

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

**HPLC ANALİZİNDE ÇAKIŞAN PİK VEREN BİLEŞİKLERİN DAD, ON-LİNE
FRAP VE PEROKSİNİTRİTLE REAKSİYON KULLANILARAK AYIRT
EDİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimyager Ozan Emre EYUPOĞLU

HAZİRAN 2012
TRABZON

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**HPLC ANALİZİNDE ÇAKIŞAN PİK VEREN BİLEŞİKLERİN DAD, ON-LİNE
FRAP VE PEROKSİNİTRİTLE REAKSİYON KULLANILARAK AYIRT
EDİLMESİ**

Kimyager Ozan Emre EYUPOĞLU

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
"YÜKSEK LİSANS (KİMYA)"
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 25.05.2012
Tezin Savunma Tarihi : 13.06.2012**

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Murat KÜÇÜK

Trabzon 2012

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalında

Ozan Emre EYUPOĞLU tarafından hazırlanan

**HPLC ANALİZİNDE ÇAKIŞAN PİK VEREN BİLEŞİKLERİN DAD, ON-LİNE
FRAP VE PEROKSİNİTRİTLE REAKSİYON KULLANILARAK AYIRT
EDİLMESİ**

başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 29 / 05 / 2012 gün ve 1458 sayılı

kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI

Üye : Prof. Dr. Murat KÜÇÜK

Üye : Doç. Dr. Ahmet ALVER

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bitirme tezimi hazırlarken, başından sonuna kadar bana destek veren, yardımcı olan, sonsuz bilgi ve tecrübesiyle yol gösteren çok değerli hocam Prof. Dr. Murat KÜÇÜK' e sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım. HPLC' nin kullanımında bana yardımını esirgemeyen Gümüşhane Üniversitesi Araş. Gör. Nesibe ARSLAN BURNAZ'a ve her zaman her konuda beni destekleyen ve yanımda olan sevgili aileme teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Ozan Emre EYUPOĞLU
Trabzon 2012

TEZ BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “HPLC Analizinde Çakışan Pik Veren Bileşiklerin DAD, On-line FRAP ve Peroksinitritle Reaksiyon Kullanılarak Ayırt Edilmesi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Murat KÜÇÜK ‘ün sorumluluğunda tamamladığımı, verileri / örnekleri kendim topladığımı, deneyleri / analizleri Karadeniz Teknik Üniversitesi Kimya bölümü Biyokimya Laboratuvarında yaptığımı başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.25 / 05 /2012

Ozan Emre EYUPOĞLU

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ BEYANNAMESİ	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VII
SUMMARY	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar(ÇİZELGELER) DİZİNİ	XIV
SEMBOLLER DİZİNİ	XV
KISALTMALAR DİZİNİ.....	XVII
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Genel Bilgiler.....	2
1.1.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	7
1.1.1.1. HPLC Sistemi.....	10
1.1.1.1.1. HPLC’de Kullanılan Dedektörler ve Performans Özellikleri.....	13
1.1.1.2. HPLC’nin Sınıflandırılması	16
1.1.1.3. HPLC Kullanırken Alınması Gereken Önlemler.....	17
1.1.1.4. HPLC için Örnek Hazırlanması.....	26
1.1.1.5. Kromatogram.....	26
1.1.1.6. HPLC Uygulama Alanları	28
1.1.1.7. On-line HPLC ve Uygulamaları	29
1.1.2. HPLC’de Pik Çakışmalarının Temel Nedenleri	23
1.1.3. Dedektörlerin Çakışma Sorunlarına Getirdiği Çözümler.....	25
1.1.4. Türevlendirme.....	33
1.1.4.1. Peroksinitritle Reaktivite	26
1.1.5. Fenolik Bileşikler	27
1.1.5.1. Fenolik Bileşiklerin Önemi	28
1.1.5.2. Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması	29
1.1.5.3. Fenolik Bileşiklerin Gıda Kaynakları.....	30
1.1.5.4. Fenolik Bileşiklerin Elde Edilme Yöntemleri	32
1.1.5.5. Fenolik Bileşiklerin Antioksidan Özellikleri ve Sağlık Üzerine Etkileri.....	33

1.1.5.6. Fenolik Bileşiklerin HPLC ile Analizleri.....	35
1.1.6. Antioksidan Tayin Yöntemleri.....	36
1.1.6.1. FRAP (Demir (III) İndirgeme /Antioksidan Kuvvet) Yöntemi.....	37
1.1.6.2. On-line-HPLC-FRAP.....	38
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	40
2.1. Materyal ve Yöntem.....	47
2.1.1. Kullanılan Cihazlar.....	80
2.1.2. Kullanılan Kimyasallar.....	40
2.1.3. Standartlar ve HPLC Sıraları.....	42
2.1.4. HPLC-UV-DAD Koşulları.....	44
2.1.5. On-line -HPLC-FRAP Koşulları.....	45
2.1.6. Fenolik Asitlere Peroksinitrit ile Reaktivite Uygulaması.....	45
3. BULGULAR.....	47
3.1. DAD ile Çakışan Bileşen Analizi.....	47
3.2. UV ve DAD Veri Karşılaştırmalı Analizi ile Çakışan Pik Analizi.....	50
3.3. Karışımların Dalga Boyu Çakıştırmaları.....	52
3.4. Konsantrasyon Değişiminin Kromatogramlardaki Etkisi.....	55
3.5. Çakışan Bileşenlerin Peroksinitritle Dönüştürülmesiyle HPLC-DAD Analizi Sonucu Tayini.....	60
3.6. Pik Alanı ve Pik Yükseklikleri Oranları ile Konsantrasyonun İlişkisi.....	69
3.7. Karışım Halindeki Fenolik Asitlerin Bileşim Yüzdesi Heaplamları.....	73
4. SONUÇLAR, İRDELEME VE ÖNERİLER.....	80
5. KAYNAKLAR.....	82
ÖZGEÇMİŞ	

Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

HPLC Analizinde Çakışan Pik Veren Bileşiklerin DAD, On-line FRAP ve Peroksinitritle Reaksiyon Kullanılarak Ayırt Edilmesi

Ozan Emre EYUPOĞLU

Karadeniz Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Murat KÜÇÜK

2012, 87 Sayfa

Bu çalışmada, 16 fenolik asit standardı (rosmarinik asit, benzoik asit, *p*-OH benzoik asit, protokatekuik asit, protokatekualdehit, syringik asit, sinapik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, kafeik asit, gentisik asit, vanilik asit, vanilin, gallik asit, syringaldehyt, klorojenik asit) 25 °C’de, çözücü gradienti ve süre faktörleri değiştirilerek çakıştırıldılar. DAD ile çakışan bileşen analizleri yapıldıktan sonra fenolik asitlerin yerleri belirlendi. Aynı yerde pik veren fenolik asitlerin spektrum farklılıklarından ayırt edilmesi sağlandı. Çakışan pikler için farklı dalga boylarındaki absorbans oranlarına karşılık gelen yüzde bileşim grafikleri oluşturularak karışımdaki bileşimler bulundu. Fenolik asitlerin çakışma durumunda ayırdedilebilecekleri dalga boyları belirlendi ve standartların çakışmayacağı karışımlar hazırlandı, on-line FRAP’la 10 farklı konsantrasyonda antioksidan aktiviteler belirlendi. Klorojenik asit – *p*-OH benzoik asit ve vanilik asit – kafeik asit ikililerinin kalitatif ayrımı sadece klorojenik asit ve kafeik asitin aktif olması sayesinde 595 nm’de gerçekleşti. Vanilin – *p*-kumarik asit ikilisinin her ikisinin de aktivitesinin olmamasından dolayı bu yöntemle ayrımı gerçekleştirilemedi. Gentisik asit – protokatekualdehit ve ferulik asit – sinapik asit ikililerinde ise her iki bileşen de aktif olduğundan, 280 nm ve 595 nm’deki pik alanları oranlarından çizilen grafikler yardımıyla karışımdaki yüzde molar bileşimleri hesaplandı. Ayrıca standartlar, laboratuvarında sentezlenen peroksinitritle tek tek, off-line olarak hem pH 7.4’te hem de peroksinitritin 1 M HCl ile reaktivitesi durdurularak muamele edilip HPLC’de yürütüldüler ve fenolik asit pik kaybolması veya dönüşüme uğramasıyla da fenolik asitler ayırt edildiler.

Anahtar Kelimeler: DAD, On-line FRAP, Fenolik asit, HPLC, Peroksinitrit

Master Thesis
SUMMARY

In HPLC Analysis, Separated of Compounds, Given Overlapped Peaks Using DAD, On-line FRAP and Peroxynitrite Reaction

Ozan Emre EYUPOĞLU

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Chemistry Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Murat KÜÇÜK
2012, 87 Pages

In this study, 16 phenolic acids (rosmarinic acid, benzoic acid, *p*-OH benzoic acid, protocatechuic acid, protocatechualdehyde, syringic acid, synapic acid, *p*-cumarinic acid, ferulic acid, caffeic acid, gentisic acid, vanillic acid, vanillin, gallic acid, syringaldehyde, chlorogenic acid) were overlapped by changing solvent gradient and time at 25 °C. After the analysis of the overlapping peaks with DAD, the retention times of the phenolic acids were determined. The phenolic acids having overlapping peaks were resolved by spectral differences. For the overlapping phenolic acids, compositions were determined from the graphs of percentage composition versus absorbance ratios at selected wavelengths. The wavelengths at which resolution could be attained were determined, the standard mixtures with non-overlapping composition were prepared, and on-line FRAP activities of phenolic acids at ten different concentrations were determined. Qualitative separation of chlorogenic acid – *p*-OH benzoic acid and vanillic acid – caffeic acid pairs was realised from the peaks at 595 nm as only one was active, i.e. chlorogenic and caffeic acids. Vanillin – *p*-cumarinic acid pair could not be resolved as both were inactive. Because both components of gentisic acid – protocatechualdehyde and ferulic acid – synapic acid pairs were active, %molar compositions of these pairs were calculated from the graphs of ratios of peak areas at 280 and 595 nm versus component percentage. Additionally, standards were reacted with peroxynitrite separately at pH 7.4 and after inactivating peroxynitrite by premixing with 1 M HCl and then injected to HPLC system, and peaks were resolved based on reactivities towards peroxynitrite with peak disappearings and peak transitions.

Key Words: DAD, On-line FRAP, Fenolic acid, HPLC, Peroxynitrite

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Runge'nin çalışmasından bir kesit	3
Şekil 1.2. Goppelsroeder'in çalışmasından bir kesit.....	3
Şekil 1.3. Tswett'in 1906 yılı yayınındaki çizimleri. a) 2-3 mm genişliğinde ve 20-30 mm uzunluğunda 5 li kolondan oluşan aparat. b) Daha büyük hacimli örnekler için 1-3 cm genişliğinde ve 5-9 cm uzunluğunda kolondan oluşan aparat. c) Bitki pigmentlerinin ayrımı, burada kolon sabit fazı CaCO_3 , hareketli faz ise CS_2 'dir.	4
Şekil 1.4. HPLC cihazı iç ve dış görüntüsü	8
Şekil 1.5. Gaz ve Sıvı Kromatografi Teknikleri	9
Şekil 1.6. Üç bileşenli bir karışımın kromatografi sistemi ile etkileşiminin şematik olarak gösterimi.	9
Şekil 1.7. HPLC Sisteminin Basit Bir Şeması (1)Çözelti rezervuarı, (2) Çözelti pompası, (3) Gradient vana, (4) Mobil faz dağıtımının karışım kanalı, (5) Yüksek basınç pompası (6) Açık pozisyonda switch kapağı (6') Kapalı durumda switch kapağı, (7) Örnek Enjektörü, (8) Ön Kolon (9) Analitik kolon, (10) Dedektör (11) Kaydedici, (12) Atık toplayıcı. ...	10
Şekil 1.8. Pompa sisteminden iç ve dış görünüm	11
Şekil 1.9. Enjeksiyon portu ve sisteme enjeksiyon	12
Şekil 1.10. Analitik ve Preperatif Kolonlar	12
Şekil 1.11. İki ksantin'in ters faz kromatografisi ile ayrıştırılması.(a)'da analitik kolon, (b)'de preparatif kolon kullanılmıştır.	13
Şekil 1.12. Diyot serili dedektörün (DAD) şematik diyagramı	14
Şekil 1.13. Bir HPLC-MS enstrümanının yapısı	15
Şekil 1.14. Örnek Bir Normal faz kromatogramı	16
Şekil 1.15. Kompleks bir karışımın (parfüm) ters faz HPLC kromatografisi ile elde edilmiş kromatogramı.....	17
Şekil 1.16. t_R^1 ve t_R^2 değerleri her bir maddenin alıkonma zamanı.....	20
Şekil 1. 17. Kolon Kromatografisinde Molekül Büyüklüğüne Göre Ayrılma ve Alıkonma Zamanına Göre Oluşan Kromatogram	21
Şekil 1. 18. HPLC'nin uygulama alanlarından örnekler	22
Şekil 1.19. On-line enzim uygulaması sistem diyagramı	22

Şekil 1.20. Gradient çözücü değişimleriyle oluşturulmuş metotta 16 standart fenolik asidin çakışan pik kromotogramı (1) gallik asit, (2) protokatekuik asit, (3) gentisik asit, (4) protokatekulaldehit (5) klorogenik asit, (6) p-OH benzoik asit, (7) vanilik asit, (8) kafeik asit, (9)syringik asit, (10) vanilin, (11) p- kumarik asit, (12) syringaldehit, (13)ferulik asit, (14)sinapik asit, (15) rosmarinik asit, (16) benzoik asit.....	24
Şekil 1. 21. Bal numunesindeki 12 kinolon bileşğinin kromotogramı ve DAD spektrum analizleri.....	25
Şekil 1.22. Fenolik asitlerin genel yapısı: a) Benzoik asit türevleri b) Sinamik asit türevleri (Shahidi vd., 1995).....	29
Şekil 1.23. Flavonoidlerin genel yapısı	30
Şekil 1.24. Demir (III)'ün indirgenme reaksiyonu	37
Şekil 1.25. Online FRAP sistemi	39
Şekil 3.1. 1000 µM'lık 5 farklı fenolik asit karışımının 280 nm çakışma kromotogramı 1-gallik asit, 2-protokatekuik asit, 3-gentisik asit, 4-protokatekulaldehit, 5- klorogenik asit, 6-p-OH benzoik asit, 7-vanilik asit, 8-kafeik asit, 9-syringik asit, 10-vanilin, 11-p-kumarik asit, 12-syringaldehit, 13- ferulik asit, 14- Sinapik asit, 15-rosmarinik asit, 16- benzoik asit.....	47
Şekil 3.2. 1000 µM'lık 5 farklı fenolik asit karışımının 595 nm çakışma kromotogramı 1-gallik asit, 2-protokatekuik asit, 3-gentisik asit, 4-protokatekulaldehit, 5- klorogenik asit, 8-kafeik asit, 9-syringik asit, 12-syringaldehit, 13- ferulik asit, 14- Sinapik asit, 15-rosmarinik asit.....	47
Şekil 3.3. HPLC' de Yürüme numara sırasıyla 5 farklı fenolik asitin spektrum çakıştırılması (10-vanilin, 11-p-kumarik asit, 12-syringaldehit, 13-ferulik asit, 14-sinapik asit).....	50
Şekil 3.4. HPLC' de Yürüme numara sırasıyla 4 farklı fenolik asitin spektrum çakıştırılması (3- Gentisik asit (2,5-dihidroxy benzoik asit), 4- Protokatekulaldehit, 5- Klorogenik asit, 6- p-OH Benzoik asit).....	50
Şekil 3.5. HPLC' de Yürüme numara sırasıyla 3 farklı fenolik asitin spektrum çakıştırılması (7-vanilik asit, 8-kafeik asit, 9-syringik asit).....	51
Şekil 3.6. HPLC' de Yürüme numara sırasıyla 2 farklı fenolik asitin spektrum çakıştırılması (15-rozmarinik asit, 16- benzoik asit)	51
Şekil 3.7. HPLC' de Yürüme numara sırasıyla 7 farklı fenolik asitin DAD kromotogram çakıştırılması (9- syringik asit, 10-vanilin, 11-p-kumarik asit, 12-syringaldehit, 13- ferulik asit, 15-rozmarinik asit, 16- benzoik asit).....	51
Şekil 3.8. A seri karışımının çalışma için seçilen tüm dalga boylarındaki kromotogram çakıştırması	52
Şekil 3.9. B seri karışımının çalışma için seçilen tüm dalga boylarındaki kromotogram çakıştırması	53

Şekil 3.10. C seri karışımının çalışma için seçilen tüm dalga boylarındaki kromotogram çakıştırması	53
Şekil 3.11. D seri karışımının çalışma için seçilen tüm dalga boylarındaki kromotogram çakıştırması	53
Şekil 3.12. E seri karışımının çalışma için seçilen tüm dalga boylarındaki kromotogram çakıştırması	54
Şekil 3.13. A seri karışımının 280 nm’de 10 farklı konsantrasyon için kromotogram çakıştırılması	55
Şekil 3.14. B seri karışımının 280 nm’de 10 farklı konsantrasyon için kromotogram çakıştırılması	56
Şekil 3.15. C seri karışımının 280 nm’de 10 farklı konsantrasyon için kromotogram çakıştırılması	56
Şekil 3.16. D seri karışımının 280 nm’de 10 farklı konsantrasyon için kromotogram çakıştırılması	57
Şekil 3.17. E seri karışımının 280 nm’de 10 farklı konsantrasyon için kromotogram çakıştırılması	57
Şekil 3.18. A seri karışımının 595 nm’de 10 farklı konsantrasyon için kromotogram çakıştırılması	57
Şekil 3.19. B seri karışımının 595 nm’de 10 farklı konsantrasyon için kromotogram çakıştırılması	58
Şekil 3.20. C seri karışımının 595 nm’de 10 farklı konsantrasyon için kromotogram çakıştırılması	58
Şekil 3.21. D seri karışımının 595 nm’de 10 farklı konsantrasyon için kromotogram çakıştırılması	59
Şekil 3.22. E seri karışımının 595 nm’de 10 farklı konsantrasyon için kromotogram çakıştırılması	59
Şekil 3.23. Gallik asitin peroksinitritle 246 ve 280 nm’deki kör ve doğrudan uygulamalarla reaktivite karşılaştırılması kromotogramı	60
Şekil 3.24. Protokatekuik asitin peroksinitritle 246 ve 280 nm’deki kör ve doğrudan uygulamalarla reaktivite karşılaştırılması kromotogramı	60
Şekil 3.25. Protokatekulaldehitin peroksinitritle 246 ve 280 nm’deki kör ve doğrudan uygulamalarla reaktivite karşılaştırılması kromotogramı	61
Şekil 3.26. Gentisik asitin peroksinitritle 246 ve 280 nm’deki kör ve doğrudan uygulamalarla reaktivite karşılaştırılması kromotogramı	61
Şekil 3.27. Klorogenik asitin peroksinitritle 246 ve 280 nm’deki kör ve doğrudan uygulamalarla reaktivite karşılaştırılması kromotogramı	61
Şekil 3.28. p-OH benzoik asitin peroksinitritle 246 ve 280 nm’deki kör ve doğrudan uygulamalarla reaktivite karşılaştırılması kromotogramı	62

Şekil 3.29. Vanilik asitin peroksinitritle 246 ve 280 nm'deki kör ve doğrudan uygulamalarla reaktivite karşılaştırılması kromotogramı.....	62
Şekil 3.30. Kafeik asitin peroksinitritle 246 ve 280 nm'deki kör ve doğrudan uygulamalarla reaktivite karşılaştırılması kromotogramı.....	62
Şekil 3.31. Syringik asitin peroksinitritle 246 ve 280 nm'deki kör ve doğrudan uygulamalarla reaktivite karşılaştırılması kromotogramı.....	63
Şekil 3.32. Vanillinin peroksinitritle 246 ve 280 nm'deki kör ve doğrudan uygulamalarla reaktivite karşılaştırılması kromotogramı.....	63
Şekil 3.33. p-kumarik asitin peroksinitritle 246 ve 280 nm'deki kör ve doğrudan uygulamalarla reaktivite karşılaştırılması kromotogramı.....	63
Şekil 3.34. Syringaldehitin peroksinitritle 246 ve 280 nm'deki kör ve doğrudan uygulamalarla reaktivite karşılaştırılması kromotogramı.....	64
Şekil 3.35. Ferulik asitin peroksinitritle 246 ve 280 nm'deki kör ve doğrudan uygulamalarla reaktivite karşılaştırılması kromotogramı.....	64
Şekil 3.36. Sinapik asitin peroksinitritle 246 ve 280 nm'deki kör ve doğrudan uygulamalarla reaktivite karşılaştırılması kromotogramı.....	64
Şekil 3.37. Rosemarinik asitin peroksinitritle 246 ve 280 nm'deki kör ve doğrudan uygulamalarla reaktivite karşılaştırılması kromotogramı.....	65
Şekil 3.38. Benzoik asitin peroksinitritle 246 ve 280 nm'deki kör ve doğrudan uygulamalarla reaktivite karşılaştırılması kromotogramı.....	65
Şekil 3.39. Fenolik asitlerin 280 ve 595 nm dalga boyundaki ortalama pik yükseklikleri oranlarının 10 farklı konsantrasyona göre dağılım grafiği.....	69
Şekil 3.40. Fenolik asitlerin 280 ve 595 nm dalga boyundaki ortalama pik alanları oranlarının 10 farklı konsantrasyona göre dağılım grafiği.....	70
Şekil 3.41. Fenolik asitlerin maksimum dalga boyları ve 595 nm dalga boyundaki ortalama pik alanları oranlarının 10 farklı konsantrasyona göre dağılım grafiği.....	70
Şekil 3.42. Fenolik asitlerin 280 nm pik alanı –konsantrasyon grafiği.....	71
Şekil 3.43. Fenolik asitlerin 595 nm pik alanı –konsantrasyon grafiği.....	71
Şekil 3.44. Fenolik asitlerin λ_{max} pik alanı –konsantrasyon grafiği.....	71
Şekil 3.45. Protokatekulaldehit ve gentsik asidin spektrum çakıştırması.....	73
Şekil 3.46. Protokatekulaldehit ve gentsik asidin 280 ve 246 nm'lerdeki alanları oranına karşılık bileşim yüzdeleri grafiği.....	73
Şekil 3.47. Klorogenik asit ve p-OH benzoik asidin spektrum çakıştırması.....	74
Şekil 3.48. Klorogenik asit ve p-OH benzoik asidin 280 ve 260 nm'lerdeki alanları oranına karşılık bileşim yüzdeleri grafiği.....	74
Şekil 3.49. Vanilik asit ve kafeik asidin spektrum çakıştırması.....	75
Şekil 3.50. Vanilik asit ve kafeik asidin 308 ve 260 nm'lerdeki alanları oranına karşılık bileşim yüzdeleri grafiği.....	75
Şekil 3.51. Vanilin ve p-kumarik asidin spektrum çakıştırması.....	75

Şekil 3.52. Vanilin ve p-kumarik asidin 308 ve 246 nm’lerdeki alanları oranına karşılık bileşim yüzdeleri grafiği.....	76
Şekil 3.53. Gentisik asidin ve protokatekulaldehidin 280 ve 595 nm kromotogram çakışması.....	77
Şekil 3.54. Gentisik asidin ve protokatekulaldehidin 280 ve 595 nm alan oranlarına karşılık bileşim yüzdeleri grafiği.....	77
Şekil 3.55. Klorogenik asidin ve p-OH benzoik asidin 280 ve 595 nm kromotogram çakışması.....	77
Şekil 3.56. Vanilik asidin ve kafeik asidin 280 ve 595 nm kromotogram çakışması.....	78
Şekil 3.57. Vanilin ve p-kumarik asidin 280 nm kromotogramları.....	78
Şekil 3.58. Ferulik asit ve sinapik asidin 280 ve 595 nm kromotogram çakışması.....	78
Şekil 3.59. Ferulik asit ve sinapik asidin 280 ve 595 nm alan oranlarına karşılık bileşim yüzdeleri grafiği.....	79

TABLolar (ÇİZELGELER) DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1.1. HPLC Tarihi gelişim kronolojisi	5
Tablo 1.2. Ayırmayı Etkileyen Parametreler.....	9
Tablo 1.3. HPLC' de Olası Problemler ve Çözümleri (URL-4, 2012)	19
Tablo 1.4. Fenolik maddelerin elde edilme yöntemleri (Mangas vd., 1997; Lu ve Foo, 1997; De Sotillo vd., 1994; Madsen ve Betelsen, 1995; Chkikvishvili ve Gogiyo, 1995)	33
Tablo 1.5. On-line antioksidan denemelerinin karşılaştırılması	39
Tablo 2.1. Çalışmada kullanılan cihazlar.....	40
Tablo 2.2. Kimyasallar ve satın alındıkları firmalar	41
Tablo 2.3. Standart çözeltilerin ve kullanılan reaktiflerin hazırlanışları	40
Tablo 2.4. Çalışmada kullanılan fenolik bileşikler (HPLC alıkonma zamanı sırasına göre)	42
Tablo 2.5. HPLC elüsyon gradient programı.....	44
Tablo 2.6. HPLC yürüme sıra numaralarıyla verilmiş standart seri içerik ve adları	44
Tablo 2.7. HPLC yıkama için kullanılan program.....	45
Tablo 3.1. Fenolik asitlerin spektrumları.....	48
Tablo 3.2. Fenolik asitlerin dalga boyları	52
Tablo 3.3. Peroksinitritin Doğrudan (PN) Uygulanması	66
Tablo 3.4. Peroksinitritin Kör olarak (PNK) Uygulanması.....	67
Tablo 3.5. Fenolik asitlerin λ_{max} , 280 nm, 595nm'deki alanlarından konsantrasyon hesabı için katsayılar ($y=ax+b$; y: alan; x: konsantrasyon).....	72

SEMBOLLER DİZİNİ

β	Beta
g	Gram
kg	Kilogram
μ g	Mikrogram
μ L	Mikrolitre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
M	Molar
mM	Milimolar
nm	Nanometre
ppm	Parts per million
$^{\circ}$ C	Santigrad derece
cm	Santimetre
%	Yüzde

KISALTMALAR DİZİNİ

ABTS	2,2'- azino-bis -3 etil-benziazolin-6-sülfonik asit
β -PE	β - Phycoerytrine
BHA	Bütillenmiş hidroksi anisol
BHT	Bütillenmiş hidroksi toluen
CDD	Conductivity detector
CUPRAC	Cu (II) indirgenme antioksidan kapasite
DAD	Diode array detector
DPPH	2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl
ECD	Electro chemical detector
ELSD	Evaporative light scattering detector
FLD	Floresans dedektör
FRAP	Ferric reducing/antioxidant power
GC	Gaz kromatografisi
İTK	İnce tabaka kromatografi
NP-HPLC	Normal phase high performance liquid chromatography
ORAC	Oksijen radikali absorbans kapasitesi
PARS	poli- ADP-riboz sentaz
PDA	Photo diode array detector
PVP	Poli vinil prolidin
PES	Poli eter sülfan
RID	Refractive index detector
RP-HPLC	Reverse phase high performance liquid chromatography
SOD	Süper oksit dismutaz
TEAC	Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite
TBHQ	Tert-bütillidrokinon
TPTZ	2,4,6-tripiridil-S-triazin
t_R	Retention time
UV	Ultra violet

1. GİRİŞ

Günümüzde HPLC uygulamaları değişik sektörlerde ve bu sektörler içinde de değişik analizlerde kullanılarak kendine önemli bir yer edinmiştir. Bu analizlerde özellikle on-line HPLC uygulamaları dikkat çekmektedir. On-line uygulamalarda analizlerde sistem metodolojisi oluşturmak önem arz etmektedir. Yapılan analizler bu metodoloji üzerinden yürüyerek analizlerde hızlilik ve kolaylık sağlamaktadır. Bu açıdan çalışmada özellikle çakıştırma metodolojisi uygulandı. Bunun için daha çok gradient değişimlerinden yararlanıldı ve çakışan pikler, UV-DAD ile farklı fragment karışımlarının birbiriyle karşılaştırılması yoluyla aydınlatıldı. Bu durum farklı analizlerde oluşan karmaşık piklerin UV-DAD ile aydınlatılabileceğine ışık tutmaktadır. Ayrıca çalışmada analizlerde fenolik asitler kullanıldı. Çünkü antioksidan analizler oldukça yaygındır ve fenolik asitlerde antioksidan aktivite gösteren bileşik gruplarındandır. Bu açıdan antioksidan analizlerin on-line bir uygulaması olan on-line HPLC-FRAP, KTÜ kimya laboratuvarında geliştirildi ve farklı konsantrasyonlarda fenolik asitlerin antioksidan aktiviteleri pik yüksekliği ve pik alanlarına göre belirlendi. Çakışma metodolojisindeki ayırım ayrıca on-line HPLC-FRAP aktivitesi durumlarının UV-DAD analizi ile aydınlatılmasıyla da çözüme kavuşturuldu. HPLC analiz çalışmalarında analiz numunesi farklı çözücü şartlarında farklı bileşenlere dönüşebilmektedir. Bu da analizlerde ayırım güçlüğü sorununa neden olabilmektedir. Yapılan çalışmada, analizlerde olabilecek bu dönüşüm planlı olarak peroksinitritle off-line olarak reaktiviteyle gerçekleştirildi. Fenolik asitlerden bazıları farklı bileşiklere dönüşerek farklı alıkonma zamanlarında yeni bileşenler verdiler, bazıları da farklı bileşenlere dönüşmedi, normal alıkonma zamanında olması gerektiği yerde pik verdi. Dönüşen ve dönüşmeyenler DAD ile karşılaştırılarak belirlendi ve böylece analizlerde olabilecek dönüşümler için yeni bir metodoloji uygulanmış oldu. Karmaşık çakışmalarda MS dedektörle yapılan farklı kütle fragmentleri analizleri pahalı bir yol olduğu için DAD ile yapılabilecek ayırım alternatif ve daha ucuz bir yoldur.

1.1.Genel Bilgiler

1908 ve 2008 yılında gazeteler ve romanlarda öne çıkan bazı konular, aradan bir yüzyıl geçmesine rağmen değişmemiştir. Ancak geçen bu yüzyıl süresince hayatımızda önemli değişimlerin olduğu da aşikârdır. Kağından otomobile, buharlı trenlerden jetlere, çiftliklerden bütünleşmiş tesislere iksirlerden farmasötiklere, telgraftan radyo ve televizyona, hesap makinelerinden bilgisayar ve internete uzanan bir gelişim söz konusudur. Bu gelişim sürecinde bilim yalnızca teknolojiyi ve kullandığı aparatları değil yaşantımızdaki terim ve kuralları da değiştirmiştir (Anonim, 2007).

Bu dönüşüm ve ilerleme sürecinde ana argüman olarak kimya, kimyanın kullandığı argümanlardan da kromatografi ön plana çıkmaktadır. Bu bir asırlık periyot içerisinde kromatografi binlerce çeşit bileşiğin ekstraksiyonu, tanımlanması ve saflaştırılmasında kullanılmış ve 6 adet Nobel Kimya Ödülü direk olarak kromatografi çalışmalarına verilmiştir (Lesney,1998).

Bir asır öncesinde kimya ve özellikle organik kimya, kullanılan metotları ve bu konuda çalışan araştırmacı sayısı ile köklü bir saha haline gelmişti. Kimyanın temel konusu kimyasal reaksiyonları açıklığa kavuşturmak, saf maddeleri elde etmek, karmaşık organik bileşikleri yapısal bileşenlerine ayırmak ve bunları tekrar sentezlemek idi. Bu amaçla da ekstraksiyon ve kristalizasyon sıklıkla kullanılan yöntemler olmuşlardır. İncelenecek bileşikler izole etmek bilim olarak görülüyor ancak bunların reaksiyonları bilim olarak görülüyordu. Reaksiyona tabi tutulacak bileşikler için de en azından gram düzeyinde saf miktarların elde edilmesi gerekiyordu. Ancak incelenecek bileşenleri elde etmek oldukça zahmetli bir iş olup 35 mL çilek esansiyel yağı elde edebilmek için 6 yıl süren ve 30 ton çileğin kullanıldığı, portakal suyunun hoş koku bileşenlerini elde etmek amacıyla da 11356 litre meyve suyunun işlendiği çalışmalar literatürde mevcuttur. Bu ve benzeri durumların değişmesi için 1950'lerde gaz kromatografisinin ortaya çıkışını beklemek gerekmekteydi (Ettre, 2000).

Kromatografi tekniğini Mikhail Semenovich Tswett'in, kâğıt kromatografisi tekniğini ise Archer John Porter Martin'in geliştirdiği genellikle kabul görmüştür. Ancak kâğıdı teşhis amaçlı ilk kullanan Martin değildir.

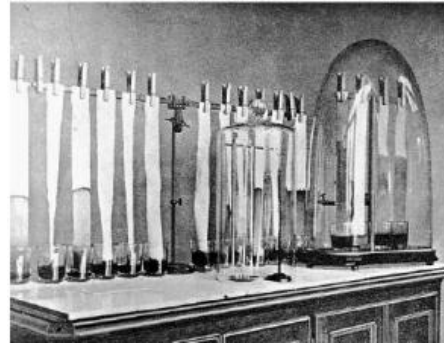
Romalılar yaklaşık 1900 yıl önce mor renkli bir balıktan elde ettikleri ve kaftanlarını boyamak amacıyla kullandıkları boya maddesinin kalite kontrolünü papirüs ile yapmaktaydılar (Ettre, 2001) (Tablo 1.1).

Alman fizikokimyacı Friedlieb Runge'nin 1850-1866 yılları arasında, katran türevi boyar maddeleri bir kâğıt veya bez üzerine damlatarak oluşan halkalardan faydalanıp her bir boyar maddeyi temsil eden bir desen oluşturmaya çalışması kâğıt kromatografisinin ilk örneklerinden biri sayılmaktadır (Williams, K.R. Colored Bands) (Şekil 1.1).

Ozon gazını da keşfeden Christian Friedrich Schoenbein 1861 yılında solüsyonlar içerisine daldırdığı filtre kâğıtlarında çözücülerin farklı hızlarda ilerlediğini gözlemlemiştir. Friedrich Goppelsroeder tekniği daha sonra boya, süt, yağ ve Şarap gibi örnekleri incelemek amacıyla kullanmıştır (Ettre, 2001) (Şekil 1.2).



Şekil 1.1. Runge'nin çalışmasından bir kesit

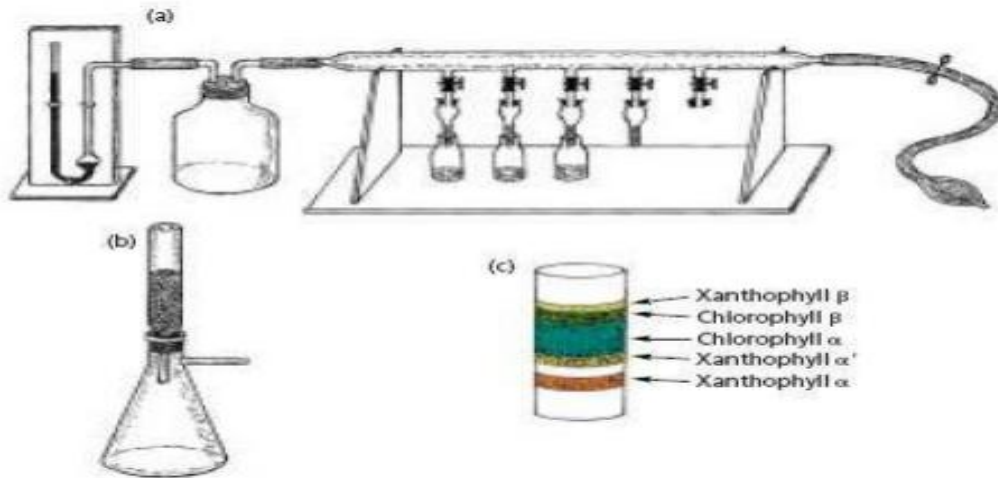


Şekil 1.2. Goppelsroeder'in çalışmasından bir kesit

Tswett klorofil üzerinde çalışırken farklı çözücülerin pigmentlerin ekstraksiyonunda farklı davrandıklarını görmüştür. Pigmentlerin etanol veya aseton ile rahatlıkla ekstrakte edilirken petrol eteri ve ligroin çözücülerinin bugün bizim karotenoidler diye adlandırdığımız pigmentleri ekstrakte ettiğini ama klorofili ekstrakte etmediğini belirler. Bu bilgi yeni olmamakla birlikte önceki araştırmacılar bunu pigmentin çözücü muamelesi ile yapısının değişmesi ile açıklamaktadır.

Tswett bu geleneksel görüşü reddedip pigmentlerin yaprak yüzeyine farklı moleküler bağlarla bağlandığı görüşünü (örneğin klorofilin) doğru bir biçimde farz eder. Yalnızca çözme gücü bu moleküler bağlardan büyük olan çözücüler pigmentleri ekstrakte edebilmektedir. Diğer taraftan ekstrakte edilen pigmentler için bu moleküler bağlar artık mevcut olmayıp pigment sonradan daha zayıf bir çözücü içerisinde çözünebilmektedir. Tswett bu görüşüyle adsorpsiyon olayını ve moleküler bağları doğru şekilde açıklamıştır. Bundan sonraki basamakta ise bitki dokularında gözlediği bu durumu taklit etmeyi dener. Etanol ile aldığı bitki ekstraktlarından etanolü uzaklaştırır ve kalan kısmı ligroin de çözer. Bu çözeltiyi filtre kâğıdına emdirir. Çözücü olarak ligroin ilavesiyle sadece karotenleri alabildiğini ancak etanol ilave ettiği zaman bütün pigmentlerin çözüldüğünü gözlemlemiştir.

Tswett tez çalışmasının devamı olarak pigmentlerin kâğıttan başka maddelerle de seçici olarak ayrılabilirliği üzerinde sistematik çalışmalarını sürdürmüştür. Bu amaçla 100 den fazla organik ve inorganik katı maddenin klorofil ile olan adsorpsiyon karakteristiklerini incelemiştir. En iyi sonuçları inülin, kalsiyum karbonat ve alumina ile elde etmiştir. Pigment içeren çözeltilerin ince tüp içerisine boşaltıldığında sarı ve yeşil bantların oluşmaya başladığını, daha fazla çözücü ilavesiyle bantların ayrılıp genişleyerek kolonda ilerlediğini ve bantların daha sonra farklı renk tonlarındaki bantlara ayrıldığını gözlemlemiştir(Şekil 1.3). Bu süreç kromatografik ayırım süreci olup Tswett ilk kez 1906 yılında kromatografi kelimesini kullanır. Kromatografi kelimesi Latince chroma (renk) ve graphein (yazmak) kelimelerinin birleşmesinden oluşmuştur ve kelimesi kelimesine tercümesi renk yazmaktır. Burada anlatılmak istenen ise kolonda ayrılan farklı renkteki bileşenlerin oluşturduğu bantların görüntüsüdür. Kromatografi kelimesi ile ilgili ilginç olan diğer bir nokta ise renk kelimesinin Rusçadaki karşılığı Tswett'dir (Anonim, 2007; Tswett,1906).



