

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

**YENİ BİR ON-LİNE HPLC İNDİKATÖR TAYİN YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ VE
MOR LAHANA EKSTRAKTINA UYGULANMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimyager Hacer DOĞAN

HAZİRAN 2015

TRABZON



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

**YENİ BİR ON-LİNE HPLC İNDİKATÖR TAYİN YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ VE MOR
LAHANA EKSTRAKTINA UYGULANMASI**

Kimyager Hacer DOĞAN

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde

YÜKSEK LİSANS (KİMYA)

Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 26 / 05 / 2015

Tezin Savunma Tarihi : 12 / 06 / 2015

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Murat KÜÇÜK

Trabzon 2015

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Kimya Anabilim Dalında
Hacer DOĞAN tarafından hazırlanmış**

**YENİ BİR ON-LİNE HPLC İNDİKATÖR TAYİN YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ VE MOR LAHANA
EKSTRAKTINA UYGULANMASI**

başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 26/ 05/2015 gün ve 1604 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Murat KÜÇÜK

Üye : Doç. Dr. Celal DURAN

Üye : Doç. Dr. Ali GÜNDOĞDU



**Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ
Enstitü Müdürü**

ÖNSÖZ

‘Yeni Bir On-Line HPLC İndikatör Tayin Yöntemi Geliştirilmesi ve Mor Lahana Ekstraktına Uygulanması’ adlı bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır.

Öncelikle çalışma konusunun seçiminde bana yol gösteren, araştırmalarımın başlangıcından bitimine kadar yardım ve desteğini esirgemeyen ve bana araştırma zevki ve bilimsel düşünce disiplini aşılama için çaba gösteren, tezimin her aşamasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım danışman hocam Sayın Prof. Dr. Murat KÜÇÜK’e teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca, laboratuvar çalışmalarımda benden yardımlarını esirgemeyen, her türlü bilgi ve birikimini bana aktaran Yrd. Doç. Dr. Zeynep İskefyeli’ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Diğer yandan, çalışmalarım esnasında uzaktan da olsa desteğini esirgemeyen Kadriye Yanık’a çok teşekkür ederim.

Tüm çalışmam boyunca bana anlayış gösteren ve destek veren canım aileme, araştırmam süresince maddi ve manevi desteklerini esirgemedikleri için teşekkürü bir borç bilirim.

Hacer DOĞAN
Trabzon 2015

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Yeni Bir On-Line HPLC İndikatör Tayin Yöntemi Geliştirilmesi ve Mor Lahana Ekstraktına Uygulanması” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Murat KÜÇÜK’ün sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, 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. 26/05/2015

Hacer DOĞAN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VII
SUMMARY	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
TABLolar DİZİNİ.....	XI
SEMBOLLER DİZİNİ	XII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.2. İndikatörler	1
1.2.1. İndikatörlerin Çeşitleri.....	2
1.2.1.1. Doğal pH İndikatörler.....	7
1.3. Çalışılan İndikatörler	8
1.3.1. Bromotimol Mavisi.....	8
1.3.2. Fenol Kırmızısı	9
1.4. Kromatografik Yöntemler	10
1.4.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ve Uygulamaları.....	11
1.4.1.1. Yaygın Kullanılan HPLC Dedektörleri	14
1.4.1.2. Ultraviyole (UV) Dedektör	14
1.4.1.3. Diyot Serili Dedektör (DAD)	15
1.5. Ekstraksiyon	15
1.5.1. Ekstraksiyon Çeşitleri.....	15
1.5.1.1. Katı-Sıvı Ekstraksiyon.....	16
1.5.1.2. Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon	16
1.6. Mor Lahana (<i>Brassica oleracea var. capitata f. rubra</i>)	16
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	18
2.1. Kullanılan Cihazlar.....	18
2.2. Kullanılan Kimyasallar.....	18
2.3. Mor Lahana Ekstraktının Hazırlanması.....	20

2.4.	HPLC-DAD-UV Koşulları	21
2.4.1.	HPLC Çözücü Sistemi.....	21
2.4.2.	pH İndikatörleri ile Yapılan Optimizasyon	21
2.5.	pH İndikatörlerinin on-line HPLC-indikatör Analizleri	22
2.5.1.	Mor Lahana Ekstraktının on-line HPLC-indikatör Analizleri	22
3.	BULGULAR VE TARTIŞMALAR.....	23
3.1.	pH İndikatörlerinin on-line HPLC-indikatör Analizleri	23
3.2.	Mor Lahana Ekstraktının on-line HPLC-indikatör Analizleri.....	32
4.	SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	34
5.	KAYNAKLAR	36
ÖZGEÇMİŞ		

Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

YENİ BİR ON-LİNE HPLC İNDİKATÖR TAYİN YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ VE MOR
LAHANA EKSTRAKTINA UYGULANMASI

Hacer DOĞAN

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Murat KÜÇÜK
2015, 39 Sayfa

Zayıf bir asit ve baz olan pH indikatörleri asidik ve bazik çözeltilerde farklı renk gösterirler. İndikatörlerin belirlenmesinde kullanılan titrasyon ve spektrofotometrik yöntemler karışımlardaki indikatör bileşikleri doğrudan belirlenmesinde kullanılmamaktadır. On-line HPLC biyokimyasal dedeksiyon sistemleri (örneğin on-line HPLC antioksidan tayin yöntemleri) hızla gelişmektedir. Çalışmamızda karışımlardaki indikatör özelliğe sahip bileşenlerin belirlenmesi amacıyla ilk defa bir on-line HPLC-indikatör yöntemi geliştirilmiş ve mor lahana bitkisindeki indikatör özelliğe sahip bileşenlerin belirlenmesinde kullanılmıştır. On-line olarak HPLC sistemine kombine edilen ilave pompa ve dedektör yardımıyla, standart indikatör olarak fenol kırmızısı ve bromotimol mavisi kullanılarak yeni yöntem geliştirilmiş ve mor lahananın sulu ekstraktına uygulanmıştır. Mor lahana kromatogramlarının karşılaştırılmasından indikatör olabilecek en az 3 bileşene sahip olduğu görülmektedir. Geliştirilen yeni on-line HPLC indikatör yöntemi doğal pH indikatörlerinin daha kısa süren çalışmalarla tespitini sağlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: İndikatör, On-Line HPLC, Mor Lahana

Master Thesis

SUMMARY

DEVELOPMENT OF A NEW ON-LINE HPLC-INDICATOR DETERMINATION METHOD
AND ITS APPLICATION ON RED CABBAGE EXTRACT

Hacer DOĞAN

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Science
Chemistry Graduate Program
Supervisor: Prof. Murat KÜÇÜK
2015, 39 Pages

The pH indicators, being a weak acid and base, show different colors in acidic and basic solutions. The methods of titration and spectrophotometry used in the determination of indicators are not used for the determination of indicators found in mixtures. On-line HPLC biochemical detection systems, e.g. on-line HPLC-antioxidant methods, are being rapidly developed. In our study, an on-line HPLC-indicator method was developed for the first time to determine indicator components of mixtures, and the method was applied for the determination of the components of red cabbage that have indicator potential. The new method was developed by using the standard indicators phenol red and bromothymol blue and additional pump and detector on-line with HPLC system. The method applied to aqueous redcabbage extract. The comparison of the chromatograms of red cabbage extract revealed at least three components that have pH-indicator property. The new on-line HPLC-indicator method will provide the determination of natural pH indicators within shorter investigation times.

Key Words: Indicator, On-Line HPLC, red cabbage

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Bromotimol mavisinin farklı pH'lardaki spektrumları.....	9
Şekil 2. Fenol kırmızısının farklı pH'lardaki spektrumları.....	10
Şekil 3. Kromatografik ayırmanın esası.....	11
Şekil 4. HPLC cihazının şematik gösterimi.....	12
Şekil 5. Mor lahananın görünümü	17
Şekil 6. Mor lahananın ekstraktının farklı pH'lardaki renk değişimi	17
Şekil 7. Fenol kırmızısı için spektrofotometre ile elde edilen asidik ve bazik UV-Vis spektrumları.....	23
Şekil 8. Fenol kırmızısının asidik kromatogramı.....	24
Şekil 9. Fenol kırmızısının 3D asidik kromatogramı.....	24
Şekil 10. Bromotimol mavisi için spektrofotometre ile elde edilen asidik ve bazik UV-Vis spektrumları	25
Şekil 11. Bromotimol mavisinin asidik kromatogramı.....	25
Şekil 12. Bromotimol mavisinin 3D asidik kromatogramı	26
Şekil 13. İkili indikatör karışımı asidik kromatogramı; fenol kırmızısı ve bromotimol mavisine ait DAD ile edilen spektrumlar şekilde gösterilmiştir	26
Şekil 14. İkili indikatör karışımı asidik 3D kromatogramı	27
Şekil 15. İkili indikatör karışımı bazik kromatogramları; fenol kırmızısı ve bromotimol mavisine ait DAD ile edilen spektrumlar şekilde gösterilmiştir	27
Şekil 16. İkili indikatör karışımı bazik 3D kromatogramı	28
Şekil 17. İkili indikatör karışımı kromatogramı içerisinde fenol kırmızısı asidik ve bazik karşılaştırılması	28
Şekil 18. İkili indikatör karışımı fenol kırmızısı asidik (A) ve bazik (B) 3D kromatogramları	29
Şekil 19. İkili indikatör karışımı kromatogramı içerisinde bromotimol mavisini asidik ve bazik karşılaştırılması.....	29
Şekil 20. İkili indikatör karışımı bromotimol mavisi asidik (A) ve bazik (B) 3D kromatogramları	30
Şekil 21. Tubing boyu (cm) – pik alanı	30
Şekil 22. Tubing boyu (cm) – alıkonma süresi	30
Şekil 23. Farklı tubing boylarının birinci dedektör (280 nm) ve ikinci dedektörle elde edilen asidik kromatogramlarının (280 nm) karşılaştırılması	31

Şekil 24.	Farklı tubing boylarının ikinci dedektörle elde edilen bazik kromatogramlarının (550 nm) karşılaştırılması	31
Şekil 25.	Değişen amonyak konsantrasyonu (0,1 M – 4 M) ile elde edilen kromatogramların karşılaştırılması.....	32
Şekil 26.	NH ₃ konsantrasyonu (M) – pik alanı grafiği	32
Şekil 27.	NH ₃ konsantrasyonu (M) – alıkonma süresi	32
Şekil 28.	Mor lahanaya ekstraktının spektrofotometrik UV-Vis asidik ve bazik spektrumları	33
Şekil 29.	Mor lahanaya ekstraktının asidik ve bazik kromatogramları (2.dedektör, 550 nm). 1. Dedektör ile 500 nm’de elde edilen kromatogramların karşılaştırılması amacıyla verilmiştir.....	33

TABLULAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1.	Asit-baz indikatörleri	3
Tablo 2.	Karışık indikatörler	4
Tablo 3.	Karışık indikatörlerin karışım oranı.....	5
Tablo 4.	Yükseltgenme-indirgenme indikatörleri.....	5
Tablo 5.	Denemelerde kullanılan cihazlar	18
Tablo 6.	Denemelerde kullanılan kimyasallar	19
Tablo 7.	Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları.....	19
Tablo 8.	Çalışmada kullanılan indikatörlerin molekül şekilleri ve molekül ağırlıkları.....	20

SEMBOLLER DİZİNİ

ABS: Absorbans

Ag^+ : Gümüş iyonu

AgCl : Gümüş klorür

Ag_2CrO_4 : Gümüş kromat

BB^- : Bazik ortamda bromotimol mavisi

Cl^- : Klorür iyonu

CH_3COOH : Asetik asit

cm : Santimetre

CrO_4^{2-} : Kromat iyonu

DAD : Diyot serili dedektör

dak : Dakika

g : gram

H^+ : Hidrojen protonu

H_2SO_4 : Sülfirik asit

H_3O^+ : Hidronyum iyonu

HBB : Asitli ortamda bromotimol mavisi

HIn : Asit tipi indikatör

HPLC : Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

In : Baz tipi indikatör

M : Molar

Mg : Miligram

mL : Mililitre

mM : Milimolar

MS : Kütle Spektrometrisi

NaOH : Sodyum hidroksit

NH_3 : Amonyak

nm : Nanometre

PDA : Foto diyot serili (photodiode array)

UV-Vis : Ultra viyole görünür bölge spektrometrisi

v.b : ve benzeri

vd : ve diğerleri

μL : Mikrolitre

3D : 3 boyutlu

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

pH değişimine göre renk değiştiren asit-baz indikatörleri, iyonlaşmamış türünün rengi konjuge asidinin veya konjuge bazının renginden farklı olan zayıf bir organik asit veya zayıf bir organik bazlardır. İndikatörlerin belirlenmesinde volumetrik ve spektrofotometrik yöntemler literatürde yaygın olarak kullanılmaktadır (Gündoğdu vd, 2008). Titrasyona dayalı volumetrik yöntem çok hassas bir yöntem değildir. Son yıllarda birçok alanda olduğu gibi indikatörlerin belirlenmesinde de hassasiyetin arttırılması için HPLC sistemi kullanılmaya başlanmıştır.

Birçok yüksek yapılı bitkiden, ilaç, boya, tarım ilaçları, tat ve koku maddeleri, gıda katkı maddesi ve böcek ilacı üretilebilir. Sürdürülebilir biyoçeşitliliğin akılcı kullanımı ve korunması, yeni bitkisel kaynaklı kimyasalların doğru kullanımı için çaba gösterilmelidir. Bundan dolayı, doğal boyalara olan ilgi son yıllarda oldukça artmıştır. Günümüzde sentetik boyaların yerine geçen doğal ürünlerin kullanımına yönelik farkındalık da artmaktadır. Toksik olmayan özellikleri, düşük kirlilik ve daha az yan etkilerden dolayı, gıda ürünlerinde doğal boyaların kullanımına ilgi fazlalaşmıştır. Doğal boyalar ayrıca çevre dostudur (Ramamoorthy, S. vd., 2009). Doğal kaynaklı bileşiklerin çeşitli biyoaktiviteleri araştırıldığı gibi indikatör özelliğe sahip olanların tespit edilmesi için de araştırmalar yapılmaktadır.

Günümüzde en yaygın bilinen ve doğal pH indikatörü olarak da adlandırılan bitkilerden biri de mor lahanadır. Mor lahananın indikatör özelliği göz önünde bulundurularak geliştirilen yeni yöntemlerle birçok bitkideki pH-indikatörü özelliğine sahip bileşiklerin varlığı tespit edilebilir. Böylece sentetik indikatörler yerine kullanılabilecek doğal, toksik özelliği olmayan ve daha az yan etkiye sahip indikatörler kullanılabilir.

