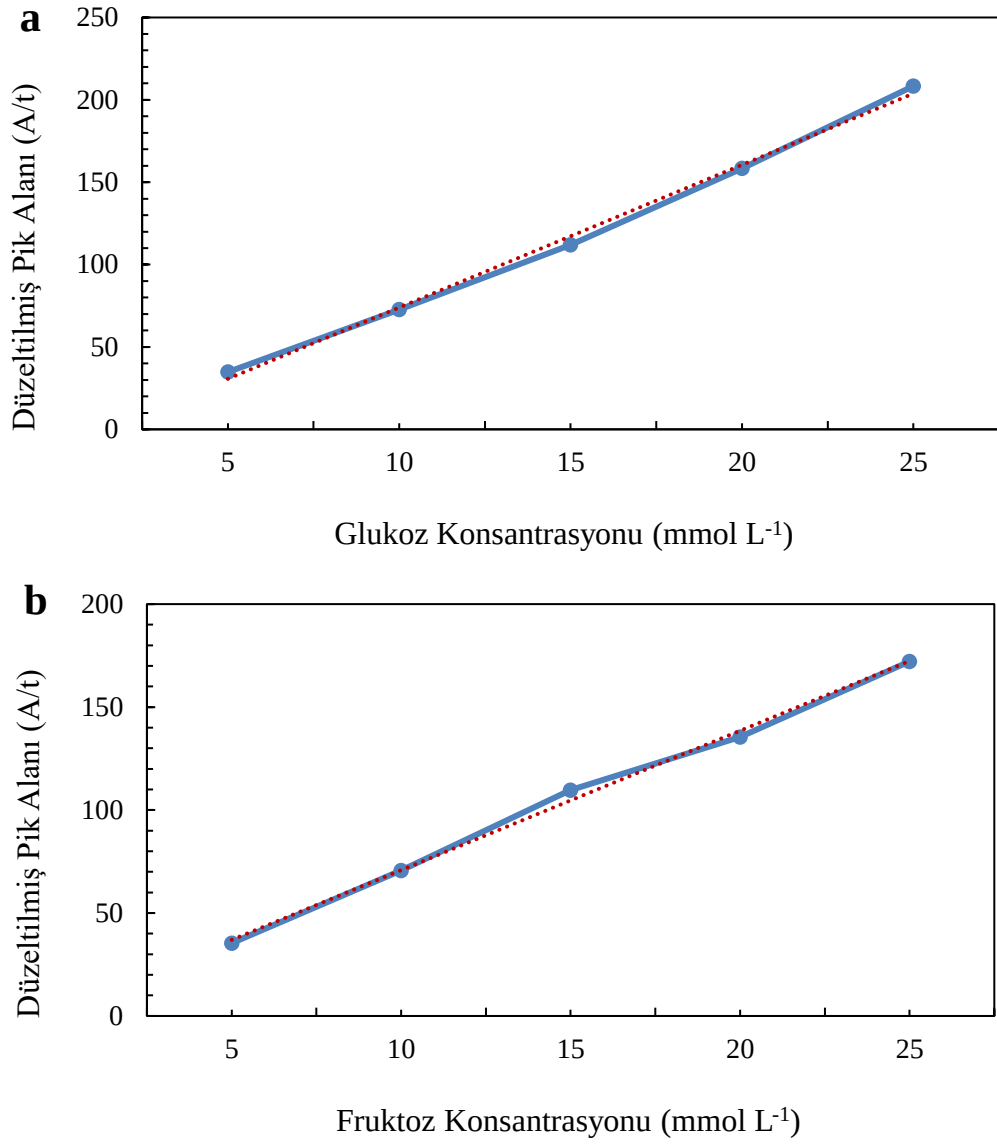
Çizelge 5.2 : Arı ekmeği, arı poleni ve arı sütündeki şeker miktarları arasındaki karşılaştırma.

	Glukoz (g 100g ⁻¹)	Fruktoz (g 100g ⁻¹)	F/G	Referans
Arı Ekmeği	6,20 – 21,5	11,6 – 32,1	1,7 – 2,2	[14]
Arı Poleni	2,40 – 4,90	5,50 – 6,20	1,1 – 2,5	[16]
Arı Sütü	2,10 – 7,70	3,20 – 7,10	0,6 – 1,7	Bu çalışma

5.1.3 Metod validasyonu

5.1.3.1 Doğrusallık

Kalibrasyon eğrileri glukoz için 5-25 mmol L⁻¹, fruktoz için ise 5-25 mmol L⁻¹ konsantrasyon aralığında lineerlik gösterdi. Şekil 5.7a'da glukozun, 5.7b'de ise fruktozun kalibrasyon eğrileri görülmektedir. Çizelge 5.3'te görüldüğü üzere glukoz ve fruktoza ait regresyon denklemleri sırasıyla $y = 8,6589x - 12,639$ ve $y = 6,7705x + 3,1061$ olarak bulundu. Regresyon katsayıları ise glukoz ve fruktoz için 0,996 olarak elde edildi.



Şekil 5.7 : a) Glukoza ve b) Fruktoza ait kalibrasyon eğrileri.

Çizelge 5.3 : Glukoz ve fruktoza ait regresyon denklemleri ve regresyon katsayıları.

	Regresyon Denklemi	Regresyon Katsayısı (R^2)
Glukoz	$y = 8,6589x - 12,639$	0,996
Fruktoz	$y = 6,7705x + 3,1061$	0,996

5.1.3.2 LOD ve LOQ değerleri

LOD ve LOQ değerleri ICH'nin belirlemiş olduğu standartlara göre hesaplandı. Glukoz ve fruktoz için LOD değeri 1,214 mmol L⁻¹ ve LOQ değeri ise 3,679 mmol L⁻¹ olarak bulunmuştur.

5.1.3.3 Kesinlik

Kesinlik parametresi testinden elde edilen gün içi göç zamanları ve gün içi düzeltilmiş pik alanları (A/t) tekrarlanabilirlik hesaplamaları glukoz ve fruktoz için sırasıyla Çizelge 5.4'te görülmektedir. Görüldüğü gibi hem glukoz için hem de fruktoz için %bağıl standart sapma (%BSS) değerleri %5'ten düşüktür. Bu değerler yöntemin tekrarlanabilirliğini göstermekte olup kesinlik için uygun bulundu.

Çizelge 5.4 : Glukoz ve fruktoz için gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik değerleri.

	Düzeltilmiş Pik Alanı (A/t)		Zaman (t)	
	Gün İçi Tekrarlanabilirlik (n=7) (%BSS)	Günler Arası Tekrarlanabilirlik (n=3x7) (%BSS)	Gün İçi Tekrarlanabilirlik (n=7) (%BSS)	Günler Arası Tekrarlanabilirlik (n=3x7) (%BSS)
Glukoz	3,23	4,83	1,05	4,55
Fruktoz	4,82	4,63	1,61	4,89

5.1.3.4 Geri kazanım

Yöntemin geri kazanımı, Çanakkale'ye ait arı sütü örneğinde bulunan glukoz ve fruktoz miktarının (6 mmol L^{-1}) yarısı, kendisi ve iki katı kadar standart glukoz ve fruktoz çözeltisi ilavesi ile belirlendi. Geri kazanım sonuçları Çizelge 5.5'te verildiği gibidir.

Çizelge 5.5 : Glukoz ve fruktoz için geri kazanım yüzdeleri.