Şekil 1.3. Tswett'in 1906 yılı yayınındaki çizimleri. a) 2-3 mm genişliğinde ve 20-30 mm uzunluğunda 5 li kolondan oluşan aparat. b) Daha büyük hacimli örnekler için 1-3 cm genişliğinde ve 5-9 cm uzunluğunda kolondan oluşan aparat. c) Bitki pigmentlerinin ayrımı, burada kolon sabit fazı CaCO₃, hareketli faz ise CS₂'dir.

Tablo 1.1. HPLC Tarihi gelişim kronolojisi

1906	Mikhail SemenovichTswett (1872-1919) Calcium Carbonate, Petroleum Ether
1931	Kuhn ve Lederer
1938	Ismailov ve Schraiber
1940'lar	Consden, Gordon ve Martin Partisyon ve Kâğıt Kromatografisi
1950'ler	Stahl Gaz, İnce-Tabaka, Jel-Süzme ve Gradient Elution Kromatografisi
1960'lar	Ticari HPLC'ye giriş

Kromatografi tarihi yeni fazların, yeni dedeksiyon metotlarının, eski tekniklerin yeni uygulama alanlarının keşfini içine alan bir keşifler tarihidir. Genel anlamda kromatografi basit bir teknik olup temel dayanak noktası analitin sabit ve hareketli fazlarda farklı oranda dağılımıdır. Bu esnek ayırma ilkesi esnek ve çok yönlü olup 100 yıl boyunca ayırımı sağlayabilecek çeşitli ilkelerin keşfine, tekniğin hedef ve uygulama alanlarının genişlemesine yol açmıştır. Gelişim süresi içinde her basamak mantığını bir önceki basamaktan almıştır. Sıvı-katı adsorpsiyon kromatografisi ile başlayan süreci partisyon kromatografisi takip etmiştir. Kromatografi ayrıca kullanılan tekniğin kendi içerisinde de esneklikler sağlar. Hareketli fazın akışı gravite, basınç, kapiler aktivite ve elektroosmoz olabilir. Ayırma işlemi çeşitli sıcaklıklarda gerçekleşebilir ve analiz edilen bileşenler ultramikro düzeyden makro düzeye kadar değişebilir (Ettore, 2000).

Partisyon Kromatografisi, Kâğıt Kromatografisi, İnce Tabaka Kromatografisi (İTK), Gaz Kromatografisi, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) gibi kromatografi çeşitleri vardır.

Partisyon Kromatografisi temelleri, Archer John Porter Martin ve Richard Laurence Millington Syngé tarafından atıldı. İki araştırmacının temel amaçları yünde bulunan ve tekli amino ve karboksil grubu içeren aminoasitleri klasik ekstraksiyon teknikleri ile elde etmektir.

Kromatografisi tekniğinin detaylarını 1941 yılında açıkladılar. Kurutucu ajan olarak kullanılan silikajel destek fazına suyu sabit faz olarak emdirip % 0,5 etil alkollü kloroform çözeltisini hareketli faz olarak kullandılar. Metil oranj indikatörü ilavesi ile de kolonu terk eden amino asitleri kırmızı renkli bantlar olarak ayırdılar. Bu teknikteki yenilik Tswett'in ilk uyguladığı tekniğe ilave olarak hareketli fazın sürekli akışının sağlanması ve her bir bandın bireysel olarak toplanıyor olmasıydı.

Martin ve Syngé'nin çalışmasının önemli tarafı partisyon ilkesini ayırma işleminde temel alması böylelikle kromatografiyi doğrusal bir süreç haline getirip örnek

büyükliğünden bağımsız hale getirmesidir. Çok önemli bir özellik de sürekli akışın kullanıldığı bu teknikte kolonların tekrar kullanılabilir olmasıdır. Ayrıca kromatografi teorisine matematiksel bir açıklama getirip teorik plaka sayısı kavramını geliştirmişlerdir.

Dikarboksilli ve bazik aminoasitlerin separasyonu amacıyla sıvı-sıvı partiyon kromatografisinin geliştirilmesi arzusu kâğıt kromatografisinin ortaya çıkışındaki temel nedendir. Kolon kromatografisinde destek fazı olarak kullanılan silikajelin bu aminoasitler için çok aktif bir madde olduğu belirlenmiştir. Boya analizlerinde daha önce kullanılmış olan filtre kâğıdı Martin tarafından destek fazı olarak düşünüldü. Bu amaçla da filtre kâğıdına su emdirilmiştir. Martin'in ekibinin yeni üyesi A.H. Gordon aminoasitlerin kâğıt üzerinde renklenmesini sağlayan ninhidrin reaksiyonunu literatür araştırması sırasında bulduğu zaman kâğıt kromatografisinin esası ortaya çıkmış bulunuyordu. Bu yeni teknik 1943 yılında özet olarak yayınlanmıştır. İnce tabaka kromatografisi (İTK) kâğıt kromatografisi gibi bir düzlemsel kromatografi tekniğidir. Kâğıt kromatografisinde sabit faz olarak yalnızca selüloz kullanılabilirken İTK de çok çeşitli fazlar bu amaçla kullanılabilir. İTK yeni bir keşif olmayıp var olan tekniklerin geliştirilmesi ile ortaya çıkmıştır. İTK ile ilgili ilk sonuçlar 1938 yılında iki Ukrayna'lı bilim adamı N.A. Izmailov ve M.S. Shraiber tarafından yayınlanmıştır. Bu araştırmacılar farmasötik solüsyonları incelemek amacıyla önce kolon kromatografisi tekniğini deneyip analizin oldukça yavaş ilerlediğini görmüşlerdir. Daha sonra adsorbanları cam plakalar üzerine uygulayıp analiz edilecek örneğin bir damlasını plakalar üzerine ilave etmişler ve bunu çözücü uygulamasıyla geliştirmişlerdir. Kullandıkları tekniğe de spot kromatografisi adını vermişlerdir. İTK tekniğinin gerçek mucidi 1956 ve 1958 yılında yaptığı iki çalışması ile tekniğin geniş manada tanınması ve kabul görmesini sağlayan Egon Stahl olarak görülür. İTK'nın temel avantajı basit ve kolay uygulanabilir olması ve ayrıca çok sayıda örneği paralel olarak analize alabilme imkânı vermesidir (Ettre, 2000; Ettre, 2001). Martin ve Synge 1941 yılındaki sıvı-sıvı partiyon kromatografisi ile ilgili ilk yayınlarında bu tekniklerinde kullanılan hareketli fazın sıvı olduğunu ancak gaz halindeki örneklerin taşıyıcı gaz kullanılarak analiz edilebileceğini öngörmüşlerdir. Bu öngörü takip eden 10 yıl içerisinde kimsenin dikkatini çekmemiştir. Martin ve James 1950 yılında ilk olarak duyurdukları gaz-sıvı partiyon kromatografisinin detaylarını 1952 yılındaki yayınlarında açıklamışlardır. 1952 yılındaki ilk yayın diatome toprağına emdirilmiş stearik asitin sabit faz olarak, azot gazının hareketli faz olarak kullanıldığı uçucu yağ asitleri analizleri ile ilgili olup birkaç ay sonra diğer grup bileşenlerin analiz sonuçlarını yayınlamışlardır (Bartle ve Myers, 2002).

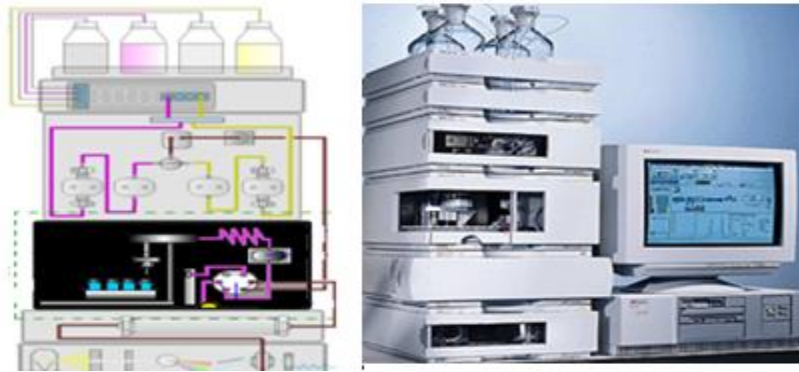
1.1.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

1950 li yıllarda klasik sıvı kromatografisi tekniği düşük tekrarlanabilirlik sağlayan ve analizcinin el becerisine dayalı bir teknik olup gaz-sıvı partiyon kromatografisi, kolonların tekrar kullanılabilmesi ve karmaşık donanım dizaynı ile ön plana çıkmaktaydı. Bu yıllarda sıvı kromatografisini temel alarak geliştirilen aminoasit analizörü ve steroid analizörü ise karmaşık sistemler olmasına rağmen sınırlı bir kullanım alanına sahipti. Sıvı kromatografisinin geri planda kalmasında hareketli fazın difüzyon hızının düşük olması temel neden idi. Eğer sıvı kromatografisi geliştirmek için daha küçük ve tekdüze partiküller elde etmek, daha kısa bir difüzyon yolu sağlamak ve hareketli fazın hızını artırmak gerekmektedir. Martin ve Syngge 1941 yılındaki yayınlarında bunu öngörmüşler ve 1960 lı yıllarda daha kesin bağımlılarla bu durumu ortaya koymuşlardı. 1960 lı yıllardan itibaren teorisi iyice olgunlaşan sıvı kromatografisi alanında ilk modern cihaz 1965 yılında Yale Üniversitesi'nde Csaba Horvath tarafından geliştirildi. Tekniğin kısa bir özetini 1966 yılında Nature dergisinde duyuran Horvath aynı yıl Uluslararası Kromatografi Sempozyumu'nda tekniğin detaylarını açıklamıştır. Horvath geliştirmiş olduğu cihaza bugün de evrensel olarak kullanılan "yüksek performanslı sıvı kromatografisi" adını vermiştir. Başlangıçta sıvı kromatografisinin hangi branşının hâkim olacağı pek belli değildi. Ancak zamanla apolar sabit fazların ve polar hareketli fazların kullanıldığı zıt faz kromatografisi ön plana çıkmıştır. Horvath zıt faz kromatografisi teorisini ortaya koyarken Kirkland silika partiküllerine uzun zincirli hidrokarbon ve diğer bir grup organik molekülleri kovalent bağ ile bağlayarak bağlı sabit fazların gelişimine öncülük etmiştir. 1971 yılında Kirkland ve Synder'in yayınladığı "Modern Practice of Liquid Chromatography" adlı kitap bu tekniğin anlaşılması ve yaygınlaşmasında önemli bir yere sahip olmuştur. Bugün yüksek performanslı sıvı kromatografisi tekniği gaz kromatografisi tekniğine üstünlük sağlamış ve en çok kullanılan analitik teknik olmuştur. 1999 yılı verilerine göre yılda 2,2 milyar dolarlık HPLC, 1 milyar dolarlık gaz kromatografisi cihazları satışı söz konusudur.

Gaz ve sıvı kromatografinin uygulama alanları farklıdır; ancak birçok bileşen her iki kromatografiyle de ayrılabilir (Şekil 1.5). Amaca uygun seçim yapılır. Kromatografiyle ayrılan maddelerle daha başka işlemler yapılacaksa bunların toplanması istenir. Toplama işleminde, Gaz kromatografisinde taşıyıcı faz gaz olduğundan, ortamdan hemen uzaklaşır ve saf madde uygun bir soğutma sistemiyle kolayca sıvı veya katı halde elde edilebilir. Sıvı kromatografisinde, taşıyıcı faz sıvı olduğundan, saf madde ile birlikte gelen taşıyıcı sıvının uzaklaştırılması için ek işlemler yapılmalıdır. Bu koşulda gaz kromatografisi tercih edilir.

Sıvı Kromatografi, ayrılacak bileşik ısıya karşı duyarlıysa veya büyük molekülüyse kullanılır. Bir sıvıda çözülmüş ayrılacak bileşenler, bir kolon içerisinde bulunan genellikle katı bir destek üzerindeki sabit faz ile farklı etkileşimlere girerek, kolon içinde değişik hızlarda ilerler. Kolonu değişik zamanlarda terk ederler ve böylece birbirlerinden ayrılırlar.

- ▶ Ayrılan bileşik, kolon çıkışına bağlanan uygun bir dedektörle tespit edilip miktarıyla orantılı olarak kaydedilir. Yüksek hızda gerçekleştirilen ayırmaların yapıldığı sıvı kromatografi sistemlerine, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) denir (Şekil 1.4).

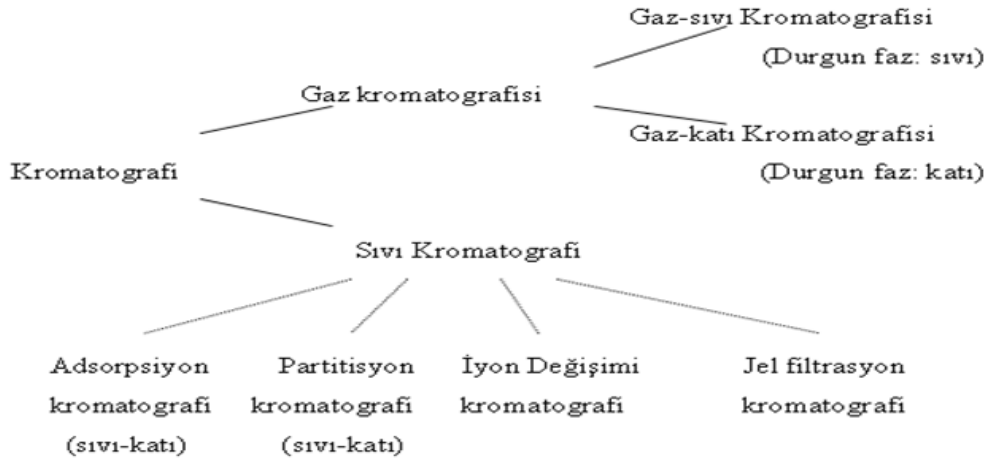


Şekil 1.4. HPLC cihazı iç ve dış görüntüsü

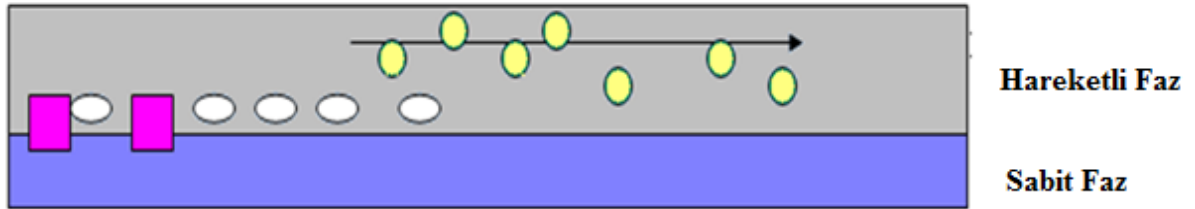
- ▶ HPLC, analitik kimya ve biyokimyada kullanılan, bileşiklerin kolonun durgun faz ile etkileşimi ve polarite farklarına dayanarak, bileşiklerin çözeltiden ayrılmasını ve ölçülmesini sağlayan bir kolon kromatografi türüdür (Tablo 1.2).
- ▶ HPLC, farklı çeşit durgun fazlardan (genelde, hidrofobik doymuş karbon zincirleri), hareketli faz(lar)ı hareket ettirerek kolondan bileşikleri geçiren bir pompadan ve bileşiğin niteliklerini ve alıkonma zamanını ölçen bir dedektörden yararlanır.
- ▶ Bileşiklerin alıkonma zamanları, durgun faz ile etkileşimlerinin gücüne, hareketli fazın akış hızına göre değişir.
- ▶ HPLC pompası, çok ufak tanecikli sabit fazın üzerinden yüksek basınçta hareketli fazın yürütülmesini sağlar.
- ▶ HPLC bu özellikleri ile sıradan kolon kromatografiden daha iyi bir ayırıştırmaı daha kısa kolonlar ile başarır.

Tablo 1.2. Ayırmayı Etkileyen Parametreler

Kolon ile ilgili	Hareketli fazla ilgili	Ölçüm ile ilgili	Örnek ile ilgili
Tür	Tür	Dedektör türü	Örnek derişimi
Boyut	Bileşim	Dalga boyu	Örnek hacmi
-	Akış hızı	-	-



Şekil 1.5. Gaz ve Sıvı Kromatografi Teknikleri



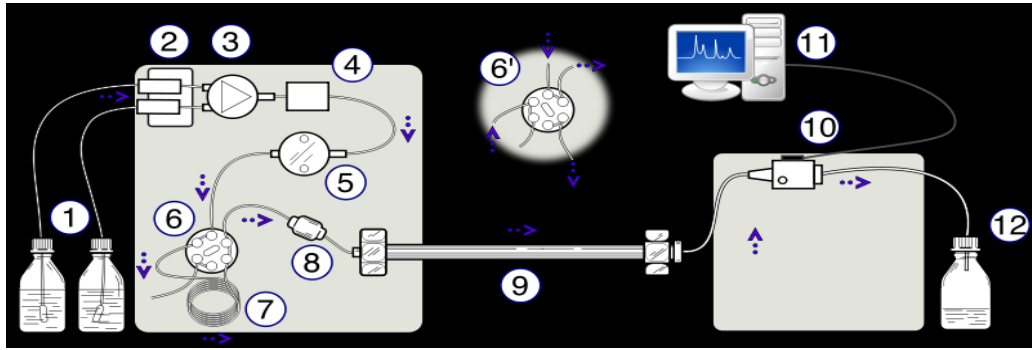
Şekil1.6. Üç bileşenli bir karışımın kromatografi sistemi ile etkileşiminin şematik olarak gösterimi.

Mobil fazla daha fazla etkileşen yuvarlak bileşen mobil fazla birlikte hareket etmektedir. Bu sebeple bu bileşen sistemden en çabuk çıkacaktır. Kare bileşen ise sabit fazla daha çok etkileşmektedir ve sistemde en uzun süre kalacak bileşen budur. Elips şekilli bileşenin ise mobil fazla etkileşimi yuvarlak kadar değildir ve bu nedenle yeşile nazaran daha uzun süre kromatografi sisteminde kalacaktır (Şekil 1.6).

1.1.1.1. HPLC Sistemi

HPLC aşağıdaki temel birimlerden oluşur (Şekil 1.7) :

- Hareketli / Taşıyıcı Faz Deposu
- Taşıyıcı Faz Hareket Birimi; Pompa(lar)
- Enjeksiyon (Örnek Yükleme) Birimi
- Ayırma Birimi; Kolon(lar)
- Degasser
- Ölçüm Birimi; Dedektör(ler)
- Yazım Birimi; kaydedici, İntegratör
- Atık Deposu



Şekil 1.7. HPLC Sisteminin Basit Bir Şeması

(1)Çözültü rezervuarı, (2) Çözültü pompası, (3) Gradient vana, (4) Mobil faz dağıtımının karışım kanalı, (5) Yüksek basınç pompası (6) Açık pozisyonda switch kapağı (6') Kapalı durumda switch kapağı, (7) Örnek Enjektörü, (8) Ön Kolon (9) Analitik kolon, (10) Dedektör (11) Kaydedici, (12) Atık toplayıcı.

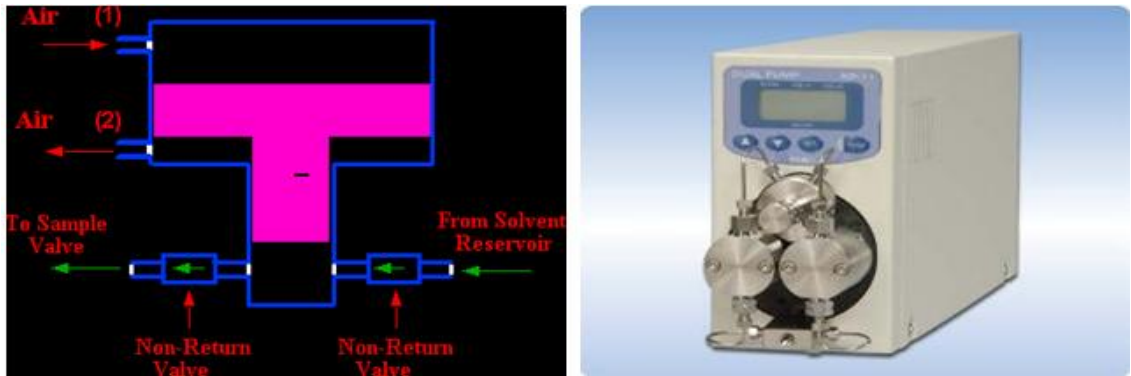
Ayrılmaya etki eden değişkenlerden bir tanesi hareketli fazdır. Hareketli faz farklı polaritede çözücü ya da çözücü karışımlarından oluşabilir ve HPLC'de rezervuar şişeleri içinde bulunur. İyi bir hareketli faz;

- Sabit fazın özelliklerini değiştirmemeli
- Örnekteki bileşenlerin hepsini çözmeli
- Düşük viskozitede olmalı
- Gerekğinde bileşenlerden kolayca ayrılabilmesi (kolayca buharlaşabilmesi)
- Kullanılan dedektöre uygun olmalı
- Ekonomik ve istenen saflıkta kolayca bulunabilir olmalıdır.

Pompa, hareketli fazı kaptan alıp sisteme verme görevini gerçekleştirmektedir. Pompa hareketli fazın istenen basınç ve akış hızında kromatografi sistemine verilmesini sağlamaktadır. Hareketli faz pompalama sistemi, vuruntusuz akış oluşturmak üzere çift pistonlu bir pompa içerir. Pistonların biri emerken diğeri bastığından sıvı kromatografi için çok önemli olan düzgün akış elde edilir.

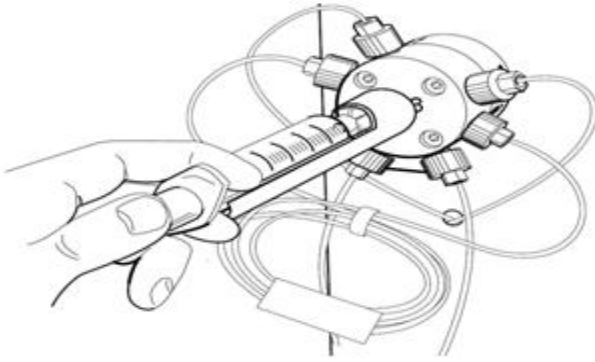
Eğer akış hızı düşük olursa karışım kromatografi sisteminde daha uzun süre tutulacak ve daha iyi bir ayırma sağlanacaktır. Ama bu durumda da çalışma süresi uzayacaktır. Bu sebeple optimum akış hızı sağlanmalıdır. Pompa sistemi eluentin; enjektör, kolon ve dedektör boyunca sürekli sabit akışının kontrolünü gerçekleştiren ünitelerdir (Şekil 1.8).

Akış hızına göre → Standart bore sistemleri, preparatif pompa sistemleri, Micro bore pompa sistemleri
 Pompanın yapıldığı malzemeye göre → metalik / ametalik
 Mobil faz iletme mekanizmasına göre → şırınga tip, piston pompa



Şekil 1.8. Pompa sisteminin iç ve dış görünümü

Enjeksiyon birimi, çözeltinin hareketli faza enjekte edilmesini sağlayan parçadır. Otomatik veya elle yapılmaktadır. Karışımı çözmekte kullanılan çözücü hareketli faz ile uyumlu olmalıdır. Polarlıkları yakın olmalı, çökme, bulanma olmamalıdır. Örneğin rahat yüklenmesi ve hareketli faz akışının enjeksiyondan etkilenmemesi için örnek çok uçlu bir vananın içerdiği kangala verilir. Vananın pozisyonu değiştirilerek hareketli fazın kangaldan geçmesi, dolayısıyla enjeksiyon sağlanır (Şekil 1.9).



Şekil 1.9. Enjeksiyon portu ve sisteme enjeksiyon

Kolon birimi ise, kromatografik ayırmanın gerçekleştiği HPLC parçasıdır. Kolonlar paslanmaz çelik veya kartuş şeklindedir. Analitik ya da preparatif amaçlı olabilirler (Şekil 1.10) (Şekil 1.11). Analitik kolonların içindeki dolgu maddeleri iki tiptir:

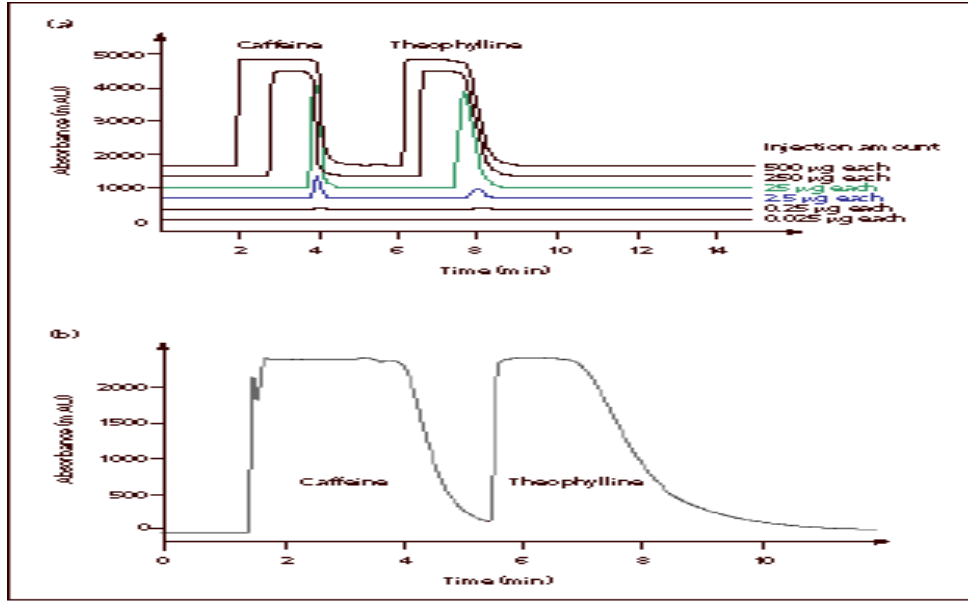
Poröz kolonlar: Bu tipteki kolonların içindeki dolgu maddesinin taneciklerinin çapı 3-10 μm arasında değişmektedir.

Periküler kolonlar: Bu kolonda ise ortada çekirdek adı verilen cam ya da polimerden yapılmış 30-40 μm çapında bir bölüm, bunun üstünde ise 1-3 μm kalınlığında bir film tabakası bulunmaktadır. Sabit fazı oluşturan madde bu film tabakasıdır.



Şekil 1.10. Analitik ve Preparatif Kolonlar

Preparatif kolonlar ise tek bir enjeksiyonda daha fazla madde ayrımı sağlamak için, daha geniş ve daha fazla dolgu maddesi içeren kolonlardır. Genellikle 6 mm çaplı 25-100 cm uzunluğunda kolonlardır.



Şekil 1.11. İki ksantin'in ters faz kromatografisi ile ayrıştırılması. (a)'da analitik kolon, (b)'de preparatif kolon kullanılmıştır.

Yüksek basınçta yapılan kromatografide, sisteme verilmeden önce, hareketli fazın içerisindeki çözülmüş gazlar uzaklaştırılmalıdır; aksi halde HPLC' de, hava, hareketli fazda, yüksek basınç altında çözüneceğinden, pompa başında veya dedektör hücrelerinde, doğru analize imkân vermeyen, hava kabarcıkları oluşur. Bu durum, dedektörden çok hatalı değerler alınmasına neden olur. Hareketli fazdan gaz uzaklaştırma işlemi ısıtma veya vakum uygulayarak olur. Vakum Uygulama işlemi degasser ile sağlanır. Degaze işlemi özellikle, gazların kolayca çözüldüğü su, alkol ve asetonitril veya bunların karışımı için gereklidir (URL-2, 2009).

1.1.1.1.1. HPLC'de Kullanılan Dedektörler ve Performans Özellikleri

Bir HPLC sisteminde kullanılabilen dedektörleri genel olarak seçici ve seçici olmayan dedektörler olarak ikiye ayırabiliriz:

Seçici dedektörler sadece belli maddelere cevap verirler. Örneğin floresans dedektörü sadece floresans özelliği olan maddeleri saptarlar.

Seçici olmayan dedektörler ise genel uygulamalı dedektörlerdir ve çok sayıda maddeyi saptayabilirler. HPLC donanımında olan dedektörler, örnek bileşenlerini tayin ederken ölçtükları fiziksel özelliklere göre sekiz çeşittir (URL-1, 2006).

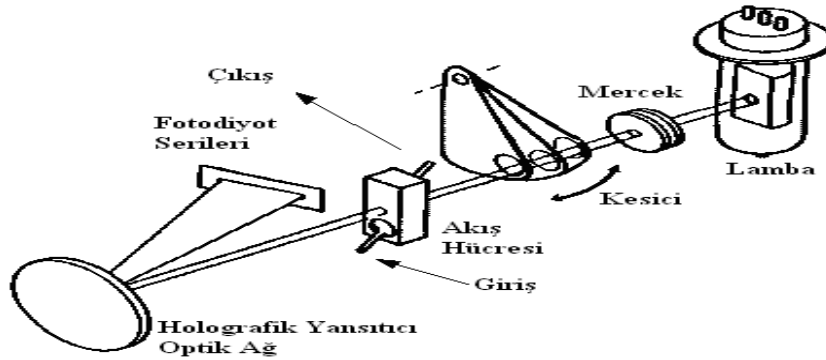
A) Ultraviole / Görünür Bölge Dedektörü (Ultraviolet / Visible dedector – UV / VIS): Lambert-Beer yasası geçerlidir.

Spektrum taraması yapmak, farklı dalga boyunda çalışmak veya dalga boyunu zamana karşı programlamak mümkündür. Pek çok organik molekül ve fonksiyonel grup 190 nm'den 800 nm'ye kadar olan ultraviyole (UV) ve/veya görünür (VIS) alanda elektromagnetik enerji absorplar. Çözeltiden sürekli olarak ışın geçerken analitler tarafından ışının bir kısmı absorbe edilebilir.

Bu gerçekleştiğinde geçen ışın bir prizmanın içinden geçtiğinde bir spektrum üretilir ve bu absorpsiyon spektrumu olarak adlandırılır. Bir enerji absorpsiyonunun sonucu olarak atomlar ve moleküller düşük enerjili seviyeden (başlangıç ya da temel hal) daha yüksek bir seviyeye (uyarılmış hal) geçer. Absorbe edilen elektromagnetik enerji uyarılmış ve temel haller arasındaki enerji farkına eşittir (Jaffé ve Orchin, 1964). Tipik UV-VIS spektrofotometre, bir ışık kaynağı, bir monokromator, bir dedeksiyon hücresi ve bir dedektör içerir.

Işık kaynağı genellikle spektrumun UV bölgesinde elektromagnetik enerjiyi yayan bir döteryum lambasıdır. İkinci bir ışık kaynağı olan tungsten lamba ise spektrumun VIS bölgesindeki dalga boyları için kullanılır.

B) Fotodiyot Array Dedektörü (Photodiode array detector: PDA veya DAD): UV-VIS dedektörden farkı, 512 elementten oluşan bir yüzeyde, her elementin ayrı bir dalga buyundaki absorbansı eş zamanlı olarak ölçebilmesidir. Bu sayede 3 boyutlu kromatogramlar almak ve istenilen her pikin çok hızlı spektrum taramasını görebilmek olasıdır. Ayrıca istenilen dalga boyu aralığında çalışılabilmesi bu dedektörün sağladığı bir diğer önemli avantajdır. Kullanılan ışık kaynağı döteryum veya tungsten lambadır (Şekil 1.12).



Şekil 1.12. Diyot serili dedektörün (DAD) şematik diyagramı

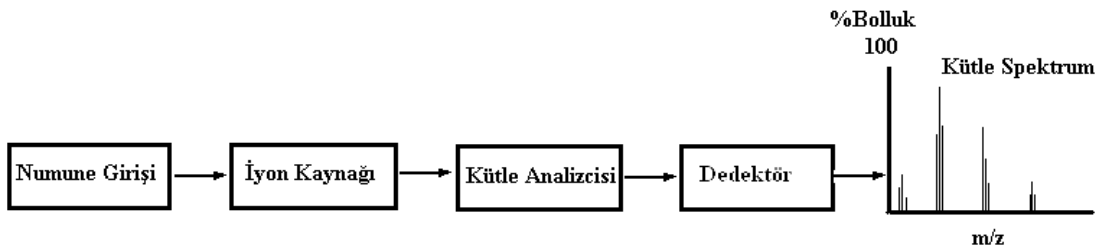
C) Floresans Dedektörü (Fluorescence dedector-FLD): Organik maddelerin yaklaşık %15'i floresans oluşturma yeteneğine sahiptir. Oluşan floresans ölçülmektedir. Kullanılan ışık kaynağı ksenon lamba olup, duyarlılığı uv/vıs dedektöre göre yaklaşık 10^3 kat fazladır.

D) İletkenlik Dedektörü (Conductivity dedector-CDD): İletkenlik ölçülür. Daha çok anyon ve katyon analizlerinde kullanılır. Sıcaklık kontrolü çok önemlidir bu sebeple kolon fırını içerisinde çalışmalıdır. Kullanılan mobil fazın iletkenliği ne denli düşük olursa oluşan gürültü de o denli düşük olur.

E) Refraktif İndeks Dedektörü (Refractive index dedector-RID): Kırılma indisi ölçülür. Sıcaklıktan etkilenir. Örnek bileşenlerinin bulunduğu ortamda yoğunluk artacağından gelen ışık kırılarak hücreyi terkeder. Işığın ölçülen kırılma oranından (kırılma indisi) kantitatif tayin yapılır.

F) Elektrokimyasal Dedektör (Electrochemical dedector-ECD): Elektroaktif maddeler analizlenebilir. Yani bileşenler, belirli potansiyel değerlerinde yükseltgenebilir veya indirgenebilir olmalıdır. Ölçülen fiziksel özellik tayin sırasında oluşan elektrik akımıdır.

G) Kütle Dedektörü (Mass dedector-MS): Yüksek-performanslı sıvı kromatografi-kütle spektrometri (HPLC-MS) oldukça çok yönlü bir enstrümantal tekniktir. HPLC-MS'in GC-MS'e nispeten başlıca avantajı çok daha geniş bir yelpazede bileşiklerin analizini gerçekleştirebilme kapasitesine sahip olmasıdır. Yüksek polarite gösteren veya yüksek molekül ağırlıklı termal olarak kararsız bileşikler hatta proteinler bile rutin şekilde HPLC-MS kullanılarak tamamen analiz edilebilirler. Örnek bileşenlerine ait çok özgün kromatogramlar elde edilir, dolayısıyla özellikle kalitatif tayinlerde teşhis amaçlı kullanımlarda çok önemli bir dedektördür. Temel enstrüman örnek girişi (bir sıvı kromatografisi), iyonlaşma bölümü, kütle analizcisi ve dedektör içerir (Şekil 1.13).



Şekil 1.13. Bir HPLC-MS enstrümanının yapısı

H) Evaporatif Işık Dağıtıcı Dedektör (Evaporative light scattering dedector-ELSD)

Detektörlerin performans özellikleri:

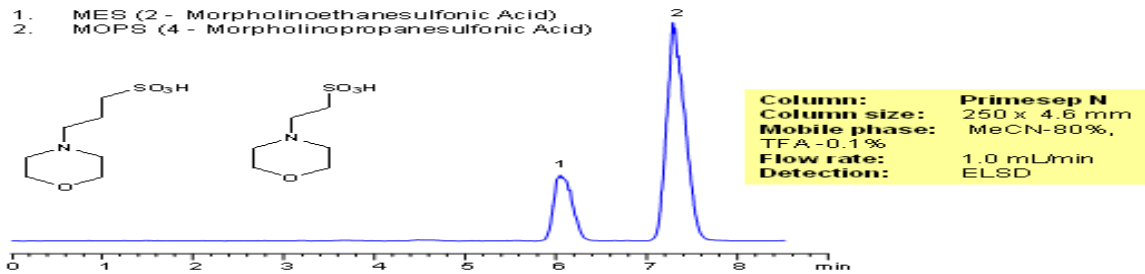
- Hassasiyet
- Seçicilik
- Lineerlik
- Kalitatif Bilgi
- Güvenilirlik
- Kullanım kolaylığı
- Üniversal olması

1.1.1.2. HPLC' nin Sınıflandırılması

HPLC' yi kolon içinde gerçekleşen ayırma mekanizmalarına göre şu şekilde sınıflandırabiliriz:

- Normal faz kromatografisi *
- Ters faz kromatografisi *
- Yer değiştirme kromatografisi
- Büyüklük harici kromatografi
- İyon değişimi kromatografisi
- Biyoafinite kromatografisi

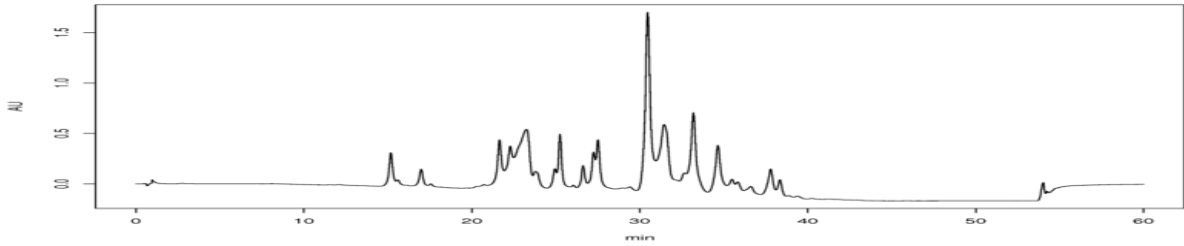
Normal faz kromatografisi: Maddelerin sabit fazda farklı güçte adsorplanması prensibi ile çalışan kromatografi türüdür (Şekil 1.14). Sabit faz polar bir katıdır ve en çok silika jel kullanılmaktadır. Hareketli faz olarak ise apolar çözücülerden faydalanılmaktadır. Örneğin, heksan, eter, bu kromatografi türünde apolar çözücülerde çözünen maddeler ayrılabilir.



Şekil 1.14. Örnek Bir Normal faz kromatogramı

Dezavantajları: Normal faz kromatografide, sıvı fazın kontrolü çok önemli ve kritiktir. Hareketli faz bileşimindeki küçük değişiklikler kromatogramda belirgin farklılıklara neden olabilir. Dengeye ulaşma normal faz kromatografisinde çok yavaştır ve ayrıca polar maddenin de elüsyonu çok yavaştır, yayvan pikler oluşur. Apolar çözücüler çok pahalıdır ve onları nemden uzak tutmak zordur. (URL-3, 2011).

Ters faz kromatografisi: Sabit faz apolar yapıdadır ve hareketli faz polar çözücülerdir (su, alkol). Burada, karışım bileşenlerinin farklı hızlarda geç etmeleri maddelerin sıvı sabit faz ve sıvı hareketli faz arasındaki farklı dağılımına dayanır (Şekil 1.15).Sıvı sabit faz çok ince taneli destek katısının yüzeyine çok ince bir film halinde kaplanmıştır. En çok bilinen sabit fazlar C₈ (oktil silan, -(CH₂)₇-CH₃) ve C₁₈ (oktadesil silan, -(CH₂)₁₇-CH₃) adıyla bilinen yapılarıdır. Bu teknikte suda ve alkolde çözünen maddeler ayrılabilir.