1.2 İndikatörler

Bir kimyasal türün, örneğin asidik veya alkali bir çözeltinin, eşik konsantrasyonun varlığında ya da yokluğunda genellikle renk değişikliği ile işaret veren maddelere *indikatör* denir. Örneğin; metil sarısı bazik bir çözelti içerisinde rengi sarıdır, fakat üzerine yavaş yavaş asit ilave edilirse renk sarıdan kırmızıya döner.

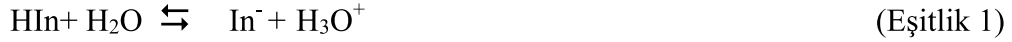
İndikatörlerin çoğu düşük konsantrasyonlarda bile renk dönüşümünü sağlarlar. (URL-1)

İndikatörleri; asit-baz indikatörleri, yükseltgenme/indirgenme (Redoks) indikatörleri, ve çöktürme indikatörleri (Adsorpsiyon İndikatörleri) gibi gruplara ayırabiliriz.

1.2.1. İndikatörlerin Çeşitleri

Asit-baz indikatörleri; zayıf asit ve zayıf bazlardır. Buldukları çözeltinin pH'sına bağlı olarak sentetik ve doğal indikatör maddelerin birçoğu farklı renkler gösterir. Bu maddelerin bazıları yüzyıllar önce suyun asitliğini veya bazlığını göstermede kullanılmıştır ve halen de asit-baz indikatörü olarak kullanılmaktadır. Bu indikatörler çözelti içerisindeki H^+ iyonu (H_3O^+ iyonu) konsantrasyonuna (pH'a) bağlı olarak renk değiştirirler.

Bir asit-baz indikatörü, iyonlaşmamış türünün rengi konjuge asitinin veya konjuge bazının renginden farklı olan zayıf bir organik asit veya zayıf bir organik bazdır. Asit tipi bir indikatör olan HIn'nin davranışı şu şekilde gösterilebilir:



İyonlaşma sırasında molekülün iç yapısında meydana gelen değişiklikler renk değişimine neden olur. Baz tipi bir indikatör olan In'nin davranışı şu şekildedir:



Eşitlik 1'den denge sabitini K_{In} ile ifade edersek; asit tipi indikatörün iyonlaşması için şu eşitlik yazılabilir:

$$K_{In} = \frac{[H_3O^+][In^-]}{[HIn]} \quad (\text{Eşitlik 3})$$

Bu eşitlikten de görüldüğü üzere hidronyum iyonu derişimi, çözeltinin rengini kontrol eder. $[HIn] / [In^-]$ oranı 10'dan büyük veya 0,1'den küçük olduğunda, insan gözü In^- ve HIn karışımını içeren çözeltideki renk farklılıklarına duyarlı değildir (Skoog vd., 2002).

Tablo 1. Asit-baz indikatörleri

İndikatör	pH Aralığı	Asit Rengi	Baz Rengi	İndikatör Derişimi (g/100mL)	Çözücüsü
Timol Mavisi	1.2 - 2.8	Kırmızı	Sarı	0.1	%95 Etanol
Metil Sarı	2.9 – 4.0	Kırmızı	Sarı	0.5	%95 Etanol
Bromfenol Mavi	3.0 – 4.6	Sarı	Mavi	0.04	%20 Etanol
Metil Oranj	3.1 - 4.5	Kırmızı	Sarı	0.1	Su
Bromkrezol Yeşili	3.8 - 5.5	Sarı	Mavi	0.02	%95 Etanol
Bromfenol Kırmızısı	5.2 – 7.0	Sarı	Kırmızı	0.04	7.8 ml 0.01 N NaOH + su
p-nitrofenol	5.6 – 7.6	Renksiz	Sarı	0.25	%50 Etanol
Metil Kırmızısı	4.2 – 6.3	Kırmızı	Sarı	0.1	%95 Etanol
Nitrazin Sarısı	6.0 – 7.0	Sarı	Mavi	0.1	Su
Bromtimol Mavi	6.0 – 7.6	Sarı	Mavi	0.1	%50 Etanol
Fenol Kırmızısı	6.4 – 8.0	Sarı	Kırmızı	0.1	Su
Nötral Kırmızısı	6.8 – 8.0	Kırmızı	Sarı	0.1	70 ml %95 Etanol + su
Krezol Kırmızısı	7.2 – 8.8	Sarı	Kırmızı	0.1	Su
Timol Mavi	8.0 – 9.6	Sarı	Mavi	0.1	%95 Etanol
Fenolftalein	8.3–10.0	Renksiz	Kırmızı	1.0	%50 Etanol +0.0.1 N NaOH
Timolftalein	9.3–10.5	Renksiz	Mavi	0.1	%95 Etanol
Alizarin Sarısı	10.0-12.1	Sarı	Viyole	0.1	su

Bazı titrasyonlarda daha hassas sonuç alabilmek için, daha dar pH aralığında titrasyonun gerçekleşmesi sağlanır. İki uygun indikatör çalışılarak yakın pH aralığında renk değiştiren karışım elde edilir. Böyle indikatörlere karışık indikatörler (Üniversal İndikatörler) denir. (URL-2)

Tablo 2. Karışık indikatörler

İndikatörler		Konsantrasyon (g/100mL)		Çözücüsü	Asit Rengi	Baz Rengi	Geçiş pH'sı	Geçiş Rengi
I	II	I	II					
Metil sarısı	Metilen mavisi	0,05	0,05	%95 Etanol	Mavi, viyole	Yeşil	3,2	Viole
Metil oranj	Ksilen cyanol	0,02	0,28	%50 Etanol	Kırmızı	Yeşil	3,9	Gri
Metil oranj	İndigo karmin	0,1	0,25	Su	Viyole	Sarı,yeşil	4,1	Gri
Bromkresol yeşili	Metil oranj	0,1	0,02	Su	Portakal	Koyu yeşil	4,3	Açık yeşil
Bromkresol yeşili	Metil kırmızısı	0,075	0,05	%95 Etanol	Şarap kırmızısı	Yeşil	5,1	-
Metil kırmızısı	Metilen mavisi	0,1	0,05	%95 Etanol	Kırmızı, viyole	Yeşil	5,4	Kirli mavi
Bromkresol yeşili	Klorfenol kırmızısı	0,05	0,05	Su	Sarı,yeşil	Mavi, viyole	6,1	-
Bromkresol moru	Bromtimol mavisi	0,05	0,05	Su	Sarı	Viyole,mavi	6,7	Viole
Nötral kırmızısı	Metilen mavisi	0,05	0,05	%95 Etanol	Viyole, mavi	Yeşil	7,0	-
Bromtimol mavisi	Fenol kırmızısı	0,05	0,05	Su	Sarı	Koyu viyole	7,5	Açık viole
Kresol kırmızısı	Timol mavisi	0,025	0,15	Su	Sarı	Viole	8,3	Pembe
Fenolftalein	Metil yeşili	0,033	0,067	%95 Etanol	Yeşil	Viole	8,9	Gri,mavi
Fenolftalein	Timol mavisi	0,075	0,025	%50 Etanol	Sarı	Viole	9,0	Yeşil
Fenolftalein	Timolftalein	0,1	0,1	%95 Etanol	Renksiz	Viole	9,9	-
Fenolftalein	Nil mavisi	0,033	0,133	%95 Etanol	Mavi	Kırmızı	10,0	Viole

Her bir indikatör için ayrı ayrı g/100 mL'lik çözelti hazırlanır ve Tablo 3'teki oranlarda karıştırılır. (URL-2)

Tablo 3. Karışık indikatörlerin karışım oranı

İndikatörler		Karışım Oranları (V _I / V _{II})
I	II	
Metil oranj	İndigo karmin	1/1
Fenolftalein	Timol mavisi	3/1
Bromkresol yeşili	Metil kırmızısı	3/1
Nötral kırmızısı	Metilen mavisi	1/1
Bromtimol mavisi	Fenol kırmızısı	1/1
Kresol kırmızısı	Timol mavisi	1/3
Fenolftalein	Nil mavisi	1/2
Metilen Kırmızısı	Metilen Mavisi	1/1

Yükseltgenme-indirgenme (redoks) indikatörleri; yükseltgenmiş ve indirgenmiş hallerinin renkleri farklı olan maddelerdir. Genel redoks indikatörlerinin renk değişimleri, spesifik indikatörlerin aksine analit ve titrantın kimyasal yapısından büyük ölçüde bağımsızdır. Titrasyon süresince titrasyonun meydana geldiği sistemin elektrot potansiyelindeki değişmelere bağlıdır. Yükseltgenme-indirgenme indikatörlerindeki renk değişimi için şu yarı reaksiyon yazılabilir:



Pek çok indikatörün indirgemesinde protonlar yer aldığı için bir renk değişiminin meydana geldiği potansiyel aralığı (geçiş potansiyeli) genellikle pH'ya bağlıdır.

Tablo 4. Yükseltgenme-indirgenme indikatörleri

İndikatör	Yükseltilmiş Rengi	İndirgenmiş Rengi	Geçiş Potansiyeli, V	Şartlar
5-Nitro-1,10-fenantrolin demir(II) kompleksi	Soluk mavi	Kırmızı-menekşe	+1,25	1 M H ₂ SO ₄
2,3'-Difenilamindi-karboksilik asit	Mavi-menekşe	Renksiz	+1,12	7-10 M H ₂ SO ₄

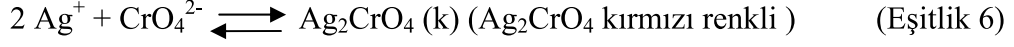
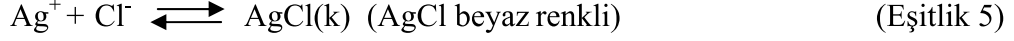
Tablo 4'ün devamı

1,10 –Fenantrolin demir (II) kompleksi	Soluk mavi	Kırmızı	+1,11	1 M H ₂ SO ₄
5-Metil-1,10 fenantrolin demir (II) kompleksi	Soluk mavi	Kırmızı	+1,02	1 M H ₂ SO ₄
Erioglosin A	Mavi-kırmızı	Sarı-yeşil	+0,98	0,5 M H ₂ SO ₄
Difenilamin sülfonik asit	Kırmızı-menekşe	Renksiz	+0,85	Seyreltik asit
Difenilamin	Menekşe	Renksiz	+0,76	Seyreltik asit
p-Etoksikrisoidin	Sarı	Kırmızı	+0,76	Seyreltik asit
Metilen Mavisi	Mavi	Renksiz	+0,53	1 M asit
Indigo tetrasülfonat	Mavi	Renksiz	+0,36	1 M asit
Fenosafranin	Kırmızı	Renksiz	+0,28	1 M asit

Çöktürme indikatörleri; kimyasal bir indikatörle elde edilen dönüm noktasında, genellikle bir renk değişimi görülür veya nadiren de titre edilen çözeltide bulanıklık ortaya çıkar ve kaybolur. Bir çöktürme titrasyonunda kullanılacak indikatörün özellikleri; renk değişimi analitin titrasyon sıçrama bölgesinde ortaya çıkmalıdır ve renk değişimi reaktifin veya analitin p değerinin belirli bir aralığında görülmelidir.

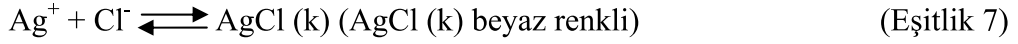
Çöktürme indikatörlerinin uygulamasında üç yöntem kullanılır:

1. Mohr yöntemi: Bu yöntem ilk defa 1865'de K.F. Mohr tarafından geliştirilmiştir. Klorür, bromür ve siyanür iyonlarının arjentometrik tayininde sodyum kromat indikatör olarak kullanılabilir. Mohr titrasyonu, kromat iyonu zayıf kromik asitin konjüge bazı olduğundan, pH 7-10 aralığında yapılmalıdır.



2. Fajans yöntemi: Bu yöntem ilk defa 1926'da K. Fajans tarafından bulunmuştur. Bir adsorpsiyon indikatörü, çöktürme titrasyonunda katının yüzeyine adsorplanabilen bir bileşiktir. Adsorpsiyon, idealde eşdeğerlik noktası yakınında meydana gelir ve sadece bir renk değişimi ile değil aynı zamanda rengin çözeltiden katıya geçmesi ile sonuçlanır. Örneğin; floresein gümüş nitratla klorür iyonunun titrasyonu için yararlı olan bir indikatördür.

3. Volhard yöntemi: Bu yöntem 1874 yılında Jacob Volhard tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntemde demir (III) iyonu indikatör gibi davranır. Bu yöntemde analit çözeltisinin kesinlikle asidik olması gerekir. Klorür için Volhard yöntemi (Skoog vd, 2002)



1.2.1.1. Doğal pH İndikatörleri

Asit-baz titrasyonlarında sentetik indikatörler kullanılabilir. Çevre kirliliği, maliyet ve bulunabilirlik açısından asit-baz indikatörleri için doğal bileşikler de aranmaya başlanmıştır. Yapılan bazı çalışmalar sonucunda doğal ürünler standart sentetik indikatörler gibi kullanılabileceği görülmüştür. Bu ürünler sentetik indikatörlerde olduğu gibi dönüm noktasında renk değişimi göstermektedir. Doğal indikatörlerin ekonomik, kullanışlı ve hassas titrasyon için kullanılabilecekleri bulunmuştur. (Patil vd, 2009)

Antosiyaninler, suda çözünür ve pH'a göre kırmızı, mor veya mavi renk alırlar. Antosiyaninler bitkilerin yaprak, kök, sap, çiçek ve meyve de dahil olmak üzere bütün dokularda meydana gelebilir. Antosiyaninlerin pH indikatörü olarak kullanılma nedeni,

farklı pH'larda yapısındaki değişikliklerden dolayı verdiği renk dönüşümüdür. Örneğin; asitte kırmızı, bazda ise maviye dönerler (Bondre vd, 2012). Bu yüzden antosiyanin oranı yüksek olan bitkiler doğal indikatör olarak tercih edilebilir. Bu konuda literatürde en çok doğal indikatör olarak tercih edilen bitki mor lahanadır.

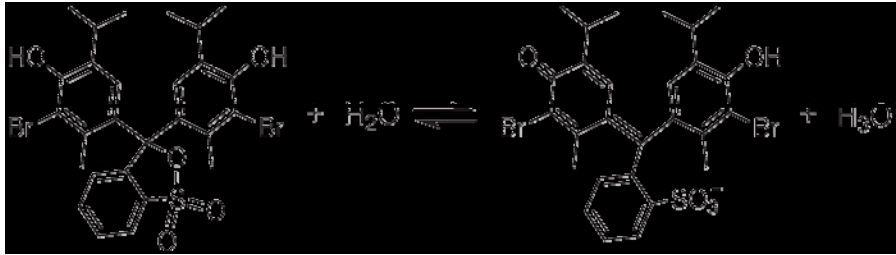
1.3. Çalışılan İndikatörler

Bu çalışmada bromotimol mavisi ve fenol kırmızısı indikatörleri kullanılmıştır.