Eklenen Miktar (mmol L^{-1})		%Geri Kazanım $\pm$ SS*
Glukoz	3	%98,78 $\pm$ 1,04
	6	%99,07 $\pm$ 0,63
	12	%98,51 $\pm$ 0,81
Fruktoz	3	%98,83 $\pm$ 0,60
	6	%96,62 $\pm$ 0,56
	12	%98,66 $\pm$ 0,53

*n=3, SS: Standart Sapma

5.2 Arı Sütü Örneklerinin Organik Asit Analizi

5.2.1 Örnek ekstraksiyonu optimizasyonu

Arı sütü numunelerinin ekstraksiyonu için yapılan tüm optimizasyonlar, Bölüm 5.1.1’de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Optimizasyonların sonunda 0,25 g arı sütü numunesi tartıldıktan sonra yaklaşık 80°C’ye ısıtılmış deiyonize su ile 10 mL’de çözülmesine ve manyetik karıştırıcı ile 60 dk boyunca ekstrakte edilmesine karar verildi.

5.2.2 Metod optimizasyonu

Birçok literatürde arı ürünlerinde majör organik asit olarak belirtilen glukonik asidin miktar tayini CE’e bağlı temassız iletkenlik dedektörü ile gerçekleştirildi. Glukonik asit, işçi bal arılarının tükürük bezlerinden salgılanan glukoz oksidaz enzimi ile glukozun enzimatik olarak parçalanması ile oluşan bir üründür [22, 83].

Yöntemde tampon olarak organik asitlerin ayrımı için yaygın olarak kullanılan MES tamponu seçildi [84-86]. EOA’nın yönünü değiştirmek, kapiler iç duvarını pozitif kaplamak ve böylece organik asitlerin hızlı göçünü sağlamak için, tampona katkı maddesi olarak bir yüzey aktif madde olan CTAB eklendi [84, 87].

Tampon konsantrasyonunu optimize etmek için CTAB miktarı, tampon pH değeri ve pH ayarlama materyali sabit tutularak denemeler yapıldı. Tampon konsantrasyonunun düşmesi ile piklerde daha iyi rezolüsyon gözlemlendi. Bu yüzden MES tamponunun konsantrasyonu 20 mmol L⁻¹ olarak seçildi.

Yüzey aktif madde konsantrasyonunu optimize etmek için MES konsantrasyonu 20 mmol L⁻¹ ve diğer değişkenler (tampon pH değeri ve pH değerini ayarlarken kullanılan çözelti) sabit tutularak farklı CTAB konsantrasyonları denendi. MES tamponu içindeki CTAB miktarı düşük konsantrasyonlarda pik genişlemesine ve piklerde cephe oluşumuna neden oldu. CTAB miktarı arttıkça da standart piklerinde daha iyi ayırım gözlemlendi ve göç süresi kısaldı. Bu yüzden CTAB konsantrasyonu olarak 0,2 mmol L⁻¹’ye karar verildi.

Literatürde MES tamponu ile organik asit ayrımları pH 6,0-7,0 civarında yapıldığı için, tampon pH değerinin optimizasyonu bu aralıkta yapıldı [84-86]. 20 mmol L⁻¹ MES ve 0,2 mmol L⁻¹ CTAB içeren tamponun pH değeri tris ile 6,0, 6,5 ve 7,0’ye ayarlandı. Tampon pH’nın düşmesiyle piklerin ayrımı iyileşti. Bu yüzden tampon pH’ı 6,0 olarak belirlendi.

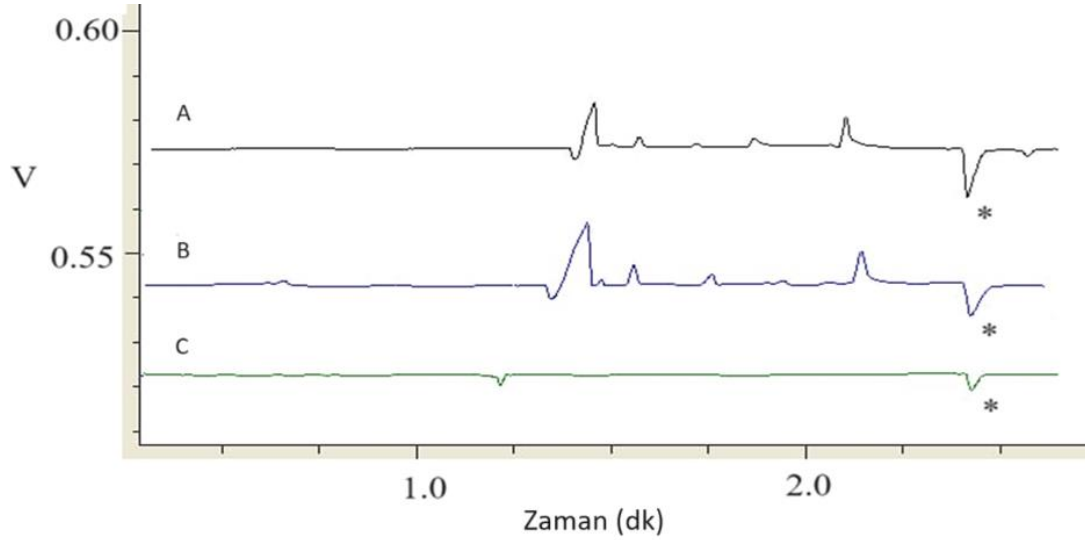
Tampon pH değerini ayarlamak için pH değerini ayarlarken kullanılan çözelti dışındaki tüm değişkenler sabit tutularak tris ve histidin ile denemeler yapıldı. Tris kullanıldığında standart pikleri daha hızlı gelirken histidin kullanıldığında göç süresi uzadı. Ayrıca histidin kullanılan tamponla yapılan injeksiyonda pikler düzgün ayrıldı. Bu yüzden tampon pH'ı tris ile ayarlandı.

Optimizasyonlar sonucunda arı sütlerindeki organik asitlerin ayrımı için, yüzey aktif madde olarak 0,2 mmol L⁻¹ CTAB içeren 20 mmol L⁻¹ MES tamponu tris ile pH değeri 6,0 olacak şekilde ayarlanarak kullanıldı.

5.2.3 Yöntemin arı sütü örneklerine uygulanması

Arı sütü örneklerindeki organik asitlerin analizi için Bölüm 5.2.2'de anlatılan optimizasyonlar sonucunda karar verildiği gibi, yüzey aktif madde olarak 0,2 mmol L⁻¹ CTAB içeren 20 mmol L⁻¹ MES tamponu kullanıldı. Tampon pH değeri ise tris ile 6,0'ya getirildi. Glukonik asit miktarları her arı sütü örneğinden önce injekte edilen standart glukonik asit piki ile örnek pikinin karşılaştırması ile gerçekleştirildi ve bu işlem iki kez tekrarlandı.

Şekil 5.8, glukonik asit analizine ait elektroferogramları içermektedir. Burada A, 100 ppm glukonik asit standardı eklenmiş olan Bingöl arı sütü örneğine; B, Bingöl arı sütü örneğine; C, glukonik asit standardına ait elektroferogramları göstermektedir. Tüm arı sütü örneklerinde glukonik asit tespit edilmiştir. Arı sütü örneklerinin glukonik asit içerikleri Çizelge 5.6'da verilmiştir. Örneklerin glukonik asit içerikleri 0,50 ile 4,59 g 100 g⁻¹ arasındadır.