Şekil 1.15. Kompleks bir karışımın (parfüm) ters faz HPLC kromatografisi ile elde edilmiş kromatogramı.

1.1.1.3. HPLC Kullanırken Alınması Gereken Önlemler

A) Hareketli faz çözücülerini için önlemler:

Farklı dolgulu kolonlar için çözücü sınırlaması: Silika dolgulu bir kolon kullanıldığında, kullanılan hareketli fazın pH'ına dikkat edilmelidir. Uygun pH aralığı 2- 7.5 arasındadır.

Gözenekli polimere sahip bir kolonun çözücüsünü değiştirirken, kolon maddesinde şişme veya büzülme olup olmadığına dikkat edilmelidir. Dolgu maddesinin şişmesi, su yüzdesiyle artar. Asit, baz, tuz veya iyon çifti kullanıldıktan sonra kolon, metanol / su karışımı ile temizlenmelidir.

Çözücünün saflığı: HPLC' de kullanım için mümkün olan en yüksek saflıkta bir çözücü önerilir.

Çözücünün degaze edilmesi: HPLC' de, eğer hava, hareketli fazda, yüksek basınç altında çözünürse, pompa başında veya dedektör hücresinde, doğru analize imkân vermeyen, hava

kabarcıkları oluşur. Bu yüzden mobil faz olarak kullanılan çözücü tamamen degaze edilmelidir.

Çözücünün süzülmesi: HPLC çözeltileri, kullanılmadan önce daima süzülmalıdır. Eğer süzülmeden kullanılırlarsa, kolon filtresi ve kolon başı tıkanabilir. Bunun sonucunda duyarlılığın azalması, basıncın artması ve kolon ömrünün azalması gibi değişik problemler ortaya çıkabilir.

Çözücülerin değişimi: Eğer çözücü değiştirilecek olursa, diğer çözelti ilkiyle iyi karışabilir olmalıdır. Bu durum yalnızca pompanın düzensiz çalışmasına yol açmaz, aynı zamanda kolon ve dedektörü de kararsız hale getirir. Bir tampon kullanıldıktan hemen sonra organik bir çözücü kullanılırsa, HPLC sistemi tuzların çökmesi yüzünden çalışamaz hale gelir. Organik çözücü kullanılmadan önce sistem su veya ara polaritede bir çözücü ile temizlenmelidir.

B) Kolon kullanımı için önlemler:

Kolon seçimi: Örneğin molekül kütlesi, solvent sisteminin çözünürlüğü, ayırma modu gibi bilgiler performanslı bir ayırmadan önce kolon seçimine yardım eder.

Ön-kolon kullanımı: Hareketli faz, pompa çıkışından sonra, ayırmayı sağlayan kolon ile aynı sabit fazı içeren bir ön-kolondan geçirilir. Bu uygulamanın amacı, hareketli fazdaki safsızlıkları toplamak ve hareketli fazı sabit faz ile doygunluğa getirmektir.

Kolon tabakasının bozulması: HPLC sistemi çalıştırılmaya başlanınca akış hızı yavaş yavaş artırılmalıdır. Aynı uygulama sistem kapatılırken de izlenmelidir. Böylece kolon tabakasının bozulmaksızın kolon basıncının artması sağlanır.

Kolonun korunması: Kolonlar rutubetli ve çok yüksek veya çok düşük sıcaklıkların olduğu yerlerde saklanmamalıdır. Kolonların özel bir çözücü ile saklanması, kirlenmeyi azaltır ve kolon ömrünü artırır.

Kolonun rejenerasyonu (yenilenmesi): Kolon performansı azaldığında en iyisi kolonu rejenere etmektir. Normal faz kolonları kullanıldığında, kolon önce çok az polarlıkta bir çözücü geçirilerek yenilenebilir ve sonra tekrar hareketli fazla dengeye getirilir.

C) Dedeksiyon sisteminin korunması için önlemler:

Dedeksiyon hücresinde gaz kabarcıkları oluşursa, tayinde problemler ortaya çıkar. Gaz kabarcığının oluşumunu önlemek için şu önlemler alınmalıdır:

- Sistemde sızıntı olmamalıdır.
- Solvent HPLC sisteminde kullanılmadan önce degaze edilmelidir.

- Eter, pentan gibi uçucu solventler sistemde buharlaşacağından, bunları kullanmaktan kaçınılmalıdır.

Tablo 1.3. HPLC' de Olası Problemler ve Çözümleri (URL-4, 2012)

Problem	Problemin Sebebi	Çözüm
Basıncın artması	Giriş kılcal boruları tıkalı / kolon tıkalı / dedektör hücresi tıkalı (mekanik kirlenme, enjektör valfinde rotor piston aşınması, pompa contalarında aşınma)	Tıkanmanın olduğu yer tespiti (pompa çalışırken pompa ile dedektör arası tüm vida bağlantıları açılır.), süzgeç / filtre değiştirilmesi
Çözünürlüğün azalması / düşük ayırım	Kolon güçlü şekilde alıkonan madde ile kirlenmiş, basınç ve mekanik etkilerle kolon dolgu maddesinde kanallar oluşmuş	Kolonun çözücü ile iyice yıkanıp temizlenmesi / yeni kolon alınması
Kolonun ayırım performansının değişkenlik göstermesi	Kolon aşırı yüklenmiştir. Kütleli yüklenbilirlik sınırı: 100 µg / g durgun faz. Hacimsel yüklenbilirlik sınırı: 50 µL / g durgun faz.	Enjeksiyon valfi değiştirilmeli, Küçük miktarda enjeksiyon yapılmalı.
Parçalı / bölünmüş pikler	Kolonda kirlilik mevcuttur.	Kolon çözücü ile iyice yıkanıp temizlenmelidir.
Pik genişliğinin fazla olması	Mobil fazın pH' sı örneğin alıkonma süresini etkiler.	Uç pH' larda çalışılmamalı.
Hayalet pikler: örnek enjekte edilmediği halde görünen pikler	Mobil faz kirliliği var.	Gradient saflıkta mobil faz kullanılmalı.
Pik çakışması	Numunenin çözündüğü çözücünün gücü hareketli fazın gücünden çok büyüktür, diğer bir sebep ise kolon girişindeki ölü hacimdir.	Farklı çözücü gradienti ile farklı metod oluşturularak ayırım sağlanabilir.
Piklerde asimetri ve kuyruklanma	Kolona aşırı yükleme, ağır metal, artık maddelerin etkisi	Kolonun çözücü ile iyice yıkanıp temizlenmesi /yeni kolon alınması

1.1.1.4. HPLC İçin rnek Hazırlanması

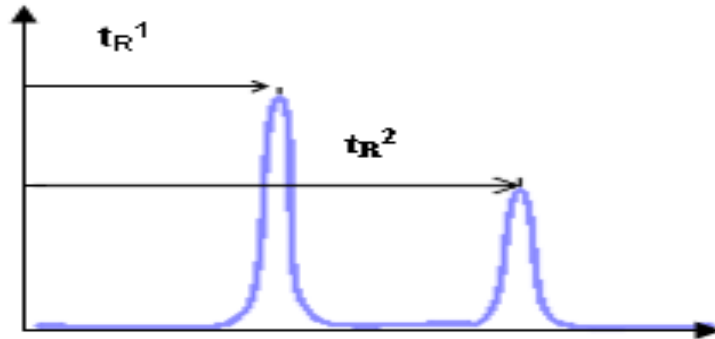
Katı rnekler: Bir rneği HPLC sistemine vermek için, bu örneğin, hareketli faz olarak kullanılan zcde znmesi gerekir. Örneğin, metanol/su karışımı bir hareketli fazla ile analiz yapılacaksa, örnek metanolde, suda veya metanol/su karışımında zlmelidir. rnek bileşenlerinin, mobil faz zcsnde okmemesine de dikkat edilmelidir.

Sıvı rnekler: Sıvı örneklerde üzücü, sistem ile uyumluysa, doğrudan enjekte edilebilir. Eğer rnekler istenen zcde değillerse veya enjekte edilecek kadar derişik değillerse, kurutulmalıdır veya deriştirilmelidir. Daha sonra hareketli fazda tekrar znmelidir.

Örneklerin süzülmesi: Hareketli faz akışında azalmaya, geri basıncında artmaya, kolon veriminde azalmaya ve istenmeyen piklere neden olabilecek znmeyen maddelerin kolona girmesini önlemek için, örneğin enjeksiyondan önce süzülmesi tavsiye edilir.

1.1.1.5. Kromatogram

Dedektörden madde geçtiğinde sonuç olarak kromatogram adı verilen grafikleri elde ederiz. Dedektörden geçen her bir madde kromatogramda bir pik olarak gözlenecektir.

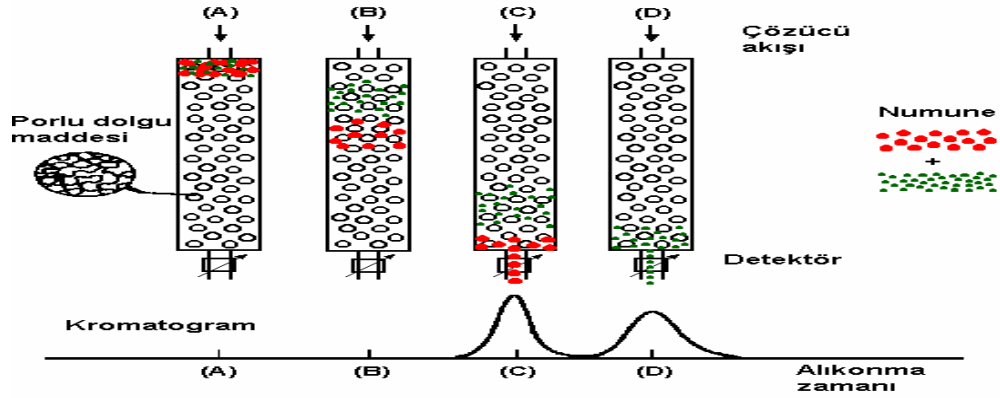


şekil 1.16. t_R^1 ve t_R^2 değerleri her bir maddenin alıkonma zamanı

Alıkonma zamanı, Retention Time (t_R); rnek bileşenlerin kolona girişinden (rneğin enjeksiyonundan) kolondan çıkışına kadar (dedektöre ulaşması) gerekli olan süredir (şekil 1.17). Kromatogramdaki pikler dışında kalan kısımlar hareketli fazı göstermektedir ve “baseline” adını almaktadır. Bazı hallerde alıkonma zamanı yerine alıkonma hacmi de kullanılmaktadır. Bu durumda okuduğumuz değer maddenin, hareketli fazın kaçıncı mililitresinde kolondan çıktığını göstermektedir. Piklerin kapladıkları alanlar maddelerin miktarları ile orantılıdır (şekil 1.16).

Alıkonma zamanına,

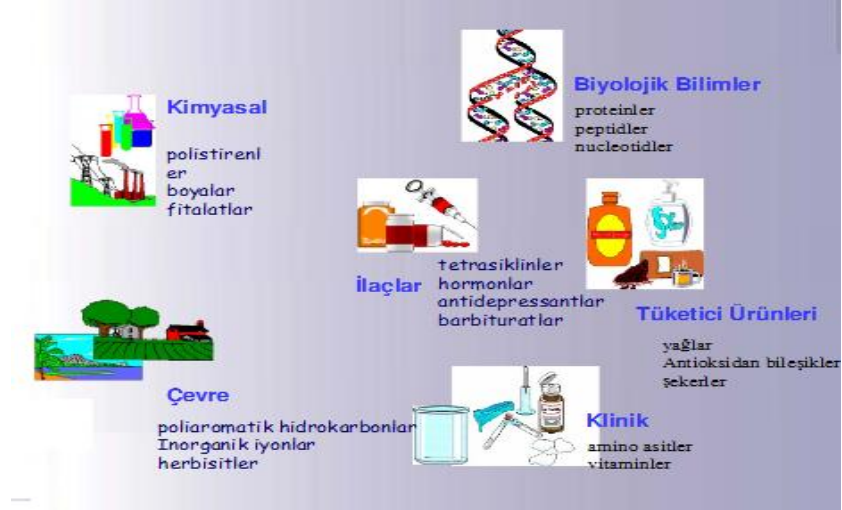
- Hareketli fazın cinsi,
- Sabit fazın cinsi ve tanecik büyüklüğü,
- Sıcaklık,
- Kolon boyutları,
- Hareketli fazın akış hızı, etki etmektedir.



Şekil 1. 17. Kolon Kromatografisinde Molekül Büyüklüğüne Göre Ayrılma ve Alıkonma Zamanına Göre Oluşan Kromatogram

1.1.1.6. HPLC Uygulama Alanları

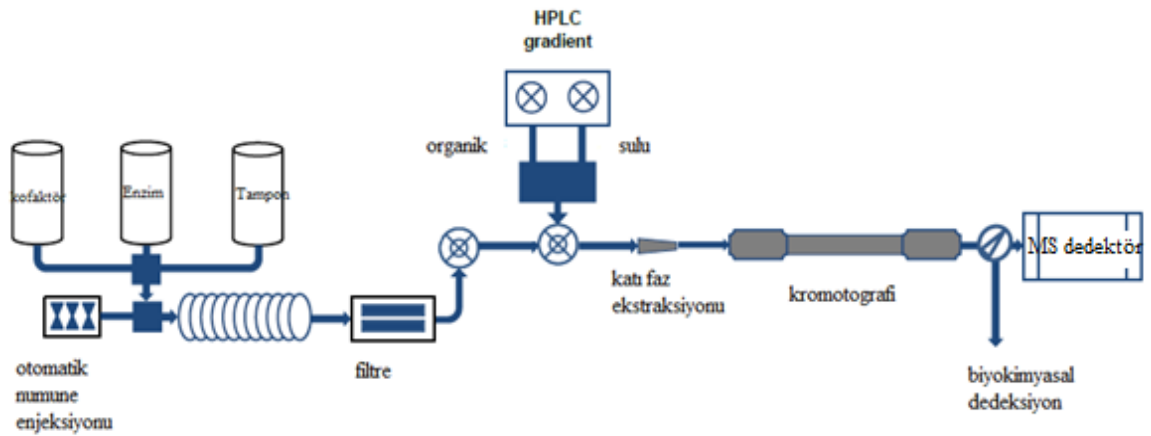
HPLC, ilaç ve biyoteknoloji endüstrisi, çevre ve arıtma analizleri, adli tıp, petrokimya analizleri, gıda, kozmetik ve vitamin analizleri yanında, protein ve nükleik asit analizleri de dahil olmak üzere geniş bir uygulama yelpazesine sahiptir (Şekil 1.18). Ayrıca iz (eser) miktarda madde tayinlerinde örneğin fındıkta aflotoksin tayini, idrarda uyuşturucu tayini, atık sularda ağır metal tayini gibi birçok analiz kolunda etkin ve kullanışlı bir analiz, saflaştırma ve ayırım tekniğidir.



Şekil 1. 18. HPLC'nin uygulama alanlarından örnekler

1.1.1.7. On-line HPLC ve Uygulamaları

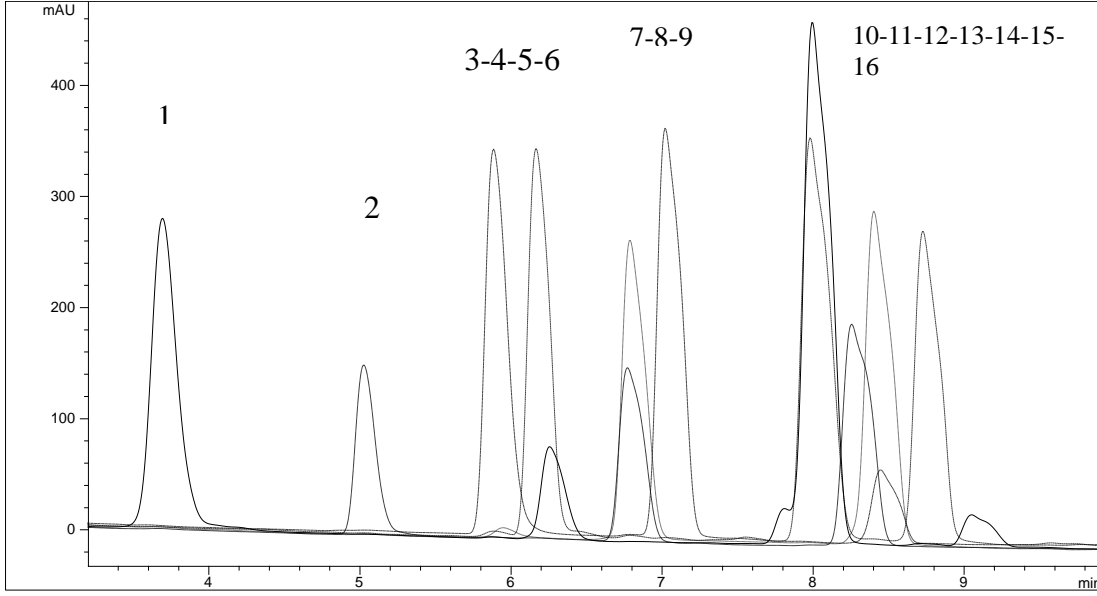
HPLC sistemine on-line uygulamalar, akış sistemi devam ederken sistemin tubinglerle bağlantılı olarak ek şırınga sistemleri ya da ek donanımlarla (örneğin ek dedektör sistemi (MS gibi)) desteklendiği ve herhangi bir kimyasal reaksiyonun sistem içinde gerçekleştiği kombine uygulamalardır. Bu şekilde on-line antioksidan ve enzim uygulamaları mevcuttur (Şekil 1.19).



Şekil 1.19. On-line enzim uygulaması sistem diyagramı

1.1.2. HPLC’de Pik Çakışmalarının Temel Nedenleri

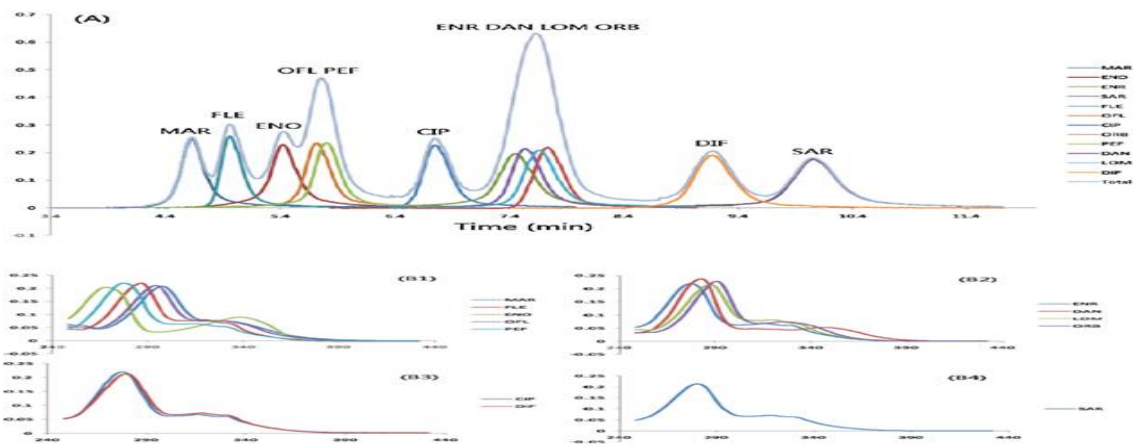
Pik çakışmalarının temelinde numunenin çözündüğü çözücünün gücü etkilidir. Eğer numunenin çözündüğü çözücü hareketli fazın gücünden çok büyükse, ya da kolon girişinde ölü hacim oluşturacak ve alıkonma zamanını etkileyecek bir durum mevcutsa piklerin birbiriyle çakıştığı kromotogramlar olacaktır (Tablo 1.3). Çözücülerin HPLC sisteminde farklı gradient oranlarıyla karıştırılmaları polariteyi etkileyeceği için kolon içinde numunenin alıkonma zamanını etkileyecektir, dolayısıyla daha erken ya da daha geç kolondan çıkacaktır ve bu da kromotogramlardaki piklerin çakışma ya da ayrılma durumlarında etkilidir. Aynı zamanda akış hızı, sıcaklık gibi faktörlerde piklerin çakışma durumlarında etkilidir. Kolon sıcaklığı fazla olduğu zaman viskozite düşeceği için numunenin kolon içindeki akıcılığı artar ve beklenenden daha kısa zamanda kolonu terkeder, bunun tam tersi durum da mümkündür. Kolon sıcaklığı çok düşük olduğu zaman da viskozite artacağı için akıcılık azalır ve dolayısıyla da kolon içinden çıkış zamanı gecikir. Bu gecikme veya erken gelmeler numunenin içerdiği bileşimde bulunan maddelerin molekül yapısı, polaritesine de bağlıdır. Bu şekilde bileşimdeki maddeler aynı gecikmeye ya da erken gelmeye sahip olabilir yani alıkonma zamanları aynı olabilir ve kromotogramda aynı yerde pik verebilirler. Hatta bileşimdeki bileşiklerin maksimum verdikleri dalga boyları da yakınsa ya da aralıkları birbiriyle örtüşüyorsa spektrumları da birbiriyle tam üst üste çakışıyor olabilir. Piklerin çakışmalarında etkili olan diğer faktör olan akış hızı artırıldığı zaman pikler daha erken gelir ve HPLC yürütme süresi de kısa ise pikler üst üste gelebilir. Akış hızını yavaşlatarak pikler daha yavaş gelebilir ve daha ayrı görüntülenebilir fakat akış hızıyla yapılan değişiklikler kolondaki partiküllerin kopmasına dolayısıyla kolon ömrünün erkenden bitmesine yol açacağı için akış hızında çok fazla değişiklik yoluna gidilmemelidir. Ayrıca pik genişlemeleri de piklerin birbiriyle iç içe girmesine dolayısıyla çakışmalarına neden olabilir. Bunda daha çok hareketli fazın pH’ sı etkilidir. Uç pH’larda çalışılmamalıdır. Dolayısıyla numunenin içinde bulunduğu çözücünün pH’sına dikkat edilmelidir. Yapmış olduğum çalışmada daha çok gradient değişikliklerle çözücü polaritesi değiştirilerek çakışma durumları oluşturulmuştur (Şekil 1.20), akış hızı ve sıcaklık sabit tutulmuştur.



Şekil 1.20. Gradient çözücü değişimleriyle oluşturulmuş metotta 16 standart fenolik asidin çakışan pik kromotogramı
 (1) gallik asit, (2) protokatekuik asit, (3) gantisik asit, (4) protokatekulaldehit (5) klorogenik asit, (6) p-OH benzoik asit, (7) vanilik asit, (8) kafeik asit, (9) syringik asit, (10) vanilin, (11) p- kumarik asit, (12) syringaldehit, (13) ferulik asit, (14) sinapik asit, (15) rosemarinik asit, (16) benzoik asit

1.1.3. Dedektörlerin Çakışma Sorunlarına Getirdiği Çözümler

HPLC’ de dedektörler numunedeki bileşenlerin özelliklerine göre seçilmelidirler. Örneğin bileşenler floresans özelliğe sahipse floresans özelliği ölçen dedektör tercih edilmelidir. Dedektörler, genellikle gradient, akış hızı, sıcaklık gibi birçok faktör ayarlandığı halde çakışan piklerin olduğu kromotogramlarda numunedeki bileşenlerin özelliklerinden yararlanarak ya da bu bileşenlere ayırmak istediğimiz özelliği kazandıracak türevlendirmeyi sağladıktan sonra bileşenlerin özelliklerinden yararlanarak bileşene özgü spektrum almayı ve dolayısıyla ayırt etmeyi sağlarlar. Bu açıdan en kullanışlı dedektörler kütle dedektörleridirler. Çünkü bileşenlerin herbir fragmentinin analizi yapılabilir. Fakat bu dedektörler oldukça pahalıdır. Bu açıdan DAD ve UV dedektörler oldukça fazla kullanılmaktadırlar. Bileşenlerin kromofor özelliklerinden ve maksimum absorpsiyon verdiği dalga boylarından yararlanarak analizleri yapılır. Farklı bileşenleri içeren karışımlar HPLC’de ayrı ayrı yürütülür. Daha sonra kromotogramlar üst üste çakıştırılır, her kromotogramdaki pikin spektrum görüntüsü DAD’la belirlenir ve çakıştırıldıktan sonra hangi piklerde hangi bileşenlerin çakıştığı belirlenebilir ve MS dedektöre göre çok daha ucuz olan DAD’la bileşenler belirlenmiş olur. Bazen baseline pik olarak algılanabilir, bazı pikler baseline’ın altında kalıyor olabilir, bunlar da DAD’la pik spektrumu alınarak çözücü piki, baseline, numune piki ayırımı yapılabilir. 2011’de Yong-Jie Yu ve ark., tarafından yapılan çalışmada bal numunelerinde 12 tane kinolon bileşiği çakışması DAD ile belirlenerek aydınlatıldı (Şekil 1.21).



Şekil 1. 21. Bal numunesindeki 12 kinolon bileşiğinin kromotogramı ve DAD spektrum analizleri

1.1.4. Türevlendirme

Kromatografik analizden önce türevlendirme, örnek hazırlanmasında birkaç neden için kullanılabilir. Uçucu olmayan maddelerin uçucu türevlerinin elde edilmesi, gaz kromatografisi ile ayrılması için bunların işlem görmesiyle, yani türevlendirilmesiyle mümkündür. Sıvı kromatografisinde, floresan türevleri, özellikle de yüksek hassasiyetli saptanabilir maddeler için hazırlanabilir. GC analizi için uçucu maddelerin uçucu olmayanlardan eldesinde, organik asitler, bir katalizör olarak boron trifluoride kullanılarak veya doğrudan diazometan ile esterlenmiş olabilir. Bazı durumlarda, çözünen polaritesi büyük ölçüde kromatografik davranışın iyileştirilmesi ve atığın azaltılması için gereklidir. Polariteyi azaltmak genellikle asilasyon ile, amino, hidroksil ve tiol grupları için elde edilebilir. Açılasyon, basitçe asit anhidritler, asit klorürler (ör. asetil klorür ve asetik anhidrit) ile doğrudan reaksiyona sokularak elde edilebilir. Sıvı kromatografisi analizlerinde, UV kromoforlar ve floroforlar genellikle UV absorpsiyon ve floresans duyarlılığı artırmak için örnek molekülleri halinde sunulmaktadır. Bu moleküllerden Benzil klorür, *m*-toluol klorür ve *p*-nitrobenzil klorür bir çözünen molekülü ile UV absorpsiyonu veren bir hale gelebilirler. Bir karbonil grubu içeren bir çözelti içine UV kromoforları tanımlamak için kullanılan, 3,5-dinitrofenilhidrazin ve *p*-nitrobenzilhidroksilamin iki en yaygın ve etkili reaktiftir. Başka bir floresan türevi birincil ve ikincil aminler, ancak aromatik aminler, fenol ve tiyoller ile yüksek floresan türevleri sağlar (URL-5, 2012).

Türevlendirme HPLC'de bileşenlerin başka moleküllere dönüşerek farklı zamanda farklı yerde pik oluşturmasıyla bileşenlerin ayrılmasını sağlar. Çalışmada fenolik asitler peroksinitritle off-line olarak reaktiviteye sokularak başka bileşiklere dönüştürüldü, bazı fenolik asitler dönüştü bazıları dönüşmedi ve HPLC'de yürütüldüler, farklı zamanlarda oluşan piklere dönüşen ya da dönüşmeyen bu bileşenler DAD ile kromotogramda belirlendi.

1.1.4.1. Peroksinitrit ile Reaktivite

Peroksinitrit, nitrik oksit ile superoksit radikallerinin reaksiyonu ile oluşan önemli bir biyolojik oksidandır. Bu reaksiyonun hızı, superoksitin SOD ile olan reaksiyon hızından yaklaşık 4 kat daha fazladır. Normal koşullarda çok az peroksinitrit oluşabilir. NO ve süperoksitin konsantrasyonunun arttığı ve/veya SOD aktivitesinin düşük olduğu patolojik olaylarda peroksinitrit oluşumu belirgin olarak artar.

İnflamasyon gibi birçok patolojik durumda hücre içi kalsiyum konsantrasyonu artarak, NO ve süperoksitin salıverilmesine yol açar. Organizmada peroksinitrit, hidroksil radikali gibi davranan hidrosinitrite (HOONO) dönüşür. Peroksinitritin parçalanmasıyla yüksek konsantrasyonlarda nitrojen dioksit (NO₂) oluşur. Oluşan bu ürünler güçlü oksidan özelliğe sahiptir. Bu reaktif nitrojen bileşikleri lipidler, DNA, tiyoller, aminoasitler ve metallere reaksiyona girerek enzim fonksiyonlarını bozar, membran bütünlüğüne zarar verir ve DNA mutasyonuna neden olabilir. Bunların sonucunda lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu başlar. Peroksinitrit proteinlerdeki veya serbest haldeki tirozinin fenolik halkasına nitro grubu ekleyerek 3-nitrotirozini oluşturur. Bu reaksiyon spontan olarak oluşabileceği gibi, geçiş metalleri, SOD, CO₂ ve miyeloperoksidaz tarafından da katalize edilir. Nitrit ve hipoklorik asit reaksiyon ürünleri gibi ajanların, peroksinitritten bağımsız olarak nitrotirozin oluşturabildiklerinin bildirilmesine karşın, biyolojik sistemlerde oluşan nitrotirozinin yaygın olarak peroksinitrit oluşumunu yansıtması daha olasıdır.

Peroksinitrit hücre membran lipidlerinin peroksidasyonuna, DNA ve çok sayıda enzim proteininin oksidasyonuna neden olur.

Ayrıca peroksinitrit, DNA'da tek zincir kırılmasına neden olurken, nükleer bir enzim olan "poli-ADP-riboz sentaz" (PARS)'da aktive olur. PARS, substratı NAD⁺'yi tüketip, mitokondrial solunum ve elektron transportunu inhibe ederek hücrel enerji üretimini baskılar. Sonuçta glikoliz hızı, elektron transportu ve ATP oluşumu azalır, bu da akut hücre hasarı ve hücre ölümüne neden olur (Radi vd., 1991).

1.1.5. Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler antioksidan olarak, insan vücudundaki çeşitli nedenlerle oluşmuş serbest radikalleri temizleme yeteneğine sahiptirler. Ayrıca, ağır ve radyoaktif metallere şelatlama ve otooksidasyonu önleme konusunda da fenolik bileşikler oldukça etkilidirler. Başka bir deyişle bunlar, çeşitli reaktif oksijen türlerini hücrelerden uzaklaştırarak metabolizmayı zinde tutarlar.

Fenolik bileşikler veya polifenoller bitkilerde çeşitli meyve, sebze, kuruyemiş, tohum, çiçek, kök ve gövde kısımlarında doğal olarak sentezlenen maddelerdir (Wollgast ve Anklam, 2000).

Sarımsak, keten tohumu, soya fasulyesi, yeşil çay ve turunçgiller gibi birçok yiyecekte bulunan fenolik asitler, normal hücrelerin serbest radikallerden zarar görmesini engellemeye yardımcı olan antioksidanlardır.

Fenolik asitler ayrıca, besinlerdeki nitratın midede doğal olarak oluşan bazı enzimlerle birleşmesiyle ortaya çıkan nitrosamin gibi kanserojenleri etkisiz hale getirirler. Fenolik asitler, vücudun en etkili toksin parçalayıcılarından olduğuna inanılan glüstasyon adlı bir aminoasidin üretimini de hızlandırır (URL-6, 2012). Fenolik maddeler bitkisel kaynaklı besinlerin lezzetine özellikle ağızda buruk bir tat bırakma yönünde ve rengine etki eden, meyve ve sebzelerde genellikle çok az miktarlarda bulunmakla birlikte önemli olan bir madde grubudur. Fenolik maddeler aromatik halkasında bir veya daha fazla hidroksil grubu içeren bileşiklerdir (Shahidi ve Nacz, 1995). Bu bakımdan en basit fenolik maddenin bir tane hidroksil grubu içeren benzen yani fenol olduğu ve diğer fenolik maddelerin bundan türediği bilinmektedir (Cemeroğlu ve Acar, 1986). Fenolik maddeler basit fenolik maddeler ve polifenoller olmak üzere kabaca iki gruba ayrılmakla beraber meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunan fenolik maddeler hidroksibenzoik asitler, hidroksisünamik asitler ve flavonoidler olmak üzere üç kısımda incelenmektedirler. Flavonoidler ise kateşinler, antosiyanidinler, flavonoller, flavanonlar ve proantosiyanidinler (löykoantosiyanidinler) olmak üzere beş alt gruba ayrılmaktadırlar (Cemeroğlu ve Acar, 1986).

1.1.5.1. Fenolik Bileşiklerin Önemi

Bugüne kadar en az 5000 tane fenolik madde tanımlanmış olup bunların 2000'den fazlası doğal flavonoidlerdir. Genelde bitkilerin yaprak, çiçek, meyve gibi canlı dokularında glikozitler şeklinde, odunsu dokularında aglikonlar şeklinde, çekirdeklerinde ise her iki formda da bulunabilmektedirler (Shahidi ve Nacz, 1995). Bitkiler aleminde fenolik madde içeriği en zengin olan bitkinin *Camellia sinensis* olduğu bildirilmektedir (Wilson ve Clifford, 1995). Fenolik maddeler açısından meyvelerin sebzelerden daha zengin olduğu bilinmektedir.

İnsanoğlunun bilinçli olarak yararlandığı ilk bileşiklerden birisi, eskiden tanen olarak adlandırılan bitkisel fenoliklerdir. Bunların ortak özelliği proteinlerle kompleks oluşturarak çökelti yapmalarıdır. Bu özelliğinden dolayı fenolik maddelerce zengin bitki ve ekstraktları deri sanayinde kullanılmaktadır. Ham derideki proteinlerle tanenlerin stabil ve mikrobiyal bozulmaya dayanıklı kompleksler oluşturması prensibiyle pek çok kullanım alanı olan bir materyal elde edilmektedir (Cemeroğlu, 1998).

Fenolik maddeler gıda sanayinde de teknolojik olarak kullanım alanı bulmuştur. Berrak meyve suyu üretiminde uygulanan jelatin durultmasında yardımcı madde olarak kullanılan maddelerden birisi de tanendir (Schobinger, 1988).

Flavonoidler ve sinnamik asitler en önemli antioksidan ve serbest radikal tutucu ve zincir kırıcılar olarak bilinmektedirler (Shahidi ve Nacz, 1995). Bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), propil gallat ve tert-bütillhidrokinon (TBHQ), besin maddelerinde oksidatif acılaşmaya karşı kullanılmaktadır. Fenolik maddeler gıdalarda mikrobiyal güvenlik açısından da önemlidir. Baharatlarda bulunan eugenol, timol, humulan, lupulon, allil izotiyosiyanat gibi bileşiklerin antimikrobiyal etkiye sahip olması baharatların çoğunu gram (+) bakteriler ve küflere karşı etkili hale getirmektedir. Baharatların karışım halinde kullanılmalarının bu etkiyi daha da artırdığı bilinmektedir (Yalçın vd., 1997). Fenolik maddelerin gıda sanayii yanında farmakolojide de kullanım alanı oldukça geniştir. İlaç sanayiinde fenolik maddelerin özellikle antimikrobiyal özelliklerinden yararlanılmaktadır.

1.1.5.2. Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması

Bitkisel materyallerde bulunan fenolik bileşikler, fenolik asitler ve flavonoidler olarak iki gruba ayrılırlar. Hidroksibenzoik ve hidroksisinnamik asitler olarak iki gruba ayrılırlar. Hidroksibenzoik asitler C₆-C₁ fenilmetan yapısında olup, bitkisel gıdalarda genelde iz miktarda bulunurlar. Bunlar salisilik asit, *m*-hidroksibenzoik asit, gallik asit, vanilik asitler gibi asitlerdir. Hidroksisinnamik asitler ise C₆-C₃ fenilpropan yapısındadırlar. Fenilpropan halkasına bağlanan OH grubunun konumu ve yapısına göre farklı özellik gösterirler. Çok yaygın bulunanları; kafeik asit, ferulik asit, *p*-kumarik asit ve *o*-kumarik asitlerdir. Bitkilerde büyük bir kısmı organik asitler ve şekerlerle esterleşmiş halde bulunan, fenolik asitlerin kimyasal yapıları Şekil 1.22’de görülmektedir.

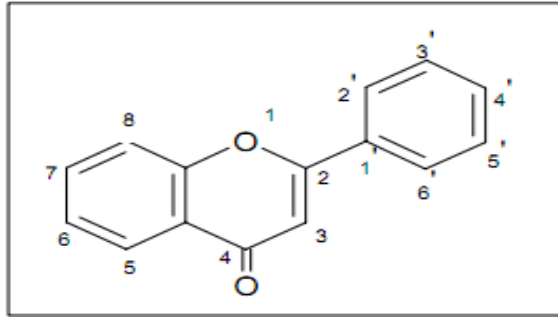
Asit	R1	R2	R3	Asit	R1	R2	R3
<i>p</i> -Hidroksibenzoik	H	OH	H	<i>p</i> -Kumarik	H	OH	H
Pirokate şük	H	OH	OH	Kafeik	H	OH	OH
Vanilik	CH ₃ O	OH	H	Ferulik	CH ₃ O	OH	H
Siringik	CH ₃ O	OH	CH ₃ O	Sinapik	CH ₃ O	OH	CH ₃ O
Gallik	OH	OH	OH				

Şekil 1.22. Fenolik asitlerin genel yapısı: a) Benzoik asit türevleri b) Sinamik asit türevleri (Shahidi vd., 1995)

Flavonoidlerin karbon iskeleti, iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşan ve 15 karbon atomu içeren, difenilpropan (C₆-C₃-C₆) yapısındadır. Flavonoidlerin yapısındaki OH grupları, reaktif özelliklerinden dolayı kolaylıkla glikozitlenir (Bilaloğlu

vd., 1999). Flavan türevleri olan flavonoidlerin genel yapısı Şekil 1.23'te görülmektedir. Flavonoidler gıdalarda en yaygın bulunan polifenollerdir. Yaklaşık 6500 farklı flavonoid bilinmektedir (Saldamlı, 2007). Yapısal olarak beş gruba ayrılırlar;

- 1- Antosiyanidinler
- 2- Flavonlar ve flavonollar
- 3- Flavanonlar
- 4- Kateşinler ve löykoantosiyanidinler
- 5- Proantosiyanidinler



Şekil 1.23. Flavonoidlerin genel yapısı

1.1.5.3. Fenolik Bileşiklerin Gıda Kaynakları

Fenolik bileşikler bitki ve hayvansal kökenli pek çok gıdanın tat ve aromasına katkıda bulunabilirler. Gıdalarda acılık ve burukluğun kaynağı olan fenolik bileşiklerin önemli bir bölümü, meyve, sebze ve bunlardan elde edilen ürünlerin lezzetinin oluşmasında çok önemlidir. Yapılan araştırmalar; fenolik asitlerden pirokateşuik asidin 30 ppm, siringik asidin 240 ppm'lik konsantrasyona ulaşması halinde acı tat şeklinde algılandığını, fakat fenolik asitlerin bir kaçının birlikte sinerjistik etki göstermesi sonucu algılama sınırının daha düşük konsantrasyonlarda gerçekleştiğini göstermektedir. Örneğin *p*-kumarik asidin 48 ppm ve ferulik asidin 90 ppm'e ulaşması ile duyusal olarak ekşi ve acı tadı hissettirdikleri, her ikisinin birlikte algılama konsantrasyonunun ise 20 ppm'e kadar düştüğü saptanmıştır. Gıdalarda bulunan bazı fenolik bileşikler dilin tüm yüzeyinde ve yanak mukozasında bir buruşturma ve kurutma duyusuna neden olabilmektedir. Bu duyu burukluk olarak değerlendirilmektedir. Burukluğu sağlayan fenolik bileşikler gıdaların kabul edilebilirliğini etkileyebilmektedir (Cemeroğlu, 2004; Shahidi vd., 1995; Saldamlı, 2007). Trabzon hurması, dağ eriği, kızılılık ve şarap ağızda buruk tadı veren gıdalara örnek olarak verilebilir (Koca, 2007). Flavanon glikozitleri turunçgillerde yaygın olarak bulunmaktadır.