1.3.1. Bromotimol Mavisi

Bromotimol mavisi, zayıf asit ve bazlar için kullanılan bir pH indikatörüdür. Nötr çözeltilerde yeşil renktedir. Mikroskop altında hücre duvarlarını ve çekirdeklerini tanımlamak amacı ile biyolojik boya maddesi olarak ta kullanılır. Bitkilerin aktivitelerini ve solunum hareketlerini incelemek için de bromotimol mavisi kullanılır. Ayrıca havuzların ve akvaryumların sularında bulunan karbondioksit miktarını (karbondioksit zayıf asit özelliği gösterir) hesaplamak amacıyla da kullanılır.

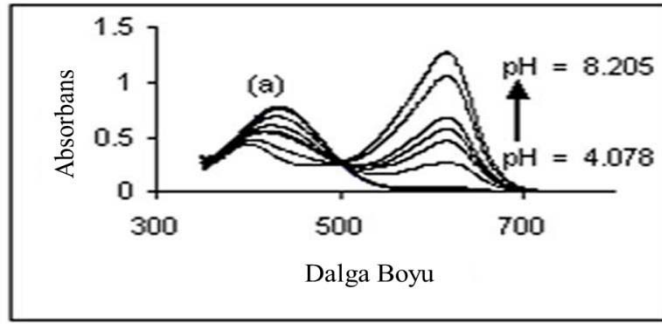
Bromotimol mavisi, pH 6,0-7,6 arasında renk değişimi gösterir ve renk sarıdan maviye döner (Eşitlik 10 (Klotz vd, 2011)). Molekül kapalı formülü ise $C_{27}H_{28}Br_2O_5S$ 'dir. Bu indikatörün farklı pH'larda verdiği UV-Vis spektrumları Şekil 1'de görülmektedir.



(Eşitlik 10)

HBB (sarı)

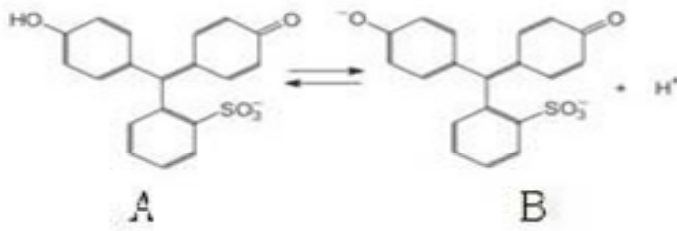
BB⁻ (mavi)



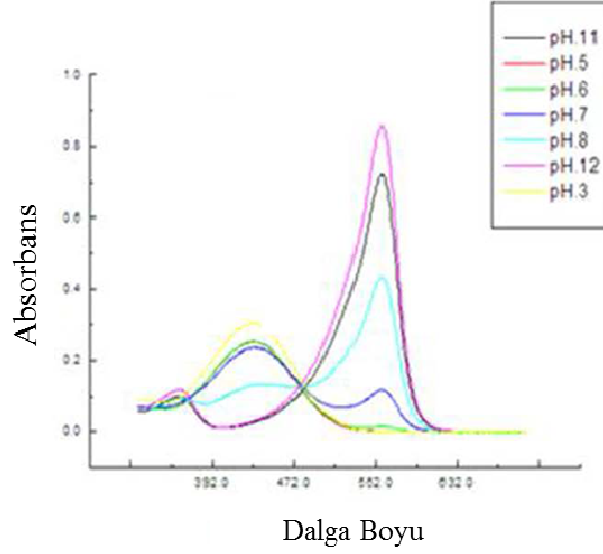
Şekil 1. Bromotimol mavisinin farklı pH'lardaki spektrumları (su içinde) (Zarei vd, 2009)

1.3.2. Fenol Kırmızısı

Fenol kırmızısı, suda çözülebilen kırmızı kristal yapıdadır. 6,8-8,2 arasında renk değiştirir. Asidik rengi sarıdır, bazik rengi ise pembedir. Bununla birlikte pH 8, 11 ve 12 de pembe renk gösterir. pH 3,5 ve 6 da ise sarı renk verir (Tewodros, 2010). Fenol kırmızısının çeşitli kullanım alanları vardır. Bunlara gözyaşı miktarını belirlemek için yapılan test (Bingöl, 2009), endoskopik fenol kırmızısı testi (Öztürk, 2008), TSG (Triple Sugar Iron) Besiyeri Testi (Tıbbi Laboratuvar, Mikroorganizmaların Kültür ve Doğrulama Testleri -2, 2011) örnek gösterilebilir. Fenol kırmızısının asit – baz denge reaksiyonu Eşitlik 11'de ve UV-Vis spektrumları Şekil 2'de gösterilmiştir.



(Eşitlik 11)

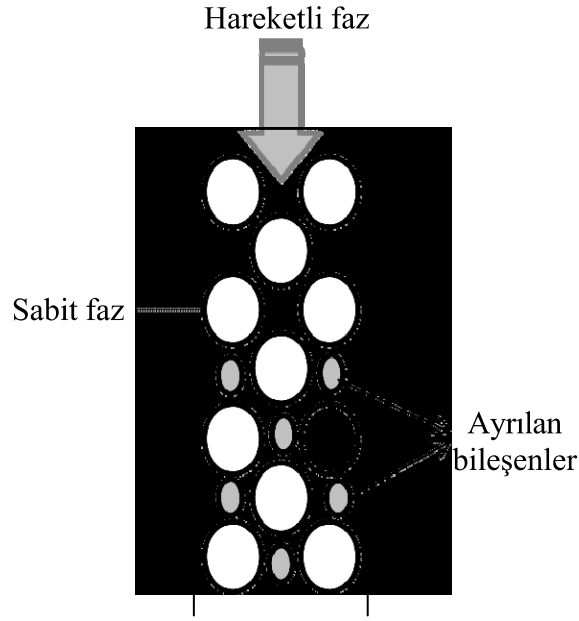


Şekil 2. Fenol kırmızısının farklı pH'larda fenol spektrumu (Tewodros, 2010)

1.4. Kromatografik Yöntemler

Kromatografi, başka yöntemler ile ayrılmaları genellikle mümkün olmayan karmaşık karışımlardaki benzer bileşenlerin ayrılmalarını sağlayan metodlar grubudur. Kromatografik ayırmalarda numune gaz, sıvı ya da süperkritik akışkan olabilen hareketli bir fazda çözülür. Hareketli faz uygun bir sabit faz boyunca geçirilir. Sabit faz tarafından güçlü tutulan bileşikler hareketli fazın akışıyla yavaş hareket ederler. Diğer taraftan sabit faz tarafından zayıf tutulan bileşikler ise hızlı hareket ederler. Hareketlilikteki farklılıklar sonucu numunenin bileşenleri kantitatif ve/veya kalitatif olarak ayrılırlar (Skoog vd., 1998; Akyüz, 2007).

Kromatografi hareketli fazın özelliklerine göre üç gruba ayrılabilir. Bunlar; gaz kromatografisi, sıvı kromatografisi ve süperkritik akışkan kromatografisidir. Kromatografik işlemlere göre ise şu şekilde sınıflandırılır; adsorpsiyon kromatografisi, dağılma (paylaşım) kromatografisi, iyon-değişim kromatografisi ve boyut eleme kromatografisi. Sıvı kromatografisinde bu dört form uygulanabilirken, bileşenlerin uçuculuğunun gerekli olduğundan gaz kromatografisinde adsorpsiyon ve paylaşım kromatografisi uygulanabilir. (Sandra, 2004; Akyüz, 2007)

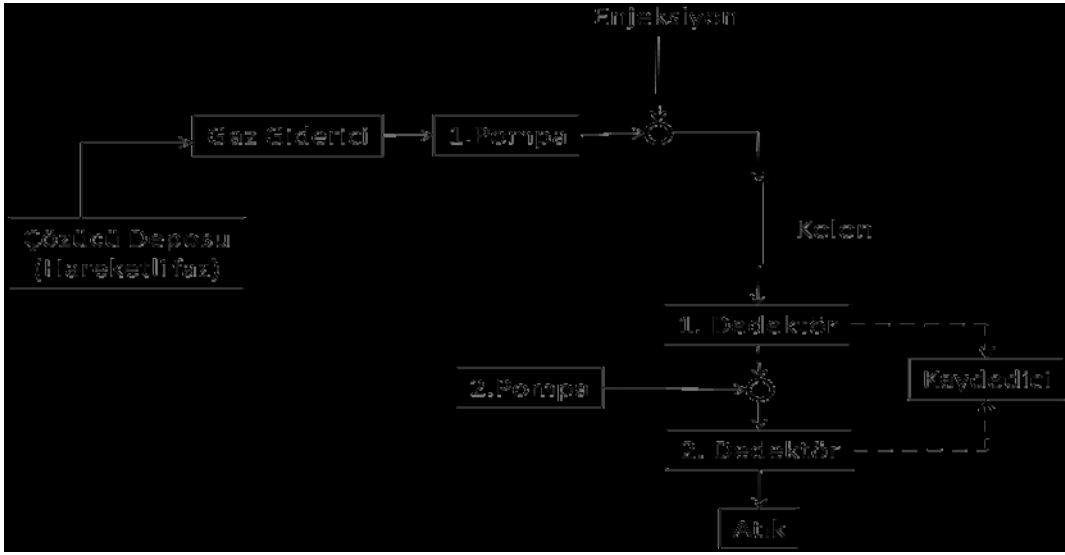


Şekil 3. Kromatografik ayırmanın esası
(Çolak vd., 2011; Burnaz, 2013).

1.4.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ve Uygulama Alanları

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) farmakolojik, çevresel, endüstriyel ve biyolojik v.b. numunelerdeki anorganik ve organik bileşiklerin ayrılması ve belirlenmesi için uygulanan analitik bir tekniktir. Sıvı hareketli faz ve sabit faz arasında dağılım davranışlarındaki farklılıklardan dolayı numunedeki bileşikler kolon boyunca farklı hızlarda geç ederler.

HPLC genel olarak bir hareketli faz deposu, bir enjektör, bir ayırma kolunu (seçimli ön-kolon), bir pompa, bir kolon ısıtıcısı, bir dedektör ve bir integratör veya bilgisayarlı dijital sinyal kaydedicisinden oluşur (Akyüz, 2007). Ayrıca on-line HPLC cihazlarına ilave pompa ve dedektörler eklenerek kombine sistemlerle belirli etkiye sahip bileşenler için tayin yöntemleri de geliştirilmektedir (Şekil 4).



Şekil 4. HPLC cihazının şematik gösterimi

Tipik bir HPLC çalışması bir lineer değişim kullanarak karıştırılan iki çözücü ve kolon boyunca belli bir akış hızını içerir. Ayırmanın seçiciliğini optimize etmek için çözücülerde değişiklikler ve ilaveler yapılır. Çözücülerin bulunduğu hareketli faz depoları, kolonda ve dedektör sisteminde gaz oluşturarak bozucu etkilere sebep olacak çözünmüş gazların (genellikle oksijen ve azot) giderilmesi için bir cihazla donatılmıştır (Skoog vd., 1998; Akyüz, 2007). Pompa yüksek basınçta sabit akışı sağlar ve ayırma sırasında çözücülerin çeşitli kompozisyonlarına programlanabilir. Kolon iç çapına bağlı olarak, akış hızı ayarlanır. HPLC kolonlarında küçük iç çapı, küçük akış hızı gerektirir. Analitik HPLC için tipik olarak 0,5–5 ml/dak akış hızı 400 bar'a kadar çalışan pompalar tarafından üretilebilir (Akyüz, 2007).

HPLC sisteminde iki farklı elüsyon uygulanabilir: izokratik ve gradient. İzokratik elüsyon tipinde, hareketli faz içeriği veya oranı analiz süresince değişmez. Tek pompa ve tek çözücü kullanılır. Çözücü tek bileşen içerebileceği gibi çoklu bileşenlerden oluşan homojen karışım da olabilir. Ancak çok sayıda pikin ayrımının gerektiği çalışmalarda genellikle yetersiz kalır bu durumda gradient elüsyon tercih edilir. Gradient elüsyonda, hareketli faz içeriği veya oranı analiz süresince değişir. En fazla dört farklı hareketli faz kullanılabilir (Tekeli, 2012; Burnaz, 2013).

HPLC sisteminde, farklı polarlıktaki hareketli ve sabit faz kullanılır. Örnek bileşenleri, hareketli ve sabit fazların bağlı polarlığına dayalı olarak iki kolon tipinden biri seçilerek ayrılabilir (Skoog, 1998). Normal faz (NP) kolonunda, sabit faz hareketli faza

göre daha polardır. Apolar veya düşük polariteli bileşener/analitler kolondan en önce çıkar, ilk elüe edilir. Hareketli fazın polaritesi arttıkça, bileşenin kolonda tutunması (elüsyon zamanı) azalır. Ters faz (RP) kolonunda, sabit faz hareketli faza göre daha apolardır. Yüksek polarlığa sahip bileşenler kolondan ilk önce çıkar. Hareketli fazın, polarlığı arttıkça elüsyon zamanı artar (Ercan, 2012; Akyüz, 2011; Burnaz, 2013). Analitin tutunması hareketli fazın hidrofobikliği arttıkça azalır ve en polar analitler ilk elüe edilirler. HPLC analizlerinin yaklaşık olarak yüzde seksen ters faz tipinde gerçekleştirilir. Silikon ters faz kolonlarına modifiye edilir. Silika jelde modifiye olan oktil (C8) ve oktadesil (C18) en fazla kullanılanlarıdır (Akyüz, 2007).

HPLC yaygın olarak birçok alanda kullanılmaktadır. Başlıca kullanım alanları; kimyasal ayırma, saflaştırma, tanımlama ve derişim tayinidir.

Kimyasal Ayırma; HPLC’de kimyasal ayırma işlemi, belli bir sabit faz ve mobil faz bileşiminden farklı çıkış süresinin olmasından yararlanılarak yapılmaktadır. Sabit faz ve mobil faz seçimi kimyasal ayırmanın dercesini belirler.

Saflaştırma; hedeflenen bir maddenin diğer maddelerden ya da atıklardan ayrılması işlemine denir. Belli kromatografik koşullarda her maddenin karakteristik bir piki bulunur. Koşullar ayrılması istenen maddeye göre ve diğer maddelerle olan ilişkisine göre belirlenir. Kromatografik saflaştırma işleminde, kolon çıkışında toplanan istenilen madde diğer fraksiyonlardan izole edilir ve bu ancak doğru bir mobil faz ile mümkündür. Herhangi bir safsızlık veya istenmeyen bir maddenin karışmasını engellemek için istenilen maddenin kolondan çıkış süresi kısa olmalıdır.