Şekil 5.8 : A: 5×10^{-4} mol L⁻¹ glukonik asit standardı eklenmiş olan Bingöl arı sütü örneği; B: Bingöl arı sütü örneği; C: 4×10^{-4} mol L⁻¹ glukonik asit standardı. Ayırma koşulları: kapiler kolon: 50 µm iç çap, 60 cm toplam uzunluk; ayırma tamponu: 20 mmol L⁻¹ MES/0,2 mmol L⁻¹ CTAB, pH 6; voltaj: -28 kV.

Çizelge 5.6 : Arı sütü örneklerinin glukonik asit içerikleri.

Arı Sütü Örnekleri	Glukonik Asit (g 100g ⁻¹ ± SS)*
Kırklareli	1,25 ± 0,03
Çanakkale	1,02 ± 0,08
Bilecik	1,05 ± 0,07
Amasya	0,50 ± 0,06
Ordu	0,98 ± 0,05
Kastamonu	0,65 ± 0,05
Konya	0,77 ± 0,06
Karaman	0,51 ± 0,06
Çankırı	4,59 ± 0,10
Elazığ-1	0,80 ± 0,05
Iğdır	1,24 ± 0,06
Elazığ-2	0,81 ± 0,07
Bingöl	0,96 ± 0,05
Gaziantep-1	0,98 ± 0,05
Gaziantep-2	0,94 ± 0,06

*n=3, SS: Standart Sapma

Organik asitler arı sütünün uzun süre mikroorganizmalara karşı bozulmadan korunabilmesi için önemlidir. Arı sütünün kalitesinin belirlenmesi için en yaygın kullanılan kriterlerden biridir.

Önceki yıllarda laboratuvarımızda diğer arı ürünlerinden olan arı ekmeği ve arı poleninde kapiler elektroforez ile majör organik asit olan glukonik asidin analizi

gerçekleştirilmiştir [14, 16]. Bu tez kapsamında analiz edilen arı sütündeki glukonik asit miktarı, Çizelge 5.7’de arı ekmeği ve arı polenindeki glukonik asit miktarlarıyla sonuçlarla karşılaştırılmıştır. Arı ekmeği, arı poleni ve arı sütündeki glukonik asit miktarları sırasıyla 43,66-63,2 g kg⁻¹, 5,9-32 g kg⁻¹ ve 0,5-4,6 g kg⁻¹ aralığında tespit edilmiştir. Glukonik asit, glukozun glukoz oksidaz ile parçalanması sonucu oluşan bir üründür. Çizelge 5.7’de glukonik asit miktarının glukoz ile orantılı değiştiği görülmektedir. En yüksek glukoz ve glukonik asit içeriği arı ekmeğinde bulunurken, arı sütünde glukoz miktarının daha düşük olması sebebiyle arı sütündeki glukonik asit miktarı en azdır.

Çizelge 5.7 : Arı ekmeği, arı poleni ve arı sütündeki glukoz ve glukonik asit miktarları.

	Glukoz (g 100g ⁻¹)	Glukonik asit (g kg ⁻¹)	Referans
Arı Ekmeği	6,20 – 21,5	43,6 – 63,2	[14]
Arı Poleni	2,40 – 4,90	5,90 – 32,0	[16]
Arı Sütü	2,10 – 7,70	0,50 – 4,60	Bu çalışma

5.2.4 Metod validasyonu

5.2.4.1 LOD ve LOQ değerleri

LOD değeri iki farklı baseline alanından alınan ortalama gürültünün üç katı, LOQ değeri ise on katı olarak hesaplanmıştır. Glukonik asit için LOD değeri 1,34 µmol L⁻¹ ve LOQ değeri ise 4,47 µmol L⁻¹ olarak bulunmuştur.

5.2.4.2 Kesinlik

Kesinlik parametresi testinden elde edilen gün içi göç zamanları ve gün içi düzeltilmiş pik alanları (A/t) tekrarlanabilirlik hesaplamaları glukonik asit için Çizelge 5.8’de görülmektedir. Görüldüğü gibi glukonik asit için %bağıl standart sapma (%BSS) değerleri %5’ten düşüktür. Bu değerler yöntemin tekrarlanabilirliğini göstermekte olup kesinlik için uygun bulundu.

Çizelge 5.8 : Glukonik asit için gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik değerleri.

	Düzeltilmiş Pik Alanı (A/t)		Zaman (t)	
	Gün İçi Tekrarlanabilirlik (n=7) (%BSS)	Günler Arası Tekrarlanabilirlik (n=3x7) (%BSS)	Gün İçi Tekrarlanabilirlik (n=7) (%BSS)	Günler Arası Tekrarlanabilirlik (n=3x7) (%BSS)
Glukonik Asit	3,95	4,98	0,68	3,95

5.2.4.3 Geri kazanım

Yöntemin geri kazanımı, Bilecik’e ait arı sütü örneğinde bulunan glukonik asit miktarının ($0,12 \text{ mmol L}^{-1}$) yarısı, kendisi ve iki katı kadar standart glukonik asit çözeltisi ilavesi ile belirlendi. Geri kazanım sonuçları Çizelge 5.9’da verildiği gibidir.

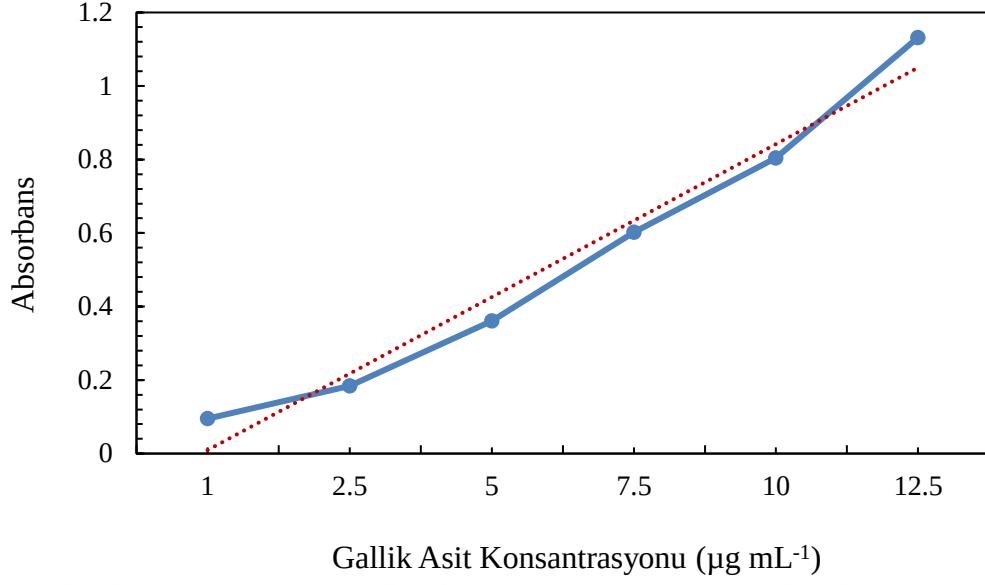
Çizelge 5.9 : Glukonik asit için geri kazanım yüzdeleri

	Eklenen Miktar (mmol L^{-1})	%Geri Kazanım $\pm$ SS*
Glukonik Asit	0,06	%101 $\pm$ 3,0
	0,12	%97,9 $\pm$ 3,2
	0,24	%97,7 $\pm$ 1,8