Örneğin greyfurtlarda acı tadı veren naringin bir flavanon glikozittir. Portakallarda ise naringin ve neohesperidin fazla miktarda bulunmaktadır. Depolanan meyve sularında ferulik asit ise nahoş tat vermektedir.

Üzümde tat duyusu ve lezzet gelişimiyle fenolik bileşiklerin ilişkisi pek çok çalışmalar sonucunda belgelenmiştir. Üzümlerde genel olarak basit fenoller ekşilik, kondanse fenoller ise burukluğa sebep olurlar. Hidroksisülik asit tartaratları, kateşin ve proantosiyandinler üzüm ve şarapta tat oluşumu ve kahverengileşmeden sorumludurlar (Harmanakaya, 2003). Şarapların acı ve buruk tadı, rengi ve antioksidan etkileri fenolik bileşik olan antosiyandinlerden ileri gelmektedir.

Diğer pekmezlerde göre daha buruk bir tada sahip olan andız pekmezinin. kateşol, kateşin, epikateşin, kuersetin, *o*-kumarik asit, kafeik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, kloregenik asit ve gallik asit gibi fenolik maddeler bakımından çok zengin bir kaynak olduğu görülmüştür (Turhan vd., 2007).

Bazı araştırmacılar siyah çayın lezzeti üzerine, monomerik fenolikler; flavanoller, flavonoller, theogallein, kloregenik asit, *p*-kumarik asit ve kafeik asidin önemli katkısının olduğu sonucuna varmışlardır. Flavanoller, klorojenik asit ve kateşinlerin oksidasyon ürünleri olan ve fermantasyon süresince oluşan theaflavinlerin çayın burukluğu üzerinde etkili olduğu ifade edilmektedir (Velioğlu, 2005).

Fenolik bileşiklerin naturel (beyazlatılmış, ham) fındık örneklerinde kavrulmuş fındık örneklerine göre daha yüksek miktarda bulunduğunu saptanmıştır (Artık, 2004). Sert kabuklu meyvelerle ilgili olarak yapılan bir başka çalışmada, ceviz bileşimindeki fenolik bileşiklerin (proantosiyandinler), ceviz kabuğunun renginden ve ceviz meyvesinin buruk tadından sorumlu olduğu bildirilmektedir (Bakkalbaş, 2009).

Yer fıstığının tipik tat ve aromasına vanilik, *o*-kumarik ve ferulik asit gibi fenolik bileşiklerin büyük ölçüde katkısının olduğu belirtilmektedir (Şimşek, 2004). Fenolik bileşikler bazı baharat ve otların lezzeti üzerine de etkili olabilmektedir. Anethol, estragol, eugenol, timol ve karkavol çoğu baharat ve otların, toplam duyuşal karakteristilerine katkısı olan uçucu fenolik bileşiklerdir. Eugenol, tarçındaki ana lezzet bileşenlerinden biridir. Timol, kekik bitkisi ve bu bitkiden elde edilen ticari yağların uçucu kısımlarında bulunduğu bildirilmiştir (Shahidi vd., 1995).

Polifenoller zeytinyağının lezzeti ile bağlantılı bileşenlerin önemli bir sınıfını oluştururlar. Fenolik bileşiklerin zeytinyağındaki miktarı 300 mg / kg'ı aştığı zaman acı bir tada sebep olduğu ifade edilmektedir (Gunstone, 2002).

Elma, ayva ve patates gibi bazı meyve ve sebzeler kesildiği veya zedelendiği zaman bir süre sonra renklerinin değişip esmerleştiği görülür. Polifenoloksidaz enzimlerinin, fenolik bileşikleri okside etmesi sonucu meydana gelen enzimatik esmerleşme, gıdalarda kalite kaybı olarak değerlendirilmekte ve gıdaların işlenmesi sırasında fenolik bileşiklerin oksidasyonu çeşitli yöntemlerle önlenmeye çalışılmaktadır (Anonim, 2006).

Bakla, bezelye ve börülcelerin tohum kabuğundaki fenolik bileşik miktarı, tüm tohumdan 7-10 kat daha fazladır. Çiçek ve tohum kabuğunun rengi ile fenolik bileşik (proantosiyanidin) düzeyi arasında yakın bir ilişki vardır. Fenolik bileşikleri içermeyen bakla çeşitleri beyaz tohum kabukları ile karakterizedir (Pekşen ve Artık, 2005).

1.1.5.4. Fenolik Bileşiklerin Elde Edilme Yöntemleri

Fenolik maddelerin besin maddeleri ve atıklarından izole edilmesinde, özellikle çözgen ekstraksiyonu, tanımlanmasında ise daha çok kromatografik teknikler kullanılmaktadır. Bunların yanında son yıllarda membran teknolojisi ile fenolik maddelerin elde edilmesi üzerine çalışmalar yapılmaya başlamıştır (Tablo 1.4). Borneman vd. (1997), polietersülfon (PES) ve polivinilprolidon (PVP) kombinasyonu ile yapılmış membranların elma suları ve model çözeltilerden polifenollerin ayrılmasında yalnızca PES kullanılan membranlara göre daha etkili olduğunu ve akış oranının da daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Mangas vd. (1997), inorganik membranlar kullanarak ters akım filtrasyon tekniğiyle elma sularının durultulması üzerine yaptıkları çalışmada, sıcaklık, işlem süresi ve membran tipinin polifenollerin ayrılmasında etkili olduğunu, ultrafiltrasyon ile düşük sıcaklıkta elma suyunun yeterli stabiliteye ulaşmasını sağlayacak ölçüde polifenol ayrılabilirdiğini belirlemişlerdir.

Tablo 1.4. Fenolik maddelerin elde edilme yöntemleri (Mangas vd., 1997; Lu ve Foo, 1997; De Sotillo vd., 1994; Madsen ve Betelsen, 1995; Chkikvishvili ve Gogiyo, 1995)

Yöntem	Uygulama	Çözücü	Kullanım Alanı	
Ekstraksiyon	Çözücü Ekstraksiyonu	Metanol	Kekik, lavanta, mercanköşk, nane, fesleğen, pirinç kabuğu, zeytin ve yaprağı, kuşyemi, nişasta atık suları, biberiye, patates kabuğu, elma posası, susam çekirdeği, sarımsak, adaçayı	
		Aseton	Kuşyemi, zeytin ve yaprakları	
		Hekzan	Sarımsak, biberiye, adaçayı	
		Eter	Mandarin atıkları	
		Etilasetat	Sarımsak	
		Diklorometan	Biberiye	
		Benzen	Mandarin atıkları	
		Tuz çözeltisi	Patates kabuğu, çay	
		Buhar Distilasyonu Vakum Distilasyonu Moleküler Distilasyon	Kloroform	Biberiye
			Su	Biberiye
Kromatografi	Kolon Kromatografisi Sıvı Kromatografisi		Elma Posası Ayçiçeği Küspesi	

1.1.5.5. Fenolik Bileşiklerin Antioksidan Özellikleri ve Sağlık Üzerine Etkileri

Fenolik bileşikler antialerjik, antienflamatuar, antidiyabetik, antimikrobiyal, antipatojenik, antiviral ve antirombotik etkiye sahip olduğu yapılan pek çok araştırma ile tespit edilmiştir. (MacDougall, 2002; Aras, 2006). Antioksidan olarak fenolik bileşikler kanser, kalp hastalıkları, katarakt, göz hastalıkları ve Alzheimer gibi hastalıkları engellemektedirler (Pehlivan ve Güteryüz, 2004; MacDougall, 2002; Bakkalbaşı, 2009; Karadeniz, 2006). Fenolik bileşiklere beslenme fizyolojisi açısından olumlu etkileri nedeniyle biyoflavonoid adı da verilmektedir. Kılcal dolaşım sisteminde geçirgenliği düzenleyici ve kan basıncını düşürücü etkisi göz önüne alınarak bazı kaynaklarda P faktörü (permeabilite faktörü) veya P vitamini olarak da adlandırılmaktadır (Saldamlı, 2007; Anonim, 2006) Kuşburnu P vitamini yönünden oldukça zengin olup 100 g kuşburnunda 1100-3320 mg P vitamini bulunduğu ifade edilmiştir. Kuşburnu yüksek antioksidan aktiviteye sahip polifenol grubu bileşikleri ve proantosiyanidinleri bünyesinde

barındırmaktadır (Doğan vd., 2006). Antosiyanin ekstraktlarının gıdalara yalnızca çekici renk özellikleri kazandırmadığı, aynı zamanda sağlık açısından yararlı bileşikler olduğu ve farmakolojik özellikleri nedeniyle çeşitli hastalıklarda tedavi etme amacıyla kullanıldığı bilinmektedir. Antosiyaninlerin ateroskleroz, kanser riskini azaltma, kan dolaşımı bozukluklarında ve bazı göz hastalıklarında tedavi edici niteliği bulunduğu ortaya konulmuştur (Kurılıç vd., 2005; Kırca, 2004). Üzümü meyvelerde bulunan fenolik bileşiklerden antosiyanin, kuersetin, kamferol, mirisetin ve ellagik asit antikanserojenik, antibakteriyal, antiviral ve antioksidan aktiviteye sahiptirler (Pehlivan ve Gülerüz, 2004; Aras, 2006). Nar suyunun delfinidin, siyanidin, pelargonidin gibi antosiyaninlerden ve pinikalın, ellagatinler ve ellagik asitten dolayı yüksek antioksidan kapasitesine sahip olduğu bilinir. Nar, damar üzerindeki hasarı engelleme, prostat kanseri ve kireçlemeyi önleme, ishali durdurma, otooksidasyon zararlarına karşı hücreleri koruma, normal düzeye kan glikoz seviyesini ayarlama, stokinlerin (hücrelerin birbirleriyle iletişimini sağlayan protein ve peptidlerin) oluşumunu destekleme, doğal tümörleri inhibe eden hücre kapasitelerini artırma gibi önleyici ve terapötik etkilere sahip olduğu için popülerdir. Aynı zamanda AIDS ve iltihaplaşmaya karşı etkili olduğu bulunmuştur (Ekşi ve Özhamamcı, 2009). Siyah ve yeşil çayın diüretik özellikte olduğu uzun yıllardan beri bilinmektedir (Yağcı vd., 2008).

Hertog vd. (1993) flavonoid alımı ve çay tüketimi ile kronik arter hastalığından ölüm riskinin ters orantılı olduğunu rapor etmişlerdir. Tunalier vd. (2004) dağ çayının (yayla çayı) on türüne ait ekstraktlarının antioksidan etkilerini incelemişlerdir. Üç türün diğerlerine göre daha yüksek fenolik bileşik içerdiğini ve bu türlerin antioksidan aktivitelerini diğer türlere göre yüksek belirlemişlerdir. Flavanoid türü fenolik bileşiklerin, ekstraktların büyük çoğunluğunu oluşturduğu belirlenmiştir (Tunalier vd., 2002). Tekeli vd. (2008) peygamber çiçeğinin (zerdali diken) BHA ve BHT'ye göre daha kuvvetli antioksidan etki gösterdiğini ifade etmişlerdir. Soya fasulyesi ve işlenmiş soya ürünlerinde bulunan fenolik bileşiklerin osteoporoz, kalp hastalıkları ve çeşitli kanserlerin gelişimini engellediği çeşitli araştırmalarca gösterilmiştir (Gürsoy ve Gökçe, 2001). Öztürk vd. (2004) maydanoz, dereotu ve rokanın antioksidan etkilerini BHT'nin antioksidan etkileri ile karşılaştırmışlardır.

Her üç bitkinin ekstrelerini flavonoid bileşiklerce zengin bulmuşlar ve tüm örneklerin antioksidan etkilerini BHT'ye yakın veya daha yüksek bulmuşlardır. Bütillenmiş hidroksi toluen (BHT) ve bütillenmiş hidroksi anisol (BHA) gibi sentetik antioksidanların toksik ve

kanserojen olabileceğini ortaya koyan çalışmalar sonucunda bazı ülkelerde kullanılmalarına ciddi sınırlamalar ve yasaklar getirilmiştir. Bu nedenle doğal antioksidan kaynağı olan meyve ve sebzeler, baharatlar ve bitkisel çaylara olan ilgi artmıştır (Köksal, 2007; Öztürk vd., 2002).

1.1.5.6. Fenolik Bileşiklerin HPLC ile Analizleri

Dört farklı Türk üzüm çeşidinden yapılan kırmızı şaraplar, fenolik içeriklerini belirlemek amacıyla analiz edilmişlerdir. Analiz için diod array dedektör eşliğinde ters fazlı-yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) kullanılmıştır. Türkiye’de yetiştirilen Kalecik karası, Öküzgözü, Boğazkere ve Papazkarası üzüm çeşitlerinden elde edilen kırmızı şaraplar arasındaki karakteristik farkları belirlemek için, sekiz fenolik asit (ferulik, *o*-kumarik, *p*-kumarik, kafeik, şiringik, *trans*-sinnamik, klorojenik ve gallik asitler) ile beş flavonoid ((+)-kateşin, (-)-epikateşin, kuersetin, vanilin ve rutin) standartı kullanılmıştır.

Şarap örneklerinde en fazla bulunan fenolikler, flavonoidlerden (+)-kateşin (17,82–33,59 mg L⁻¹) ve fenolik asitlerden de gallik asit (13,25-16,39 mg L⁻¹) olurken, klorojenik asit hiçbir şarap örneğinde belirlenememiştir. Böğürtlenin (*Rubus L.*) Kimyasal Bileşimi üzerine araştırmada HPLC ile yapılan çalışma sonucunda, böğürtlenin fenolik bileşiklerden en fazla kuinik asit (475.26 mg/L) ve kateşin, (122.31 mg/L) antosiyaninlerden siyanidin 3 glikozit (ortalama 831.20 mg/L), organik asitlerden ise malik asit içerdiği (ortalama 5.334 g / kg) saptanmıştır (Tosun ve Artık, 1998).

Suudi Arabistan propolisinin HPLC analizi, baskın olarak fenolik asitlerden *trans*-sinnamik, *p*-kumarik, kafeik, ferulik, sinapik; flavonoidlerden ise, apigenin, kamferol, kuersetin, rutin varlığını ortaya koydu (Mohamed vd., 2011).

Kestane Bal örneklerinin HPLC ile fenolik asit bileşenleri incelendi ve ayrıca antioksidan aktiviteleri tayin edildi. HPLC (600 E HPLC pompa, fotodiod array dedektör) ile analiz edildi. Fenolik asitlerin analizinde C₁₈ ters faz kolonu kullanıldı. Analizler metanol, su ve formik asitle gradient program uygulanarak gerçekleştirildi. Akış hızı 1 mL.dk⁻¹ ve enjeksiyon 10µL idi. Gallik asit, *p*-hidroksi benzoik asit, vanilik asit, kafeik asit, klorojenik asit, şiringik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, *o*-kumarik asit ve *trans*-sinnamik asit standart olarak kullanıldı ve analizler 280 nm’de gerçekleştirildi.

Klorojenik asit bütün örneklerde mevcut olan ana fenolik bileşen olarak bulundu (Ulusoy, 21. Ulusal Kimya Kongresi, 2007).

1.1.6. Antioksidan Tayin Yöntemleri

Canlılarda, kimyasal süreçler (prosesler), özellikle oksitlenme, serbest radikallerin oluşmasına neden olur. Yüksek derecede reaktif olan serbest radikaller farklı moleküller ile kolayca reaksiyona girebilir ve böylece hücrelere, canlıya zarar verebilir. Antioksidanlar serbest radikallerle reaksiyona girerek (onlarla bağ kurarak) hücrelere zarar vermelerini önler. Bu özellikleriyle hücrelerin anormalleşme ve sonuç olarak tümör oluşturma risklerini azalttıkları gibi, hücre yıkımını da azalttıkları için, daha sağlıklı ve yaşlılık etkilerinin minimum olduğu bir hayat yaşama şansını yükseltirler (URL-7, 2012). Antioksidanlar koruyucu etkilerini oksidasyon sürecinin farklı aşamalarında ve farklı mekanizmalarla gösterirler. Farklı test metotları antioksidan aktivite hakkında özel fakat sınırlı bilgi verdiklerinden, tek bir antioksidan üzerinde farklı antioksidan testlerinin sonuçlarının karşılaştırılması metotların gücü hakkında bilgi vereceği gibi antioksidanın farklı koruyucu etkilerini de ortaya çıkarabilir (URL-8, 2010). En çok kullanılan antioksidan tayin yöntemleri; DPPH, ORAC, TEAC, CUPRAC, FRAP ve Toplam fenol tayinidir.

DPPH Yönteminde DPPH• radikali (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ticari olarak satın alınabilen bir serbest radikal olup bu radikal 517 nm'de maksimum absorban oluşturur (Cuendet vd., 1997). Antioksidanlarla muamele, DPPH•'tan kaynaklanan mor rengin şiddeti azalarak absorbanın düşüşüne sebep olacaktır.

Toplam Fenolik Madde Tayini Metodunda, suda ve diğer organik çözücülerde çözülmüş olan fenolik bileşiklerin Folin reaktifi ile alkali ortamda renkli kompleks oluşturması esasına dayanır. Oluşan mor-menekşe renkli kompleks 700 nm'de maksimum absorban oluşturur (Slinkard ve Singleton, 1977).

TEAC yöntemi (Trolox Eşdeğeri Antioksidan Kapasite), en yaygın radikalik reaktif olan ABTS^{•+}'nin kullanılarak çeşitli maddelerin antioksidan kapasitelerinin trolox eşdeğer kapasite cinsinden belirlenmesi esasına dayanır (Apak vd., 2004). Yöntemde, ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etilbenziazolin-6-sülfonik asit)) molekülünün H₂O₂ ve metmyoglobinle mavi-yeşil renkli ABTS^{•+} radikaline dönüşmesi ve bu dönüşümün 734 nm'de fotometrik olarak gözlenmesi esastır.

ORAC (Oksijen Radikali Absorbans Kapasitesi) yöntemi β-fikoeritrin (β-phycoerythrin [β-PE]) adlı bir prob maddesinin floresansının, peroksil ve hidroksil radikalleri varlığında sönüme uğraması ve ortamdaki antioksidanların bu olayı geciktirmesine ilişkindir. β-PE'den kaynaklanan floresanstaki azalışın şiddeti onun peroksil radikalinden gördüğü hasarın miktarını göstermektedir. Numunedeki antioksidan floresanstaki bu düşüşü yavaşlatmakta ya

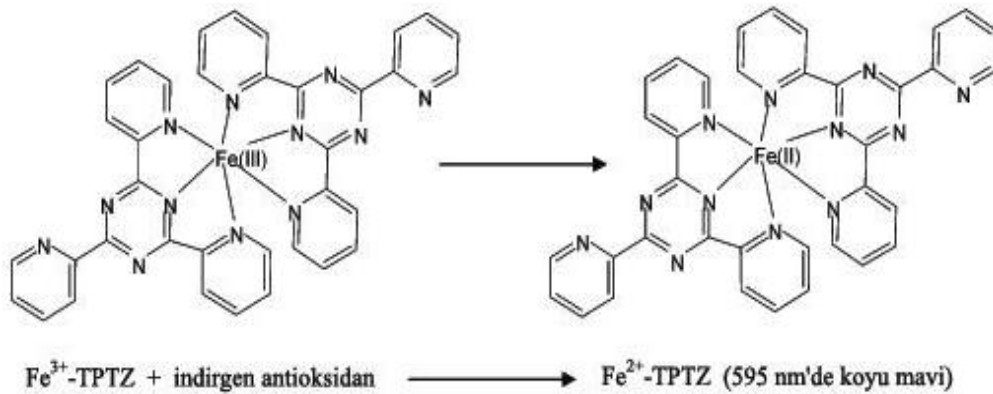
da durdurmaktadır (Apak vd., 2004).

CUPRAC (Bakır (II) İndirgenme Antioksidan Kapasite) yöntemi, diğer antioksidan aktivite tayin yöntemlerine göre daha hızlı, basit ve kullanışlıdır; radikal kromojen reaktiflerin pahalılık, güç temin edilebilirlik ve kararsızlık sorunlarından arınmıştır. Cu(II)-neokuproin reaktifi ılımlı bir yükseltgen olduğundan gıda maddelerinde bolca bulunan sitrat ve glukoz gibi bileşenlerle tepkime vermeksizin sadece antioksidanları yükseltger ve reaksiyon ürünü Cu(I)-neokuprin kelatının 450 nm'deki absorbansı okunarak sonuç verilir (Apak vd., 2005).

1.1.6.1. FRAP (Demir (III) İndirgeme / Antioksidan Kuvvet) Yöntemi

Oyaizu (1986) tarafından ortaya konan metoda göre indirgeme kuvveti özütün dolaylı olarak toplam indirgeme potansiyelini göstermekte olup $Fe^{+3} \rightarrow Fe^{+2}$ indirgenmesi ile meydana gelen renk değişimi 700 nm'de takip edilerek belirlenir (Şekil 1.24). Sonuçlar, indirgeme potansiyeli yüksek ve aynı zamanda standart bir antioksidan madde olan askorbik asit ile karşılaştırılmak suretiyle yorumlanır.

Güncel olarak kullanılan FRAP metodunda 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ)'in Fe(III) tuzu kullanılmaktadır. Bu yöntemle redoks potansiyeli 0.7 V'tan daha düşük olan bileşikler antioksidan olarak test edilebilmektedir. Polifenolik antioksidanlarda hidroksilasyon ve konjugasyonun miktarı bu yöntemde aktiviteyi etkilemektedir. FRAP yöntemi H transferi ile radikal temizleyen özellikle tiol ve proteinlerin antioksidan kapasitesini ölçmemektedir.



Şekil 1.24. Demir (III)'ün indirgenme reaksiyonu

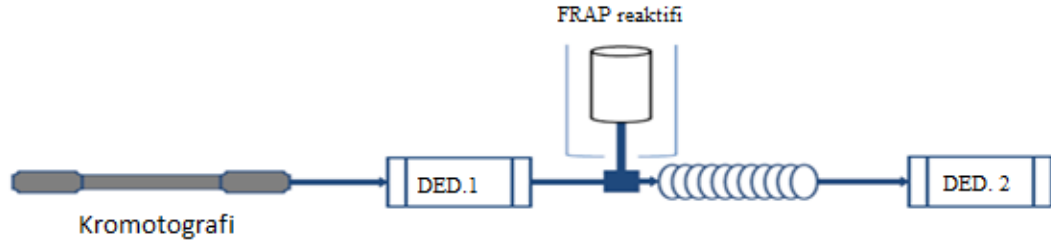
1.1.6.2. On-line –HPLC-FRAP

KTÜ kimya bölümü laboratuvarında geliştirilen on-line antioksidan FRAP uygulaması (Arslan Burnaz, Doktora tezi, 2012) fenolik asitlerin antioksidan kapasitelerinin piklerle orantılı olarak kromotogramlardan belirlenip yorumlanmasında kullanılabilir. Literatürdeki bu uygulamaya benzer on-line antioksidan denemeleri de vardır (Tablo 1.5). On-line uygulamalarda kullanılan FRAP reaktifinin hazırlanış prosedürü aşağıdaki gibidir.

- FRAP çalışma reaktifi: A, B ve C çözeltilerinin ayrı ayrı karıştırılmasıyla hazırlanır.
- A: 24 mL gradient saflıkta metanol üzerine 0,689 µL derişik (%99.5) asetik asit ilave edildikten sonra pH=3.6'ya 0.1 M NaOH (0.100 g/25 mL) ile ayarlanır. Hacim ultra saf suyla 40 mL`ye tamamlanır.
- B: 0.0125 g TPTZ'nin [2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ, MW:312.33 g/mol) 1.6 ml 100 mM HCl de çözeltilisi hazırlanır ve son hacim gradient saflıkta metanolla 4 ml'ye tamamlanır.
- C: 0.0130 g FeCl₃.6H₂O 1,6 mL ultra saf suda çözümlenerek, üzerine 2.4 mL gradient saflıkta metanol ilave edilir.
- Toplam hacim = A+B+C = 48 ml (4 numune yürütmesi için)
- 100 mM HCl: 200 µL der. (%37) HCl / 25 mL saf suda
- [der. HCl: 12.2 M (%37); der. HAc: 17.4 M (%99.5)]

Yukarıdaki prosedür sırasıyla hazırlanan FRAP reaktifi şırınga ile çekildikten sonra, şırınga HPLC sistemine tubing ile bağlı şırınga pompa sistemine oturtularak sabitlenir ve şırınga sistemi çalıştırılır ve sisteme FRAP reaktifi gönderilir (Şekil 1.25).

HPLC'nin kendi enjeksiyon kabin hücresinden numune enjeksiyonu yapıldıktan sonra numune kromatografik kolon ayırmasından çıkıp dedektör 1 (DAD)'den geçer ve dedektör 1'den çıktıktan sonra şırınga sistemine bağlı FRAP reaktifinin gönderildiği kısımdaki HPLC tubing sistemi içerisinde FRAP ile numune reaksiyonu oluşur ve dedektör 2'ye geçilir. 595 nm'de UV dedektördeki (dedektör 2) kromatograma bakıldığında antioksidan aktivitenin çıkan pik uzunluğuyla doğru orantılı arttığı görülür.



Şekil 1.25. Online FRAP sistemi

Tablo 1.5. On-line antioksidan denemelerinin karşılaştırılması

DENEME	REAKSİYON MEKANİZMASI	DEDEKSİYON	REAKTİF ÇÖZELTİ ÖZELLİKLERİ	HPLC HAREKETLİ FAZ UYGUNLUĞU
DPPH• radikal süpürme aktivitesi (Koleva vd., 2000; Zhang vd., 2009; Dapkevicius vd., 2001; He vd., 2010.)	H-ilavesi	UV-VIS, 510–520 nm	DPPH•-MeOH' de ya da MeOH/tampon karışımında (pH 7.6) (RP-HPLC için); NP-HPLC için ise <i>n</i> -hegzan	% 10–90 organik dönüşümler pH 3–6' da RP-HPLC için; gradient saflıkta <i>n</i> -hegzan ve izopropanol (NP-HPLC için)
ABTS•+ sradikal süpürme aktivitesi (Koleva, I.I. vd., 2001; He vd., 2010.)	e ⁻ -transferi	UV-VIS, 410–430, 630–640, 734 nm	ABTS•+ tamponda ya da MeOH/tampon karışımında (pH 7.4 ya da 7.6) RP-HPLC için; MeOH (NP-HPLC için)	0–100% organik dönüşümler pH 3–7.4 'da (TFA uygun değil) (RP-HPLC için); gradient saflıkta <i>n</i> -hexane ve izopropanol (NP-HPLC için)
Fosfomolibdat/ Folin-Ciocalteu reaktivitesi (Cardeñosa vd., 2002; Kusznierevicz vd., 2011.)	e ⁻ -transferi	UV-VIS, 598, 750 nm	Asidik sulu çözeltide Fosfomolibdat/ Folin-Ciocalteu reaktifi	En iyi RP-HPLCde % 80 olarak organik dönüştürücü, tuzların çökmesini engelleyen çözücüler ile kullanım için uygun; % 100 organik hareketli fazda çözünemeyen reaktifler olduğu için NP-HPLC için uygun değil.
CUPRAC reaktivitesi (Apak vd., 2010.)	e ⁻ -transferi	UV-VIS, 450 nm	Cu(II)-neokuproin (amonyum asetat tamponunda (pH 7)	RP-HPLC çözücülerile kullanım için en uygun; 100% organik hareketli fazda çözünemeyen reaktifler olduğu için NP-HPLC için uygun değil.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal ve Yöntem

Bütün kullanılan malzemeler HPLC cihaz sistemine uygun saflıktadırlar ve kullanılan Yöntemler Metod sistemolojisi içinde birbiriyle uyumlu ve sıralıdır.

2.1.1. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan madde ve malzemeler KTÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü laboratuvarlarından temin edildi. Kullanılan cihazlar ve satın alındıkları firmaları gösteren bilgiler Tablo 2.1’de verilmiştir.

Tablo 2.1. Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Markası
Mikropipet	Isotherm
UV spektrofotometre	UV-Vis LaboMed
Isıtıcı magnetik karıştırıcı	Heidolph MR 3001 K
Derin dondurucu	Bosch
Vorteks karıştırıcı	IKA Genius 3 vortex
HPLC	Agilent 1100-DAD 1200
pH metre	Hanna instruments ph 211 microprocessor
Tartım cihazı	Mettler toledo

2.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallar ve satın alındıkları firmaların ticari adları Tablo 2.2’de verilmiştir.

Tablo 2.2. Kimyasallar ve satın alındıkları firmalar

Madde Adı	Satın alınan firma
Asetik asit	Merck
Kafeik asit	Sigma
Klorogenik asit	Sigma
Fe ₃ Cl ₃ .6H ₂ O	Sigma
Ferulik asit	Fluka
Gallik asit	Sigma
Gentisik asit	Sigma
HCl	Merck

Tablo 2.2'nin devamı

Metanol	Merck
NaOH	Merck
P-Kumarik asit	Sigma
P-Hidroksi benzoik asit	Sigma
Protokatekualdehit	Fluka
Protokatekuik asit	Sigma
Sinapik asit	Sigma
Siringik asit	Sigma
Rosmarinik asit	Sigma
Vanilin	Sigma
NaNO ₂	Sigma
Siringaldehit	Sigma
Vanilik asit	Sigma

Tablo 2.3. Standart çözeltilerin ve kullanılan reaktiflerin hazırlanışları

Çözelti	Hazırlanışı
16 fenolik asit standardının stok çözeltileri	Her biri ayrı tüplerde 10 mg standardın 5 mL %40 metanol-su karışımında çözülmesiyle konsantrasyonları 2 mg/mL olarak hazırlandı, daha sonra bunlardan 10 ⁻⁶ ar mili molarlık ve bunlardanda 1 ⁻⁶ er mili molarlık stoklar hazırlanıp tüplerde +4 °C'de saklandı.
1 M HCl	8.3 mL % 37 Derişik HCl alınır ve saf su ile 100 mL'ye tamamlanır.
1 M NaOH	4 g NaOH alınır, 100 mL saf suda çözülür.
100 mM HCl	1 M HCl'den 1 mL alınıp saf suyla 10 mL'ye tamamlanır.
Peroksinitrit	0.6 M 100 mL HCl ile NaNO ₂ karışımı , 0.7 M 100 mL H ₂ O ₂ , 1.5 M 100 mL NaOH çözeltilerinden labaratuvarıda sentezlendi, dondurucuda bekletildi ve oluşan üst faz alınarak 302 nm'de absorbası ölçüldü ve daha sonra seyreltilerek kullanılmak üzere ependorflarla dondurucuda depolandı.
Metanol çözeltisi (A)	24 mL gradient saflıkta metanole 0.689 µL derişik asetik asit eklendi ve pH 3.6' ya ayarlandıktan sonra son hacim ultra saf suyla 40 mL 'ye tamamlandı.
TPTZ Çözeltisi(B)	0,0125 g TPTZ, 100 mM 1.6 mL HCl'de çözülür, son hacim 4 mL'ye metanolle tamamlanır.
FeCl ₃ .6H ₂ O çözeltisi (C)	0,0130 g FeCl ₃ .6H ₂ O 1.6 mL ultra saf suda çözülür, son hacim 4 mL'ye metanolle tamamlanır.
FRAP reaktifi (4 yürütmelik)	A, B ve C çözeltileri sırasıyla karıştırılır. (FRAP reaktifi taze hazırlanmalıdır.)

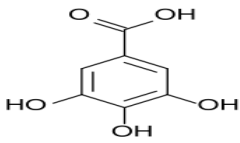
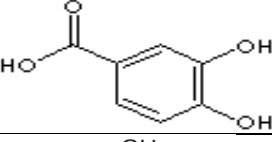
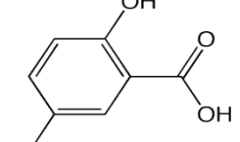
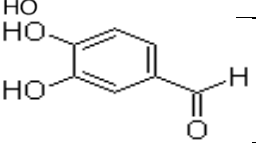
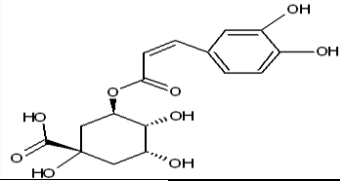
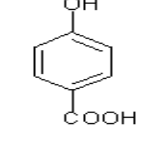
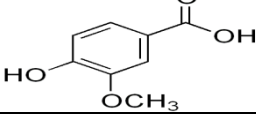
HPLC yürütmelerinde kullanılan standart çözeltiler, kullanılan reaktifler ve hazırlanışları Tablo 2.3'te verilmiştir.

2.1.3. Standartlar ve HPLC Sıraları

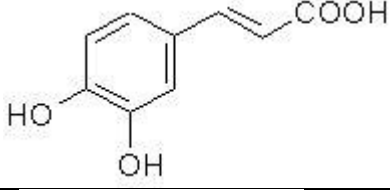
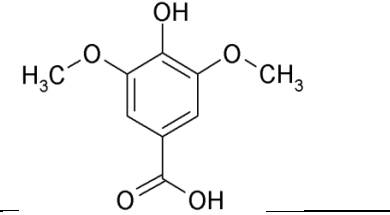
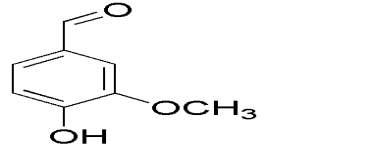
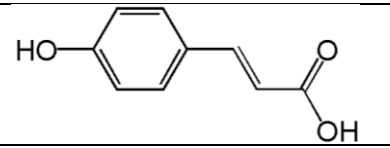
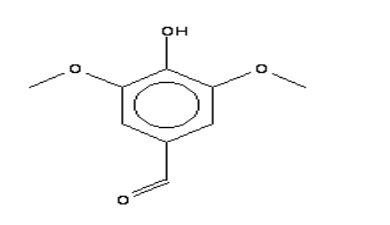
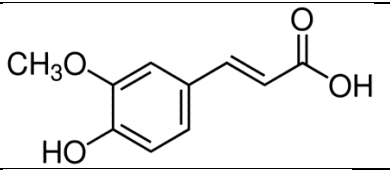
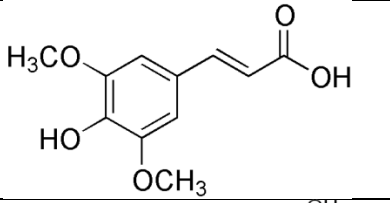
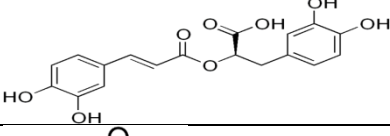
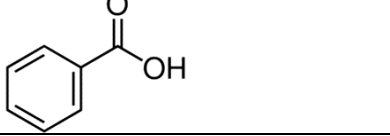
Tüm stok standart çözeltiler %40'lık metanolde 1 mM konsantrasyonda hazırlandı. Daha sonra bu stok çözeltilerden her bir standart 100 µM ve 500 µM olacak şekilde ependorfta hazırlanan 16'lı standart karışımları ve bu karışımlara müteakip pik karşılaştırmaları için 5-5-6 ve 4-4-4-4'lü karışımları HPLC'de yürütüldü.

16'lı standart karışımlarının çakıştırılmaları için 20'den fazla metod denendi ve en iyi çakıştırmanın olduğu metod seçilerek diğer kısımlar bu metod kullanılarak yapıldı. Bu metoda göre fenolik bileşiklerin geliş sırası DAD ile müteakip pik karşılaştırmalarından belirlendi ve aşağıdaki Tablo 2.4'teki gibidir.

Tablo 2.4. Çalışmada kullanılan fenolik bileşikler (HPLC alıkonma zamanı sırasına göre)

Bileşen	Formül
1- Gallik asit	
2- Protokatekuik asit	
3- Gentisik asit (2,5-dihidroxy benzoik asit)	
4- Protokatekualdehit	
5- Klorogenik asit	
6- p-OH Benzoik asit	
7- Vanilik asit	

Tablo 2.4'ün devamı

Bileşen	Formül
8- Kafeik asit	
9- Siringik asit	
10- Vanilin	
11- p-koumarik asit	
12- Syringaldehit	
13- Ferulik asit	
14- Sinapik asit	
15- Rosmarinik asit	
16- Benzoik asit	

2.1.4. HPLC-UV-DAD Koşulları

RP-HPLC-UV-DAD analizleri Agilent (Waldbronn, Almanya)'den bir diyot serili dedektör ile donanımlı 1100 seri ve DAD 1200 seridir. Enstrüman Chemstation programı ile (Agilent) kontrol edildi. Tüm analizler için bir C₁₈ kolon (250 mm × 4.6 mm i.d., 5 µm partikül; waters spherisorp ODS2) kullanıldı. Hareketli faz (A) %2 asetik asitin sudaki çözeltisi ve (B) 50/50 asetonitril / su içindeki % 0,5 asetik asitin çözeltilerinden oluşmaktaydı. Enjeksiyon hacmi 20 µL olarak kullanıldı. Akış hızı 1/2 ml.dk⁻¹ idi ve DAD dedektör 232, 246, 260, 272, 280, 290, 308, 328 nm'lerde ve bunlara ek olarak UV dedektör 280 ve 595 nm' de kromotogramlar kaydedildi. Enjeksiyon hacmi 20 µL ve kolon sıcaklığı 25 °C (klima ile oda sıcaklığı ayarlanarak)'dir.

Elüsyonda takip edilen ve en uygun çakışmanın olduğu gradient programı Tablo 2.5'de verilmiştir.