Tanımlama; HPLC analizlerinin önemli bir parçasıda bir maddenin HPLC ile tanımlanmasıdır. HPLC’de madde tanımlaması, standarda ait alıkonma süresi ile bilinmeyene ait olan pik alıkonma süresinin karşılaştırılması ile yapılabilir. HPLC ile tanımlanacak herhangi bir madde için öncelikle dedektörün doğru seçilmesi gerekir. Optimum koşullar ayarlandıktan ve dedektör seçildikten sonra bir ayırma analizi yapılmalıdır. Seçilen dedektör ve analiz koşullarında tanımlanmaya çalışılan maddenin kabul edilebilir bir çıkış süresi ve belirgin bir piki olmalıdır. Çıkış süresini kısaltmak için çeşitli ayarlamalar yapılabilir. Bunlar kolon seçimi, mobil faz seçimi ve akış hızıdır. Bilinen bir örneğin kullanılması kesin bir tanımlama için gerekir. Güvenilir bir tanımlama için birden çok metod kullanılmalıdır.

Derişim tayini; HPLC’de tanımlı bir maddenin, bir sıvı çözeltisinde derişimi tayin edilebilir. İstenilen maddenin değişik konsantrasyonlarda HPLC’ye enjekte edilmesi ile gerçekleştirilir. Bilinen konsantrasyonları bir seri pik verir. Piklerin altında kalan alanlar

hesaplanır, derişime karşı grafiğe geçirilir ve kalibrasyon grafiği çizilir. Bilinmeyen derişime ait pik alanı saptanarak, bilinmeyen derişim kalibrasyon eğrisi aracılığıyla bulunur (Haşimi, 2013).

1.4.1.1. Yaygın Kullanılan HPLC Dedektörleri

Sıvı kromatografisinde en çok kullanılan dedektörler, görünür ışığın absorpsiyonu veya ultraviyole absorpsiyonuna dayanırlar. Çok çeşitli dedektörler bulunmaktadır. Bunlar arasında absorbands, floresans, elektrokimyasal, kırma indisi, iletkenlik, kütle, ışının saçılmasını ölçen dedektörler HPLC için kullanılabilir. Bunlardan kırma indisi dedektörü hemen hemen tüm maddelere cevap veren genel amaçlı bir dedektör olmasına rağmen duyarlığı diğer detektörlere göre düşüktür ve izokratik uygulamalarda kullanılabilir. Elektrokimyasal dedektör olarak ise potansiyometrik ve voltmetrik gibi çeşitli dedektörler mevcuttur (Skoog vd, 1998). Elektrokimyasal ve floresans dedektörler, kırma indisi dedektörlerine göre daha hassastırlar, fakat seçici detektörlerdir. Kütle spektrometri dedektörleri ise güçlü, çok hassas ancak çok karmaşık ve pahalı sistemlerdir. İdeal bir dedektörde bulunması gereken özellikler; yüksek duyarlık, hızlı tepki, düşük sinyal gürültüsü, minimum pik yayılması, ayrılan bantların tekrar karışmasını engelleyen hücre yapısı ve çalışma kolaylığıdır (Haşimi, 2013).

On-line HPLC çalışmalarında sisteme yaygın olarak UV-Vis, DAD ve MS dedektörleri kombine edilir (Burnaz, 2013). Bu çalışmada UV-Vis ve DAD dedektörleri kullanıldığı için bu dedektörler hakkında bilgi verilecektir.

1.4.1.2. Ultraviyole (UV) Dedektör

HPLC'de en çok tercih edilen dedektör UV dedektördür. Bir civa ya da döteryum lambasından çıkan ışımaldan, istenilen dalga boyu seçildikten sonra kolondan çıkan türlere göre gönderilir ve numundeki bileşenlerden bu ışımayı absorplayanlar belirlenir. Çok küçük derişimlerdeki bilşenleri belirleyebilen UV dedektörlerin seçicilikleri de oldukça yüksektir (Emir, 2011). Ayrıca UV-Vis spektrofotometre; organik bileşenlerin miktarını ultraviyole ve görünür bölgede absorbands ölçümüne dayalı belirlemede uzun süredir kullanılmaktadır (Tsao ve Deng, 2004; Burnaz, 2013). Geniş uygulama alanına sahip olması ve ekonomik olmasından dolayı en sık kullanılan detektördür (Tekeli, 2012; Burnaz, 2013).

190-1100 nm arasında absorpsiyon yapan, anorganik kompleks ve kromofor gruba sahip anorganik bileşiklerin kalitatif ve kantitatif olarak belirlenmesinde UV-Vis spektrofotometre kullanılır. Özellikle diğer cihazlarla belirlenemeyen anyonların tayini için uygundur (URL-10; Burnaz, 2013).

1.4.1.3. Diyot Serili Dedektör (DAD)

Diyot serili dedektör (DAD/PDA), UV ve görünür bölgedeki absorpsiyonu algılar. Bu sistem UV-Vis dedektöründen farklıdır. DAD dedektörü bir defada belirlenen dalga boyu aralığı içerisinde geniş bir bilgi elde etmek için çoklu fotodiyot diziler içerir. Bu şekilde her diyod ayrı bir dalga boyundaki absorbansı eş zamanlı olarak ölçebilir. Bu sayede istenilen her pikin çok hızlı spektrum taramasını görebilmek ve üç boyutlu kromatogramlar almak mümkündür. Bu dedektör ile istenilen dalga boyu aralığı çalışılabilmektedir. Işın kaynağı olarak döteryum veya tungsten lamba kullanılır (Akyüz, 2011; Burnaz, 2013). HPLC-DAD kombine sistemi ile yürütülen numunelerin içerdiği bileşiklere ait piklerin HPLC ile alıkonma zamanlarına ek olarak eş zamanlı alınabilen spektrumları ile bileşikleri tanımlamak mümkündür (Burnaz, 2013).

1.5. Ekstraksiyon

Bir süspansiyon ya da çözelti içindeki maddeyi çözen, fakat süspansiyon ya da çözeltideki çözücü ile karışmayan bir başka organik çözücü yardımıyla ayırmaya “ekstraksiyon” denir. Kimyada saflaştırma değil daha çok ayırma yöntemi olarak kullanılır. Çeşitli organik bileşiklerin (asidik, bazik ve nötral) ayrılmasında ya da saflaştırılmasında kimyasal aktif ekstraksiyon yöntemi kullanılır. Buna göre asidik bir madde uygun bir baz ile, bazik madde de uygun bir asit ile tepkimeye sokularak tuz oluşturulur ve su fazına çekilmesi sağlanır. Ekstraksiyondan sonra nötral bileşik organik fazda ve sulu faz ayırma hunisinin alt kısmında kalacaktır.

1.5.1. Ekstraksiyon Çeşitleri

Katı –sıvı ekstraksiyon ve sıvı-sıvı ekstraksiyon olmak üzere yaygın iki çeşit ekstraksiyon vardır. Sıvı-sıvı ekstraksiyon, yoğunluk farkından yararlanılarak ayırma

hunisi kullanılarak yapılır. Katı –sıvı ekstraksiyon doğal ve biyolojik örneklerle ilgili uygulamalarda kullanılır.

Ekstraksiyon yönteminde, bitkisel materyalden etken maddeleri elde etmek için çeşitli polaritede çözücüler kullanılır ve çözücü maddenin cinsine göre üç farklı şekilde yapılabilmektedir. Ekstraksiyon yöntemlerinden biri organik çözücü ile ekstraksiyondur. Bu yöntemde benzen, hekzan, kloroform, petrol eteri gibi uçucu yağı, bitkisel materyallerdeki uçucu yağı kolaylıkla çözebilen organik çözücüler, ya da daha polar bileşikler çözen metanol, etanol, dimetilsülfoksit gibi organik çözücüler kullanılır. Bir diğer yöntem ise, sabit yağ ile ekstraksiyondur. Damıtma yöntemlerinin uygun olmadığı veya uçucu yağ miktarının az olduğu durumlarda tercih edilir. Bu yöntemde bitkisel materyal ile bir sabit yağ belli bir süre temasta bırakılır. Son yöntem ise, süper kritik akışkan ekstraksiyondur. Bilinen ekstraksiyon yöntemlerine karşı alternatif bir metottur. Bu metot da basamak sayısı ve çözücü tüketimi azalmakta, analiz süresi kısalmaktadır.

1.5.1.1. Katı-Sıvı Ekstraksiyonu

Katı-sıvı ekstraksiyonunda, uygun bir çözücü ile katının içerdiği maddelerden biri veya bir bölümü ekstrakte edilir. Sürekli ve kesikli ekstraksiyon uygulamaları mevcuttur. Katıların ekstraksiyonunda sürekli ekstraksiyon yöntemleri daha çok tercih edilir. Çünkü katıların ekstraksiyonu genellikle uzun zaman alır. Maddenin çözgenle daha fazla temasının sağlanması için katı örnek ince toz haline dönüştürülür. Böylece maddenin katı içinden çözeltiyeye difüzyonu de hızlandırılır ve aynı zamanda etkileşim yüzeyi artırılmış olur. Katı-sıvı ekstraksiyonda sürekli sistemde Soxhlet Ekstraktörü kullanılır.

1.5.1.2. Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon

Sıvı-sıvı ekstraksiyonu ayırma hunisi kullanılarak iki sıvının yoğunluk farkından yararlanılarak uygulanır. Karışım ayırma hunisine konulduğunda yoğunluğu büyük olan sıvı altta, küçük olan sıvı üstte ise toplanır. Yoğunlukları birbirine yakın olan maddeler kolay ayrılmaz. Bu durumda su fazını, NaCl gibi bir tuzla doyurup yoğunluğunu arttırmak gerekir ya da ayırma hunisini çalkalayarak ayrılma sağlanır. Su içindeki organik maddeyi, organik çözücü fazına alabilmek için ayırma hunisi çalkalanırken çalkaladıkça oluşan gazın çıkması için musluk hafifçe açılır. Gaz çıkışı bitene kadar bu işlem devam ettirilir. Daha sonra üstteki faz musluğun hizasına gelinceye kadar alt faz huniden boşaltılır. Sonra üst faz

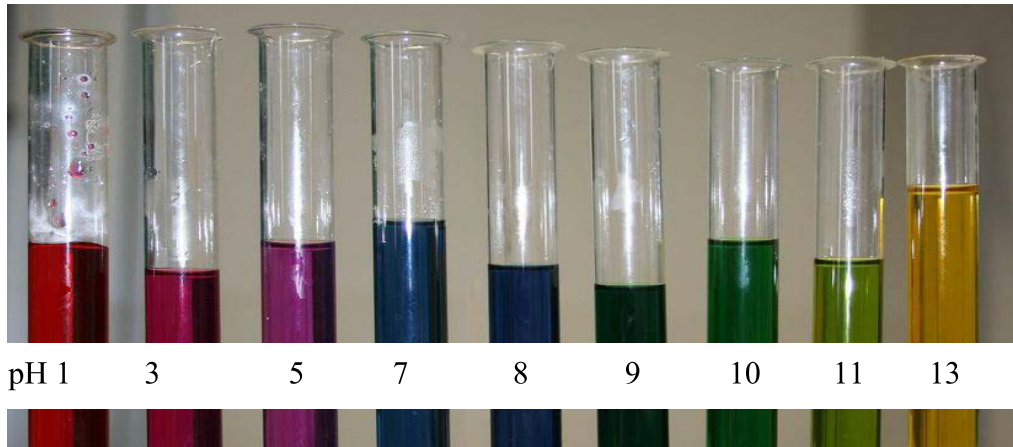
üst kapaktan alınır. Çünkü bu faz da musluktan akıtılırsa altta az da olsa kalmış olan diğer madde üst faza karışıp safsızlık oluşturabilir.

1.6. Mor Lahana (*Brassica oleracea var. capitata f. Rubra*)

Mor lahana, turpgillerden geniş ve kalın kat kat yaprakları olan bir güz sebzesi olarak yetiştirilir. Besin değeri yüksek bir sebzedir. Mor lahana, sağlık açısından yararlı olduğu kadar iyi bir gıda renklendiricisidir. Mor lahananın antosiyanin oranı çok yüksektir. Belli pH değerlerinde antosiyaninler renk karakterlerini belirler. Mor lahana antosiyaninleri ortamın pH'sına göre kırmızıdan maviye değişim gösteren geniş bir renk spektrumu sergiler (Ahmadiani vd, 2014). Bununla birlikte mor lahana geniş pH aralıklarında kararlı kalabildiği için aynı zamanda gıda boyası olarak da sıklıkla kullanılmaktadır (URL-3).



Şekil 5. Mor lahana



Şekil 6. Mor lahana ekstraktının farklı pH'lardaki renk değişimi (URL-4)

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Cihazlar

Deneylerde kullanılan madde ve malzemeler KTÜ Fen Fakültesi Kimya Bölümü Laboratuvarları'ndan temin edildi. Kullanılan cihazlar ve satın alındıkları firmaları gösteren bilgiler Tablo 5'de verilmiştir.

Tablo 5. Deneylerde kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Markası
UV-Vis Spektrofotometre	ATI Unicam UV2
Analitik terazi	Mettler Toledo MS204
Şırınga ucu filter	RC 0,45 µm
HPLC	Agilent 1100 series
HPLC şırınga	Hamilton
pH metre	Hanna

2.2 Kullanılan Kimyasallar

Denemelerde kullanılan kimyasallar ve satın alındıkları firmaların ticari adları Tablo 6'da, deneysel çalışmalarda kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları Tablo 7'de ve çalışmada kullanılan indikatörlere ait bilgiler Tablo 8'de verilmiştir.