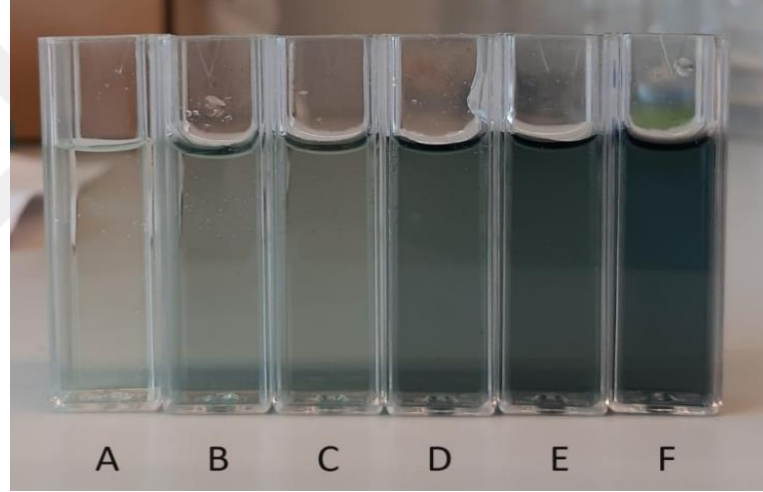
*n=3, SS: Standart Sapma

5.3 Total Fenolik İçerikleri

Örneklerin total fenolik içerikleri gallik asit eşdeğerliği (GAE) cinsinden hesaplandı. Bu amaçla öncelikle gallik asit kalibrasyon eğrisi çizildi. Kalibrasyon eğrisinin çizilmesinde $1,00\text{-}12,5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyon aralığındaki gallik asit çözeltileri kullanıldı. Gallik asite ait kalibrasyon eğrisi Şekil 5.9’da verildiği gibidir. Kalibrasyon eğrisinin denklemi $y=88,817x-0,041$ olarak belirlenirken regresyon katsayısı ise 0,986 olarak bulundu. Şekil 5.10’da ise kalibrasyon eğrisini oluştururken kullanılan standart konsantrasyonlarının renk şiddeti verilmiştir.



Şekil 5.9 : Gallik aside ait kalibrasyon eğrisi.



Şekil 5.10 : Farklı derişimdeki gallik asit standartlarının oluşturduğu renk şiddeti (A: 1,0 µg mL⁻¹, B: 2,5 µg mL⁻¹, C: 5,0 µg mL⁻¹, D: 7,5 µg mL⁻¹, E: 10 µg mL⁻¹, F: 12,5 µg mL⁻¹).

Bu yöntemde numunelerin inkübasyon süresinin optimizasyonu için 10 dk ila 120 dk arasında denemeler yapıldı. Numuneye ait absorbans değerleri 30 dk'dan sonra sabit kaldığı için optimum inkübasyon süresi olarak 30 dk'ya karar verildi.

Optimize edilmiş koşullarda arı sütü örneklerine ait total fenolik içerikleri Çizelge 5.10'da verildi.

Çizelge 5.10 : Arı sütü örneklerine ait total fenolik içerikleri.

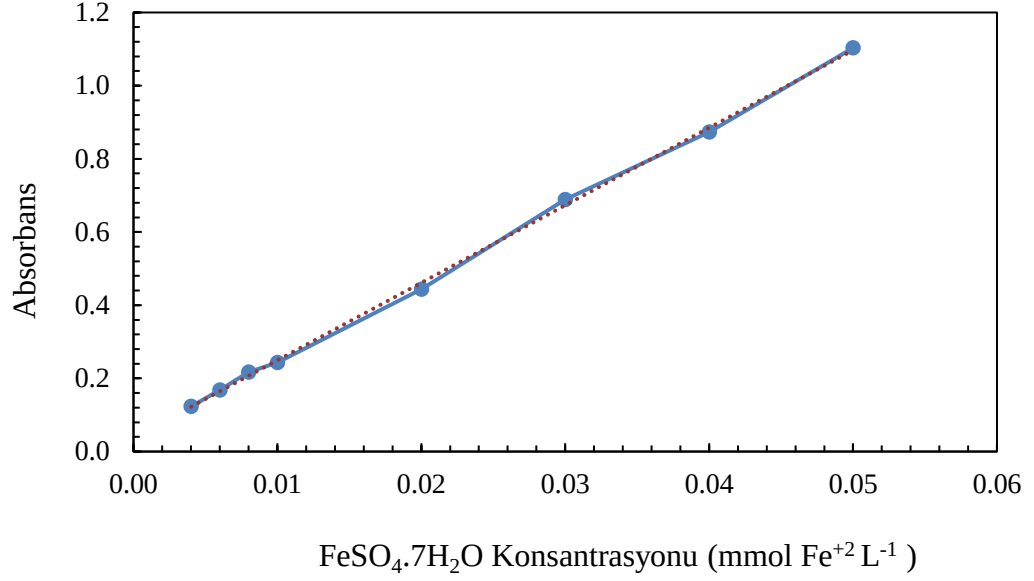
Arı Sütü Örnekleri	$\mu\text{g GAE mL}^{-1} \pm \text{SS}^*$
Kırklareli	$10,99 \pm 0,19$
Çanakkale	$11,10 \pm 0,11$
Bilecik	$10,57 \pm 0,21$
Amasya	$10,06 \pm 0,17$
Ordu	$10,59 \pm 0,00$
Kastamonu	$10,62 \pm 0,00$
Konya	$10,14 \pm 0,00$
Karaman	$10,20 \pm 0,00$
Çankırı	$12,60 \pm 0,00$
Elazığ-1	$9,988 \pm 0,00$
Iğdır	$12,20 \pm 0,00$
Elazığ-2	$12,83 \pm 0,00$
Bingöl	$11,10 \pm 0,00$
Gaziantep-1	$10,24 \pm 0,00$
Gaziantep-2	$10,46 \pm 0,00$

*n=3, SS: Standart Sapma

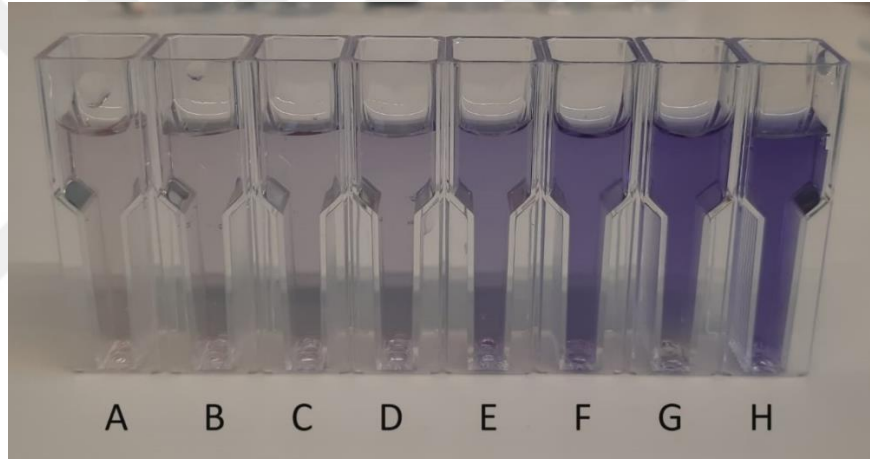
Arı sütü örneklerinin toplam fenolik madde içerikleri $9,988-118,83 \mu\text{g GAE mL}^{-1}$ aralığında olup ortalama $10,91 \mu\text{g GAE mL}^{-1}$ olarak bulundu. Elazığ'dan toplanan arı sütü örneğinin diğer örneklerle göre en yüksek miktarda fenolik madde içerdiği görüldü. En düşük fenolik madde içeriği ise Elazığ'dan toplanan diğer örnekte bulundu.