Tablo 2.5. HPLC elüsyon gradient programı

Zaman (dk)	B (%)	C (%)	D (%)	Akış (mL/dk)	Basınç
0,00	5,0	95,0	0,0	1,200	275
8,00	80,0	20,0	0,0	1,200	275
12,00	40,0	40,0	0,0	1,200	275
15,00	40,0	60,0	0,0	1,200	275
18,00	55,0	45,0	0,0	1,200	275
20,00	90,0	10,0	0,0	1,200	275

B: % 0,5 Asetik Asit; Asetonitril / su (50/50)

C: %2 Asetik Asit (suda)

D: % 100 Asetonitril

Tablo 2.6. HPLC yürüme sıra numaralarıyla verilmiş standart seri içerik ve adları

Seri Adı	Seri İçeriğindeki fenolik standartlar
A	1-6-11-16
B	2-7-12
C	3-8-13
D	4-9-14
E	5-10-15

Tablo 2.7. HPLC yıkama için kullanılan program

Zaman (dk)	B (%)	C (%)	D (%)	Akış (mL/dk)	Basınç
0,00	10,0	90,0	0,0	1,200	275
3,00	5,0	25,0	0,0	1,200	275
7,00	5,0	25,0	0,0	1,200	275
8,00	10,0	90,0	0,0	1,200	275
10,00	10,0	90,0	0,0	1,200	275

B: % 0,5 Asetik Asit; Asetonitril / su (50/50)

C: %2 Asetik Asit (suda)

D: % 100 Asetonitril

2.1.5. On-line HPLC-FRAP Koşulları

Kesikli modda 0.300 ml / dk hızla 20 ml hacimli şırınga ile enjeksiyon yapan yüksek basınca dayanıklı şırınga pompa sistemi ile FRAP reaktifi, on-line HPLC sistemine tubingle bağlantılı bir şekilde gönderilmektedir. UV dedektörden geçtikten sonra 595 nm'de antioksidan aktiviteyle doğru orantılı pik kromotogramı elde edilir. 10 farklı konsantrasyondaki standart seri içerikleri (Tablo 2.6) çift paralel olarak en uygun çakışmanın olduğu metottaki gradient karışımıyla (Tablo 2.5) yürütülmüştür.

Her bir seri, 1 mM, 650 µM, 420 µM, 270 µM, 175 µM, 115 µM, 75 µM, 50 µM, 30 µM, 20 µM toplam 10 farklı konsantrasyonda paraleliyle yürütülmüştür. Her yürütme arasında yıkama gradient programı (Tablo 2.7) uygulanmıştır.

2.1.6. Fenolik Asitlere Peroksinitrit ile Reaktivite Uygulaması

0.6 M 100 mL HCl ile NaNO₂ karışımı, 0.7 M 100 mL H₂O₂, 1.5 M 100 mL NaOH çözeltilerinden laboratuvarında sentezlenen peroksinitrit bir miktar MnO₄ ile karıştırılarak H₂O₂ 'in fazlası gaz halinde uzaklaştırıldıktan sonra süzgeç kağıdından süzüldü ve dondurucuda bekletildi. Daha sonra oluşan üst faz alınarak 302 nm'de absorbası ölçüldü.

En derişik ve en koyu sarı renkteki kısım olan bu üst faz 1 M NaOH ile 1 : 400 oranında seyreltilerek son konsantrasyon, λ_{302} : $1.67 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ değeri kullanılarak hesaplanan mutlak konsantrasyona göre 50 mM yapıldı (Hughes ve Nicklin, 1970). Her bir fenolik asitin 10 mM'lık stoklarından 500 µL' si alınıp, % 40'lık metanolla hacimleri 5 mL'ye tamamlanır. Daha sonra yine her 5 mL' ye tamamlanan fenolik asitler ayrı ayrı vortex

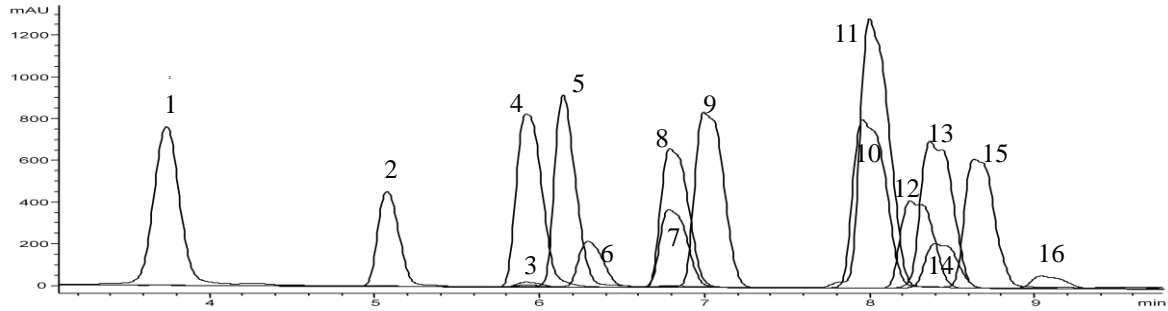
ile karıştırılırken önce 1 mL ardından yine 1 mL 50 mM'lık peroksinitritle (son konsantrasyon 10 mM) karıştırılarak 15 dk'lık inkübasyonlara bırakılırlar (Toshio vd.,1999). pH'lar 7.4'e 1 M HCl ile ayarlandıktan sonra toplam hacimler 10 mL'ye ultra saf suyla tamamlanır. Daha sonra peroksinitrit ile reaktiviteye sokulan bu karışımlar HPLC'de paralelleriyle yürütüldüler.

Peroksinitrit doğrudan 1 M HCl ile reaksiyona sokulursa etkinliğini yitirir. Dolayısıyla bu bağlamda fenolik asitlerin peroksinitritle olan reaktivite karışımlarının peroksinitrit aktivitesi durdurulduktan sonraki aynı miktar aynı pH'da kör karışımları hazırlanarak aynı şekilde paralelleriyle HPLC'de yürütüldüler.

3. BULGULAR

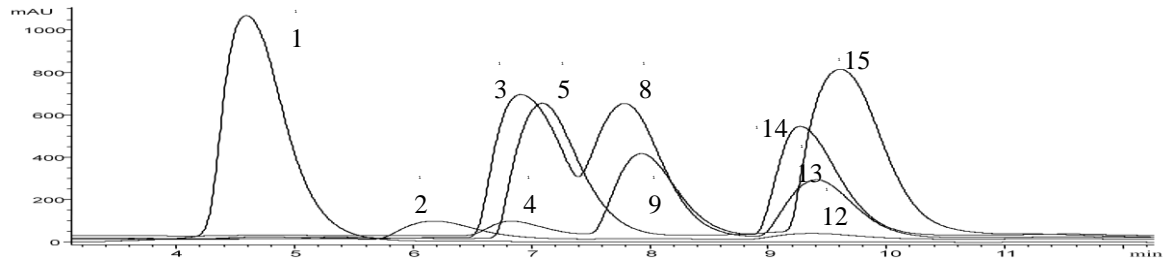
3.1. DAD ile Çakışan Bileşen Analizi

HPLC ile fenolik asitlerin çakıştırma metodolojisiyle HPLC' de yürütüldükten sonra DAD ile her fenolik asit pikinin spektrumundan fenolik asitlerin kimliği belirlendi dolayısıyla da çakışanların yerleri belirlendi ve bu karmaşık durumu gösteren kromotogramlar aşağıdadır (Şekil 3.1) (Şekil 3.2).



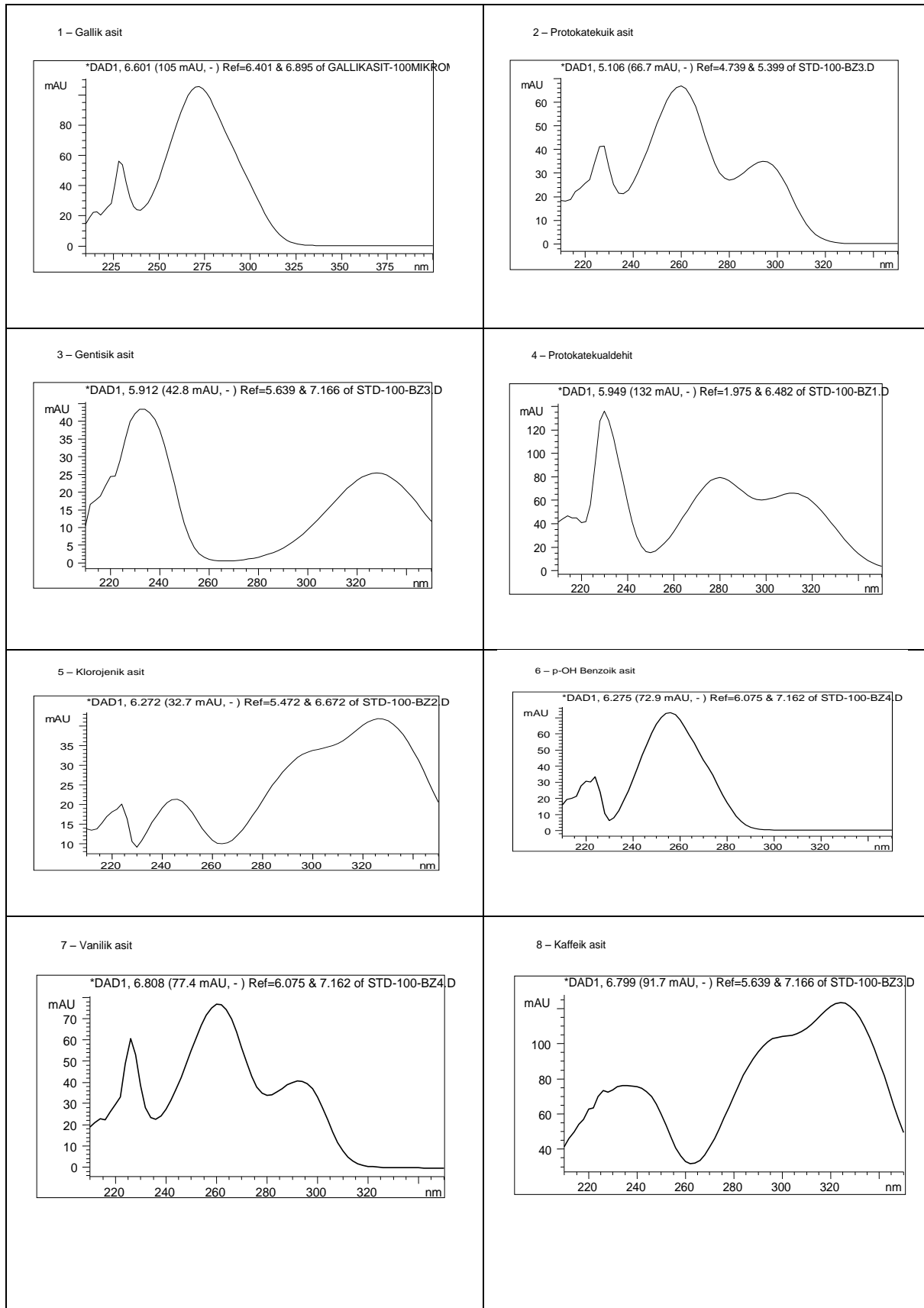
Şekil 3.1. 1000 μM ' lık 5 farklı fenolik asit karışımının 280 nm çakışma kromotogramı
1-gallik asit, 2-protokatekuik asit, 3-gentisik asit, 4-protokatekualdehit, 5-
klorogenik asit, 6-p-OH benzoik asit, 7-vanilik asit, 8-kafeik asit, 9-syringik asit,
10-vanilin, 11-p-kumarik asit, 12-syringaldehit, 13- ferulik asit, 14- Sinapik asit,
15-rosmarinik asit, 16- benzoik asit

DAD ile fenolik asit standartlarının çakıştığı kromotogram her bir fenolik asit pikine ait spektrumlarından belirlendi (Tablo 4.1). Ayrıca UV 595 nm' de on-line FRAP aktivitesi gösteren Fenolik asit piklerinin çakışma kromotogramı kolondan ayrılarak çıkan fenolik asitler on-line uygulamada tubing içerisinde reaksiyon gerçekleştikten sonra dedektöre geçtiği için beklenen alıkonma zamanlarından daha ilerde geç gelen pikler mevcuttur ve ayrıca 16 standardın her biri FRAP aktivitesi göstermediğinden 595 nm'de pik vermemiştir (Şekil 3.2).

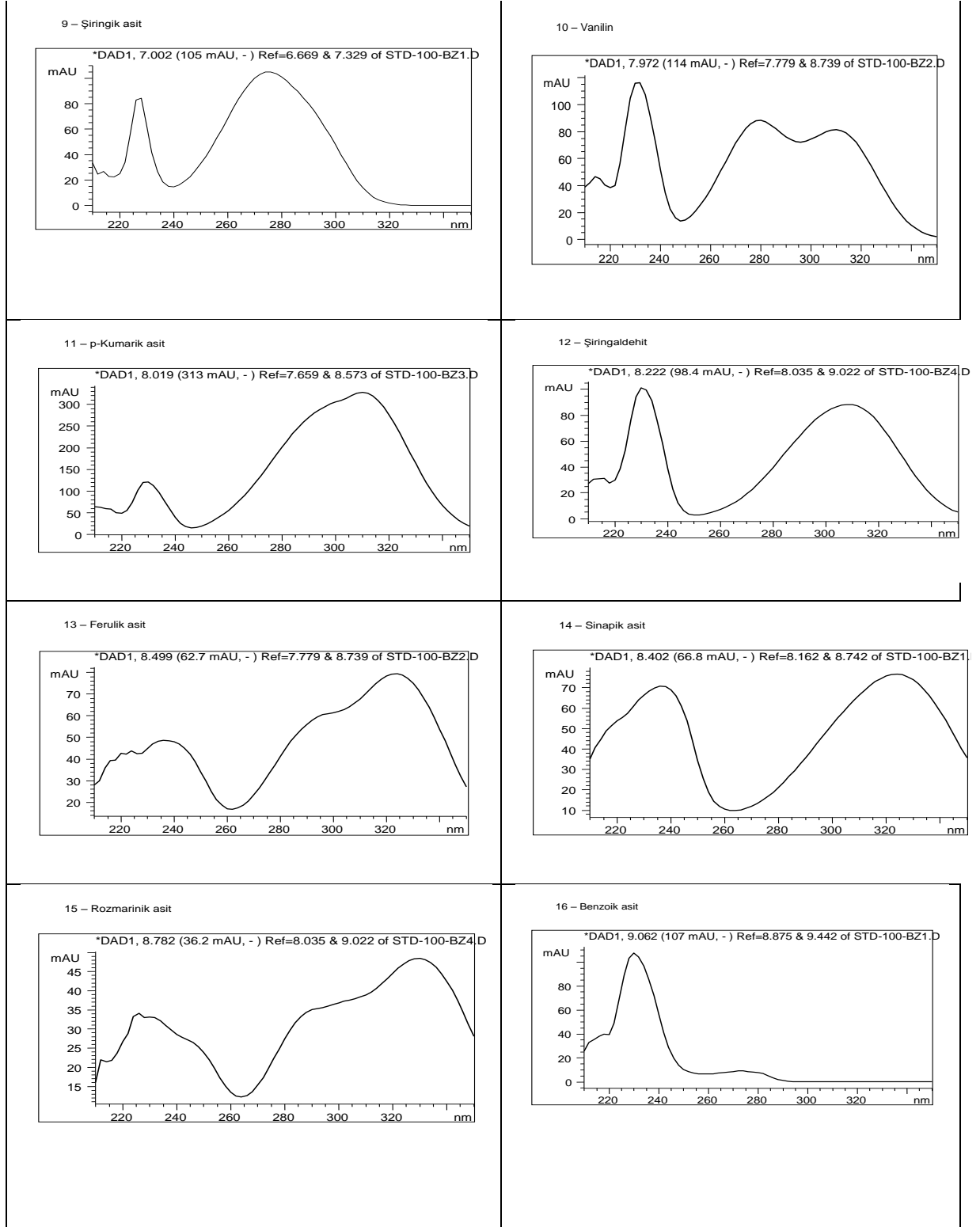


Şekil 3.2. 1000 μM ' lık 5 farklı fenolik asit karışımının 595 nm çakışma kromotogramı
1-gallik asit, 2-protokatekuik asit, 3-gentisik asit, 4-protokatekualdehit, 5-
klorogenik asit, 8-kafeik asit, 9-syringik asit, 12-syringaldehit, 13- ferulik asit, 14-
Sinapik asit, 15-rosmarinik asit

Tablo 3.1. Fenolik asitlerin spektrumları

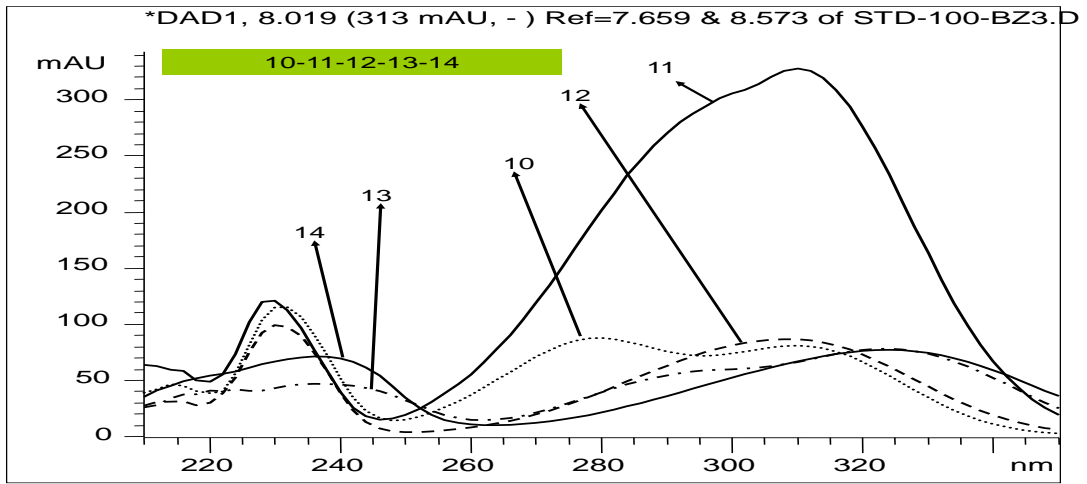


Tablo 3.1'in devamı

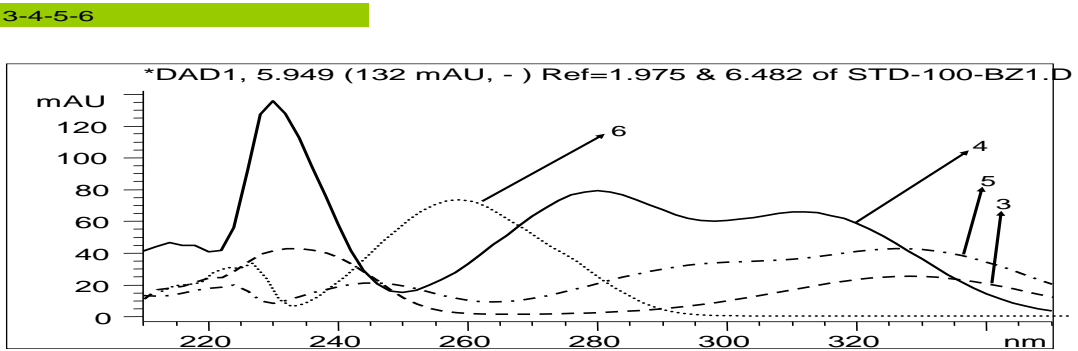


3.2. UV ve DAD Veri Karşılaştırmalı Analizi ile Çakışan Pik Analizi

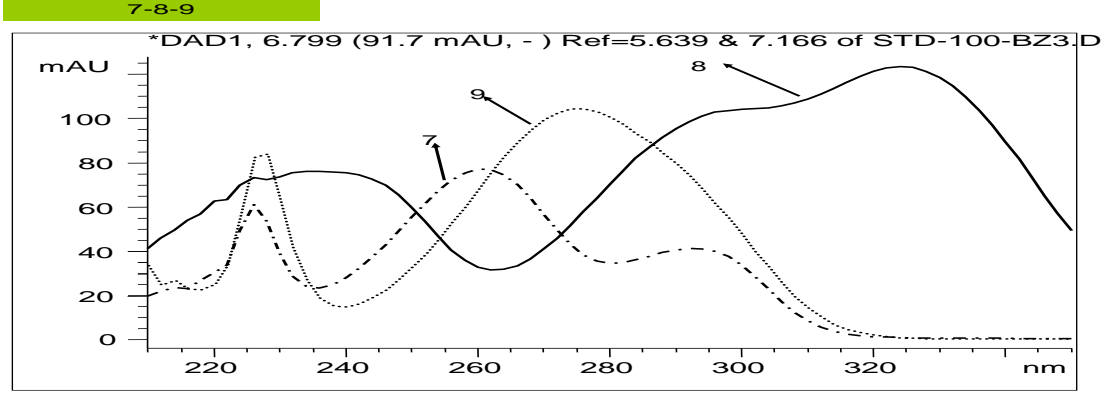
UV spektrumları üst üste çakıştırılarak çalışmada ayrımı sağlayacak en uygun dalga boyları belirlendi. Aşağıdaki spektrum çakışmaları (Şekil 3.3, Şekil 3.4, Şekil 3.5, Şekil 3.6) dikkate alınarak fenolik asitlerin maksimum dalga boyları ve bu dalga boylarına göre çalışmada ayrımın fark edilebileceği dalga boyları seçimi yapıldı (Tablo 3.2)



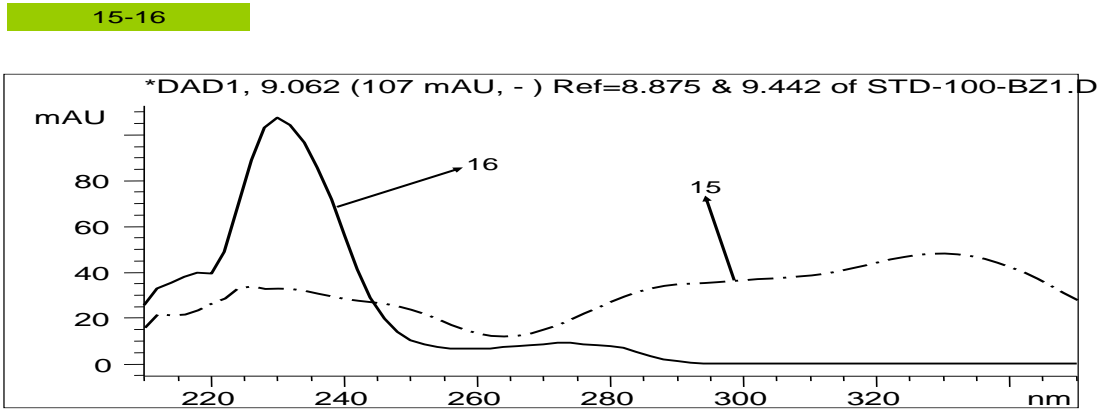
Şekil 3.3. HPLC' de Yürüme numara sırasıyla 5 farklı fenolik asitin spektrum çakıştırılması (10-vanilin, 11-p-kumarik asit, 12-syringaldehit, 13-ferulik asit, 14-sinapik asit)



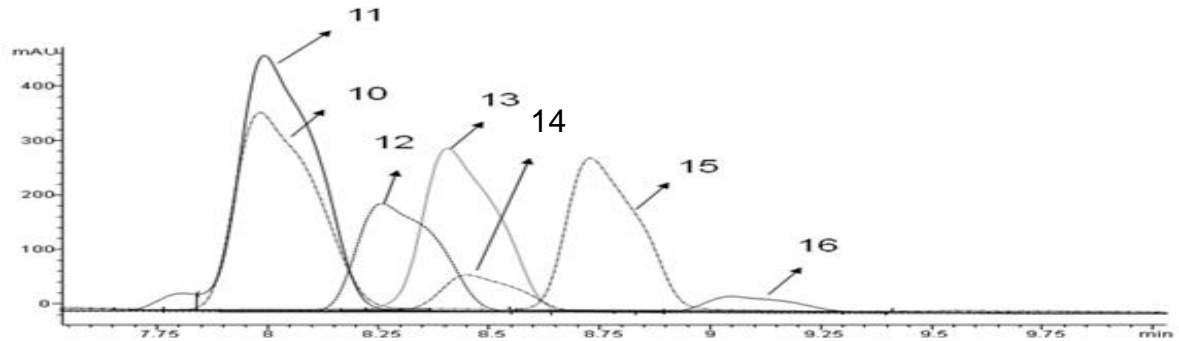
Şekil 3.4. HPLC' de Yürüme numara sırasıyla 4 farklı fenolik asitin spektrum çakıştırılması (3- Gentisik asit (2,5-dihidroxy benzoik asit), 4- Protokatekulaldehit, 5- Klorogenik asit, 6- p-OH Benzoik asit)



Şekil 3.5. HPLC' de Yürüme numara sırasıyla 3 farklı fenolik asitin spektrum çakıştırılması (7-vanilik asit, 8-kafeik asit, 9-syringik asit)



Şekil 3.6. HPLC' de Yürüme numara sırasıyla 2 farklı fenolik asitin spektrum çakıştırılması (15-rozmarinik asit, 16- benzoik asit)



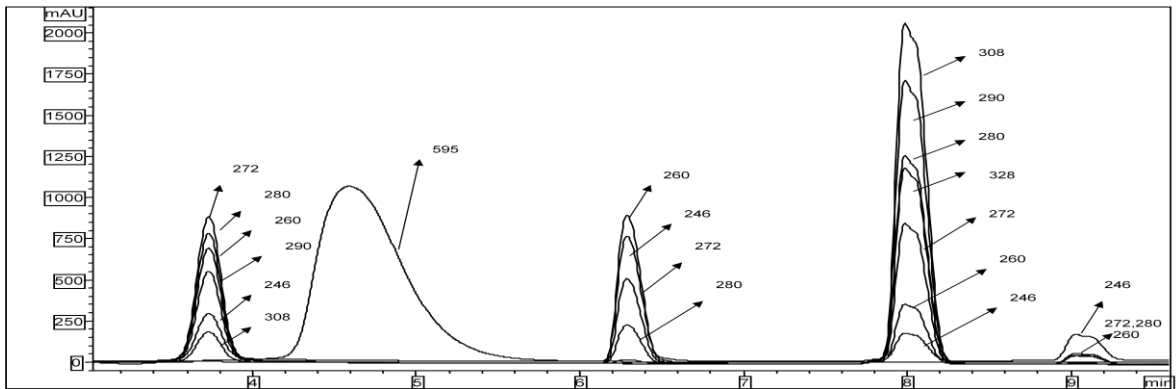
Şekil 3.7. HPLC' de Yürüme numara sırasıyla 7 farklı fenolik asitin DAD kromotogram çakıştırılması (10-vanilin, 11-p-kumarik asit, 12-syringaldehit, 13- ferulik asit, 14- Sinapik asit, 15-rozmarinik asit, 16- benzoik asit)

Tablo 3.2. Fenolik asitlerin dalga boyları

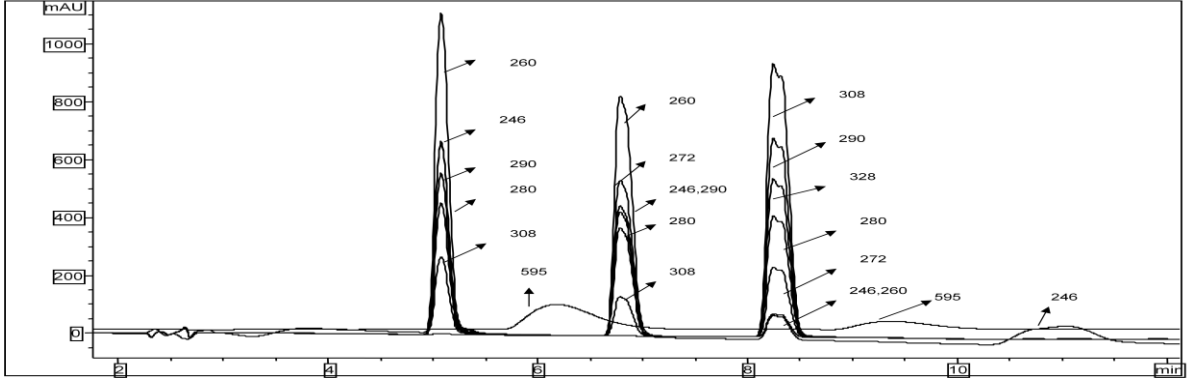
Fenolik Asitler	λ_{\max}	Çalışılan dalgaboyları
Gallik asit	272	272
Protokatekuik asit	260	260
protokatekualdehit	280	280
Gentisik asit	232	246
Klorogenik asit	328	328
p-OH benzoik asit	256	260
Vanilik asit	260	260
Kafeik asit	324	328
Syringik asit	276	272
Vanillin	280	280
p-kumarik asit	310	308
syringaldehit	308	308
Ferulik asit	320	328
Sinapik asit	324	328
Rosmarinik asit	328	328
Benzoik asit	234	246

3.3. Karışımların Dalga Boyu Çakıştırmaları

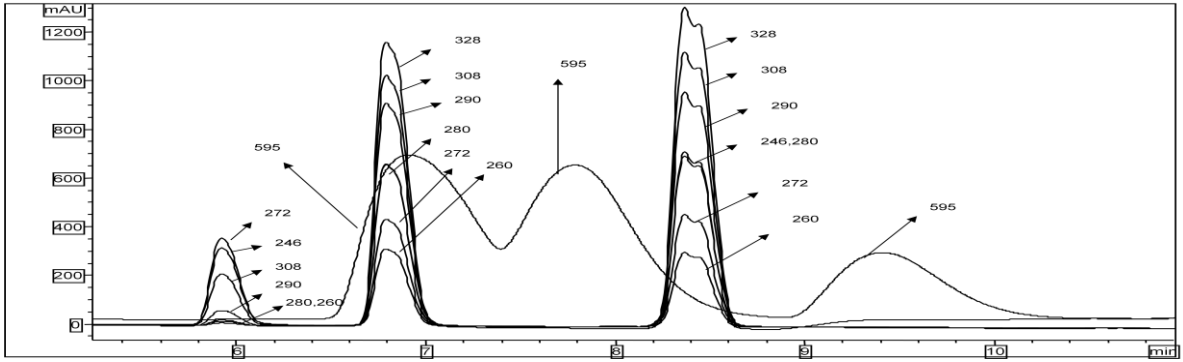
Tablo 2.6'da verilen fenolik asit seri karışımları, dalga boyu seçimindeki pik ayrımının görülebilmesi ve etkin aktivitenin daha iyi gözlenebilmesi için 595 nm'deki on-line FRAP aktivitesinde dahil olduğu seçilen tüm dalga boylarında çakıştırılarak gözlendi (Şekil 3.8, Şekil 3.9, Şekil 3.10, Şekil 3.11, Şekil 3.12).



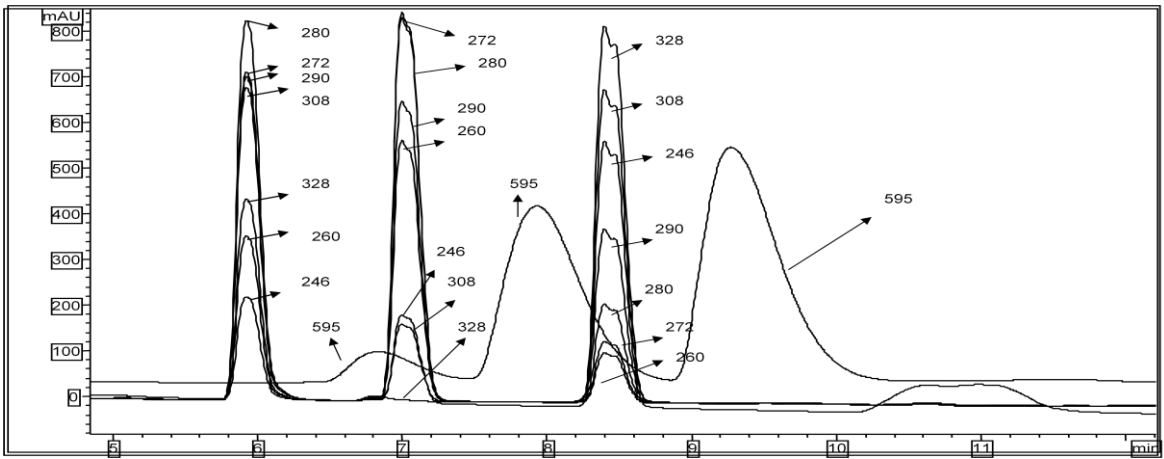
Şekil 3.8. A seri karışımının çalışma için seçilen tüm dalga boylarındaki kromatogram çakışması



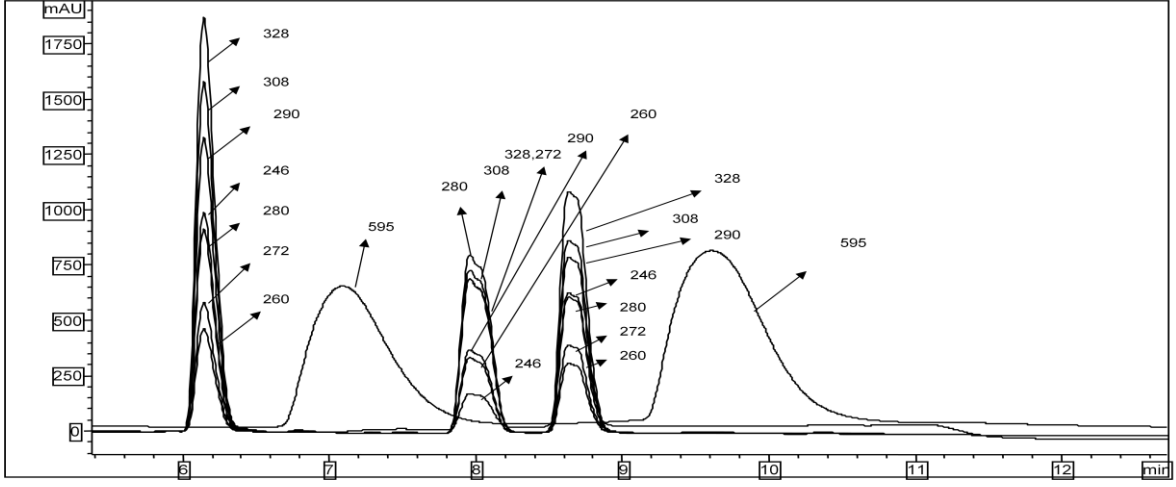
Şekil 3.9. B seri karışımının çalışma için seçilen tüm dalga boylarındaki kromotogram çakıştırması



Şekil 3.10. C seri karışımının çalışma için seçilen tüm dalga boylarındaki kromotogram çakıştırması



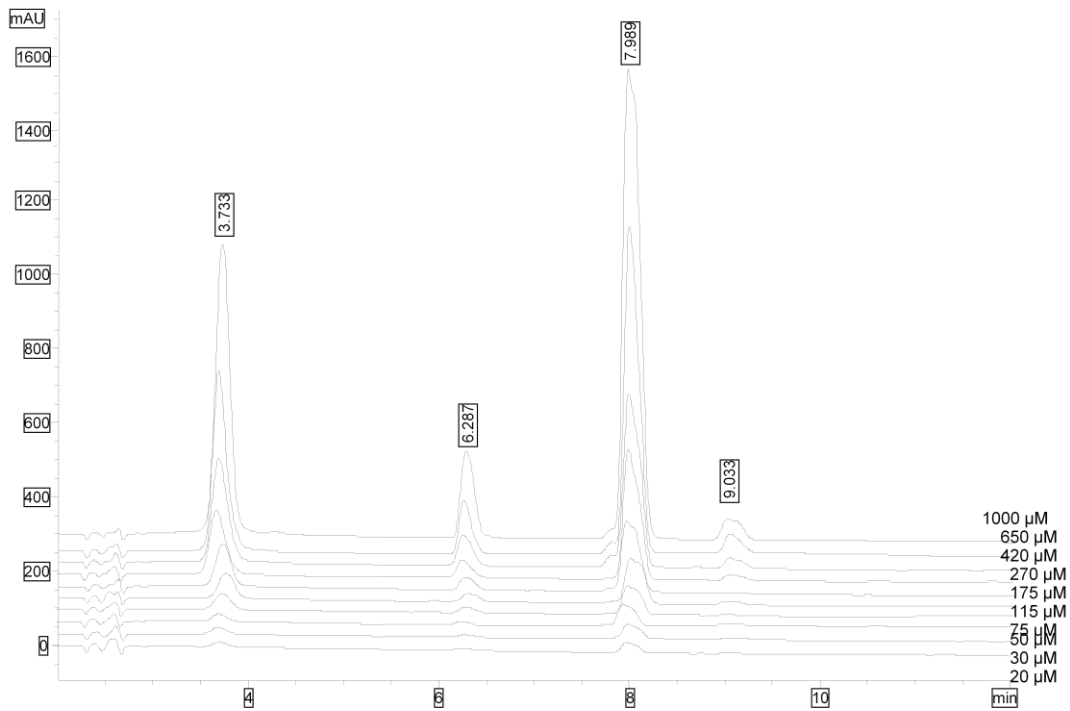
Şekil 3.11. D seri karışımının çalışma için seçilen tüm dalga boylarındaki kromotogram çakıştırması



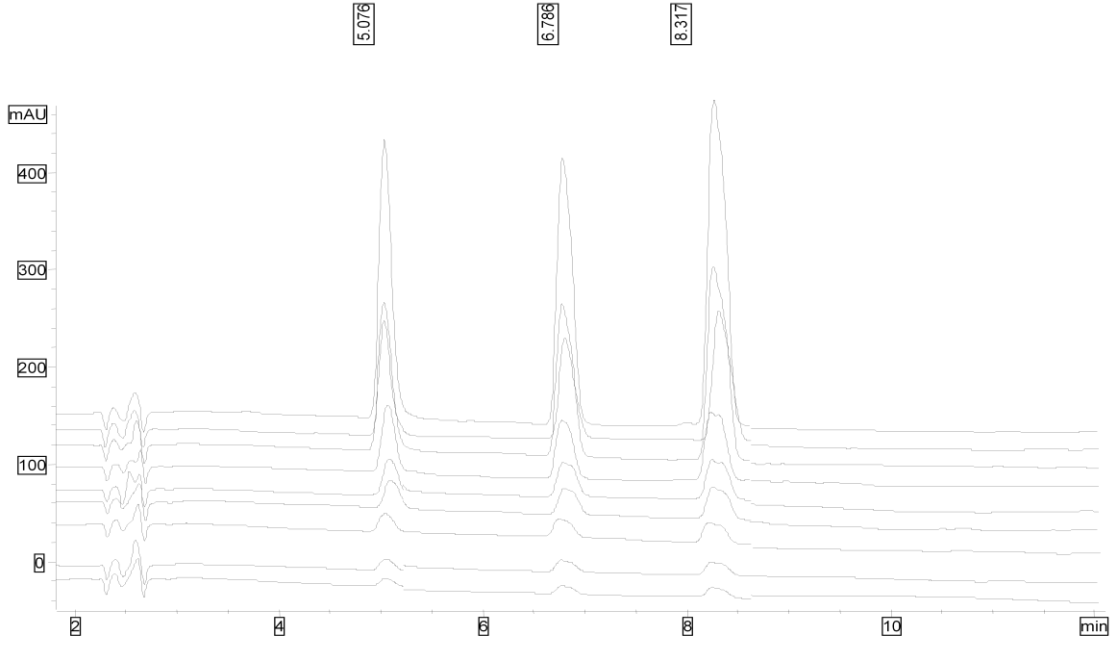
Şekil 3.12. E seri karışımının çalışma için seçilen tüm dalga boylarındaki kromatogram karşılaştırması

3.4. Konsantrasyon Değişiminin Kromatogramlardaki Etkisi

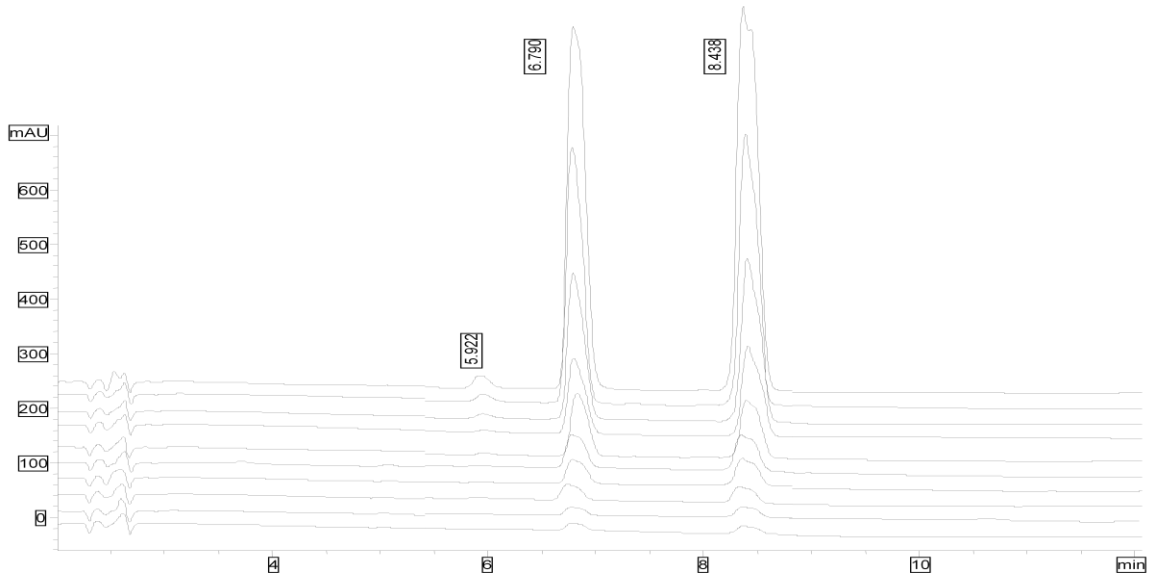
Seçilen 10 farklı konsantrasyon (1 mM, 650 μ M, 420 μ M, 270 μ M, 175 μ M, 115 μ M, 75 μ M, 50 μ M, 30 μ M, 20 μ M) için numune karışımları (A-B-C-D-E) HPLC’de yürütüldü ve kromatogramları karşılaştırıldı, konsantrasyondaki lineerlik 280 ve 595 nm’ler için gözlemlendi (Şekil 3.13 - Şekil 3.22). Ayrıca pikler konsantrasyona bağlı olarak artış ya da azalış göstermektedir ve bu artış-azalış piklerin daha çok birbirine yaklaşması ya da uzaklaşması yoluyla pik çakışmasına neden olabilmektedir.