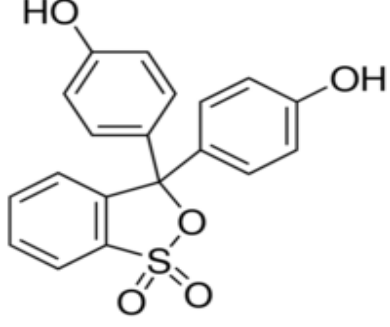
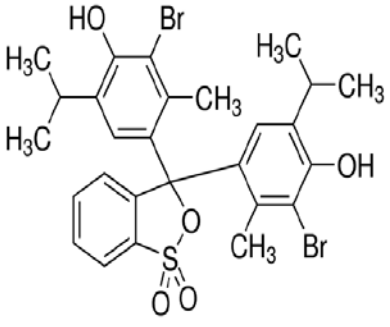
Tablo 6. Deneylerde kullanılan kimyasallar

Madde Adı	Firması
Amonyak	Sigma-Aldrich
Asetik asit	Carlo Erba
Asetonitril	Sigma-Aldrich
Metanol	Merck
Etanol	Carlo Erba
Fenol kırmızısı	Sigma-Aldrich
Bromotimol mavisi	Sigma-Aldrich

Tablo 7. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları

Çözelti	Hazırlanışı
1 M NH ₃	15 mL derişik (%26'lik) NH ₃ 185 mL saf su ile hacmi 200 mL'ye tamamlanmıştır.
%2'lik CH ₃ COOH-Saf su	2 ml derişik (%99,5'lik) CH ₃ COOH 98 ml saf su hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır.
%0,5 CH ₃ COOH-Asetonitril:Su (1:1)	0,5 mL derişik (%99,5'lik) CH ₃ COOH 49,75 mL saf su+ 49,75 mL asetonitril ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.
1 M CH ₃ COOH	1,1 mL derişik (%99,5'lik) CH ₃ COOH 18,9 mL saf su ile hacmi 20 mL'ye tamamlanmıştır.
1,3 mM Fenol kırmızısı	4,6 mg fenol kırmızısı 10 mL saf suda çözülmüştür.
1,3 mM Bromotimol mavisi	8,1 mg bromotimol mavisi az miktarda etanolde çözüldükten sonra hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.

Tablo 8. Çalışmada kullanılan indikatörlerin molekül şekilleri ve molekül ağırlıkları

	İndikatörün Adı	İndikatörün Molekül Şekli	İndikatörün Molekül Ağırlığı (g/mol)
1	Fenol Kırmızısı		354,377
2	Bromotimol mavisi		624,38

2.3 Mor Lahana Ekstraktının Hazırlanması

Çalışmada kullanılan numune seçilirken literatürde doğal indikatörler üzerinde sıklıkla çalışılan numune olan mor lahanaya tercih edilmiştir. Çalışmada kullanılan mor lahanaya 2015 yılında Trabzon'daki bir manavdan temin edilmiştir. Mor lahanadan 10 g alınarak blender ile parçalandıktan sonra 50 mL saf su ile iki saat süre magnetik karıştırıcı ile ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi. Ekstraksiyon işleminden sonra ekstrakt önce adi süzgeç kağıdı, ikinci aşamada ise mavi süzgeç kağıdından süzülmüştür. Ekstraktı daha berrak hale getirmek ve HPLC'de analiz yapmak için son olarak şırınga yardımıyla filtreden (NY 0.45 µm) geçirilmiş ve analiz için hazır hale getirilmiştir.

Çalışmada kullanılan indikatörler (fenol kırmızısı ve bromotimol mavisi) 1,3 mM konsantrasyonda çalışmaya hazırlanmıştır.

2.4. HPLC–UV–DAD Koşulları

Analizler Agilent 1100 serisine ait 4'lü çözücü pompası ve ultra viyole dedektör (UV) ile 1200 serisine ait diyot serili dedektör (DAD) ile yapılmıştır. Chem Station programı (Agilent) ile cihaz kontrol edilmiştir. Tüm analizlerde Hichrom C18 kolon (250 mm× 4.6 mm i.d., 5 µm partikül; UK) ve Hamilton şırınga (25 µL) kullanılmıştır. Analizler için yeterli numune miktarı 20 µL'dir.

İlk olarak indikatörlere ait piklerin olabildiğince ayrılabilmesi için HPLC-UV-DAD sisteminde uygun çözücü programı geliştirilmiştir. Daha sonrasında mor lahanada ekstraktındaki bileşenlere ait piklerin NH₃ ve asitli (CH₃COOH) pik alanlarının belirlenebilmesi için bir on-line-HPLC-UV-DAD-İndikatör sistemi geliştirilmiş (Şekil 4) ve bazı parametrelerin bu sistem üzerine etkisi incelenmiştir. Bu aşamada kolon öncesi hareketli faz oluşturan 4'lü pompanın ve şırınga pompanın akış hızları, kolon sonrası pompadan gelecek olan NH₃ konsantrasyonu ve kolon sonrası tubing boyu belirlenmiştir.

2.4.1. HPLC Çözücü Sistemi

HPLC sisteminde hareketli fazı oluşturmak üzere 2 farklı çözücü kullanılmıştır. Bu çözücüler;

A çözücüsü: %50-50 asetonitril-su (%0,5 asetik asit içeriyor)

B çözücüsü: Sulu %2'lik asetik asit

HPLC sisteminde uygulanan gradient çözücü programında başlangıçta %20 A ve %80 B çözücüsü ile başlanmış ve 10. dakikaya kadar lineer değişiklik yapılarak A %90'a, B ise %10 dönüştürülmüş ve bu oranlarda 17. dakikaya kadar devam edilmiş, sonra 20. dakikada %10 A ve %90 B olacak şekilde yine lineer değişiklik yapılmış ve kromatogram kaydı 20. dakikada sonlandırılmıştır.

2.4.2. pH İndikatörleri ile Yapılan Optimizasyon

Belirlenmiş olan indikatörlerden 1,3 mM'lık çözeltiler hazırlanmıştır. Bu indikatörler hareketli faz çözücü programı kullanılarak tek tek HPLC-UV-DAD sisteminde yürütülmüştür. İndikatörlerin ikili karışımı da yürütülmüştür. Piklerin birbirinden

olabildiğince ayrılması için hareketli faz çözücü programında birçok değişiklik yapılmış ve uygun program ile ikili karışım tekrar yürütülmüştür. Ayrılan piklere ait DAD'da sekiz farklı dalga boyunda (280, 390, 430, 500, 515, 550, 617 ve 650 nm) kromatogramlar elde edilmiştir.

2.5. pH İndikatörlerinin On-line HPLC-İndikatör Analizleri

İndikatörlerin alıkonma zamanı belirlendikten sonra gerekli optimizasyonlar yapıp indikatör karışımı asitli ve bazlı yürütülmüştür. Ayrıca 1. dedektör sonrası 2. pompa ile uygulanan çözeltinin etkinliğinin tubing boyuna bağımlılığını belirlemek amacıyla farklı tubing boyu (250 cm, 100 cm, 80 cm, 60 cm, 50 cm, 40 cm, 30 cm, 20 cm, 10 cm) kullanılarak asitli ve bazlı yürütmeler yine indikatör karışımında yürütmeler yapılmıştır. Bununla birlikte bazın uygulanması gereken konsantrasyonunu belirlemek amacıyla da değişen amonyak konsantrasyonları (0,1 M, 0,5 M, 1 M, 1,5 M, 2 M, 2,5 M, 3 M, 4 M) ile de ikili indikatör karışımı yürütülmüştür.

2.5.1. Mor Lahana Ekstraktının On-line HPLC-İndikatör Analizleri

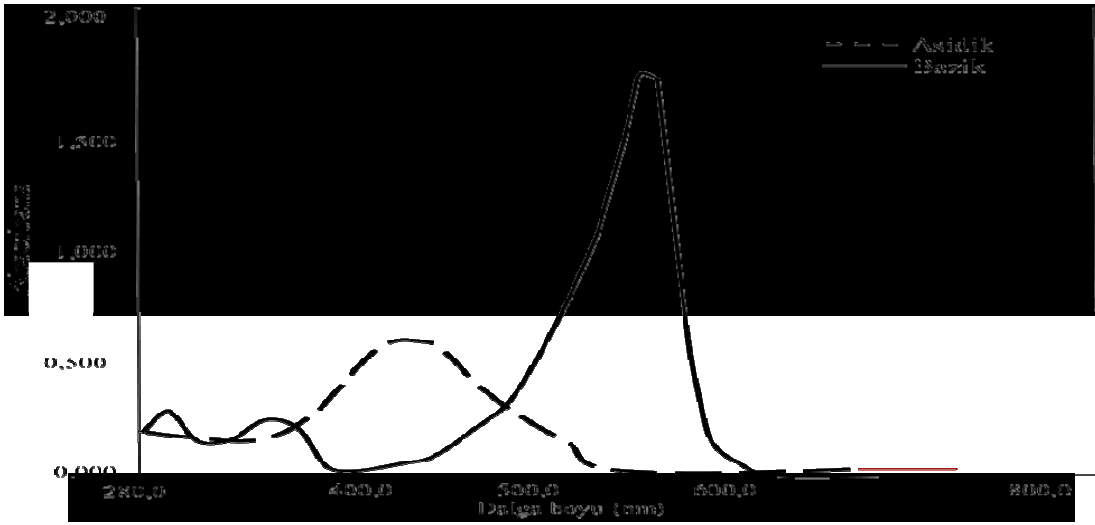
İndikatörlerde olduğu gibi mor lahana ekstraktında ilk olarak asitli ve bazlı spektrofotometrik olarak UV-Vis spektrumları alınmıştır. İndikatörler ile HPLC sisteminin programı belirlendikten sonra su ile hazırlanan mor lahana ekstraktı asidik ve bazik olmak üzere sistemde yürütülmüştür.

3. BULGULAR VE TARTIŞMALAR

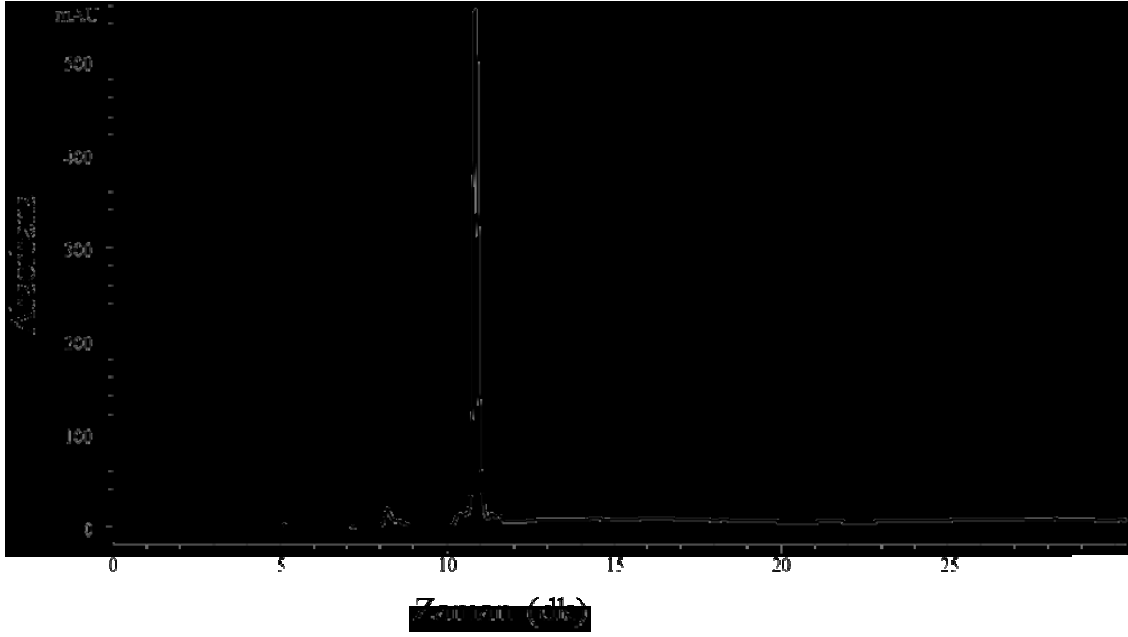
3.1. pH İndikatörlerinin On-line HPLC-İndikatör Analizleri

İndikatörlerle yaptığımız çalışmada ilk önce spektrofotometreden indikatörlerin tek tek spektrumları alınmıştır. Daha sonra fenol kırmızısı ve bromotimol mavisi tek tek yürütülmüştür.

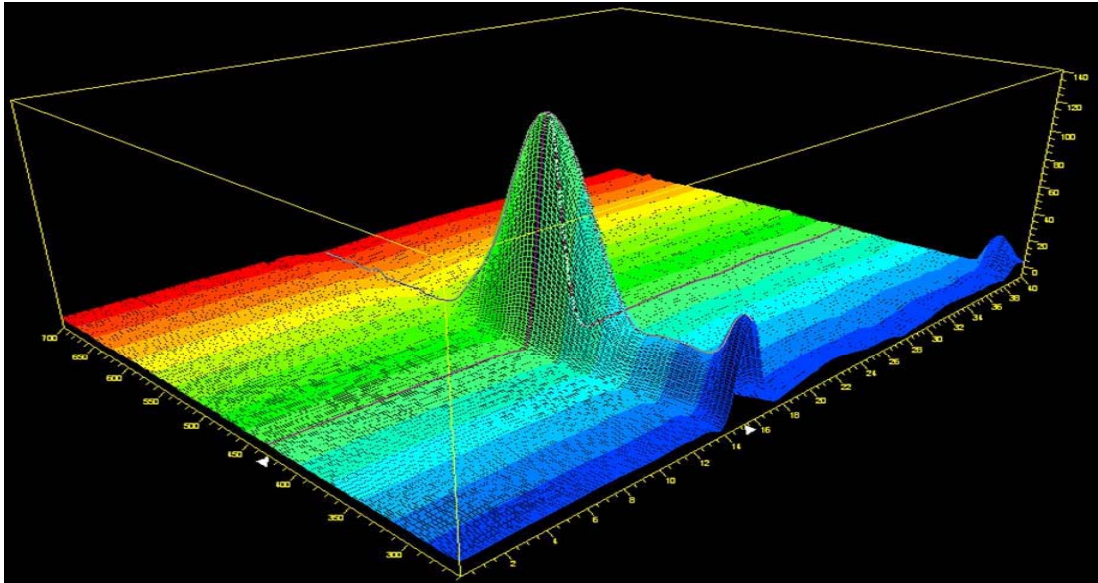
Fenol kırmızısının UV-Vis spektrumu Şekil 7’da, asidik kromatogramı Şekil 8’da ve 3D kromatogramı Şekil 9’de verilmiştir. İlk olarak fenol kırmızısının spektrofotometre cihazı ile UV-Vis spektrumu alındı. Alınan sonuçlar HPLC ile teyit edildi.