5.4 FRAP Analizi

Örneklerin demir (III) iyonlarını indirgeme gücüne dayanılarak antioksidan aktivitesi belirlemeye dayanan bu yöntemde örneklerin toplam antioksidan aktivitesi “ $\text{mg Fe}^{+2} \text{ g}^{-1}$ arı sütü” eşdeğeri olarak verildi. Bu amaçla öncelikle $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ kullanılarak 4×10^{-3} - $5 \times 10^{-2} \text{ mmol Fe}^{+2} \text{ L}^{-1}$ konsantrasyon aralığında bir kalibrasyon eğrisi çizildi (Şekil 5.11). Kalibrasyon eğrisinin denklemi $y=0,5296x+0,0376$ olarak belirlenirken regresyon katsayısı 0,999 olarak bulundu. Şekil 5.12’de ise kalibrasyon eğrisini oluştururken kullanılan standart konsantrasyonlarının renk şiddeti verilmiştir.



Şekil 5.11 : FeSO₄.7H₂O'a ait kalibrasyon eğrisi.



Şekil 5.12 : Farklı derişimdeki FeSO₄.7H₂O standartlarının oluşturduğu renk şiddeti (A: 4×10^{-3} mmol Fe⁺² L⁻¹, B: 6×10^{-3} mmol Fe⁺² L⁻¹, C: 8×10^{-3} mmol Fe⁺² L⁻¹, D: 1×10^{-2} mmol Fe⁺² L⁻¹, E: 2×10^{-2} mmol Fe⁺² L⁻¹, F: 3×10^{-2} mmol Fe⁺² L⁻¹, G: 4×10^{-2} mmol Fe⁺² L⁻¹, H: 5×10^{-2} mmol Fe⁺² L⁻¹).

Bölüm 4.5.2.1’de anlatıldığı gibi hazırlanan FRAP reaktifi ile arı sütü ekstraktları karıştırıldıktan sonra 10 dk ila 120 dk arasında inkübe edildi. Karışıma ait absorbansların 60 dk’dan sonra sabit kaldığı gözlemlendi. Bu nedenle optimum inkübasyon süresi 60 dk olarak seçildi.

Yapılan FRAP analizi sonucunda tüm örneklerin toplam antioksidan aktivitesi 1 gram ekstraktta mg Fe(II) olarak belirlendi ve Çizelge 5.11’de verildi. Arı sütü örneklerinin FRAP miktarı $0,023-0,114$ mg Fe⁺² g⁻¹ aralığında olup ortalama $0,041$ mg Fe⁺² g⁻¹ olarak bulundu. Elazığ bölgesinden toplanan arı sütü örneklerinden birinde diğer

örneklere göre en yüksek miktarda fenolik madde içerdiği görülürken diğer Elazığ arı sütü örneğinde en düşük fenolik madde içeriği tespit edildi.

Çizelge 5.11 : Arı sütü örneklerindeki FRAP analiz sonuçları.

Arı Sütü Örnekleri	FRAP (mg Fe ⁺² g ⁻¹ arı sütü ± SS)*
Kırklareli	0,056 ± 0,004
Çanakkale	0,041 ± 0,000
Bilecik	0,031 ± 0,003
Amasya	0,040 ± 0,003
Ordu	0,024 ± 0,001
Kastamonu	0,038 ± 0,001
Konya	0,033 ± 0,001
Karaman	0,039 ± 0,001
Çankırı	0,029 ± 0,001
Elazığ-1	0,023 ± 0,002
Iğdır	0,047 ± 0,001
Elazığ-2	0,114 ± 0,008
Bingöl	0,042 ± 0,002
Gaziantep-1	0,027 ± 0,000
Gaziantep-2	0,030 ± 0,001

*n=3, SS: Standart Sapma

5.5 Tartışma

Dünya'nın farklı bölgelerinden toplanan arı sütü örneklerinin kimyasal bileşimi üzerine pek çok çalışma yapılmıştır. Ancak literatürdeki veriler ürünün içsel parametrelerinin farklı olması (pH, su, titre edilebilir asitlik vb.) ve farklı analitik yöntemlerin kullanımı nedeniyle oldukça değişkenlik göstermektedir. Çünkü arı sütü için henüz referans yöntemler belirlenmemiştir.

Uluslararası tartışmalar (ISO komitesi TC34/WG13), arı sütünün tanımı, fizikokimyasal parametreleri ve kalitesi için uluslararası bir standardın oluşturulması amacıyla yürütülmektedir ancak henüz başlangıç aşamasındadır. Bu standart, özellikle ithalat-ihracat pazarı ve tüketici koruması için son derece önemlidir.

Ülkemizde arı sütü üretimi yılda yaklaşık 6-7 ton civarındadır. İhtiyaç duyulan arı sütünün %85'i ithalat ile sağlanmaktadır. Bugün dünyada yıllık birkaç bin ton üretimle tartışmasız en büyük arı sütü üreticisi Çin'dir. Bu üretim dünya piyasasında oldukça

rekabetçi bir fiyat sunmaktadır ve arı sütünün coğrafi kökeninin belirlenmesi, arı sütünün kalite kontrolü için önemli bir konudur.

Bal dışındaki arı ürünleriyle ilgili kalite standartlarına duyulan ihtiyaç, hem tüketici güvenliği hem de katma değerli ürünler yoluyla arıcılığın geliştirilmesi için geniş çapta kabul görmüştür. Arı sütünde, şekerler başlıca bileşenler arasındadır ve bunların miktarının belirlenmesi, bal veya şekerle yapılan olası hilelerin tespiti de dahil olmak üzere kalite kontrolü için dikkat çeken bir konudur. Bu tez çalışmasında Anadolu'nun farklı bölgelerinden toplanan arı sütü örneklerindeki başlıca şekerler olan glukoz ve fruktozun miktarları hızlı, hassas, ekonomik ve doğruluğu yüksek bir kapiler elektroforez-indirekt UV deteksiyon metodu ile belirlendi. Toplam şeker analizi yerine şeker profilinin belirlenmesi arı sütünün kalite kontrolü için önemli bir araç olabilir. Yöntem, Türk Gıda Kodeksi Arı Ürünler Tebliği için değerlendirilebilir. Ayrıca arı sütünün enerji için alternatif bir kaynak olduğu bu çalışma ile vurgulanmıştır.

Alifatik organik asitler aroma, tat, asidite, pH ve elektriksel iletkenliğe önemli bir katkı sağlar. Arı sütünde alifatik organik asitler hakkında az sayıda çalışma vardır ve bu bileşikler küçük bir oranda bulunmalarına rağmen çok önemlidir. Çünkü arı ürünlerinin stabilitesine, korunmasına, fiziksel, kimyasal ve duyuşal özelliklerine güçlü bir katkı sağladığı bilinmektedir. Son zamanlarda, organik asitler gıda korumada ve yeni nesil antibiyotikler olarak kullanılmaktadır. Bu bağlamda, arı sütünün organik asit içeriği değerlendirildi. Hızlı, ekonomik ve etkin bir kapiler elektroforez-temassız iletkenlik dedektörü ile arı ürünlerinde başlıca organik asit olan glukonik asidin Anadolu arı sütü örneklerindeki miktarları tespit edildi.

Bu tez çalışmasında arı sütü örneklerinin analizinde kullanılan her iki kapiler elektroforez yönteminin kullanımı ilgi çekicidir. Çünkü şeker ve organik asitler gibi düşük molar absorptiviteye sahip bileşiklerin çok yönlü bir şekilde tespit edilebildiği gösterildi. Bu bileşiklerin tayini, çevre dostu ve hassas teknikler kullanılarak kısa sürede gerçekleştirildi.