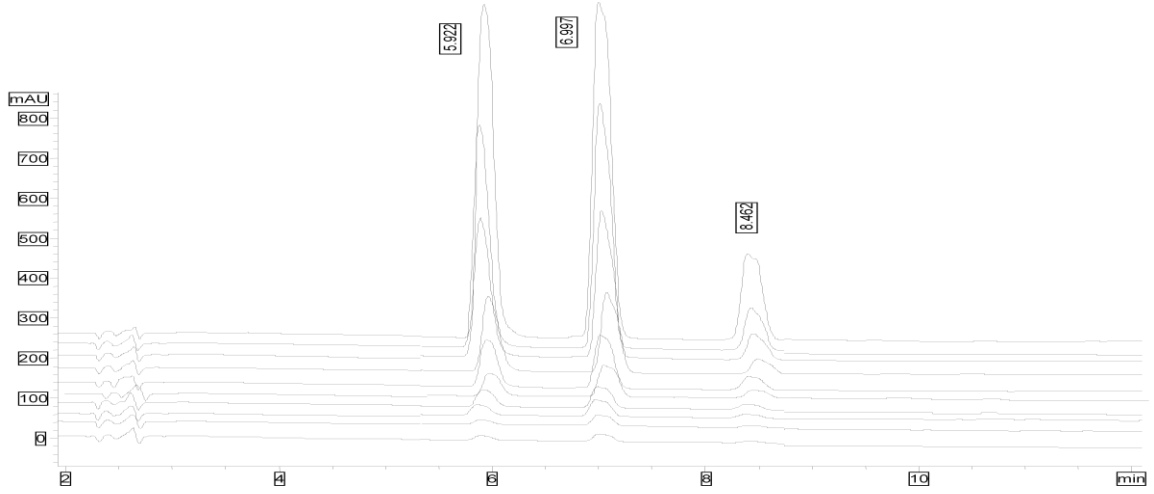
Şekil 3.13. A seri karışımının 280 nm’de 10 farklı konsantrasyon için kromatogram karşılaştırılması



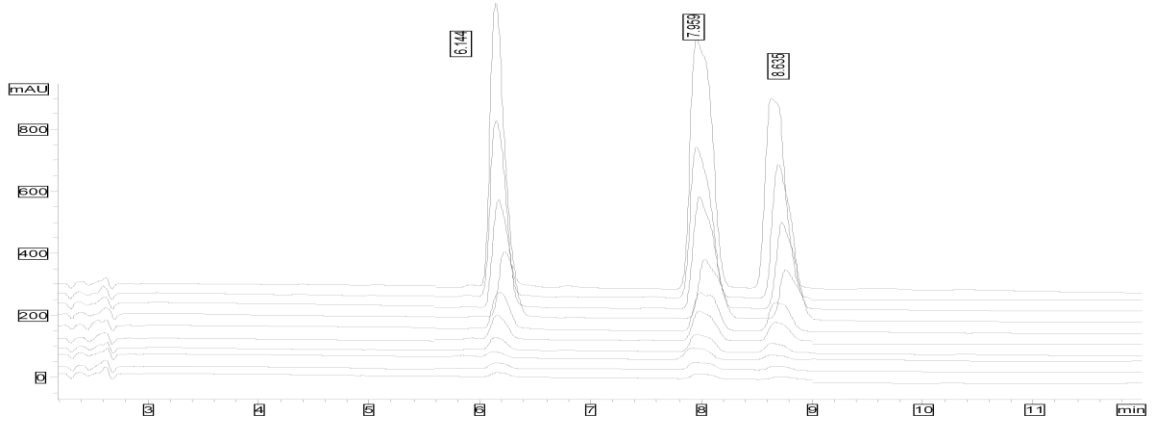
Şekil 3.14. B seri karışımının 280 nm'de 10 farklı konsantrasyon için kromotogram çakıştırılması



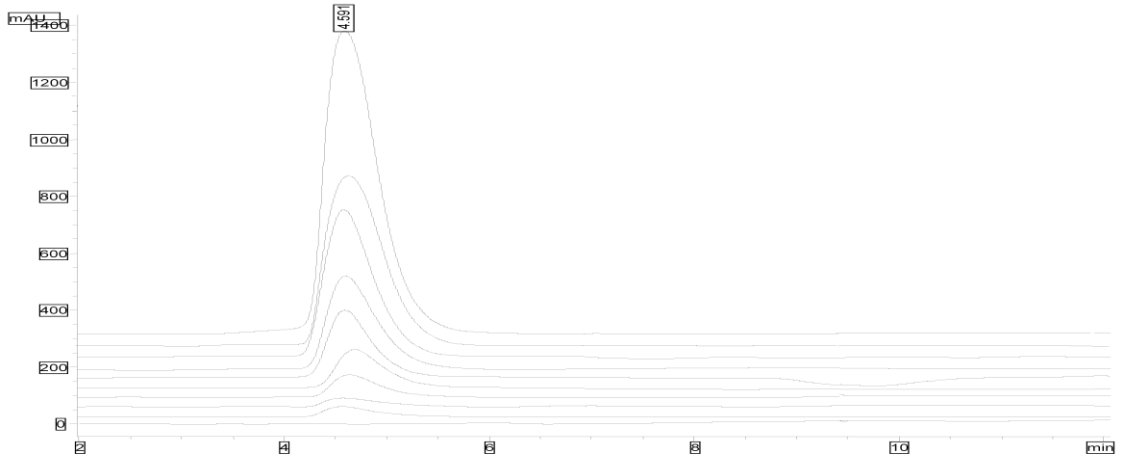
Şekil 3.15. C seri karışımının 280 nm'de 10 farklı konsantrasyon için kromotogram çakıştırılması



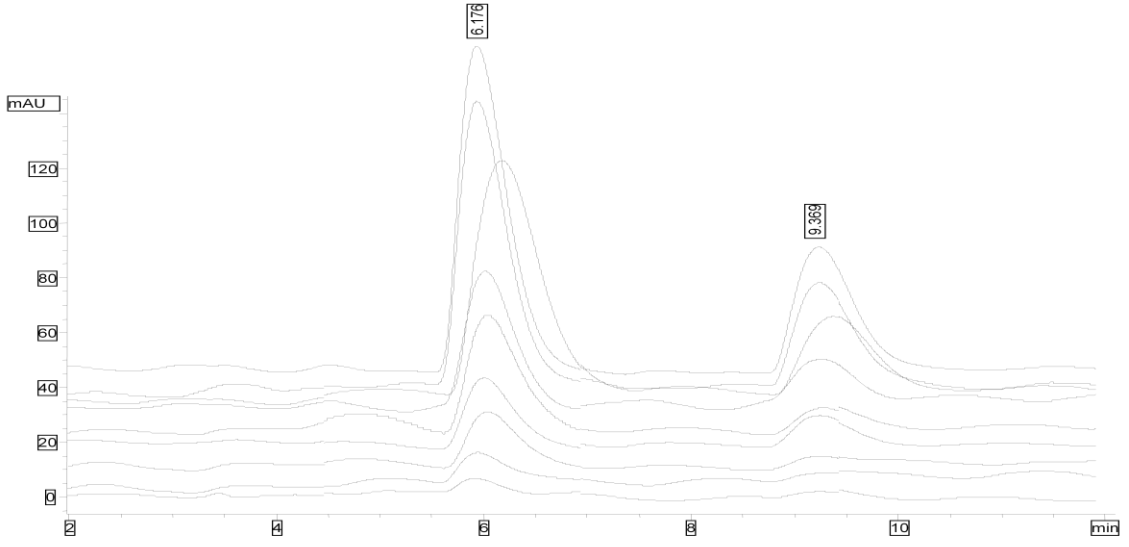
Şekil 3.16. D seri karışımının 280 nm'de 10 farklı konsantrasyon için kromotogram çakıştırılması



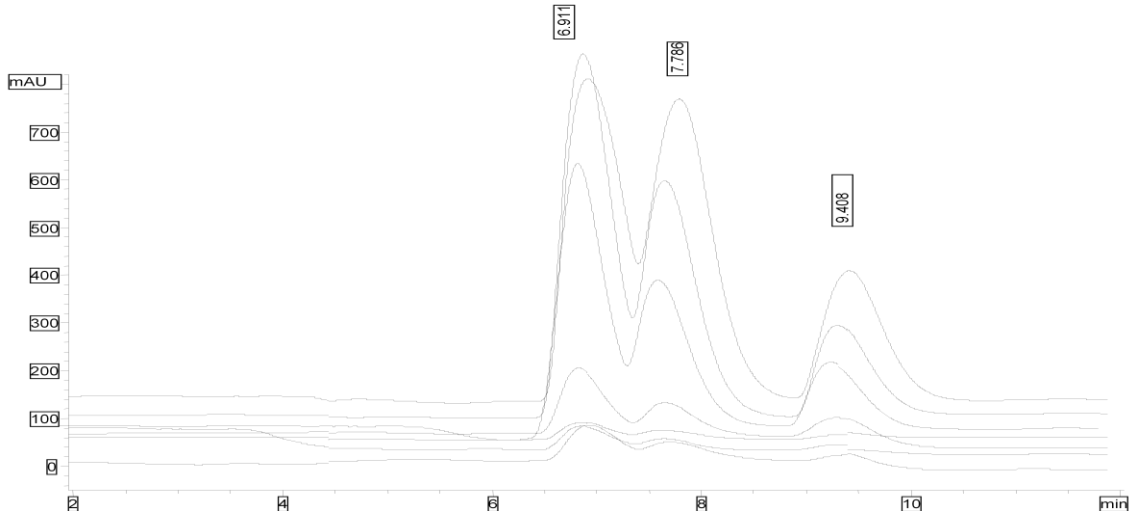
Şekil 3.17. E seri karışımının 280 nm'de 10 farklı konsantrasyon için kromotogram çakıştırılması



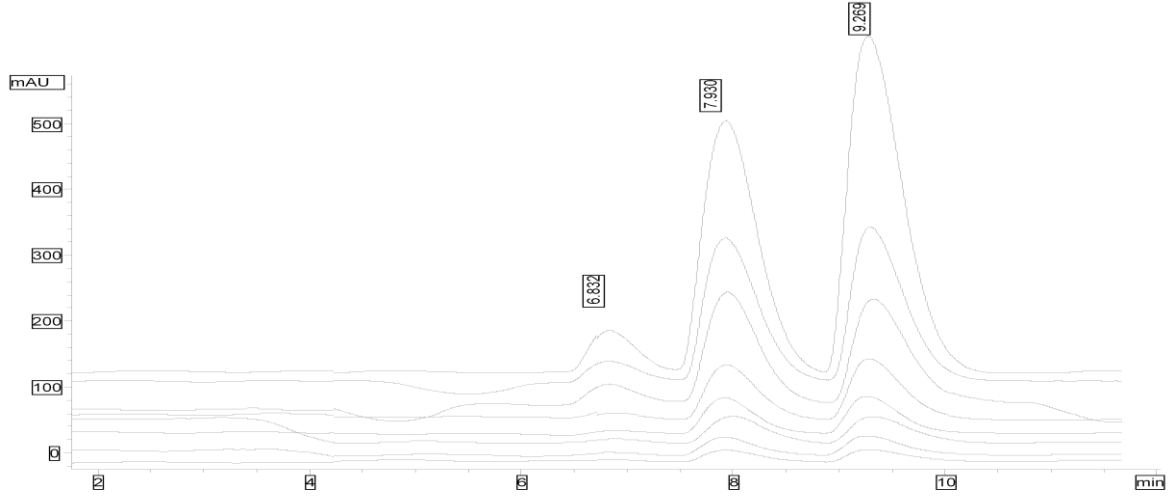
Şekil 3.18. A seri karışımının 595 nm'de 10 farklı konsantrasyon için kromotogram çakıştırılması



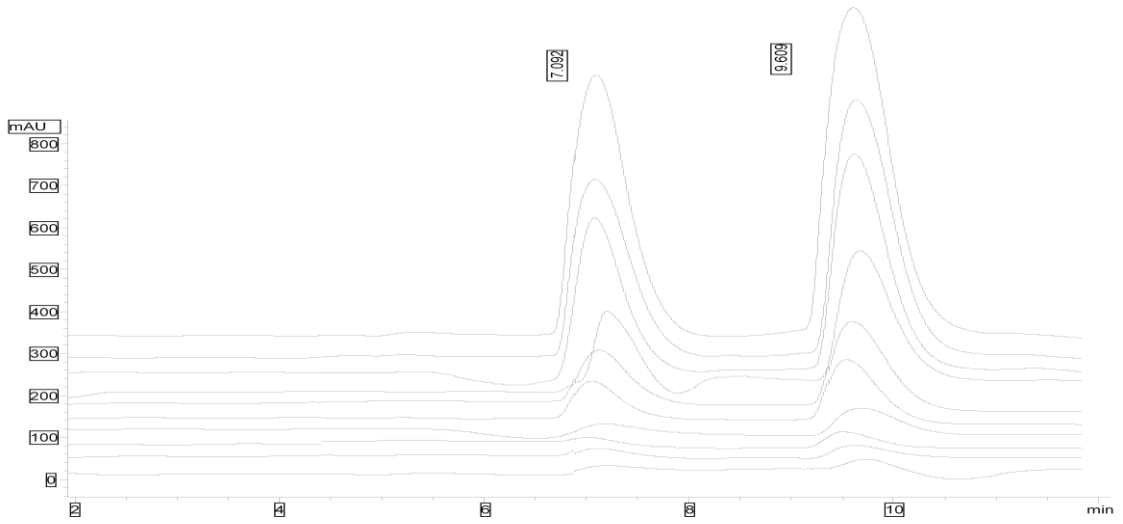
Şekil 3.19. B seri karışımının 595 nm'de 10 farklı konsantrasyon için kromotogram çakıştırılması



Şekil 3.20. C seri karışımının 595 nm'de 10 farklı konsantrasyon için kromotogram çakıştırılması



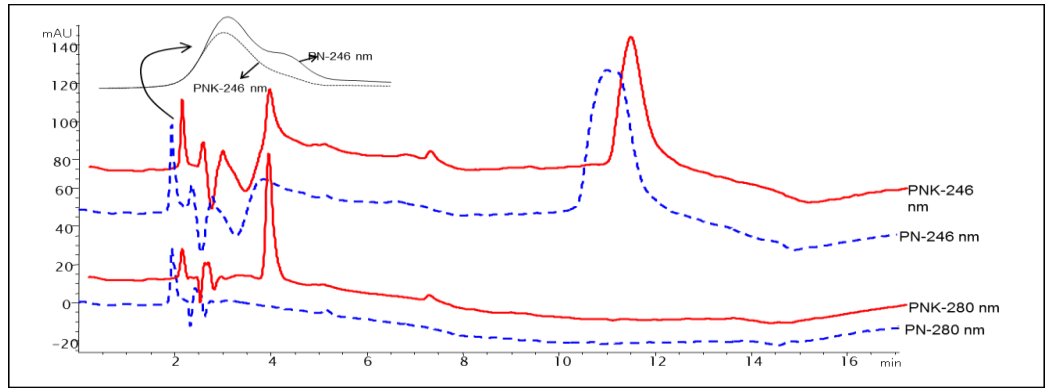
Şekil 3.21. D seri karışımının 595 nm'de 10 farklı konsantrasyon için kromotogram çakıştırılması



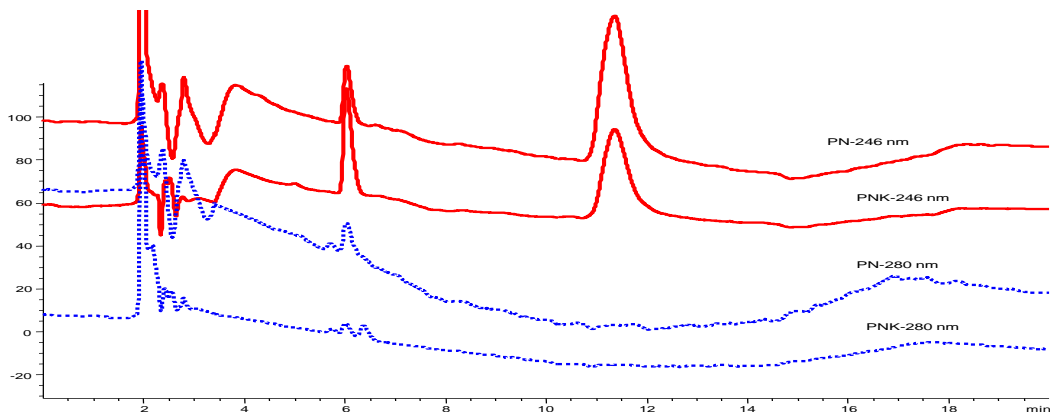
Şekil 3.22. E seri karışımının 595 nm'de 10 farklı konsantrasyon için kromotogram çakıştırılması

3.5. Çakışan Bileşenlerin Peroksinitrit ile Dönüştürülmesiyle HPLC-DAD Analizi Sonucu Tayini

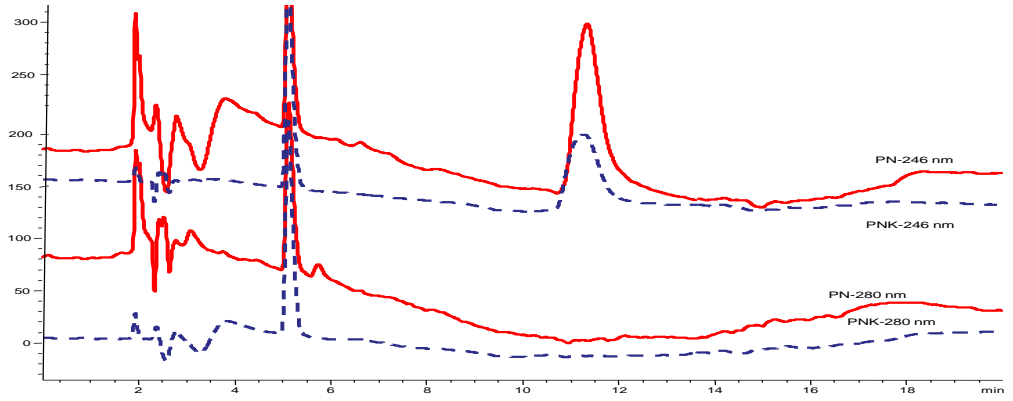
16 fenolik asitin her biri peroksinitritle off-line olarak reaktiviteye sokulduktan sonra HPLC’de yürütüldüler. Peroksinitritle bazı fenolik asitler farklı polaritede bileşikler oluştururken bazıları peroksinitritle reaksiyon oluşturmadı. Peroksinitritle reaktivite veren fenolik asitler farklı zamanlarda HPLC kromotogramlarında gelerek farklı spektrumlar oluşturdular. Peroksinitritin aktivitesi 1 M HCl ile durdurulduktan sonra (kör) uygulanması (PNK) ve peroksinitritle doğrudan muamele edilerek (PN) uygulanması ile oluşan kromotogram çakışmalarında pik boyu değişimleri dikkat çekmektedir. Değişimlerin en etkili görüldüğü dalga boyları 246 ve 280 nm’ler olduğu için bu dalga boyları seçilerek kromotogram çakışmaları karşılaştırılmıştır (Şekil 3.23-Şekil 3.38).



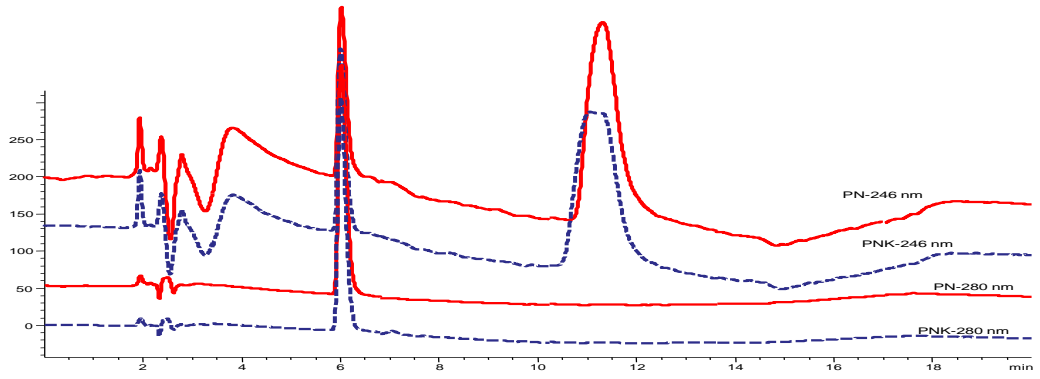
Şekil 3.23. Gallik asit peroksinitritle 246 ve 280 nm’deki kör ve doğrudan uygulamalarla reaktivite karşılaştırılması kromotogramı



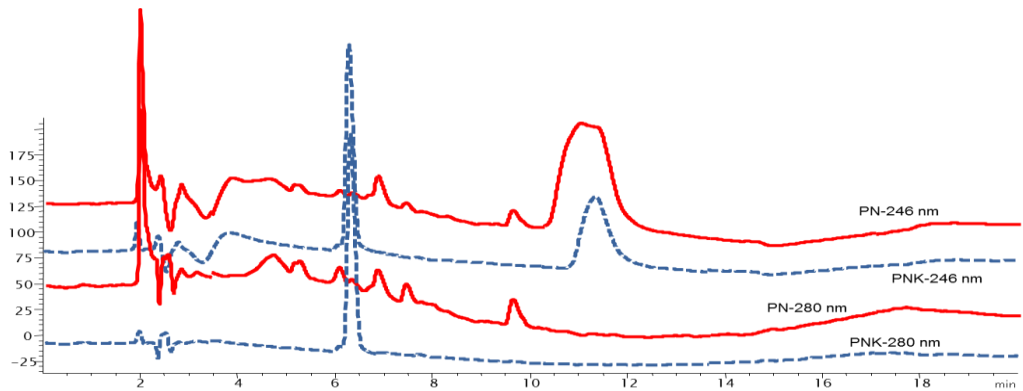
Şekil 3.24. Protokatekuik asit peroksinitritle 246 ve 280 nm’deki kör ve doğrudan uygulamalarla reaktivite karşılaştırılması kromotogramı



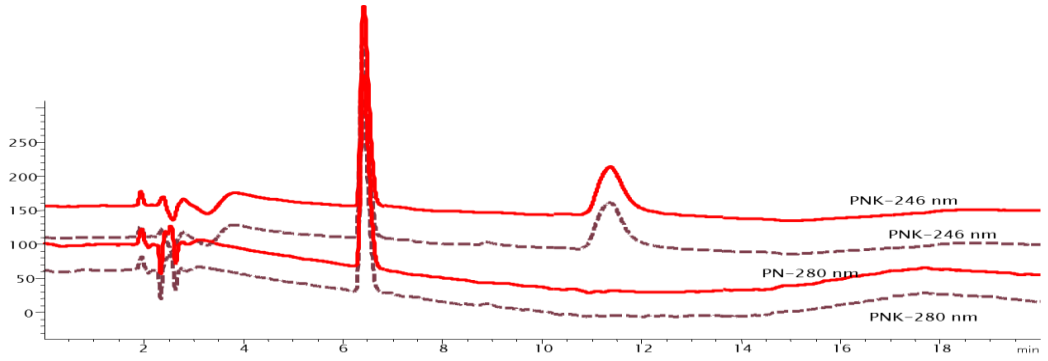
Şekil 3.25. Protocateckulaldehytin peroksinitritle 246 ve 280 nm'deki kör ve doğrudan uygulamalarla reaktivite karşılaştırılması kromotogramı



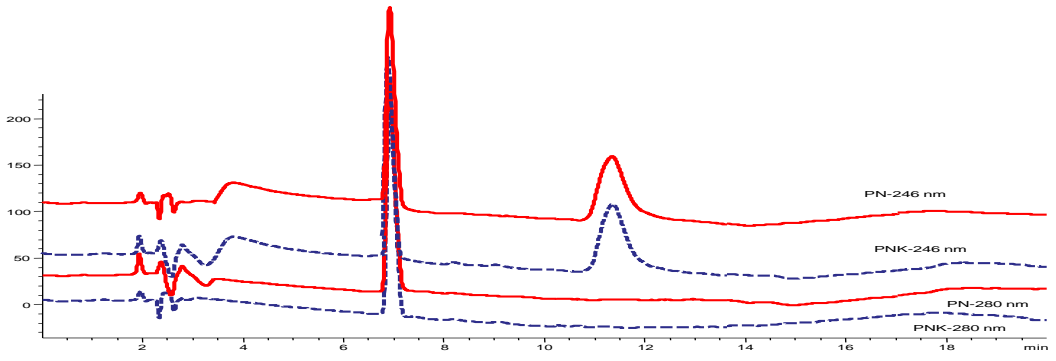
Şekil 3.26. Gentic asitin peroksinitritle 246 ve 280 nm'deki kör ve doğrudan uygulamalarla reaktivite karşılaştırılması kromotogramı



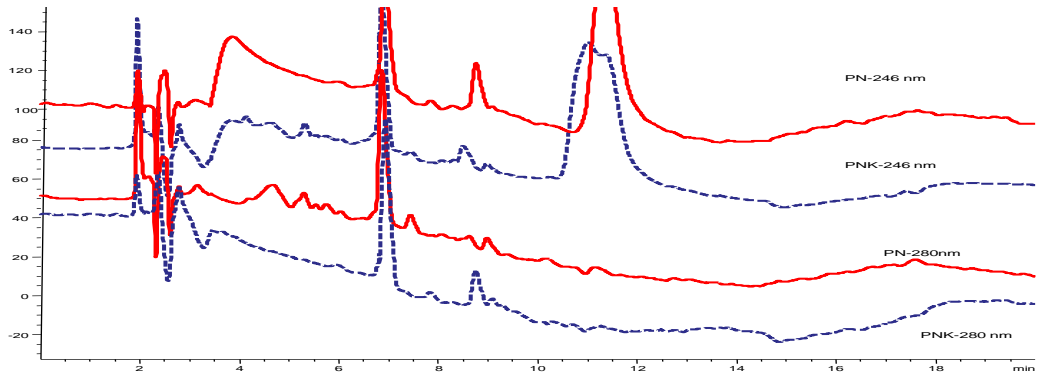
Şekil 3.27. Klorojenik asitin peroksinitritle 246 ve 280 nm'deki kör ve doğrudan uygulamalarla reaktivite karşılaştırılması kromotogramı



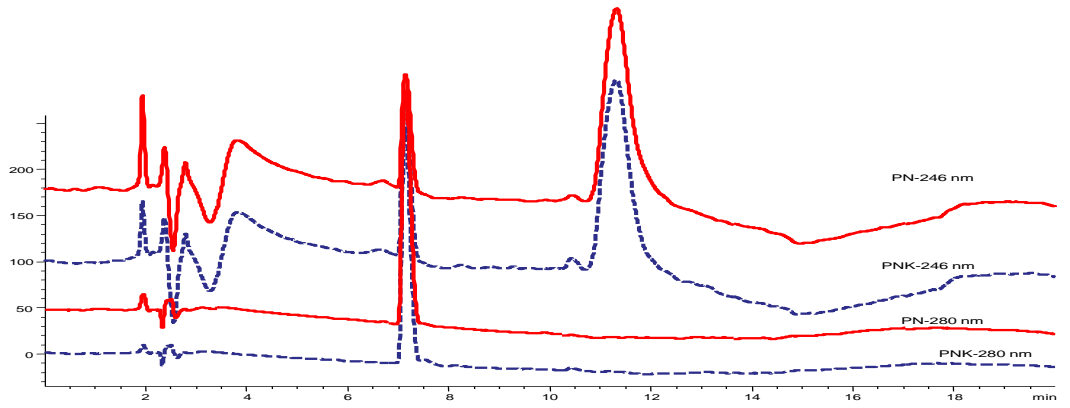
Şekil 3.28. p-OH benzoik asitin peroksinitritle 246 ve 280 nm'deki kör ve doğrudan uygulamalarla reaktivite karşılaştırılması kromatogramı



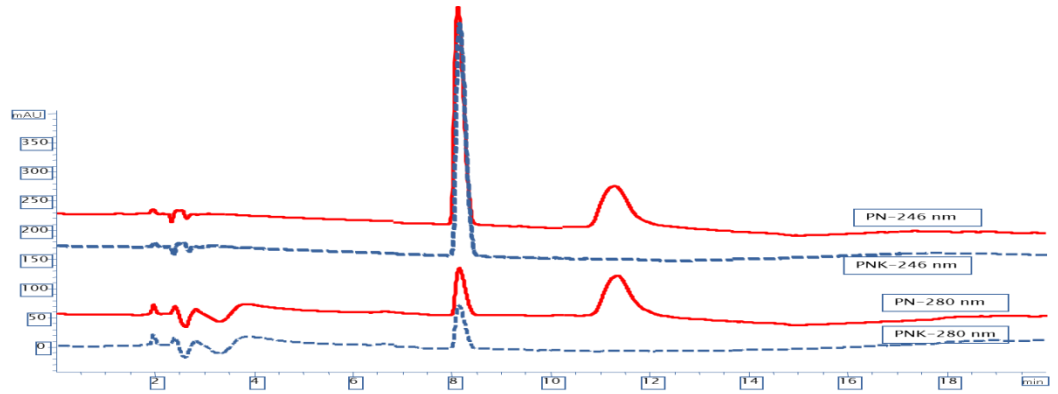
Şekil 3.29. Vanilik asitin peroksinitritle 246 ve 280 nm'deki kör ve doğrudan uygulamalarla reaktivite karşılaştırılması kromatogramı



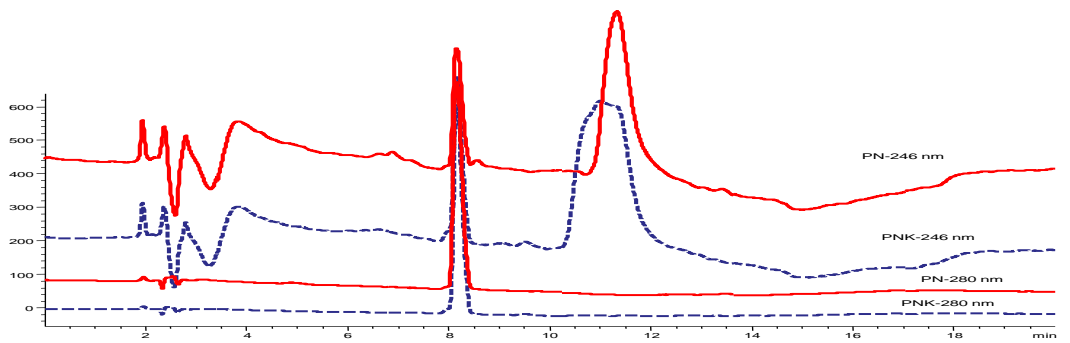
Şekil 3.30. Kafeik asitin peroksinitritle 246 ve 280 nm'deki kör ve doğrudan uygulamalarla reaktivite karşılaştırılması kromatogramı



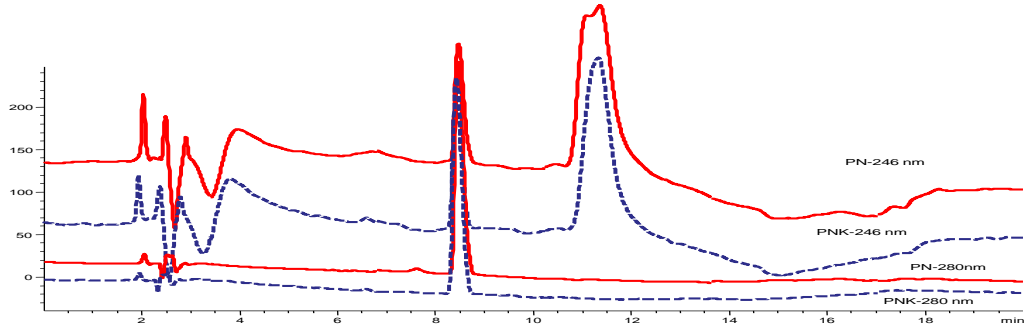
Şekil 3.31. Syringik asitin peroksinitritle 246 ve 280 nm'deki kör ve doğrudan uygulamalarla reaktivite karşılaştırılması kromotogramı



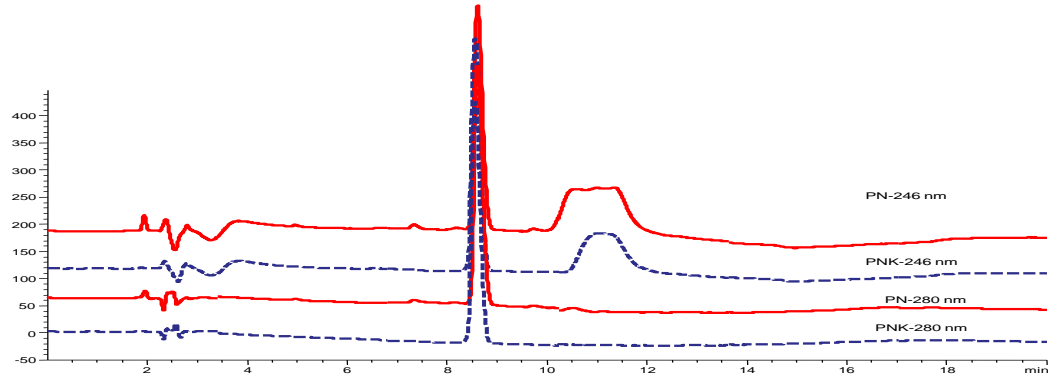
Şekil 3.32. Vanillinin peroksinitritle 246 ve 280 nm'deki kör ve doğrudan uygulamalarla reaktivite karşılaştırılması kromotogramı



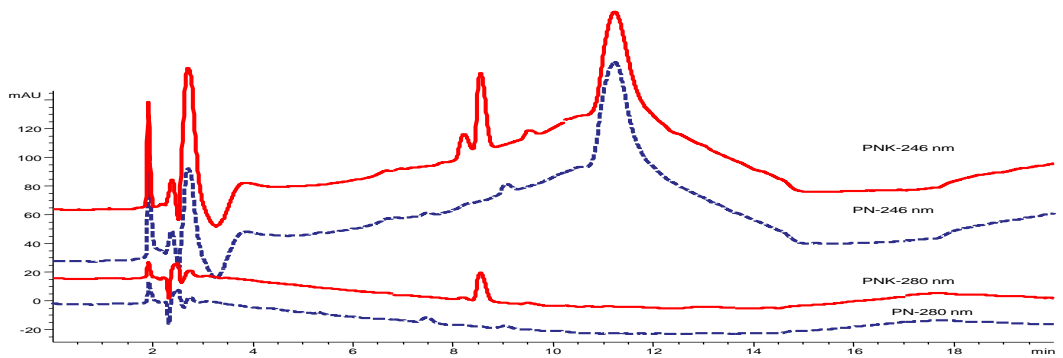
Şekil 3.33. p-kumarik asitin peroksinitritle 246 ve 280 nm'deki kör ve doğrudan uygulamalarla reaktivite karşılaştırılması kromotogramı



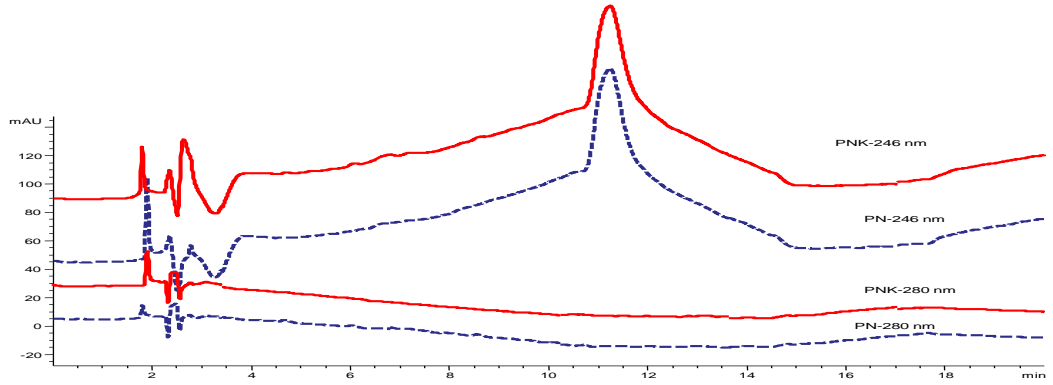
Şekil 3.34. Syringaldehitin peroksinitritle 246 ve 280 nm'deki kör ve doğrudan uygulamalarla reaktivite karşılaştırılması kromatogramı