Şekil 7. Fenol kırmızısı için spektrofotometre ile elde edilen asidik ve bazik formların UV-Vis spektrumları

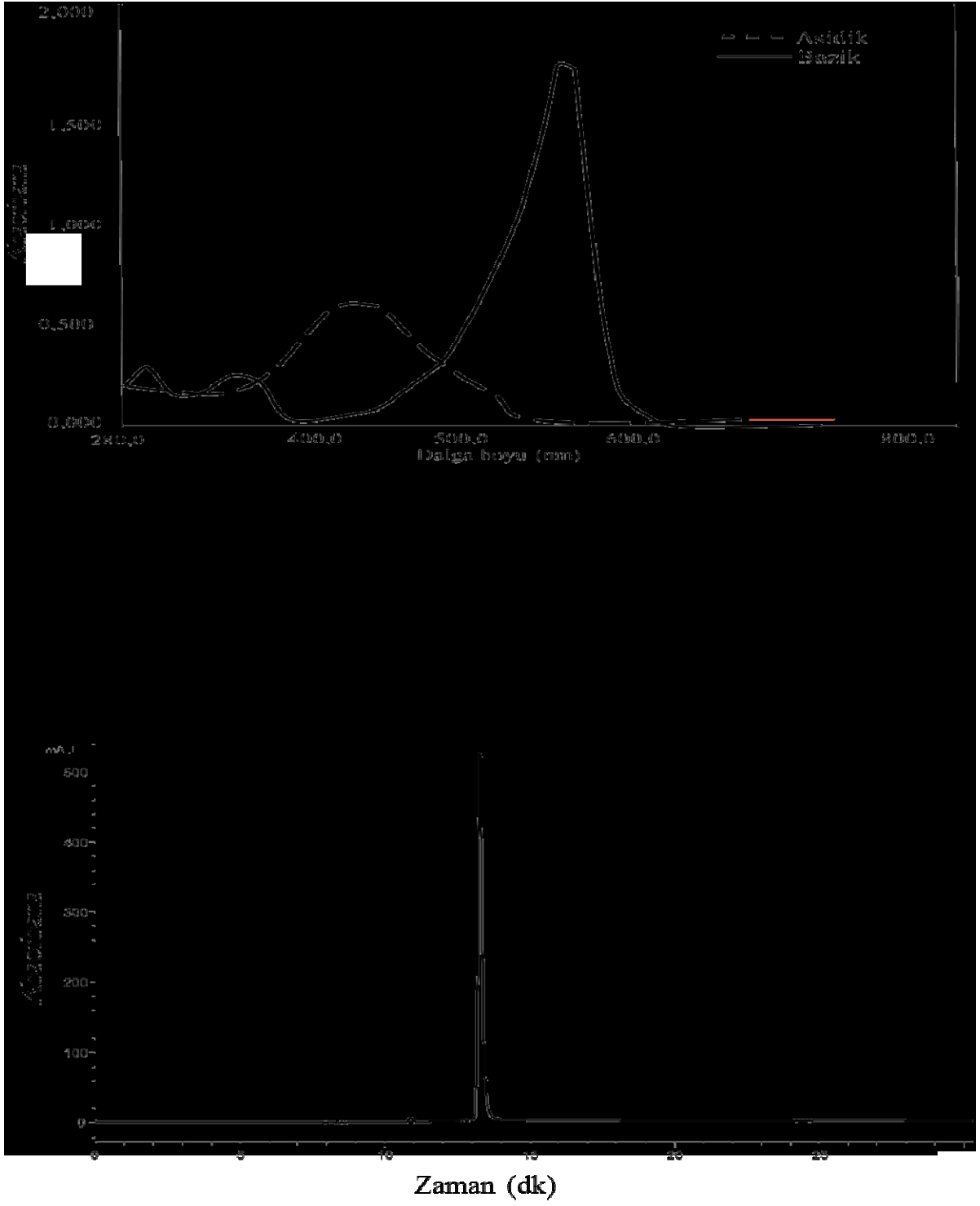


Şekil 8. Fenol kırmızısı asidik kromatogramı

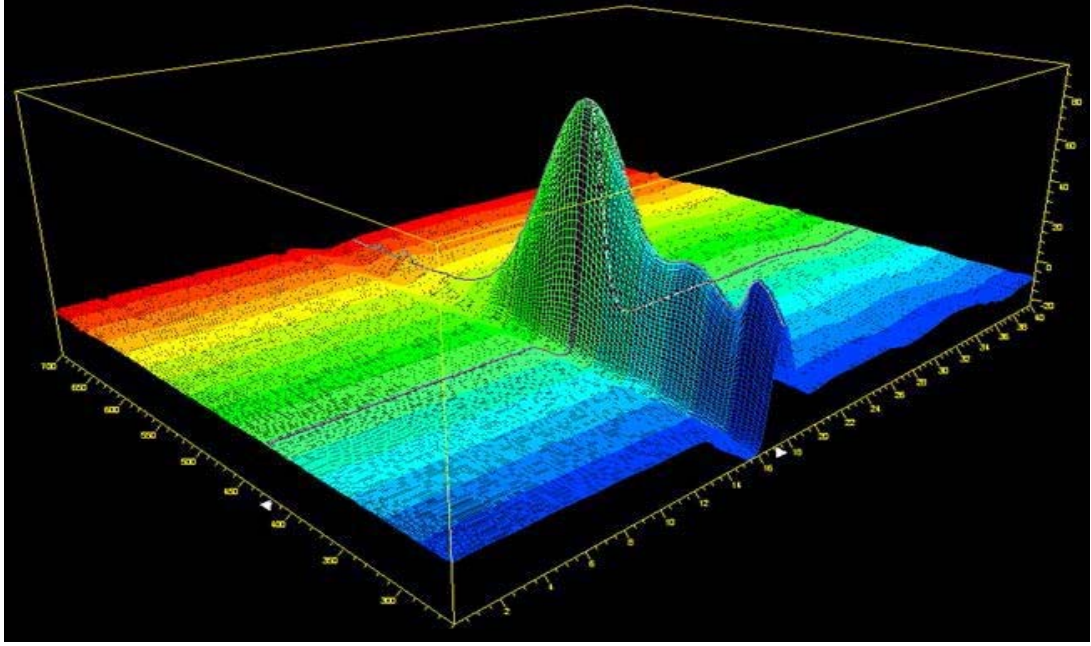


Şekil 9. Fenol kırmızısı 3D asidik kromatogramı

Bromotimol mavisinin UV-Vis spektrumu Şekil 10'de, bazik kromatogramı Şekil 11'te ve 3D kromatogramı Şekil 12'te verilmiştir. İlk olarak bromotimol mavisinin spektrofotometre cihazı ile UV-Vis spektrumu alındı. Alınan sonuçlar HPLC ile teyit edildi.

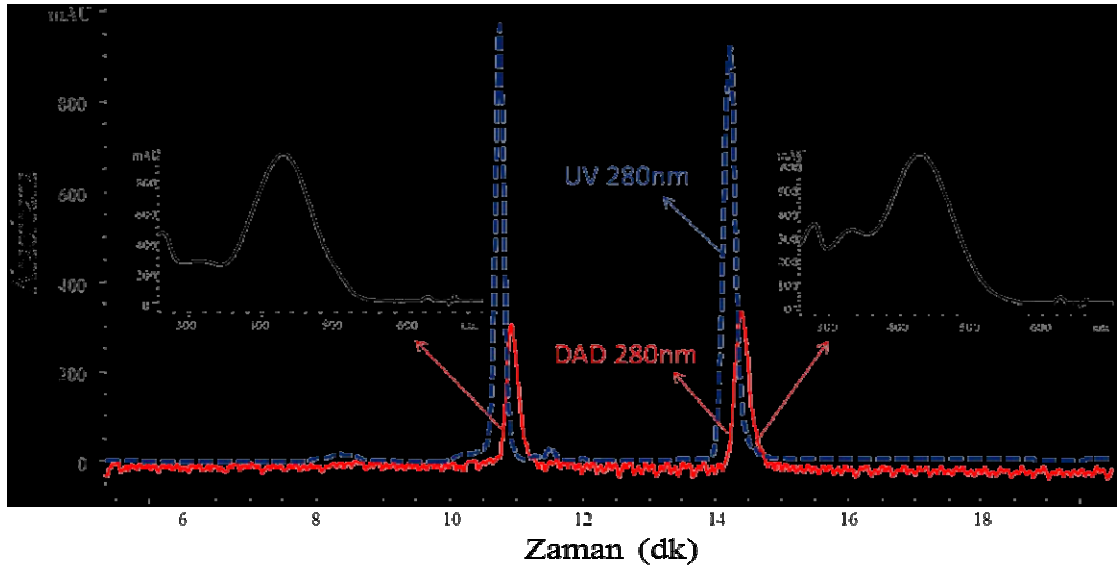


Şekil 11. Bromotimol mavisi asidik kromatogramı

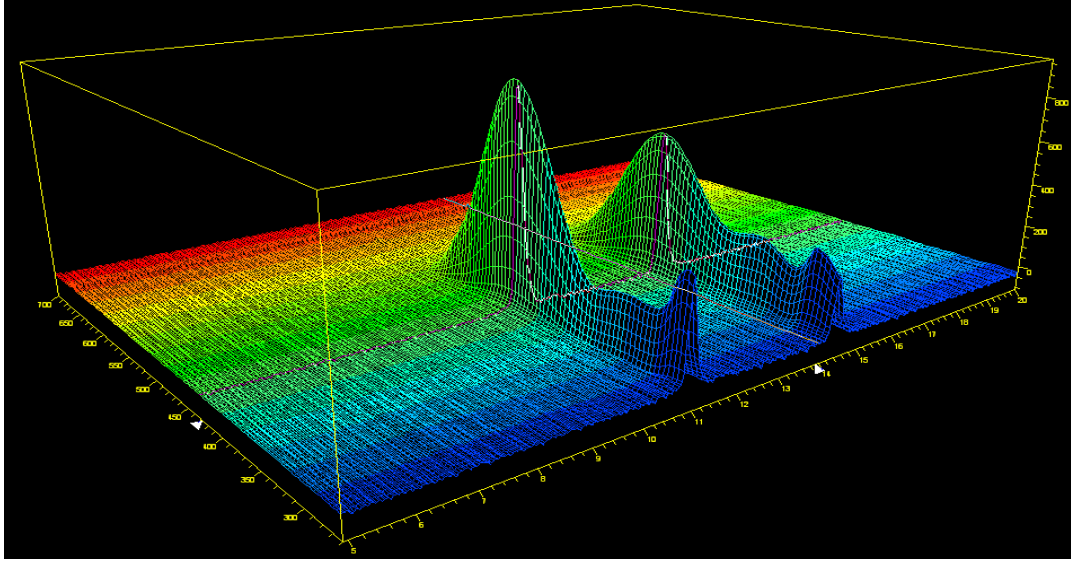


Şekil 12. Bromotimol mavisine 3D asidik kromatogramı

İkili indikatör karışımı içerisindeki fenol kırmızı ve bromotimol mavisinin asidik kromatogramların karşılaştırılması ve fenol kırmızısı ve bromotimol mavisine ait DAD ile elde edilen spektrumlar Şekil 13'te, karışımın asidik 3D kromatogramı şekil 14'da verilmiştir.

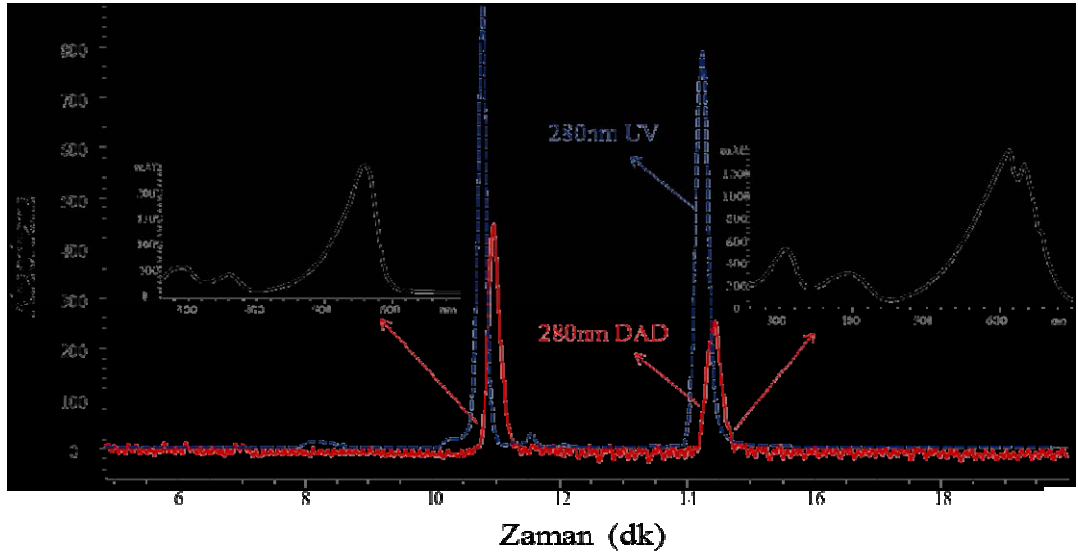


Şekil 13. İkili indikatör karışımı asidik kromatogramı; fenol kırmızısı ve bromotimol mavisine ait DAD ile elde edilen spektrumlar şekilde gösterilmiştir.

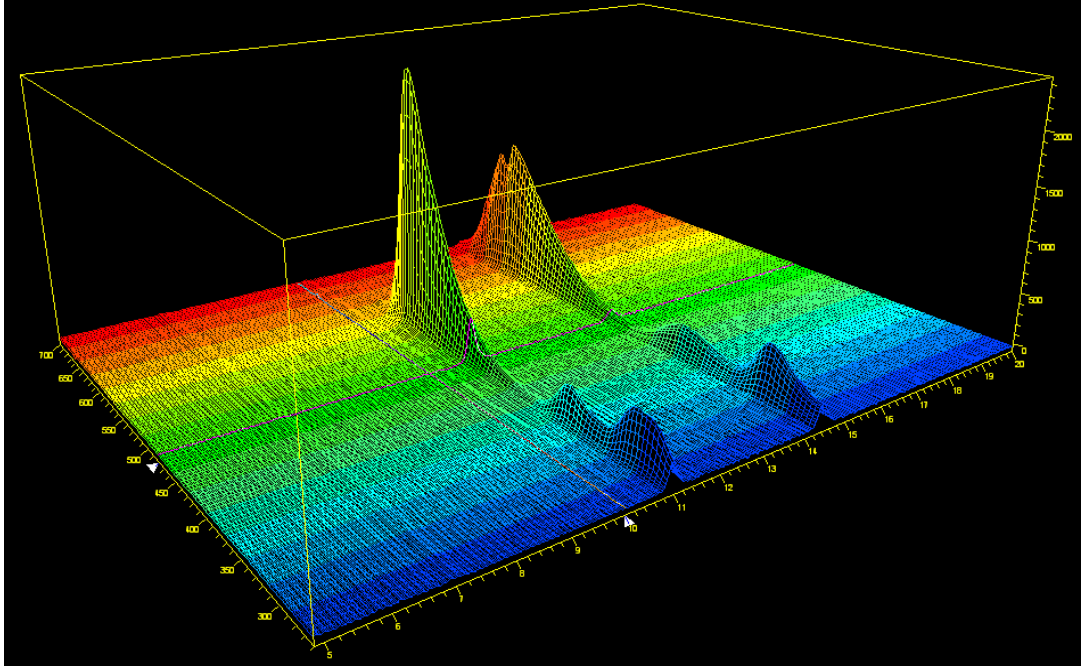


Şekil 14. İkili indikatör karışımı asidik 3D kromatogramı

İkili indikatör karışımı içerisindeki fenol kırmızı ve bromotimol mavisinin bazik kromatogramlarının karşılaştırılması ve fenol kırmızısı ve bromotimol mavisine ait DAD ile elde edilen spektrumlar Şekil 15’de, karışımın bazik 3D kromatogramı Şekil 16’de verilmiştir.