Tezin amacına yönelik olarak arı sütü örneklerinin antioksidan aktiviteleri de değerlendirildi. Doğal antioksidanlar, serbest radikallerin saldırısı sonucu oluşan çeşitli kronik hastalıkları önlemeye yönelik sağlık yararları nedeniyle son zamanlarda bilim insanları ve araştırmacıların dikkatini çekmiştir. Besin değeri temelinde, dünya

piyasalarında çeşitli biçimlerde giderek daha fazla ticari arı sütü ürünü bulunmaktadır. Tüketiciler ise kaliteli ürün talep etmektedir.

Arı sütü örneklerinin antioksidan aktiviteleri toplam fenolik madde miktarı ve demir (III) iyonu indirgeme antioksidan kapasite tayini yöntemi ile belirlendi. Sonuçlar farklı bölgelerden toplanan arı sütü örneklerinin arasındaki farklılıkları gösterdi. Güçlü antioksidan aktivitelere sahip arı sütü örneklerinin ortaya çıkarılması bu örnekleri cilt bakım ürünleri ve kozmetiklerde ideal bir bileşen yapar ve gelecekteki ürün geliştirmeleri için olanaklar açabilir.

Bu tez çalışması ile Anadolu arı sütünün önemli kimyasal bileşenlerin miktarı rapor edilmiş, antioksidan aktiviteleri ortaya çıkarılmıştır. Bu sayede hem arı ürünleri literatürüne hem de arı sütünün yeni ve alternatif terapilerdeki klinik ve farmasötik kullanımına katkıda bulunulacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] Cencic, A., Chingwaru, W. (2010). The role of functional foods, nutraceuticals, and food supplements in intestinal health. *Nutrients*, 2(6), 611-625.
- [2] Arshad, M. S., Khalid, W., Ahmad, R. S., Khan, M. K., Ahmad, M. H., Safdar, S., Kousar, S., Munir, H., Shabbir, U., Zafarullah, M., Nadeem, M., Asghar, Z., Suleria, H. A. R. (2021). Functional foods and human health: an overview. *Functional Foods Phytochem Health Promoting Potential*, 3.
- [3] Crowe, K. M., Francis, C. (2013). Position of the academy of nutrition and dietetics: functional foods. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 113(8), 1096-1103.
- [4] Martirosyan, D. M., Singharaj, B. (2016). Health claims and functional food: The future of functional foods under FDA and EFSA regulation. *Functional Foods for Chronic Diseases*, 1, 410-417.
- [5] Yücel, B., Topal, E., Kösoğlu, M. (2017). Bee products as functional food. *Superfood and Functional Food-An Overview of Their Processing and Utilization*, 15-33.
- [6] Kebede, I. A., Gebremeskel, H. F., Ahmed, A. D. (2024). Bee products and their processing: a review. *Pharmacy & Pharmacology International Journal*, 12(1), 5-12.
- [7] Bogdanov, S. (2011). Functional and biological properties of the bee products: a review. Bee Product Science. Retrieved form <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:37670040>
- [8] El-Seedi, H. R., Khalifa, S. A., Abd El-Wahed, A., Gao, R., Guo, Z., Tahir, H. E., Zhao, C., Du, M., Farag, M. A., Musharraf, S. G., Abbas, G. (2020). Honeybee products: An updated review of neurological actions. *Trends in Food Science & Technology*, 101, 17-27.
- [9] Oruç, H. H., Çaycı, M. (2021). Arı ürünleri ve biyolojik Etkileri. *Türkiye Klinikleri Veterinary Sciences-Pharmacology and Toxicology-Special Topics*, 7(1), 84-89.
- [10] Martinello, M., Mutinelli, F. (2021). Antioxidant activity in bee products: A review. *Antioxidants*, 10(1), 71.
- [11] Premratanachai, P., Chanchao, C. (2014). Review of the anticancer activities of bee products. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(5), 337-344.
- [12] Giampieri, F., Quiles, J. L., Cianciosi, D., Forbes-Hernández, T. Y., Orantes-Bermejo, F. J., Alvarez-Suarez, J. M., Battino, M. (2022). Bee products: An emblematic example of underutilized sources of bioactive compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(23), 6833-6848.

- [13] **Burucu, V.** (2022). Ürün Raporu: Arıcılık. *Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü*.
- [14] **Kalaycıoğlu, Z., Demir Kanbur, E., Kolaylı, S., Erim, F.B.** (2023). Antioxidant activities, aliphatic organic acid and sugar contents of Anatolian bee bread: characterization by principal component analysis. *European Food Research and Technology*, 249, 1351–1361.
- [15] **Aftab, J., Kalaycıoğlu, Z., Kolaylı, S., Erim, F.B.** (2021). Sample stacking-capillary electrophoretic determination of nitrate and nitrite contents as nitric oxide metabolites in kinds of honey originated from Anatolia. *Acta Alimentaria*, 50, 574-582.
- [16] **Kalaycıoğlu, Z., Kaygusuz, H., Döker, S., Kolaylı, S., Erim, F. B.** (2017). Characterization of Turkish honeybee pollens by principal component analysis based on their individual organic acids, sugars, minerals, and antioxidant activities. *LWT – Food Science and Technology*, 84, 402-408.
- [17] **Kalaycıoğlu, Z., Karadeniz, H.S., Erim, F.B.** (2021). Naturally occurring nitrate and nitrite in nutrients: determination in Anatolian honey-bee pollens by capillary electrophoresis. *AURUM Mühendislik ve Mimarlık Dergisi*, 5, 139-148.
- [18] **Kaygusuz, H., Tezcan, F., Erim, F. B., Yıldız, O., Şahin, H., Can, Z., Kolaylı, S.** (2016). Characterization of Anatolian honeys based on minerals, bioactive components and principal component analysis. *LWT-Food Science and Technology*, 68, 273-279.
- [19] **Alim, Ç.** (2019). *Propolis Örneklerinin Kafeik Asit Fenetil Ester İçeriklerinin Tayini ve Anti-İnflamatuvar Özelliklerinin İncelenmesi* (Yüksek Lisans Tezi). İstanbul Teknik Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [20] **Akay, M., Kalaycıoğlu, Z., Kolaylı, S., Erim, F. B.** (2021). Comparative determination of melittin by capillary electrophoretic methods. *Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry*, 8(4), 1211-1216.
- [21] **Silici, S.** (2019). Honeybee products and apitherapy. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 7(9), 1249-1262.
- [22] **Bilgiç, S.** (2023). *Arı Ürünlerinin Biyokimyasal Etkileri ve Faydaları, 1. Cilt*, Ankara.
- [23] **Li, Y., Miao, S., Tan, J., Zhang, Q., Chen, D. D. Y.** (2024). Capillary electrophoresis: A three-year literature review. *Analytical Chemistry*, 96(20), 7799-7816.
- [24] **Castro-Puyana, M., Herrero, M., Marina M. L.** (2022). *Capillary Electrophoresis in Food Analysis*. İspanya.
- [25] **Kalaycıoğlu, Z., Erim, F. B.** (2022). Capillary Electrophoresis in Food Analysis. *Capillary Electrophoresis: Basic principles*. Türkiye.
- [26] **Erim, F. B.** (2022). KİM 516 - Kapiler elektroforez teori ve uygulamaları, Yüksek lisans ders notları, İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya Bölümü, İstanbul, Türkiye.