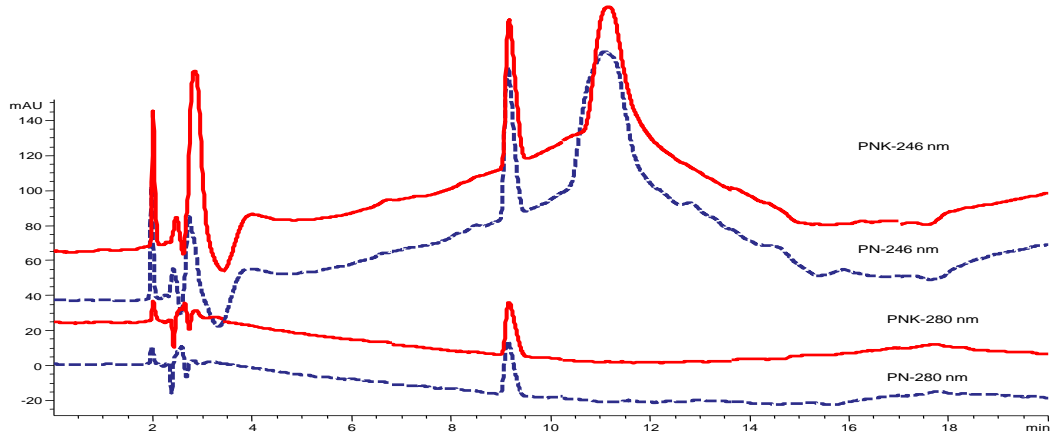
Şekil 3.35. Ferulik asitin peroksinitritle 246 ve 280 nm'deki kör ve doğrudan uygulamalarla reaktivite karşılaştırılması kromatogramı



Şekil 3.36. Sinapik asitin peroksinitritle 246 ve 280 nm'deki kör ve doğrudan uygulamalarla reaktivite karşılaştırılması kromatogramı



Şekil 3.37. Rosemarinik asitin peroksinitritle 246 ve 280 nm'deki kör ve doğrudan uygulamalarla reaktivite karşılaştırılması kromotogramı



Şekil 3.38. Benzoik asitin peroksinitritle 246 ve 280 nm'deki kör ve doğrudan uygulamalarla reaktivite karşılaştırılması kromotogramı

Tablo 3.3. Peroksinitritin Doğrudan (PN) Uygulanması

Fenolik standartlar	280 nm deki pikler			246 nm deki pikler		
	RT	ALAN	YÜKS.	RT	ALAN	YÜKS.
Gallik Asit	1,9465	192,45	28,6	1,9395	291,95	44,6
	5,143	24,75	2,2	11,1225	3668,15	72,75
protokatekuik asit	1,942	262,5	27,8	1,936	445,7	53
	5,123	549,05	45	5,12	686,7	65,5
				11,252	3320,5	69,5
gentisik asit	1,941	550,4	96,45	1,938	842,25	109,4
	6,008	54,4	4,65	6,028	366	26,95
	6,3635	65,9	5,7	11,361	2564,45	66,9
protokatekulaldehit	1,9445	71,1	10,85	1,929	125,85	22,6
	6,016	2702,3	229,3	6,0155	706,5	60,75
	7,0505	50,1	3,3	11,3245	2971,5	69,25
klorojenik asit	1,484	290,5	33,05	1,9455	896,3	127,1
	6,0345	101,05	6,6	5,118	62,75	4,65
	9,5875	137,25	9,7	6,0405	38	4,25
				6,831	206,3	16,7
				7,4045	50,75	4,4
				9,5875	148,3	10,5
p-OH benzoik asit	1,951	32,75	6	0,9375	58,9	3
	6,403	1050,8	91,6	6,403	3445,95	296,5
				11,3275	2944,1	69,05
vanilik asit	1,9585	58,25	8,75	1,5795	243,7	15,8
	6,926	1912,7	165,8	6,926	2373,35	200,95
				11,3465	2679,65	68,05
kafeik asit	1,9565	187,85	30,25	1,9475	363,8	59,2
	6,8435	407	37,25	6,8435	859,95	76,15
	7,4115	38,9	3,7	8,4785	151,15	9,95
	11,153	25,25	1,55	11,187	3418,05	69,3
syringik asit	1,9515	49,15	8,55	1,9305	111,85	21,55
	7,1345	2971	257,5	7,1345	696,4	59,6
				11,3255	2585,8	69,6
vanilin	1,9545	43,8	7,75	1,9315	96,05	17,45
	8,117	5198,55	396,35	8,118	1051,55	79,7
				11,3215	2703,15	69,5
p-kumarik asit	1,9615	86,2	14,2	1,934	100,95	17,35
	8,1605	7329,55	609,9	8,16	1002,9	80,65
				11,1655	4086,5	73,75
syringaldehit	2,0035	56,2	10,1	1,9815	126,1	23,5
	8,4525	2878,6	234,8	8,4525	593,1	46,35
				11,3435	2924,05	67,45
ferulik asit	1,956	52,3	9,1	1,9335	119,85	21,75
	8,5825	3609,25	305,1	8,5825	3746,95	318,15
				11,337	4702,75	73,05
sinapik asit	1,923	82,75	15,25	1,92	346,7	71,55

Tablo 3.3'ün devamı

	7,4695	38,7	3,4	9,072	134,85	8,35
	9,029	15,65	1,45	11,0885	1379,15	39,7
rosmarinik asit	1,9005	114,2	22,95	1,8975	245,05	56,05
	2,4415	85,95	10,3	11,1235	5123	89,4
benzoik asit	2,0075	46,1	10,3	2,005	255,7	64,1
	9,1405	398,9	30,85	9,1415	1187,05	87,4
	17,8085	31,8	1,55	11,131	3866,9	78,15

Tablo 3.4. Peroksinitritin Kör olarak (PNK) Uygulanması

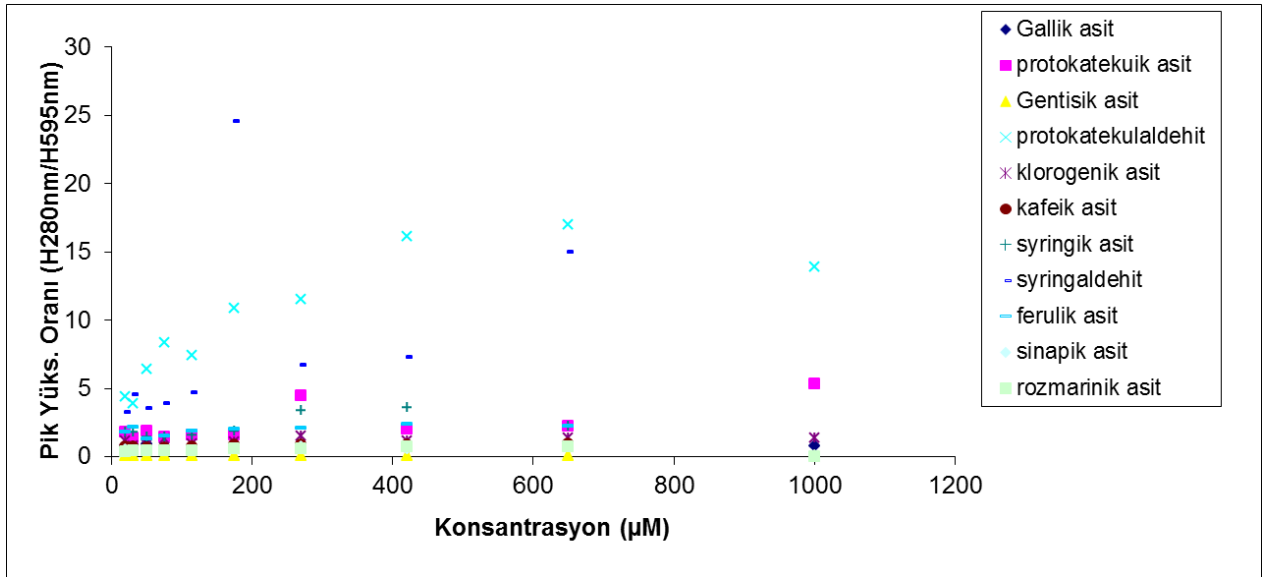
Fenolik standartlar	280 nm deki pikler			246nm deki pikler		
	RT	ALAN	YÜKS.	RT	ALAN	YÜKS.
Gallik asit	1,952	90,35	15,05	1,935	196,55	34,55
	3,754	684	62,4	3,758	422,9	27,25
	7,1025	44,35	3	11,271	2583,15	68,45
protokatekuik asit	1,9465	62,2	10	1,9275	114,9	24,1
	5,1105	1446,3	136,8	5,1105	2118,2	199,05
				11,262	2951,55	69,95
gentisik asit	1,945	218,5	28,65	1,9395	402,45	51,7
	6,018	82,7	5,8	6,023	858,7	73,4
				11,3685	2304,75	64,3
protokatekulaldehit	1,9505	66,1	10,85	1,9295	148,9	27,65
	6,0135	3682,05	313,6	6,0135	975,55	83,6
				11,236	3090,7	65,75
klorojenik asit	1,95	64,15	10,2	1,9305	151,5	28,5
	6,289	2054	187,05	6,2895	2209,9	201,1
				11,328	2938,6	68,8
p-OH benzoik asit	1,9465	46,25	7,7	1,9305	103,5	21,25
	6,407	995,75	86,7	6,4075	3287,4	280,35
				11,373	2419,45	66,2
vanilik asit	1,955	48,85	8,15	1,9315	109,05	21,85
	6,9225	2076,5	178,35	6,9225	2561,2	216,1
				11,362	2527,1	67,3
kafeik asit	1,9665	37,4	6,8	1,726	105,35	10,05
	6,938	421,35	36,2	6,934	538,15	39,05
	8,7505	99	8,35	8,757	234,7	16,6
				11,366	2281,7	65,15
syringik asit	1,9525	84,4	12,55	1,9325	169	33,4
	7,14	2113,6	179,2	7,14	490,1	41,25
				11,331	2625	68,85
vanilin	1,9565	79,65	10	1,931	98,4	18,7
	8,1145	4972,6	376,05	8,115	993,85	75,15
				11,313	2630,85	68,15
p-kumarik asit	1,955	69,45	9,35	1,932	99,15	18,6
	8,155	4406,3	360,9	8,156	633,4	47,7
				11,258	3100	69,25

Tablo 3.4'ün devamı

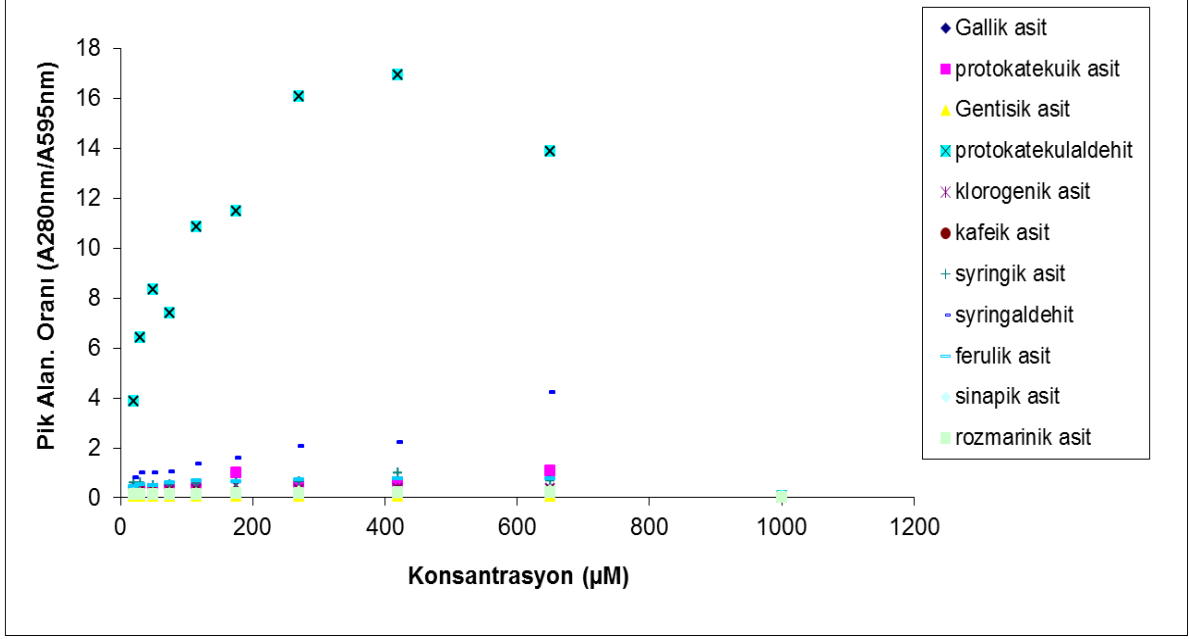
syringaldehit	1,9515	66,35	9,55	1,9305	103,8	19,25
	8,4275	3101,05	244,1	8,4275	637,15	48,8
				11,323	2856,85	70,1
ferulik asit	8,5575	5056,1	411,1	2,348	139,75	17,2
				8,5575	5256,45	426,6
				10,994	4471,35	73,55
sinapik asit	1,914	46,45	11,4	1,912	271,8	74,8
	8,547	268,85	21,35	2,6985	1456,4	97,5
				8,55	649,1	58,25
				11,2205	2503,1	72,45
rosmarinik asit	1,808	43,8	8,3	1,802	153,15	33,6
	6,0305	20,9	1,7	2,638	601,75	41,15
	8,554	29,55	2,4	11,238	3354,8	79,75
benzoik asit	2,0005	56,25	11,9	1,9985	302,5	77,8
	9,1445	395,5	29,95	2,8195	1542,45	100,65
	17,7935	88,05	2,25	9,1455	1169,8	85,25
				11,0965	3295,1	77,85

3.6. Pik Alanı ve Pik Yükseklikleri Oranları ile Konsantrasyonun İlişkisi

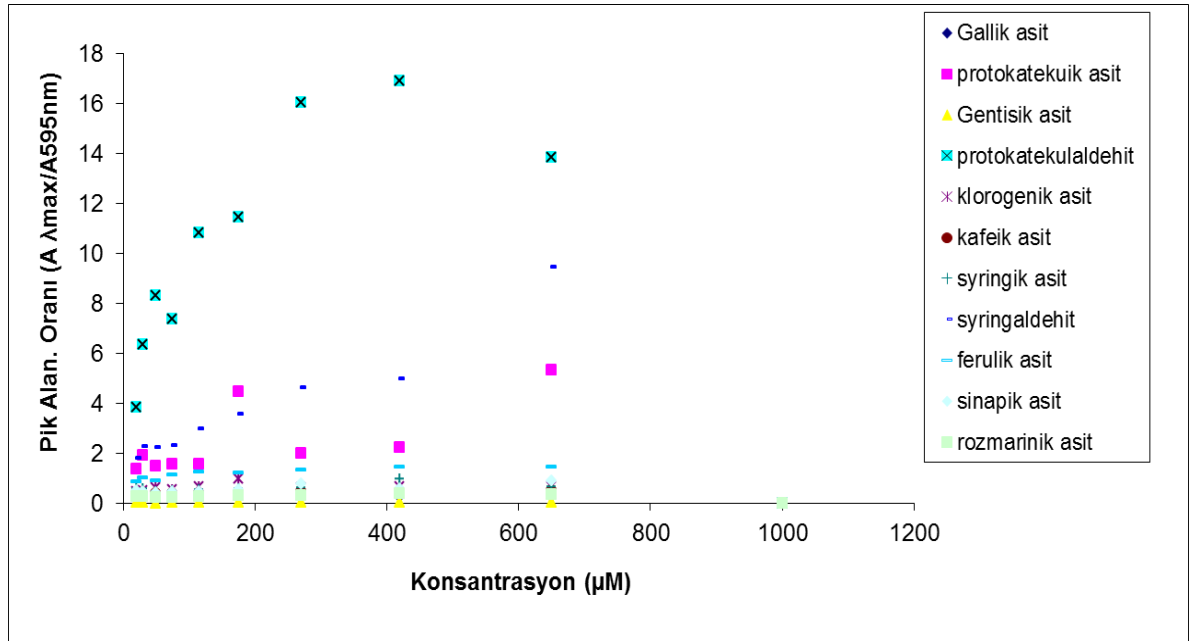
Pik yüksekliklerinin konsantrasyonla olan ilişkisini Başlık 3.4'te incelemiştik. Buna göre konsantrasyona bağlı olarak pik yükseklikleri artış ya da azalış göstermektedir. Bu azalış ve artış dalga boyları değişimlerinde sabit miktarda olmaktadır ve aralarındaki oran kullanılarak konsantrasyona karşı çizilen grafikler kullanılarak konsantrasyonu bilinmeyen bir fenolik asitin konsantrasyonu belirlenebilir. Konsantrasyon değiştikçe pik yüksekliklerinin yanında pik alanları da değişeceğinden pik yüksekliği yerine pik alanı da kullanılabilir. Bu açılarından çalışılan 10 farklı konsantrasyona karşı, 280, 595 nm dalga boyları ve her bir fenolik asitin maksimum dalga boylarındaki kromotogramlarından elde edilen pik alan ve yüksekliklerinin ortalamalarının birbirine göre oranlarından elde edilen sabit değerlerin yer aldığı grafikler oluşturuldu (Şekil 3.39-Şekil 3.44).



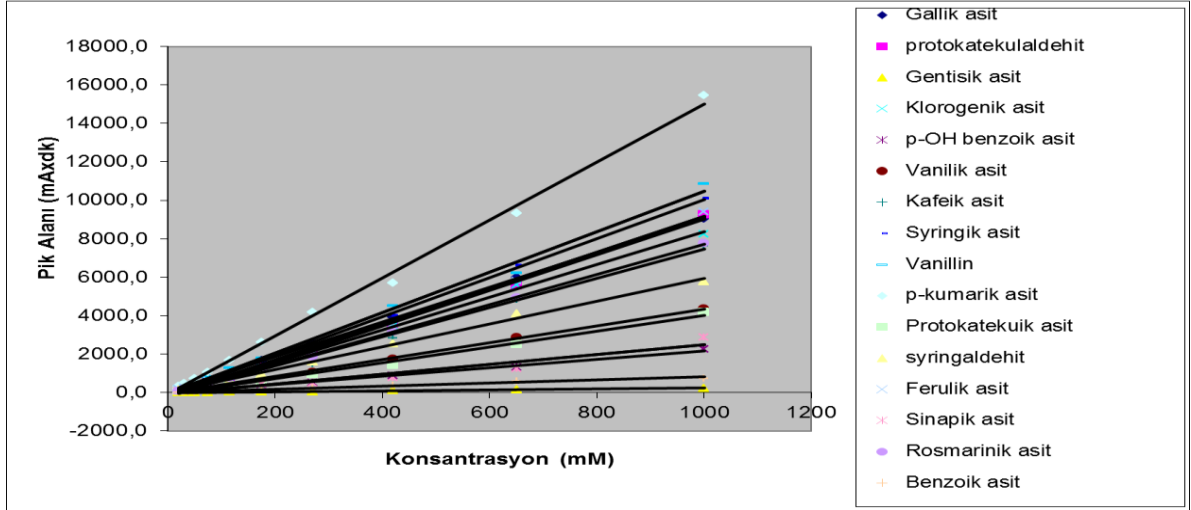
Şekil 3.39. Fenolik asitlerin 280 ve 595 nm dalga boyundaki ortalama pik yükseklikleri oranlarının 10 farklı konsantrasyona göre dağılım grafiği



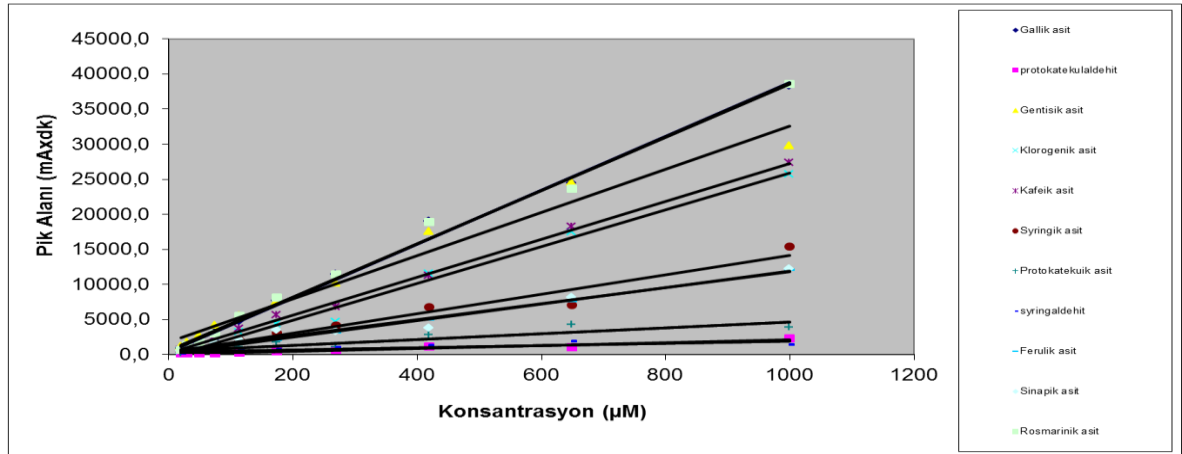
Şekil 3.40. Fenolik asitlerin 280 ve 595 nm dalga boyundaki ortalama pik alanları oranlarının 10 farklı konsantrasyona göre dağılım grafiği



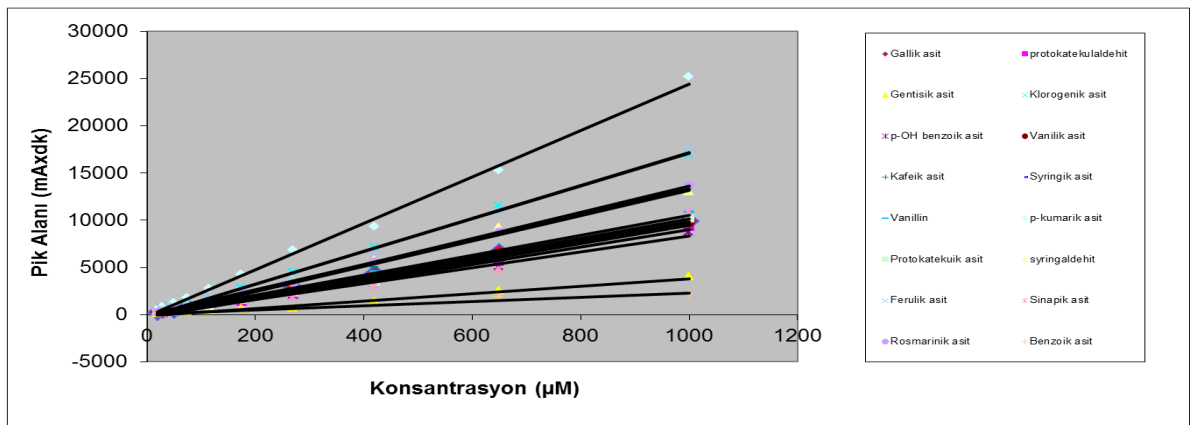
Şekil 3.41. Fenolik asitlerin maksimum dalga boyları ve 595 nm dalga boyundaki ortalama pik alanları oranlarının 10 farklı konsantrasyona göre dağılım grafiği



Şekil 3.42. Fenolik asitlerin 280 nm pik alanı – konsantrasyon grafiği



Şekil 3.43. Fenolik asitlerin 595 nm pik alanı – konsantrasyon grafiği



Şekil 3.44. Fenolik asitlerin λ_{max} pik alanı – konsantrasyon grafiği

Tablo 3.5. Fenolik asitlerin λ_{max} , 280 nm, 595nm'deki alanlarından konsantrasyon hesabı için katsayılar ($y=ax+b$; y: alan; x: konsantrasyon)

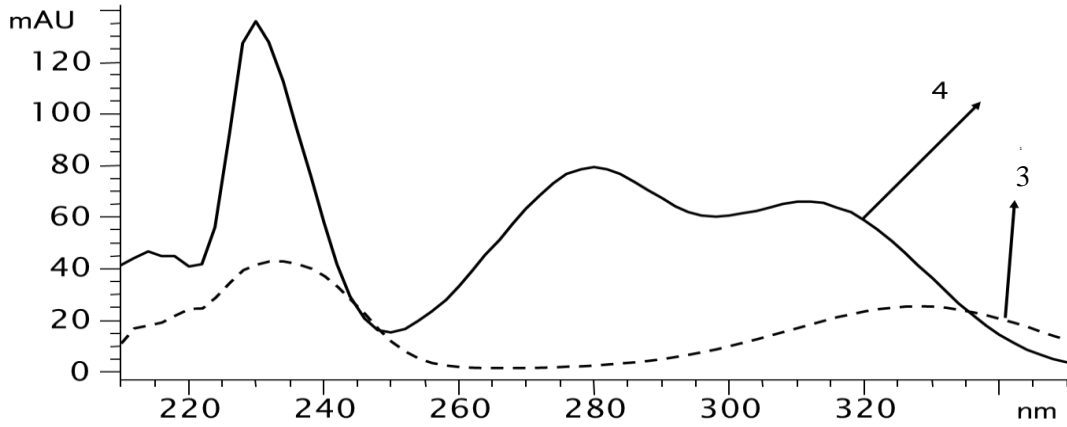
Fenolik Asitler	280 nm		595 nm		λ_{max}	
	a	b	a	b	a	b
Gallik asit	9,0324	73,786	38,404	381,18	9,9468	70,094
Protokatekuik asit	4,1028	-79507	4,1909	459,91	10,02	-196,54
protokatekulaldehit	9,2798	-245,35	2,054	39,607	9,2798	-245,35
Gentisik asit	0,2264	4,5985	30,814	1775,8	3,916	-98,471
Klorogenik asit	8,4928	-125,25	26,177	-311,98	17,354	-221,17
p-OH benzoik asit	2,1665	-0,9696			8,3526	-47,093
Vanilik asit	4,3539	-23,517			9,6733	-66,676
Kafeik asit	7,6016	-121,95	26,99	253,66	13,392	-225,45
Syringik asit	10143	-112,39	13,931	246,82	10,256	-112,84
Vanillin	10,532	-50,739			10,532	-50,759
p-kumarik asit	15,099	-74,182			24,591	-141,39
syringaldehit	5,9355	1,1981	1,5132	359,72	13,336	1,4078
Ferulik asit	9,3094	-146	11,696	163,62	17,362	-279,1
Sinapik asit	2,5778	-65,421	11,324	461,48	9,7422	-286,72
Rosmarinik asit	7,8636	-144,4	38,077	560,51	13,838	-238,84
Benzoik asit	0,7974	11,604			2,2781	39,35

Tablo 3.5'teki alanların konsantrasyona karşı grafiklerinden elde edilen katsayılar kullanılarak konsantrasyondan alana ya da alandan bilinmeyen konsantrasyona geçiş yapılabilir. Bu da HPLC'de fenolik asitlerin daha kısa sürede ve daha çabuk miktar analizinin yapılmasını sağlar.

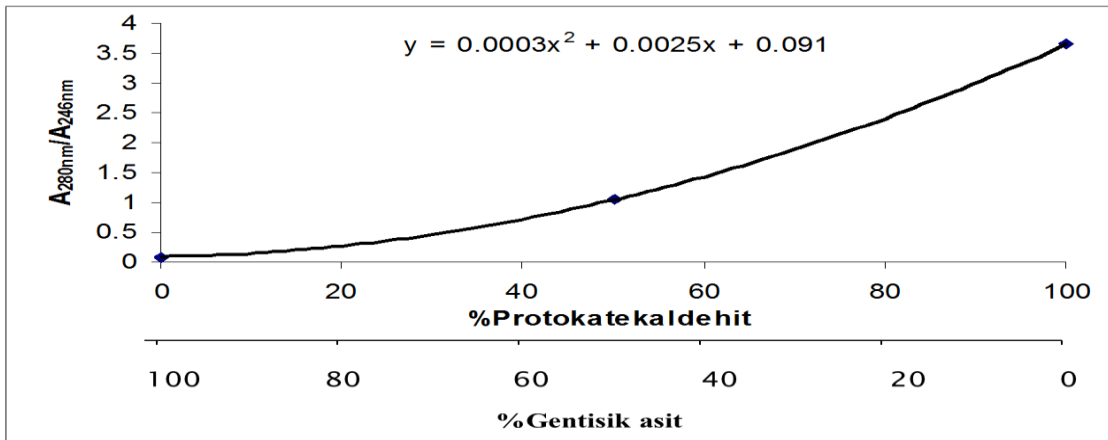
Örneğin; 280 nm'de ferulik asidin peroksinitritle kör muamelesi sonrası pik alanı:5056.1, doğrudan muamelesi sonrası pik alanı ise 3609.25'dir. $Y=ax+b$ ifadesine göre ferulik asidin katsayı değerleri yerine yazıldığında; $5056.1=9.3094x-146$ ve $3609.25=9.3094x-146$ fonksiyonları elde edilir ve buradan x'ler çekildiğinde sırasıyla 558 mikromolar ve 408 mikromolar elde edilir. Aralarındaki farkın oranlanmasıyla %26.88 gibi bir değer peroksinitritle reaktivite yüzdesi olarak bulunur.

3.7. Karışım Halindeki Fenolik Asitlerin Bileşim Yüzdesi Heaplamları

Fenolik asit karışımlarını 2'liler halinde incelediğimizde tüm karışım halindeki çakışmalarından çakışmayı merkeze alarak belirlenen 5 farklı RT değerine göre (5.920, 6.255, 6.785, 7.990, 8.434) farklı dalga boylarında birbirlerine göre alan oranları çıkarıldı ve birbirleriyle karıştırıldıklarında çakışmalarındaki % karışım oranları %0, %50 ve %100 olması durumuna göre 3 noktadan geçecek şekilde parabolik eğriler oluşturuldu. Bu alan oranlarına göre bizim bu pik karışımında % şu kadar fenolik asitten var diyebiliriz. Bu parabolik eğriler yalnızca 2'li karışımlar için geçerlidir. 3'lü ve daha fazla karışımlar için algoritmalar oluşturularak bu grafikler geliştirilebilir.

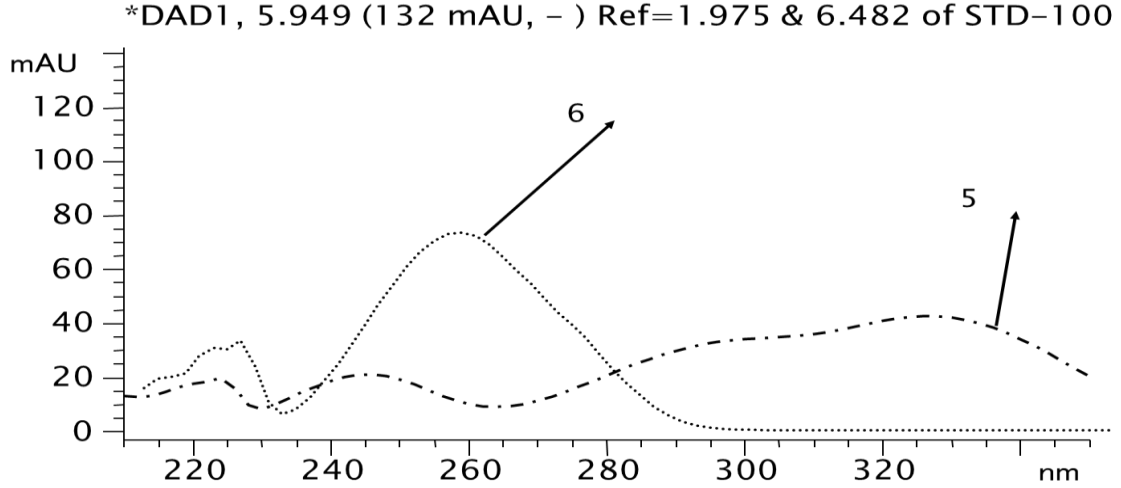


Şekil 3.45. Protokatekulaldehit ve gentisik asidin spektrum çakışması

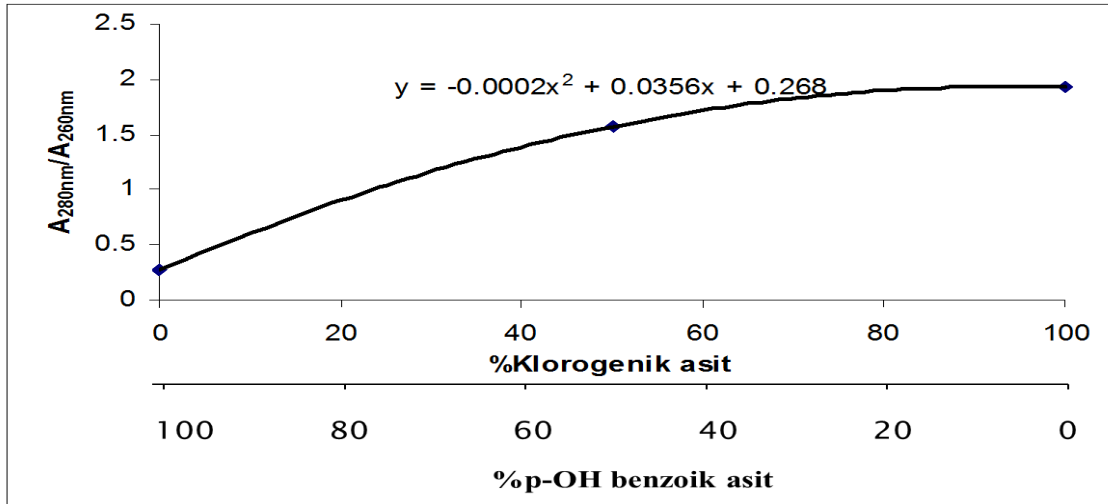


Şekil 3.46. Protokatekulaldehit ve gentisik asidin 280 ve 246 nm'lerdeki alanları oranına karşılık bileşim yüzdeleri grafiği

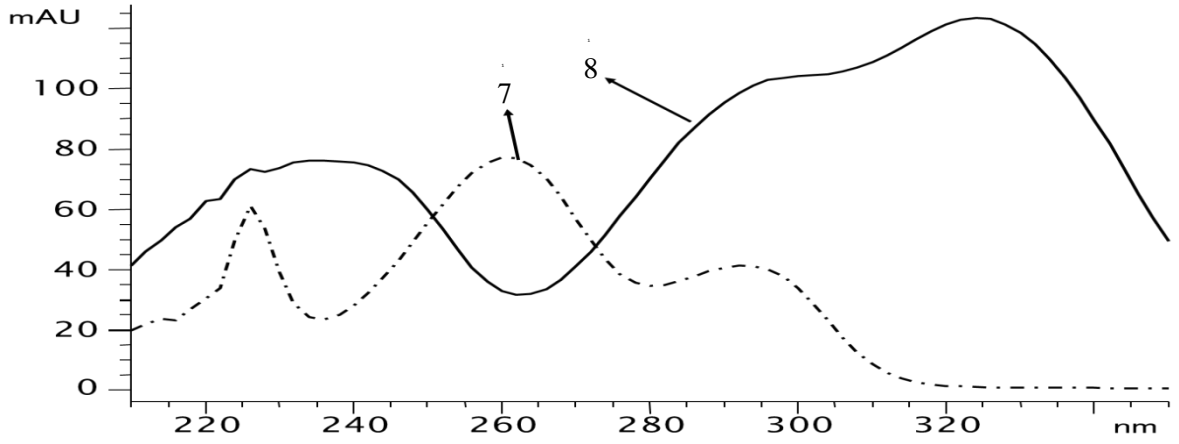
Örneğin protokatekulaldehit ve gentisik asidin spektrum çakışmalarından birinin maksimum diğerinin minimum absorbans gösterdiği ve ayrılma noktalarındaki dalga boyları olarak 280 ve 246 seçilmiştir (Şekil 3.45). Bu dalga boyundaki alanlar oranı kullanılarak birbirleriyle karışım yüzdeleri grafiği oluşturulmuştur (Şekil 3.46).