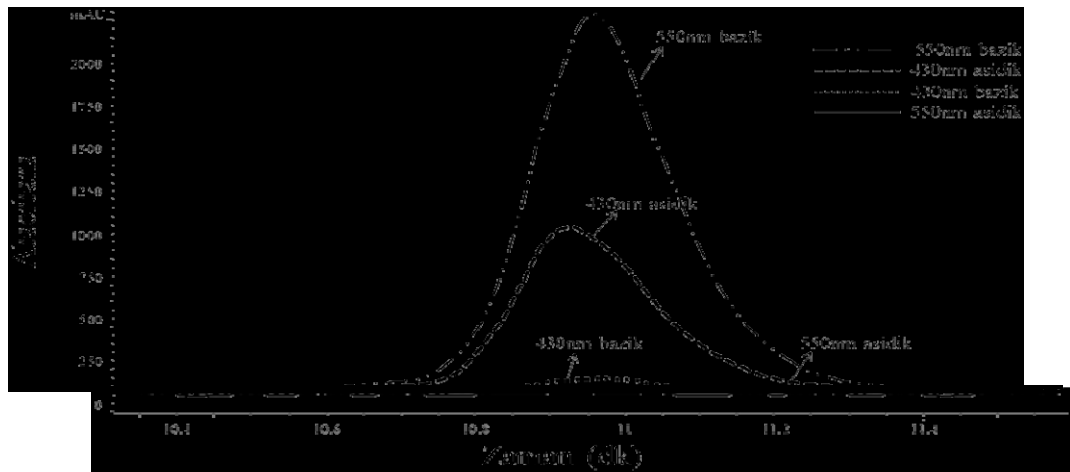


Şekil 15. İkili indikatör karışımı bazik kromatogramı; fenol kırmızısı ve bromotimol mavisine ait DAD ile elde edilen spektrumlar şekilde gösterilmiştir.

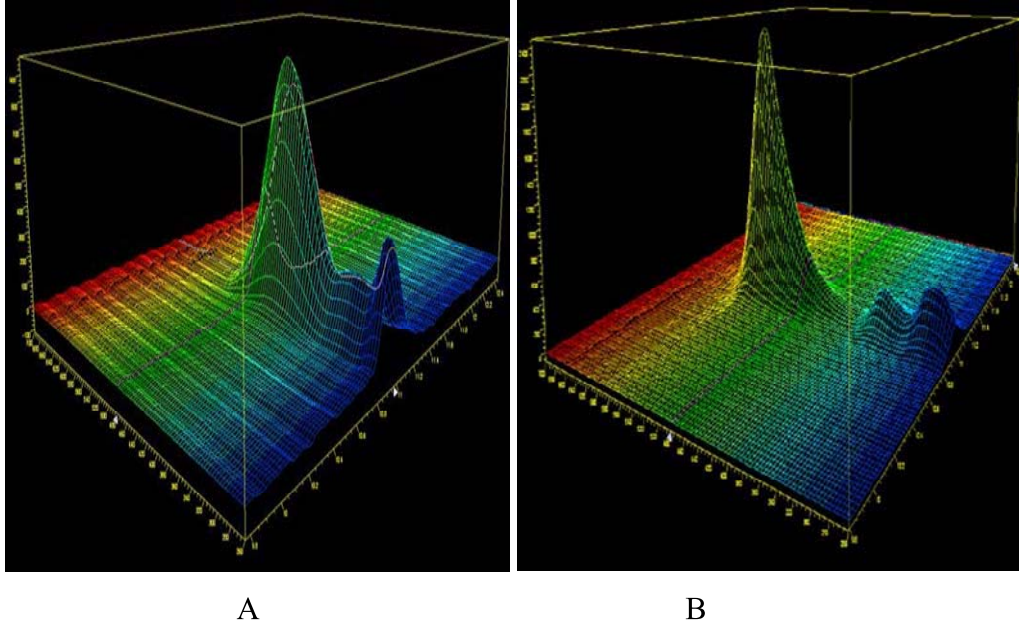


Şekil 16. İkili indikatör karışımı bazik 3D kromatogramı

İkili indikatör karışımı kromatogramı içerisinde fenol kırmızısına ait piklerin asidik-bazik çakıştırması Şekil 17, ikili indikatör karışımı içerisinde fenol kırmızısına ait piklerin asidik-bazik 3D kromatogramları Şekil 18’de verilmiştir.

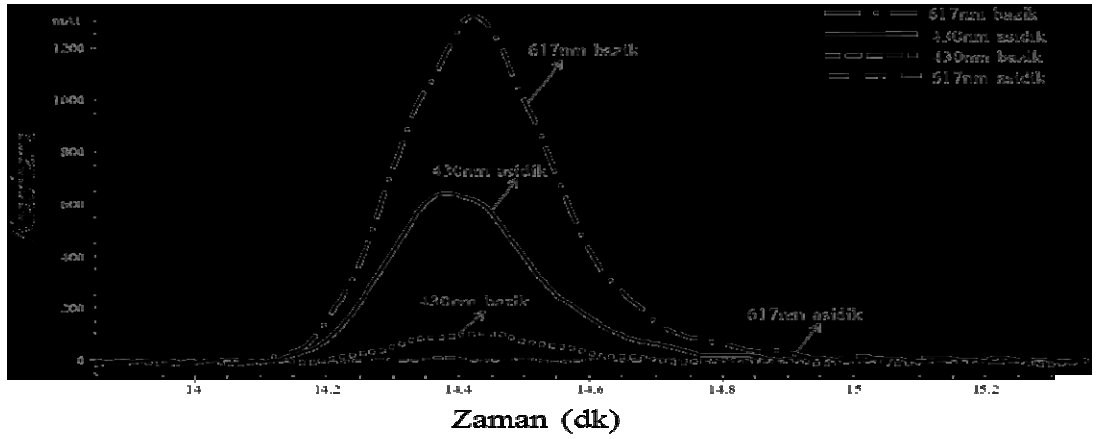


Şekil 17. İkili indikatör karışımı kromatogramı içerisinde fenol kırmızısı asidik ve bazik çakıştırması

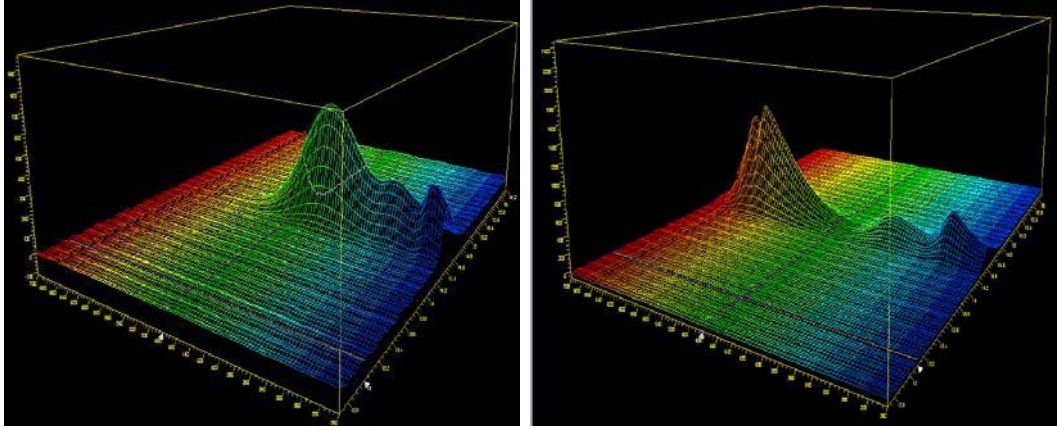


Şekil 18. İkili indikatör karışımı içerisinde fenol kırmızısı asidik (A) ve bazik (B) 3D kromatogramları

İkili indikatör karışımı kromatogramı içerisinde bromotimol mavisi asidik-bazik çakıştirması Şekil 19'de, ikili indikatör karışımı içerisinde bromotimol mavisi asidik ve bazik 3D kromatogramları Şekil 20'de verilmiştir.



Şekil 19. İkili indikatör karışımı kromatogramı içerisinde bromotimol mavisi asidik ve bazik çakıştirması

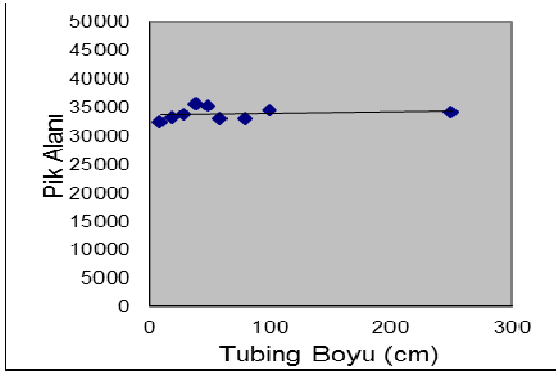


A

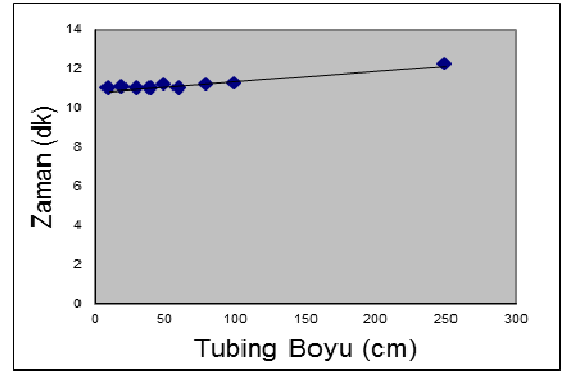
B

Şekil 20. İkili indikatör karışımı içerisinde bromotimol mavisi asidik (A) ve bazik (B) 3D kromatogramı

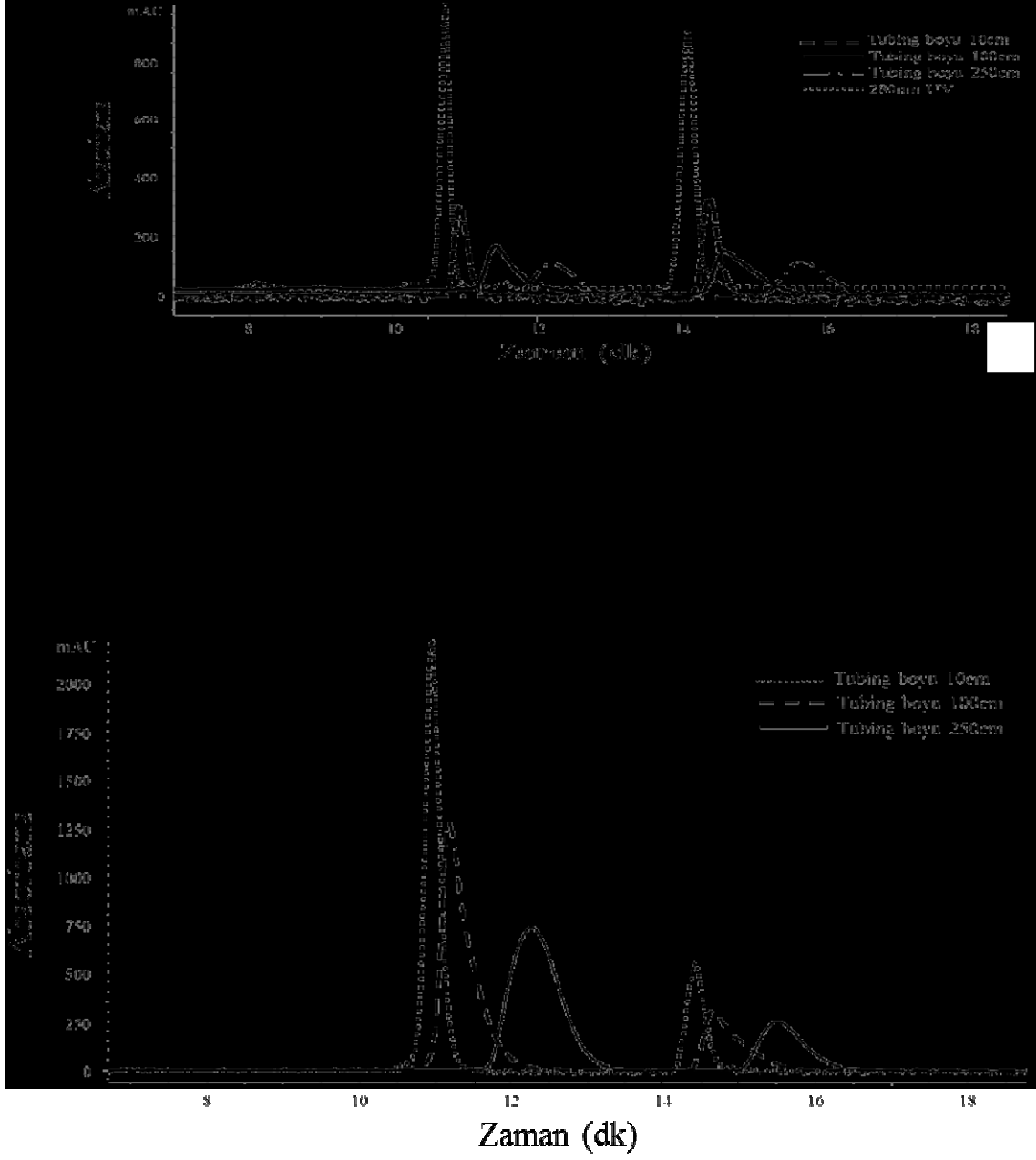
İkinci pompa ile ikinci dedektör arasında farklı tubing boyları kullanılarak asitli ve bazlı yürütmeler yapılmıştır. Belirli tubing boyuna karşılık pik alanı Şekil 21’te ve alıkonma zamanı Şekil 22’te grafiğe yansıtılmıştır. Karşılaştırılması amacıyla asitli yürütmenin kromatogramları Şekil 23, bazlı yürütmenin kromatogramları ise Şekil 26.’da verilmiştir.