- [27] Tagliaro, F., Manetto, G., Crivellente, F., Smith, F. P. (1998). A brief introduction to capillary electrophoresis. *Forensic Science International*, 92(2-3), 75-88.
- [28] Heiger, D. (2000). *High Performance Capillary Electrophoresis An Introduction*. Almanya.
- [29] Erim, F. B. (2006). Gıda Analizlerinde Yeni Bir Analitik Yöntem: Kapiler Elektroforez. *Türkiye 9. Gıda Kongresi*, Türkiye, 24-26 Mayıs 2006.
- [30] Voeten, R. L., Ventouri, I. K., Haselberg, R., Somsen, G. W. (2018). Capillary electrophoresis: trends and recent advances. *Analytical Chemistry*, 90(3), 1464-1481.
- [31] Li, S. F. Y. (1992). *Capillary electrophoresis: principles, practice and applications*. Hollanda.
- [32] Garza, S., Chang, S., Moini, M. (2007). Simplifying capillary electrophoresis–mass spectrometry operation: Eliminating capillary derivatization by using self-coating background electrolytes. *Journal of Chromatography A*, 1159(1-2), 14-21.
- [33] Swinney, K., Bornhop, D. J. (2000). Detection in capillary electrophoresis. *Electrophoresis: An International Journal*, 21(7), 1239-1250.
- [34] Voegel, P. D., Zhou, W., Baldwin, R. P. (1997). Integrated capillary electrophoresis/electrochemical detection with metal film electrodes directly deposited onto the capillary tip. *Analytical Chemistry*, 69(5), 951-957.
- [35] Skoog, D. A., Holler, F. J., Neiman, A. T. (1998). Enstrümantal Analiz İlkeleri, 206-213.
- [36] Ewing, A. G., Wallingford, R. A., Olefirowicz, T. M. (1989). Capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 61(4), 292A-303A.
- [37] Altria, K. D. (1999). Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A*, 856(1-2), 443-463.
- [38] Eşerler, S., Vardarlı, S., Savaş, G., Mutlu, C. (2023). Arı polenin bazı fiziksel, fonksiyonel ve kimyasal özellikleri ve biyolojik etkileri. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 23(2), 280-295.
- [39] Mutlu, G., Akbulut, D., Aydın, N. S., Mutlu, C. (2023). Fonksiyonel bir arıcılık ürünü olan arı sütünün bazı özellikleri ve sağlık üzerine etkileri. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 23(1), 138-152.
- [40] Ajibola, A. (2015). Physico-chemical and physiological values of honey and its importance as a functional food. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2(6), 1-9.
- [41] Kılıçoğlu, B., Kısmet, K., Koru, O., Tanyüksel, M., Oruç, M. T., Sorkun, K., Akkuş, M. A. (2006). The scolicidal effects of honey. *Advances in Therapy*, 23, 1077-1083.
- [42] Bergman, A., Yanai, J., Weiss, J., Bell, D., David, M. P. (1983). Acceleration of wound healing by topical application of honey: an animal model. *The American Journal of Surgery*, 145(3), 374-376.

- [43] Moniruzzaman, M., Khalil, M. I., Sulaiman, S. A., Gan, S. H. (2012). Advances in the analytical methods for determining the antioxidant properties of honey: A review. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 9(1), 36-42.
- [44] Biesalski, H. K., Dragsted, L. O., Elmadfa, I., Grossklaus, R., Müller, M., Schrenk, D., Walter, P., Weber, P. (2009). Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. *Nutrition*, 25(11-12), 1202-1205.
- [45] Gheldof, N., Wang, X. H., Engeseth, N. J. (2003). Buckwheat honey increases serum antioxidant capacity in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(5), 1500-1505.
- [46] Kumova, U. (2002). Önemli bir arı ürünü: Propolis. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 2(2), 10-24.
- [47] Bankova, V. (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1-2), 114-117.
- [48] Topal, E., Strant, M., Yücel, B., Kösoğlu, M., Margaoan, R., Dayioğlu, M. (2018). Ana ve erkek arı larvalarının biyokimyasal özellikleri ve apiterapötik kullanımı. *Hayvansal Üretim*, 59(2), 77-82.
- [49] Kogalniceanu, S., Lancrajan, I., Ardelean, G. (2010). Changes of the glucidic metabolism determined by the physical effort of the treatment with the Aslavital and Apilarnil. *Jurnal Medical Aradean*, 3, 33-41.
- [50] Altan, Ö., Yücel, B., Açıkgöz, Z., Şeremet, Ç., Kösoğlu, M., Turgan, N., Özgönül, A. M. (2013). Apilarnil reduces fear and advances sexual development in male broilers but has no effect on growth. *British Poultry Science*, 54(3), 355-361.
- [51] Meda, A., Lamien, C. E., Millogo, J., Romito, M., & Nacoulma, O. G. (2004). Therapeutic uses of honey and honeybee larvae in central Burkina Faso. *Journal of Ethnopharmacology*, 95(1), 103-107.
- [52] Metin, E., Koçyiğit, M. (2022). Tamamlayıcı ve Geleneksel Tıp. *Arı Ürünlerinden Apilarnil, Apiair ve Balmumunun Sağlığımız İçin Önemi*, 155-171. Türkiye.
- [53] Dobson, H. E., Peng, Y. S. (1997). Digestion of pollen components by larvae of the flower-specialist bee *Chelostoma florissomne* (Hymenoptera: Megachilidae). *Journal of Insect Physiology*, 43(1), 89-100.
- [54] Pernal, S. F., Currie, R. W. (2001). The influence of pollen quality on foraging behavior in honeybees (*Apis mellifera* L.). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 51, 53-68.
- [55] Silici, S. (2015). Arı poleni ve arı ekmeği. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 14(2), 99-105.
- [56] Kieliszek, M., Piwowarek, K., Kot, A. M., Błażej, S., Chlebowska-Śmigiel, A., Wolska, I. (2018). Pollen and bee bread as new health-oriented products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 71, 170-180.