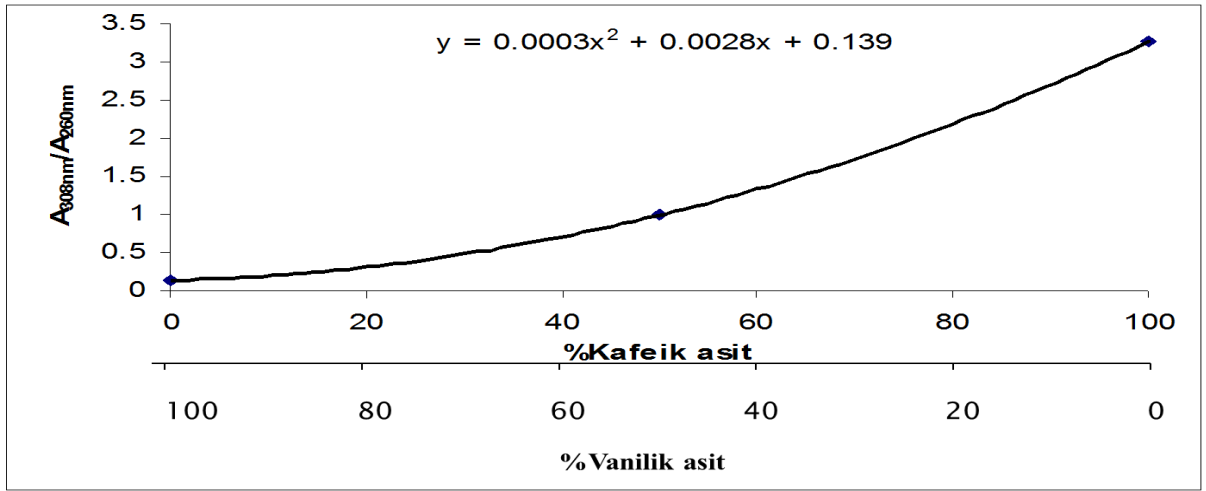
Şekil 3.47. Klorojenik asit ve p-OH benzoik asidin spektrum çakışması



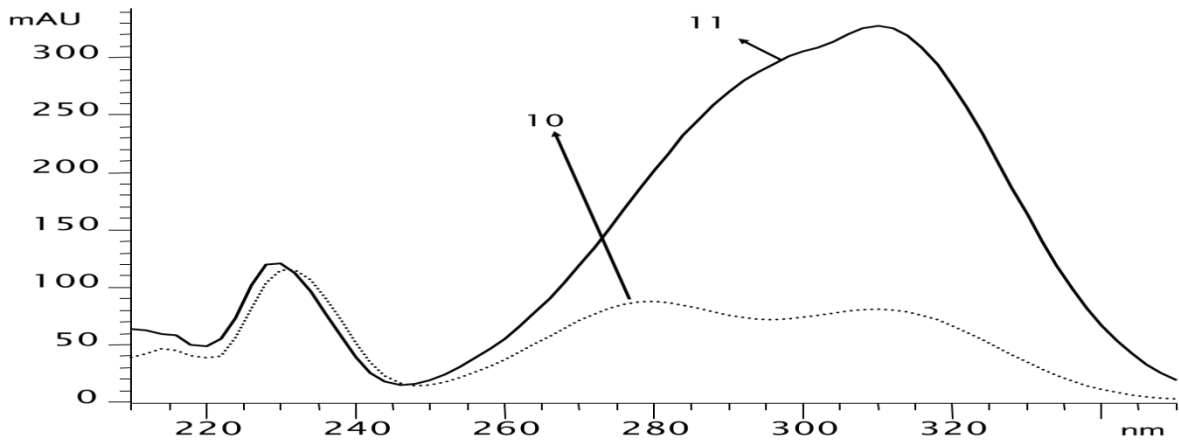
Şekil 3.48. Klorojenik asit ve p-OH benzoik asidin 280 ve 260 nm'lerdeki alanları oranına karşılık bileşim yüzdeleri grafiği



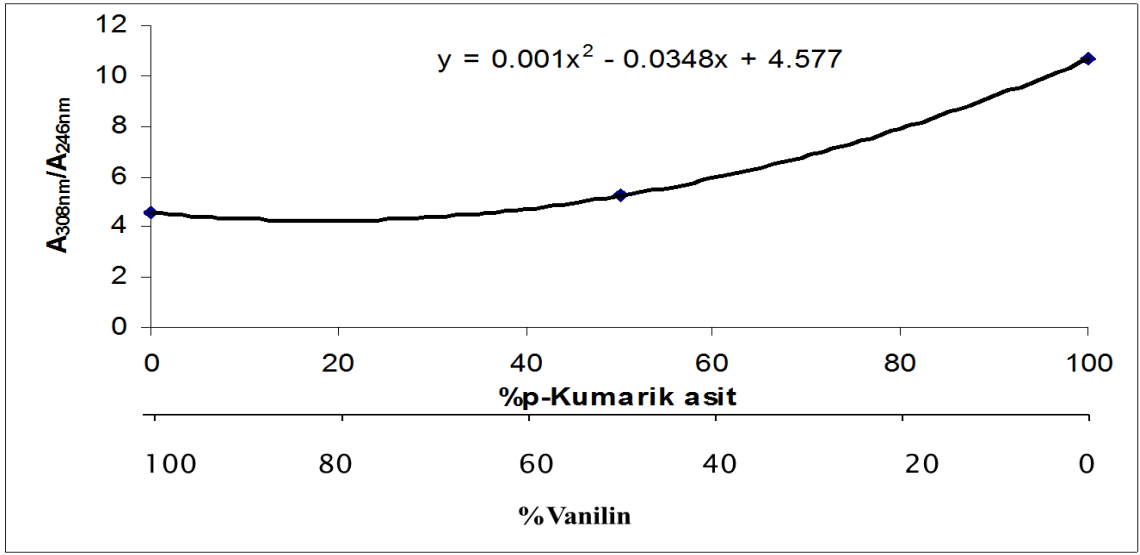
Şekil 3.49. Vanilik asit ve kafeik asidin spektrum karşılaştırması



Şekil 3.50. Vanilik asit ve kafeik asidin 308 ve 260 nm'lerdeki alanları oranına karşılık bileşim yüzdeleri grafiği



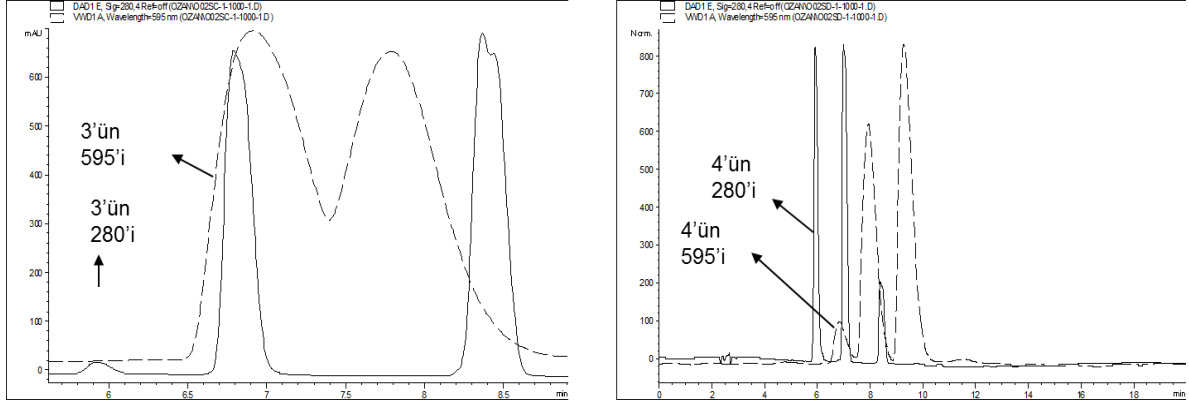
Şekil 3.51. Vanilin ve p-kumarik asidin spektrum karşılaştırması



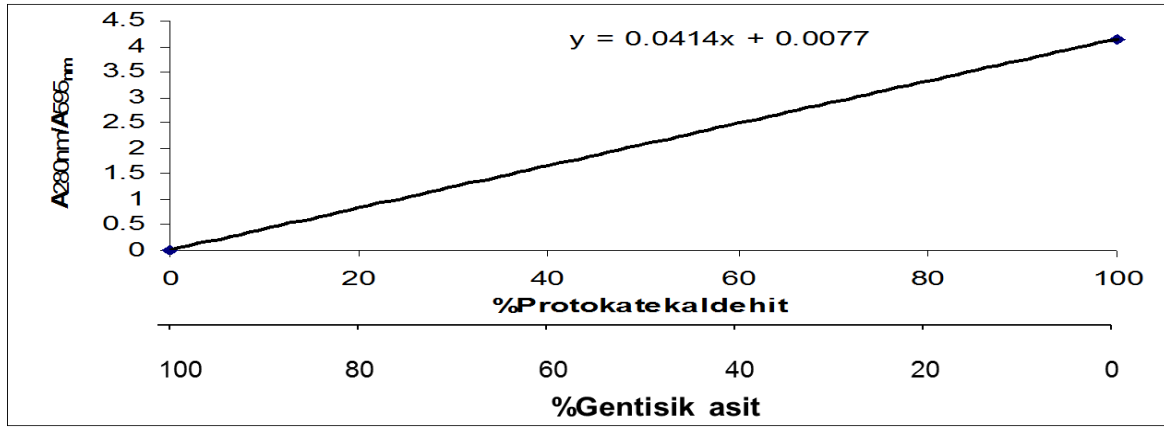
Şekil 3.52. Vanilin ve p-kumarik asidin 308 ve 246 nm'lerdeki alanları oranına karşılık bileşim yüzdeleri grafiği

Aynı şekilde spektrum çakışmalarından birinin maksimum değerinin minimum absorbans gösterdiği ve ayrılma noktalarındaki dalga boyları olarak 280 ve 260, 308 ve 246, 308 ve 260 ikilileri seçilmiştir (Şekil 3.47) (Şekil 3.49) (Şekil 3.51). Bu dalga boylarındaki alanlar oranı kullanılarak 2'li fenolik asitlerin (Klorojenik asit - p-OH benzoik asit, Vanilik asit- kafeik asit, Vanilin - p-kumarik asit) birbirleriyle karışım yüzdeleri grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 3.48) (Şekil 3.50) (Şekil 3.52). Bu grafiklerden fenolik asit karışımlarının alanları oranlarından yola çıkarak buna karşılık gelen molar yüzdelerine ulaşabiliriz.

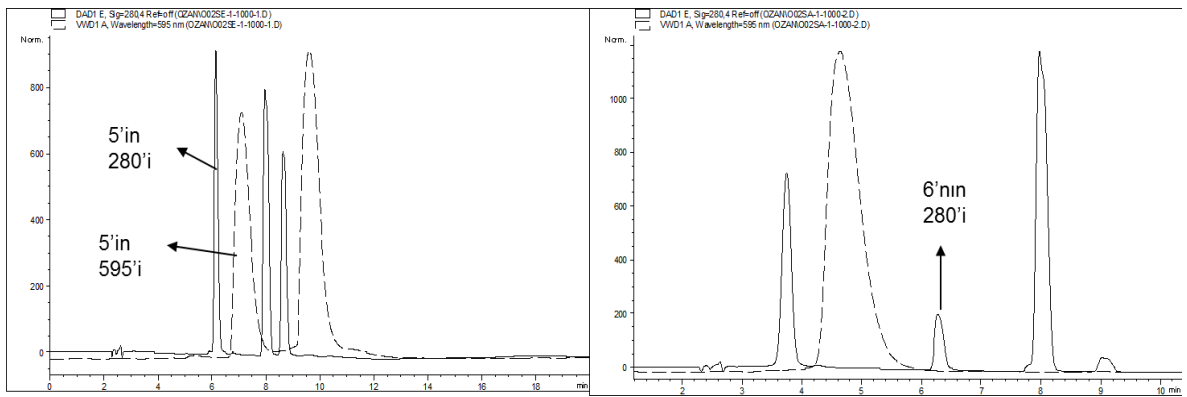
Örneğin; 280 nm'de kafeik asidin peroksinitritle kör muamelesi sonrası pik alanı: 421.35, doğrudan muamelesi sonrası pik alanı ise 407'dir. $Y=ax+b$ ifadesine göre kafeik asidin katsayı değerleri yerine yazıldığında; $407=7.6016x-121.95$ ve $421.35=7.6016x-121.95$ fonksiyonları elde edilir ve buradan x'ler çekildiğinde sırasıyla 69.58 mikromolar ve 71.47 mikromolar elde edilir. Aralarındaki farktan oranlanarak %2.64 reaktivite dönüşüm %'si hesaplanır. Aynı şekilde Vanilik asidin % reaktivitesi hesaplanarak reaktiviteye karşı % dönüşüm oranından elde edilebilecek grafik oluşturularakta birbirleriyle karışım oranları bulunabilir.



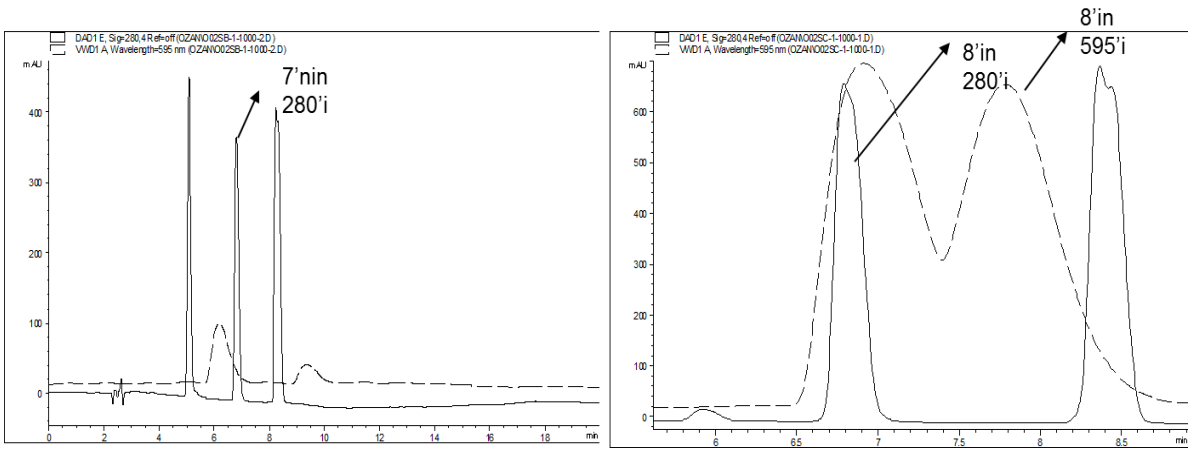
Şekil 3.53. Gentisik asidin ve protokatekulaldehidin 280 ve 595 nm kromotogram çıkışması



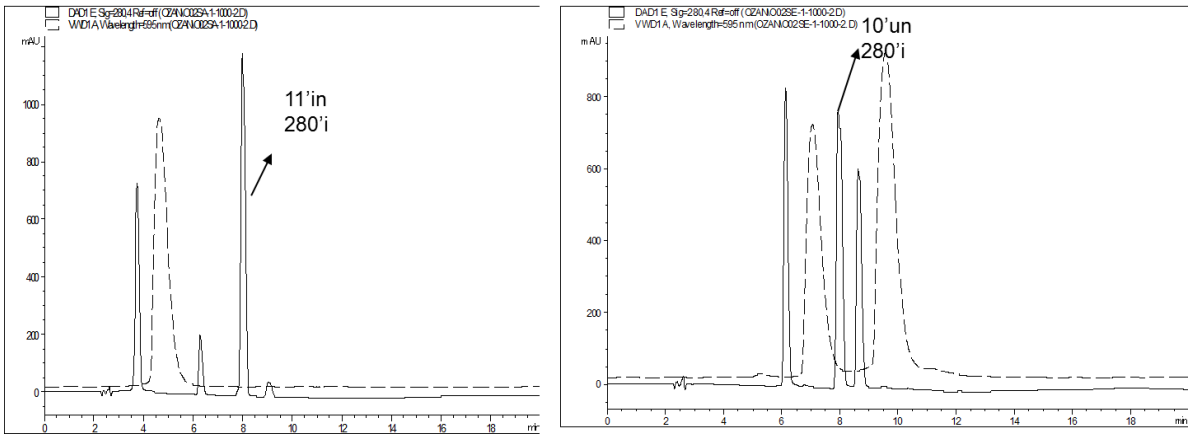
Şekil 3.54. Gentisik asidin ve protokatekulaldehidin 280 ve 595 nm alan oranlarına karşılık bileşim yüzdeleri grafiği



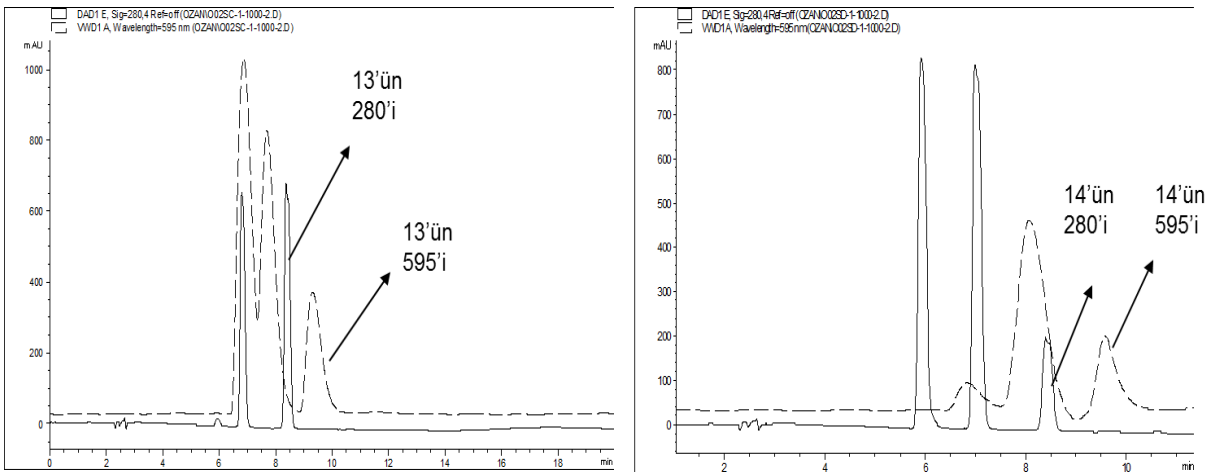
Şekil 3.55. Klorojenik asidin ve p-OH benzoik asidin 280 ve 595 nm kromotogram çıkışması



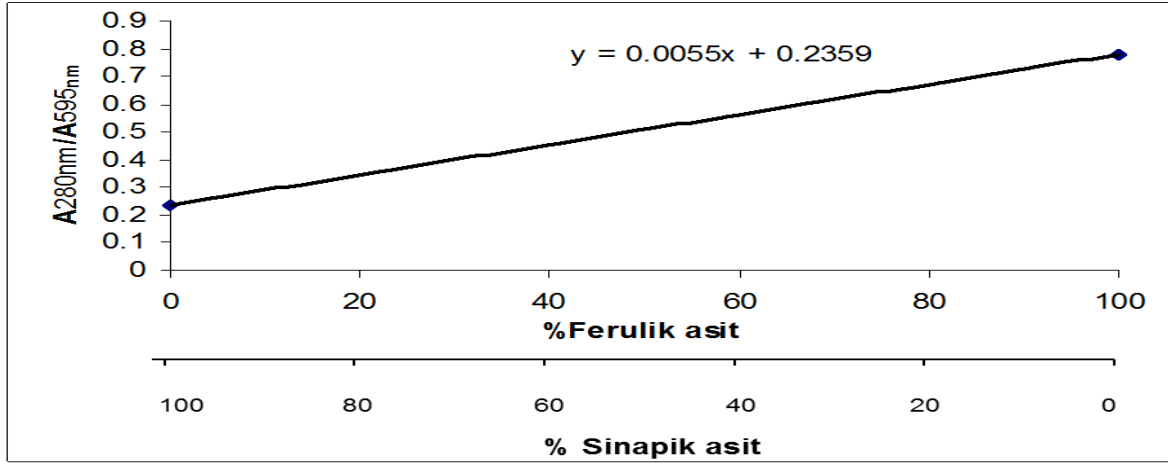
Şekil 3.56. Vanilik asidin ve kafeik asidin 280 ve 595 nm kromotogram çıkışması



Şekil 3.57. Vanilin ve p-kumarik asidin 280 nm kromotogramları



Şekil 3.58. Ferulik asit ve sinapik asidin 280 ve 595 nm kromotogram çıkışması



Şekil 3.59. Ferulik asit ve sinapik asidin 280 ve 595 nm alan oranlarına karşılık bileşim yüzdeleri grafiği

3 ve 4 numaralı fenolik asitlerin ikisinde FRAP aktivitesi göstermektedir (Şekil3.53). Dolayısıyla 280 ve 595 nm'deki alanları oranı kullanılarak karışımdaki % oranları grafikte bulunabilir (Şekil3.54). 5 ve 6 numaralı fenolik asitlerden 6 numaralı fenolik asit FRAP aktivitesi göstermediği için 595 nm'de piki yoktur. Dolayısıyla 5 ve 6 karışımında 595'te pik varsa 5 yoksa 6'dır diyebiliriz (Şekil 3.55). 5 numaralı fenolik asit FRAP aktivitesine sahip olduğu için alanları oranı eğer $A_{280 \text{ nm}} / A_{595 \text{ nm}} : 0.322179$ ise sadece 5 vardır ve bu değerden daha büyük bir oran varsa 5 ve 6'nın karışımı vardır diyebiliriz. 7 ve 8 numaralı fenolik asit karışımında 7, 595 nm'de pik vermemektedir. Dolayısıyla pik varsa bu karışımda 8 vardır diyebiliriz ve eğer $A_{280 \text{ nm}} / A_{595 \text{ nm}} : 0.280225$ ise sadece 8 vardır. Fakat daha büyük bir oran varsa 7 ve 8'in karışımı vardır (Şekil 3.56). 10 ve 11 numaralı fenolik asit karışımında ise 2 fenolik asit de 595 nm'de FRAP absorbansı vermemektedir. Dolayısıyla bu ikisini bu yöntemle ayırt edemeyiz (Şekil 3.57). 13 ve 14 numaralı fenolik asit karışımları ise 595 nm'de absorbans göstermektedirler ve 280nm/595nm pik alanları oranlarına karşılık % bileşim grafiği çizilerek karışımdaki yüzdeleri % molar olarak bulunabilir.

4. SONUÇLAR, İRDELEME VE ÖNERİLER

Çalışma, genel olarak HPLC’de yapılan analizlerde analizi yapmayı güçleştiren pik ayırımı sorununa çözüm geliştirme üzerine yapılmıştır. Bu amaçla standart fenolik asitler kullanılmıştır. Fenolik asitler, önce analiz sorununa neden olacak ve en etkin pik çakışmasını sağlayacak olan farklı kromatografik şartlar denenerek HPLC gradient elüsyon metoduyla çakıştırıldı. Daha sonra DAD kullanılarak çakışan piklerin yerleri belirlenmeye çalışıldı. Bunun içinde farklı fenolik asit karışımları 3’lü ve 4’lü karışımlar halinde HPLC’de yürütüldüler. Bu, fenolik asitlerin kalitatif bir analiz testiydi. Daha sonraki aşama ise fenolik asitlerin kantitatif miktarlarını da belirlemektir.

Bunun için HPLC’nin integrasyon ekranından pik seçimini yapmak ve etkin bir tanıma sağlamak için fenolik asit analiz çalışmalarında analiz hızı ve sistematikliği sağlamak üzere 10 farklı konsantrasyondaki fenolik asitler hazırlanarak HPLC’de yürütüldüler. Bunların kromatogramlarından pik alanları, alıkonma zamanları ve pik yükseklikleri kaydedildi. Çalışmadaki verilerin güvenilirliği için yürütmeler paralelleriyle yapıldı ve bu yürütmelerden elde edilen verilerin ortalamaları alındı. Bu şekilde elde edilen pik alanları ve yükseklikleri konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek konsantrasyonu bilinmeyen bir fenolik asitin konsantrasyonunun bulunmasına ve böylece hem analizcinin işinin kolaylaşması hem de çok değerli olan zamanın boşa harcanmaması sağlandı.

Fenolik asitlerin bir çoğu literatürlerde de gösterildiği gibi antioksidan özelliğe sahiptir. Bu amaçla yapılacak analizlerin HPLC ile olan uygulamaları on-line uygulamalardır. Bu uygulamalardan da on-line antioksidan aktivite çalışmaları ön plandadır. Laboratuvarımızda yeni geliştirilen on-line FRAP uygulamasında bu çalışmalardandır. Bu on-line uygulamanın fenolik asitler üzerinde denemesi yapıldı ve bu uygulamanın da HPLC metodolojisi analiz pratikliği için gerekiyordu. Bu amaçla 595 nm’deki FRAP aktivitesi için pik alanı ve yükseklikleri kullanılarak konsantrasyon hesabına gidildi. Ayrıca analiz edilen numuneler her zaman sabit olmayabilir, başka bir forma dönüşebilir. Bu yüzden organizmada da reaksiyonu olan peroksinitrit dönüştürme reaktif olarak kullanıldı ve metabolizmada bir reaksiyon oluşturabildiği bilindiğinden dönüşüm için fizyolojik pH tercih edildi. Analizlerde ve metabolizmada oluşabilen ve bünyemizde zarara neden olan bu dönüşümü çalışmamızda bilinçli olarak fenolik asitlere off-line olarak uygulandı ve fenolik asitlerin dönüşebilirlik (reaktivite) ve HPLC’ de alıkonma zamanı açısından birbirlerinden ayırımı sağlandı. Yine bütün bu artılara çalışmanın pahalı olan MS dedektörle değil de UV-DAD ile yapılmasını da katarsak faydanın yanında maliyetide düşürmüş oluruz. Bu şekilde

geliştirilen metod yeni analiz yöntemlerine uygulanabilir ve fenolik asitlerin yanında farklı bileşikler için de HPLC metodolojisi oluşturulabilir. Bu bileşiklerin analizlerindeki çakışma sorunları aydınlatılabilir.

Çalışmada, fenolik standartların HPLC ile tayininde çakışan pikler vermesi durumunda birbirlerinden ayırilebilmeleri için geliştirilen yöntemler şöylece sıralanabilir: (a) DAD spektrumlarına dayalı farklı dalga boylarında elde edilen kromatogramlardan elde edilen pik yüksekliği ve pik yüksekliği oranlarının kullanımı, (b) on-line antioksidan ativite uygulanmasıyla çakışan piklerin aktivitelerindeki farkın kullanılması, (c) bileşiklerin peroksinitritle olan reaktivitelerinin farklı olmasından dolayı reaksiyon öncesi ve sonrası kromatogramların karşılaştırılması.

Çalışmada ayrıca pik alan ve yüksekliklerinin birbirleriyle olan oranları kullanılarak bilinmeyen fenolik asidin konsantrasyonunun belirlenmesi veya fenolik asit karışımlarında hangi fenolik asitten % ne kadar olduğunun bulunması gerçekleştirilmiştir. On-line FRAP ve peroksinitrit yöntemlerinde, çakışan ikililerden aralarında reaktivite farkı gösterenler ayrılır, gösteremeyenler ise ayrılamazlar.

Çalışmada geliştirilen üç yöntem de çakışan piklerin ayrılmasında etkin bir şekilde kullanılabilir. Doğal numunelerde yapılacak analizlerde standart karışıma nazaran çok daha fazla bileşenin olması göz önüne alınırsa, numunedeki fenoliklerin tam olarak belirlenmesinde bu yöntemlerden iki ya da üçünün birlikte kullanılmasının avantaj sağlayacağı, daha iyi bir kalitatif analiz oluşturacağı açıktır. Geliştirilen yöntemler daha çok bitki özütlerindeki fenolik bileşenlerin aydınlatılması için uygulama alanı bulacaktır. Bu yöntemler ayrıca sentetik kimyada da bileşiklerin saf elde ediliminde de kullanılabilir.

5. KAYNAKLAR

- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S. E. ve Altun, M., 2005. Total Antioxidant Capacity Assay of Human Serum Using Copper (II)-neocuproine as Chromogenic Oxidant: The CUPRAC Method, Taylor & Francis, 39, 9, 949-961.
- Apak, R., Güçlü K., Özyürek M. And Karademir S. E., 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. J. Agric. Food Chem., 52, 7970-7981.
- Anonim, Evolving LC: The Life of an Enabling Technology <http://pubs.acs.org/journals/chromatography/chap1.html>, 2007.
- Anonim, 2006. Bitkilerde Doğal Renk Maddeleri ve Fenolik Bileşikler. Mesleki Eğitim ve Öğretim Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi, Ankara.
- Aras, Ö., 2006. Üzüm ve Üzüm Ürünlerinin Toplam Karbonhidrat, Protein, Mineral Madde ve Fenolik Bileşik İçeriklerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Arslan Burnaz N., 2012. Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Trabzon.
- Artık, N., 2004. Türk Fındıklarının Fenolik Bileşik Dağılımı ve Kavurma Prosesinde Değişimi. Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi, Proje No: 2001-07-11-045.
- Bakkalbaşı, E., 2009. Farklı Ambalaj Materyalleri ve Depo Koşullarının Ceviz İçeriğine Etkisi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara.
- Bartle, K. D., Myers, P. (2002). History of gas chromatography. Trends Anal. Chem., 21(9.10), 547-57. 23.
- Bilaloğlu, G. V., Harmandar, M., 1999. Flavonoidler. Aktif Yayınevi, İstanbul, 334-354.
- Borneman, Z., Gokmen, V., Nijhuis, H.H., 1997. Selective removal of polyphenols and brown colour in apple juice using PES/PVP membranes in a single-ultrafiltration process. J. Membrane Science 134(2),191-197.
- Cardeñosa, R.; Mohamed, R.; Pineda, M.; Aguilar, M. On-line HPLC detection of tocopherols and other antioxidants through the formation of a phosphomolybdenum complex. J. Agric. Food Chem. 2002, 50, 3390–3395.
- Cemeroğlu, A.P., Cemeroğlu, B.S., 1998. Sağlık açısından gıda fenolikleri. Gıda Teknolojisi 3(9),52-55.

- Cemeroğlu, B., 2004. Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi 1. Cilt. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No: 35, Ankara, 77-88.
- Cemeroğlu, B., Acar, J., 1986. Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi. Gıda Teknolojisi Derneği Yayın No:6, Ankara.
- Chkikvishvili, I.D., Gogiyo, N.N., 1995. Flavonoids of mandarin fruit wastes and their fungistatic effect on the fungus *Phoma tracheiphila*, Applied Biochem. Microb. 31(3), 292-296.
- Christiaan J. Malherbe, Dalene de Beer and Elizabeth Joubert, 2012, Development of On-Line High Performance Liquid Chromatography (HPLC)-Biochemical Detection Methods as Tools in the Identification of Bioactives, Int. J. Mol. Sci. 13, 3101-3133.
- Çelik, S.E.; Özyürek, M.; Güçlü, K.; Apak, R. Determination of antioxidants by a novel online HPLC-cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) assay with post-column detection. Anal. Chim Acta, 2010, 674, 79–88.
- Cuendet M, Hostettmann K, Potterat O (1997). Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fragrea blumei*, Helv ChimActa. 80: 1144–1151.
- Dapkevicius, A.; van Beek, T.A.; Niederländer, H.A.G. Evaluation and comparison of two improved techniques for the on-line detection of antioxidants in liquid chromatography eluates, J. Chromatogr. A, 2001, 912, 73–82.
- De Sotillo, D.R., Hadley, M., Holm, E.T., 1994. Potato peel waste: Stability and antioxidant activity of a freeze-dried extract, J. Food Sci. 59(5), 1031-1033.
- Doğan, A., Kazankaya, A., Çelik, F., Uyak, C., 2006. Kuşburnunun Halk Hekimliğindeki Yeri Ve Bünyesindeki Bileşenler Açısından Yararları II.Ulusal Üzümsü Meyveler Sempozyumu, Tokat, 299-303.
- Ekşi, A., Özhamamcı, İ., 2009. Chemical composition and guide values of pomegranate juice. Gıda, 34 (5), 265-270.
- Ettre, L.S. 2001. The Predawn of Paper Chromatography. Chromatographia: 54:409C414.
- Ettre, L.S. 2000. Chromatography: the Separation Technique of the 20th Century. Chromatographia, 51 (1/2): 7C17.
- Gürsoy, O., Gökçe, R., 2001. Soya ve Ürünlerinde Fenolik Bileşikler ve Beslenmeyi Kısıtlayıcı Faktörler. Pamukkale Üniversitesi Mühendislik F A Kültesi, Mühendislik Bilimleri Dergisi, 7 (1), 87-93.

- Harmankaya, N., 2003. Tane Tutum Şekilleri Farklı Üzüm Çeşitlerinde Olgunlaşma Süresince Tanelerdeki Hormonlar İle Fenolik Madde Değişimlerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- He, W.; Gao, Y.; Yuan, F.; Bao, Y.; Liu, F.; Dong, J. Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of *Gardenia* fruit oil and the analysis of functional components, J. Am. Oil Chem. Soc. 2010, 87, 1071–1079.
- Hertog, M.G.L., Feskens, J.M., Hollman, P.C., Katan, M.B., Kromhout, D., 1993. Dietary Antioxidant Flavonoids and Risk of Coronary Heart Disease: the Zutphen Elderly Study. The Lancet. 342:1007-11.
- Hughes, M.N. and Nicklin, H.G. (1970) J. Chem. Soc. A, 925-928.
- Jaffe H. and Orchin M., 1964. Theory and Applications of Ultraviolet Spectroscopy, NY, p. 292, 301.
- Karadeniz, F., 2006. Domates ve Havuçta Karotenoid Madde Dağılımı ve Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Bilimsel Arastırma Projeleri, Proje No: 20030711077.
- Kırca, A., 2004. Siyah Havuç Antosiyaninlerinin Bazı Meyve Ürünlerinde Isıl Stabilitesi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Ankara.
- Koca, İ., 2007. Kızılılık ve Trabzon Hurması Pekmezlerinin Üretim Teknikleri, Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, (2) 33-37.
- Koleva II, Niederlander HAG, Van Beek TA (2000). An on-line HPLC method for detection of radical scavenging compounds in complex mixtures, Anal. Chem. 72: 2323-2328.
- Köksal, E., 2007. Karnabahar (*Brassica Oleracea* L.) Peroksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Antioksidan Ve Antiradikal Aktivitesinin Belirlenmesi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Erzurum.
- Kurılıç, A.C., Clevidence, B.A., Britz, S.J., Simon, P.W., Novotny, J.A., 2005. Plasma and Urine Responses Are Lower for Acylated vs Nonacylated Anthocyanins from Raw and Cooked Purple, J. Agric. Food Chem. 53: 6537-6542.
- Kusznierewicz, B.; Piasek, A.; Bartoszek, A.; Namiesnik, J. Application of a commercially available derivatization instrument and commonly used reagents to HPLC on-line determination of antioxidants, J. Food Compos. Anal. 2011, 24, 1073–1080.
- Lesney, M.S., 1998. A Brief History of Color Writing. Today's Chemist at Work, 7 (8), 67C68.
- Lu, Y., Foo, L.Y., 1997. Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace. Food Chemistry 59(2), 187-194.

- MacDougall, D.B., 2002. *Colour in Food Improving Quality*. Woodhead Publishing Limited. Cambridge, England, 179-221.
- Madsen, H.L., Betelsen, G., 1995. Spices as antioxidants. Trends in Food Sci. and Tech., August 1995,v.6, 271-277.
- Mangas, J.J., Suarez, B., Picinelli, A., Moreno, J., Blanco, D., 1997. Differentiation by phenolic profile of apple juices prepared according to two membrane techniques. J. Agric. Food Chemistry 45(12),4777-4784.
- Mohamed A., Abd El-Mawla A., Eldien Husien O., Spatula DD.,1(3) : 119-127, 2011.
- M.S. Tswett. 1906. Adsorption Analyse und Chromatographische Methode. Anwendung auf die Chemie des Chlorophylls. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 1906, 24, 384.
- Oyaizu M (1986). Studies on products of browning reaction prepared from glucose amine. *Jpn J Nutr* 44:307-314.
- Öztürk, N., Tunalier, Z., Koşar, M., Başer, K.H., 2002. Petroselinum Crispum, Anethum Graveolens ve Eruca Sativa'nın Antioksidan Etki ve Fenolik Bileşikler Yönünden İncelenmesi. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, Eskişehir.
- Pehlivan, M., Gülerüz, M., 2004. Ahududu ve Böğürtlenlerin İnsan Sağlığı Açısından Önemi. *Bahçe*, 33 (1-2): 51 – 57.
- Pekşen, E., Artık, C., 2005. Antibesinsel Maddeler ve Yemeklik Tane Baklagillerin Besleyici Değerleri, OMÜ Zir. Fak. Dergisi 20 (2), 110-120.
- Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite Oxidation of Sulfhydryls. The Journal of Biological Chemistry, 1991;266(7):4244-4250.
- Saldamlı, İ., 2007. *Gıda Kimyası*. Hacettepe Üniversitesi Yayınları. Ankara, 463-492.
- Schobinger, U., 1988. *Meyve ve Sebze Suyu Üretim Teknolojisi*. Çeviren J. Acar, Eugen Ulmer GmbH and Co. Stuttgart. Germany.
- Shahidi, F., Naczki, M., 1995. *Food Phenolics, Chemistry, Effects, Applications*. Technomic, USA.
- Slinkard K, Singleton VL (1977). Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods, Am. J. Enol. Viticult. 28: 49-55.
- Şimşek, A., 2004. Değişik Kavurma Proseslerinin Bazı Fındık Çeşitlerinde Oluşturduğu Biyokimyasal Değişiklikler. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara.

- Tekeli, Y., Sezgin, M., Şanda, M.A., 2008. Konya’da Yetişen *Centaurea Pterocaula* Truatv. ’ın Fenolik Yapısı ve Antioksidan Etkisi. SDÜ Fen Edebiyat Fakültesi, Fen Dergisi (E-Dergi), 3(1), 35-41.
- Toshio N., Umeyuki D., Yoji K., Toshihiko O., Inhibitory mechanism of sinapinic acid against peroxynitrite-mediated tyrosine nitration of protein in vitro, FEBS, Letters 459, 43-46, 1999.
- Tosun İ., Artık N., Gıda, 23(6): 403-413, 1998.
- Tunalıer, Z., Öztürk, N., Koşar, M., Başer, K.H., Duman, H., Kırimer, N., 2002. Bazı Sideritis Türlerinin Antioksidan Etki Ve Fenolik Bileşikler Yönünden İncelenmesi 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, Eskişehir.
- Turhan, İ., Tetik, N., Karhan, M., 2007. Andız Pekmezi Üretimi ve Bileşimi, Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, (2) 65-69.
- Williams, K.R. Colored Bands: History of Chromatography, Journal of Chemical Education, 79:922-923.
- Willson, K.C., Clifford, M.N., 1995. Tea Cultivation to Consumption. Chapman & Hall, London.
- Wollgast, J. and Anklam, E. (2000). Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. Food Research International, 33(6), 423-447.
- Ulusoy E., Sarıkaya A.O., Kolaylı S., 21. Ulusal Kimya Kongresi, 2007.
- URL-1, http://sci.ege.edu.tr/~eubio/yaz_okulu/hplc.htm, 2006.
- URL-2, <http://www.belgeler.com/blg/2dvh/hplc-cihazı,2009>.
- URL-3, <http://www.analitık.hacettepe.edu.tr/Demolar/kromatografı.pdf>, 2011.
- URL-4, http://www.chrometisil.com/kolonlarda_hata.html, 2012.
- URL-5, <http://www.chromatography-online.org/topics/derivatization>, 2012.
- URL-6, www.bitkiseliksir.com › Antioksidan, 2012.
- URL-7, <http://tr.wikipedia.org/wiki/Antioksidan>, 2012.
- URL-8, <http://www.belgeler.com/blg/19st/antioksidan-kapasite-tayin-yontemleri>, 2010.
- Velioğlu, S., 2005. İşlenmiş Türk Çaylarında İşleme Yöntemi, Çay Sınıfı ve Sürgün Döneminin Fenolik Madde Dağılımı Üzerine Etkisinin Belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Bilimsel Arastırma Projeleri, Ankara.

- Yağcı, C., Toker, M.C., Toker, G., 2008. Bitki Doku Kültürü Yoluyla Üretilen Flavonoitler. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi 1 (1): 47-58.
- Yalçın, H., Yıldız, H., Nergiz, C., 1997. Baharatların kimyasal bileşimi ve gıda sanayiinde kullanımı. E.Ü. Mühendislik Fakültesi Dergisi Seri B Gıda Mühendisliği 15(1-2), 219-228.
- Yong, J.Y., Hai, L.W., Sheng, Z.S., Chao, K., Juan, Z., Yu, W., Shao, H.Z., Ru, Q.Y., 2011, Using second-order calibration method based on trilinear decomposition algorithms coupled with high performance liquid chromatography with diode array detector for determination of quinolones in honey samples, *Talanta*, 85, 1549–1559.
- Zhang, Q.; van der Klift, E.J.C.; Janssen, H.G.; van Beek, T.A. An on-line normal-phase high performance liquid chromatography method for the rapid detection of radical scavengers in non-polar food matrixes, J. Chromatogr. A 2009, 1216, 7268–7274.

ÖZGEÇMİŞ

12.11.1985 yılında İstanbul'da doğdu. 2003 yılında İstanbul Maltepe Süper Lisesi'nden mezun oldu. 2004 yılında KTÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'ne girdi. 2009 yılında bu bölümden onur öğrencisi olarak mezun oldu. 2010-2011 yılları arasında YTÜ Eğitim Fakültesinde Pedagojik Formasyon Eğitimini tamamladı. 2011 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Eğitimine başladı. İyi derecede İngilizce bilmektedir.