- [57] Silva, T. M. S., Camara, C. A., da Silva Lins, A. C., Barbosa-Filho, J. M., da Silva, E. M. S., Freitas, B. M., dos Santos, F. D. A. R. (2006). Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6-7), 507-511.
- [58] Algethami, J. S., El-Wahed, A. A. A., Elashal, M. H., Ahmed, H. R., Elshafiey, E. H., Omar, E. M., Naggar, Y. A., Algethami, A. F., Shou, Q., Alsharif, S. M., Xu, B., Shehata, A. A., Guo, Z., Khalifa, S. A. M., Wang, K., El-Seedi, H. R. (2022). Bee pollen: Clinical trials and patent applications. *Nutrients*, 14(14), 2858.
- [59] Mohammad, S. M., Mahmud-Ab-Rashid, N. K., Zawawi, N. (2021). Stingless bee-collected pollen (bee bread): Chemical and microbiology properties and health benefits. *Molecules*, 26(4), 957.
- [60] DeGrandi-Hoffman, G., Eckholm, B. J., Huang, M. H. (2013). A comparison of bee bread made by Africanized and European honey bees (*Apis mellifera*) and its effects on hemolymph protein titers. *Apidologie*, 44, 52-63.
- [61] Altıntaş, L., Bektaş, N. (2018). Apiterapi: 1. Arı Zehri. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 19(1), 82-95.
- [62] Kelle, İ. (2007). Apiterapi. *Dicle Tıp Dergisi*, 34(4), 311-315.
- [63] Bogdanov, S. (2009). The Beeswax Book. *Beeswax: uses and trade*. Bee Product Science.
- [64] Bogdanov, S. (2004). Quality and standards of pollen and beeswax. *Apiacta*, 38(11), 334-341.
- [65] Hu, H., Bezabih, G., Feng, M., Wei, Q., Zhang, X., Wu, F., Meng, L., Fang, Y., Han, B., Ma, C., Li, J. (2019). In-depth proteome of the hypopharyngeal glands of honeybee workers reveals highly activated protein and energy metabolism in priming the secretion of royal jelly. *Molecular & Cellular Proteomics*, 18(4), 606-621.
- [66] Collazo, N., Carpena, M., Nuñez-Estevez, B., Otero, P., Simal-Gandara, J., Prieto, M. A. (2021). Health promoting properties of bee royal jelly: Food of the queens. *Nutrients*, 13, 543.
- [67] Mărgăoan, R., Mărghitaş, L. A., Dezmirean, D. S., Bobiş, O., Bonta, V., Cătănă, C., Urcan, A., Mureşan, C. I., Margin, M. G. (2017). Comparative study on quality parameters of royal jelly, apilarnil and queen bee larvae triturate. *Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science & Biotechnologies*, 74(1).
- [68] Schieber, M., Chandel, N. S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology*, 24(10), R453-R462.
- [69] Hajam, Y. A., Rani, R., Ganie, S. Y., Sheikh, T. A., Javaid, D., Qadri, S. S., Pramodh, S., Alsulimani, A., Alkhanani, M. F., Harakeh, S., Hussain, A., Haque, S., Reshi, M. S. (2022). Oxidative stress in human pathology and aging: molecular mechanisms and perspectives. *Cells*, 11(3), 552.

- [70] **Mendonça, J. D. S., Guimarães, R. D. C. A., Zorretto-Pinheiro, V. A., Fernandes, C. D. P., Marcelino, G., Bogo, D., Freitas K. C., Hiane, P. A., de Pádua Melo, E. S., Vilela, M. L. B., Nascimento, V. A. D.** (2022). Natural antioxidant evaluation: A review of detection methods. *Molecules*, 27(11), 3563.
- [71] **Munteanu, I. G., Apetrei, C.** (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 51(11), 22(7), 3380.
- [72] **Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M.** (1999). Analysis of Total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- [73] **Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., Lima, J. L.** (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 613(1), 1-19.
- [74] **Barrows, J. N., Jameson, G. B., Pope, M. T.** (1985). Structure of a heteropoly blue. The four-electron reduced β -12-molybdophosphate anion. *Journal of the American Chemical Society*, 107(6), 1771-1773.
- [75] **Wrasse-Sangoi, M., Secretti, L. T., Diefenbach, I. F., Rolim, C. M. B., Sangoi, M. D. S.** (2010). Development and validation of an UV spectrophotometric method for the determination of aliskiren in tablets. *Quimica Nova*, 33, 1330-1334.
- [76] **Gürel, A., Hızal J., Öztekin, N., Erim, F. B.** (2006). CE determination of carbohydrates using a dipeptide as separation electrolyte. *Chromatographia*, 64, 321-324.
- [77] **Daniele, G., Casabianca, H.** (2012). Sugar composition of French royal jelly for comparison with commercial and artificial sugar samples. *Food Chemistry*, 134(2), 1025-1029.
- [78] **Sesta, G.** (2006). Determination of sugars in royal jelly by HPLC. *Apidologie*, 37(1), 84-90.
- [79] **Zhu, Z., Zhang, Y., Wang, J., Li, X., Wang, W., Huang, Z.** (2019). Characterization of sugar composition in Chinese royal jelly by ion chromatography with pulsed amperometric detection. *Journal of Food Composition and Analysis*, 78, 101-107.
- [80] **Kim, E., Jang, M., Jeong, H., Kim, Y., Shin, Y., Park, J., Lee, J., Cho, S., Hwang, I., Shin, Y.** (2023). Changes in the chemical composition of royal jelly produced through artificial bee-feeding in response to seasonal variations during non-migratory beekeeping. *Journal of Food Composition and Analysis*, 115, 104982.
- [81] **Ecem Bayram, N., Çebi, N., Çelik, S., Gerçek, Y. C., Bayram, S., Tanuğur Samancı, A. E., Sağdıç, O., Özkök, A.** (2021). Turkish royal jelly: amino acid, physicochemical, antioxidant, multi-elemental, antibacterial and fingerprint profiles by analytical techniques combined with chemometrics. *Journal of Apicultural Research*, 60(5), 751-764.

- [82] Kolaylı, S., Şahin, H., Can, Z., Yıldız, O., Malkoç, M., Asadov, A. (2016). A member of complementary medicinal food: Anatolian royal jellies, their chemical compositions, and antioxidant properties. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 21(4), NP43-NP48.
- [83] Karadal, F., Yıldırım, Y. (2012). Balın kalite nitelikleri, beslenme ve sağlık açısından önemi. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 9(3).
- [84] Law, W. S., Zhao, J. H., Hauser, P. C., Yau Li, S. F. (2007). Capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection for low molecular weight organic acids in different samples. *Journal of Separation Science*, 30(18), 3247-3254.
- [85] Tůma, P., Samcová, E., Štulík, K. (2011). Determination of the spectrum of low molecular mass organic acids in urine by capillary electrophoresis with contactless conductivity and ultraviolet photometric detection - An efficient tool for monitoring of inborn metabolic disorders. *Analytica Chimica Acta*, 685(1), 84-90.
- [86] El-Attug, M. N., Lutumba, B., Hoogmartens, J., Adams, E., Van Schepdael, A. (2010). Method development and validation for trifluoroacetic acid determination by capillary electrophoresis in combination with capacitively coupled contactless conductivity detection (CE-C⁴D). *Talanta*, 83(2), 400-403.
- [87] Pont, L., Barbosa, J., Benavente, F. (2020). A rapid and simple method for the determination of organic acids in proteolytic enzymes by capillary electrophoresis with indirect ultraviolet detection. *Microchemical Journal*, 37(1), 158, 105204.



ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Ülkü Nida ÇOLAK

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2022, Marmara Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü (İstanbul Üniversitesi YÖK-TEBİP Programı)

YÜKSEK LİSANS TEZİNDEN TÜRETİLEN SUNUMLAR:

- **Çolak, Ü. N., Kalaycıoğlu, Z., Kolaylı, S., Erim, F. B.** (2023). “Anadolu Arı Sütlerinin Şeker ve Organik Asit İçeriklerinin Kapiler Elektrophorez ile Tayini”, Sözlü Sunum. *Kromatografi XXI. Kongresi*, 14-16 Haziran 2023, Aydın, Türkiye.
- **Çolak, Ü. N., Kalaycıoğlu, Z., Kolaylı, S., Erim, F. B.** (2023). “Evaluation of Antioxidant Activity and Total Phenolic Contents in Anatolian Royal Jelly”, Oral Presentation. *12th Aegean Analytical Chemistry Days*, 19-22 October 2023, İstanbul, Turkey.
- **Çolak, Ü. N., Kalaycıoğlu, Z., Öztekin, N., Kolaylı, S., Erim, F. B.** (2024). “Determination of Organic Acid Contents in Anatolian Royal Jellies by Capillary Electrophoresis-Contactless Conductivity Detector”, Oral Presentation. *II. International Apitherapy and Nature Congress*, 8-10 May 2024, Trabzon, Turkey.