Şekil 21. Tubing boyu (cm) - pik alanı grafiği

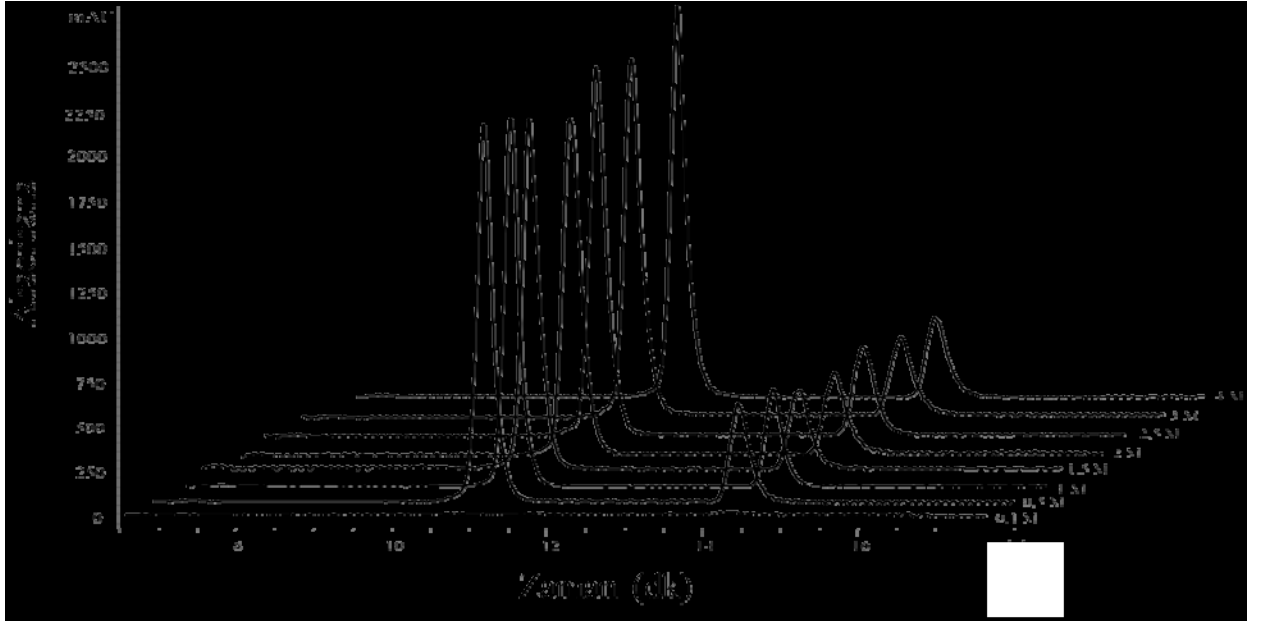


Şekil 22. Tubing boyu (cm) - alıkonma süresi grafiği

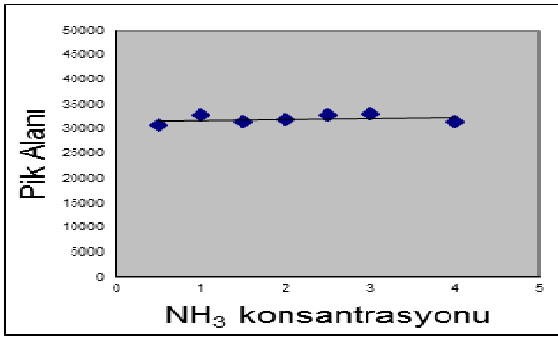


Şekil 24. Farklı tubing boylarının ikinci dedektörle elde edilen bazik kromatogramlarının (550 nm) karşılaştırılması

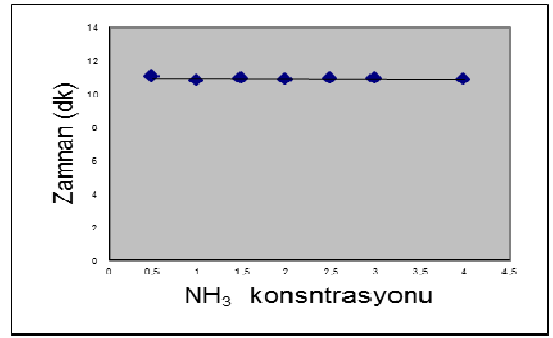
Değişen amonyak konsantrasyonuna karşılık kromatogramların değerlendirilmesi yapıldı. Ayrıca değişen amonyak konsantrasyonuna karşılık pik alanı ve alıkonma süresi grafikleri çizilmiştir. Değişen amonyak konsantrasyonunu kromatogramlarının karşılaştırılması Şekil 25, pik alanına karşılık çizilen grafik Şekil 26 ve alıkonma süresine karşılık çizilen grafik Şekil 27’de gösterilmiştir.



Şekil 25. Değişen amonyak konsantrasyonu (0,1-4,0 M) ile elde edilen kromatogramların karşılaştırılması



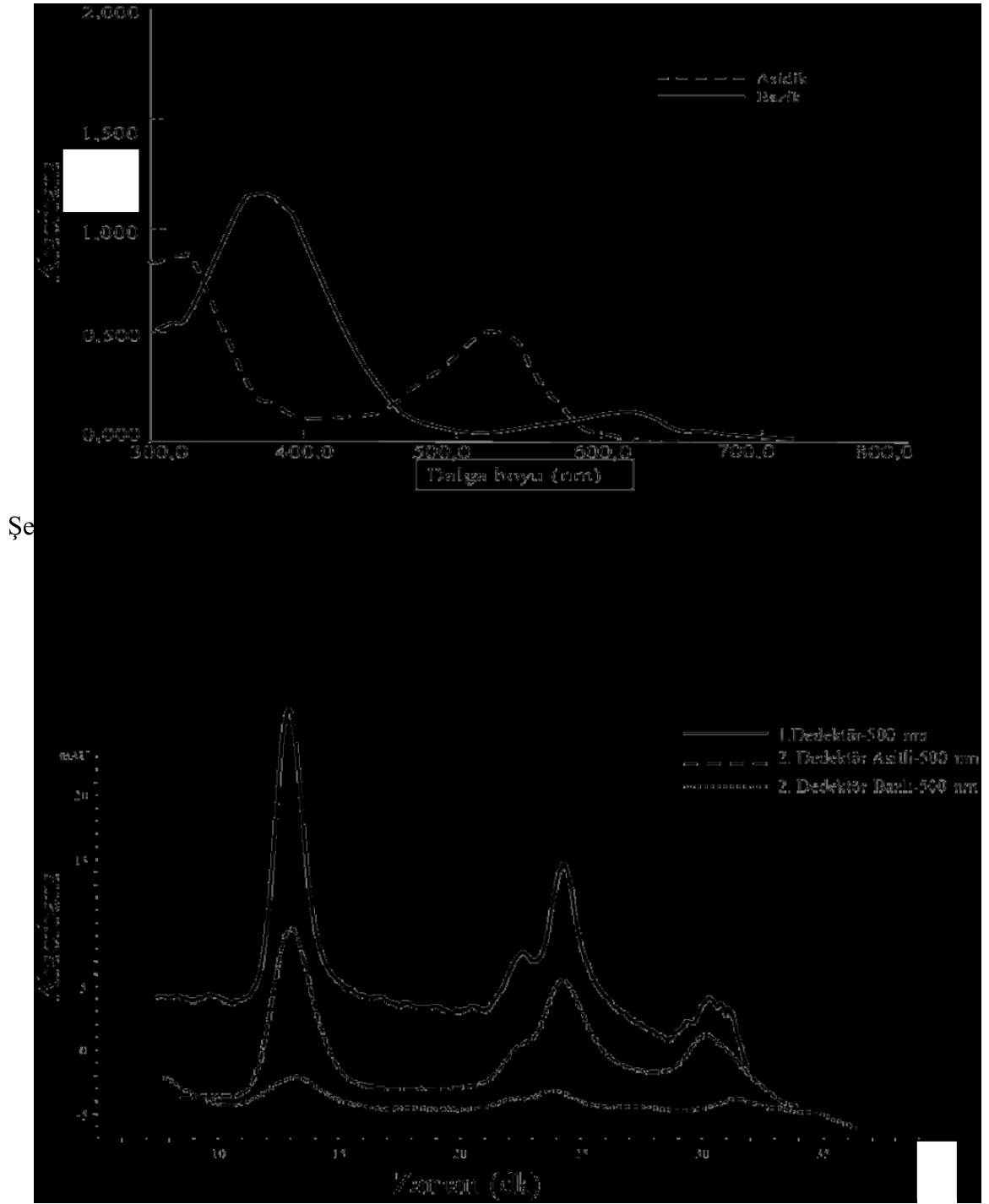
Şekil 26. NH₃ konsantrasyonu (M) - pik alanı grafiği



Şekil 27. NH₃ konsantrasyonu (M) - alıkonma süresi grafiği

3.2. Mor Lahana Ekstraktının on-line HPLC-indikatör Analizleri

Mor lahana ekstraktı ile yapılan çalışmada hazırlanan ekstrakt öncelikle asidik ve bazik olarak spektrofometrede UV-Vis spektrumu alınmıştır. Daha sonra HPLC'de yürütmesi yapılmıştır. Mor lahana ekstraktının UV-Vis asidik-bazik spektrum çakıştırılması Şekil 28'da, HPLC kromatogramları ise Şekil 29.'de verilmiştir.



Şekil 29. Mor lahanı ekstraktının asidik ve bazik kromatogramları (2. dedektör, 500 nm). 1. Dedektör ile 500 nm'de elde edilen kromatogram da karşılaştırma amacıyla verilmiştir.

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Literatürde indikatörlerin belirlenmesinde titrasyon ve spektrofotometrik yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden özellikle titrasyon yöntemi çok hassas bir yöntem değildir. Ayrıca titrasyon ve spektrofotometrik yöntemlerle karışımlarda bulunan indikatör bileşiklerin belirlenmesi doğrudan mümkün olmayıp, ancak zaman alıcı ve maliyetli saflaştırma işlemleri sonrası indikatör potansiyeli olan bileşikler belirlenebilmektedir. Bu anlamda karışımlardan kısa sürede ve düşük maliyette indikatör tespiti yapabilen yeni yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Son yıllarda HPLC sistemine kombine edilmiş birçok biyoaktivite tayin yöntemi geliştirilerek bileşiklerin ayrılmasıyla eşzamanlı olarak aktivitelerinin de ortaya konması sağlanmıştır (Burnaz, 2013). Yeni geliştirilen bu yöntemler arasında on-line HPLC-antioksidan (Aktaş vd, 2015), on-line-HPLC-enzim inhibitörü yöntemleri yaygınlaşmaya başlamıştır (Lİ vd, 2014). Benzer bakış açısıyla bu çalışmada geliştirdiğimiz on-line-HPLC-pH indikatörü yöntemi önemli bir eksikliği giderecektir.

Günümüzde sentetik ürünlerden doğal ürünlere yönelme söz konusudur. Bunun sebebi doğal ürünlerin daha ekonomik, bulunabilirliği, çalışmalar için hazırlanması kolay, toksik özelliği az ve çevre dostu olmalarıdır (Burungale vd, 2014). Çoğu alanda olduğu gibi indikatörlerin de doğalı bulunmaktadır ve gün geçtikçe bu alandaki çalışmalar artmaktadır. Yapılan bir çalışmada begonvil türü olan *Bougainvillea glabra* bitkisinin doğal bir indikatör olabileceği gösterilmiştir. Farklı pH aralıklarında bitki ekstraktlarının farklı renklere dönüştüğü gözlenmiştir (Gauravi vd, 2010). Literatürde bahsedilen diğer bir çalışma ise kökboyagillere ait *Ixora coccinea* bitkisine aittir. Farklı asit ve bazlarla yapılan titrasyonlarda standart indikatör ile paralel sonuçlar verdiği gözlenmiştir (Deshpande vd, 2010). İndikatör özelliği bulunan ve en çok ismi geçen bitki hiç şüphesiz ki mor lahanadır. Literatürde yer alan mor lahanaya ile ilgili bir çalışma; mor lahananın kağıtlarda kullanılmasındır. pH 1'den 14'e kadar farklı renk vermesinden faydalanılarak kağıt üzerinde farklı renkler oluşturulmuştur (Suzuki, 1991).

Çalışmamızda karışımlardaki indikatör özelliğe sahip bileşenlerin belirlenmesi amacıyla ilk defa bir on-line HPLC-indikatör yöntemi geliştirilmiş ve mor lahanaya bitkisindeki indikatör özelliğe sahip bileşenlerin belirlenmesinde kullanılmıştır. On-line olarak HPLC sistemine kombine edilen ilave pompa ve dedektör yardımıyla analizler

yapılmıştır. Çalışmada standart indikatör olarak fenol kırmızısı ve bromotimol mavisi kullanılmıştır. Mor lahanın sulu ekstraktının ayrılan bileşenleri sulu ve amonyaklı (NH_3) olmak üzere ikinci dedektöre gönderilmiştir. Mor lahana kromatogramlarının karşılaştırılmasından indikatör olabilecek en az 3 bileşene sahip olduğu görülmektedir. Bununla birlikte indikatörler ile yapılan bir çalışma olarak tubing boyu ve farklı konantrasyonlardaki NH_3 'ün piklerin alıkonma zamanı ve boyutu yönünden değerlendirilmesi yapılmıştır. Kullandığımız en kısa tubing ile en uzun tubing arasında bazikliğin sağlanması açısından fark görülmemiş buna bağlı olarak da çözücü kullanımını azaltmak için bu yöntemde sulu ve NH_3 'lü yürütmelerde en kısa tubingin kullanılmasına karar verilmiştir. Ancak tubing uzunluğunun kısalmasıyla taban çizgisi (baseline) gürültüsünün arttığı görülmüştür. Bundan dolayı en kısa tubing olarak seçtiğimiz 10 cm'lik değil 20 cm'lik tubing kullanılmıştır. Değişen NH_3 konsantrasyonunun pik alanını ve alıkonma zamanını değiştirmedeği de gözlenmiştir. NH_3 'ün 0,5 M ve daha yukarı konsantrasyonları aynı performansı sağlamıştır. Bu nedenle çalışmamızda 1.0 M genel çalışma konsantrasyonu olarak seçilmiştir.

İkili indikatör karışımıyla yapılan çalışmalarda indikatörlerin asidik ve bazik ortamlarda absorpsiyon spektrumlarında meydana gelen değişiklik dikkate alınarak seçilecek dalga boyları sayesinde pH duyarlılıklarının rahatlıkla belirlenebildiği görülmüştür. DAD dedektörün sağladığı istenilen dalga boyu aralığında ölçüm yapılabilmesi avantajı sayesinde hangi dalga boylarında absorbans değişikliği göstereceği bilinmeyen asit-baz indikatörlerinin karışımlardan belirlenmesi, sisteme asit ya da baz pompalanmasıyla yeni geliştirilmiş olan on-line-HPLC-indikatör yöntemiyle mümkün olabilmektedir.

Mor lahana indikatör bileşenlerinin yapıları MS gibi dedektörler kullanılmasıyla ya da preparatif olarak saflaştırılıp NMR, IR, MS, elementel analiz yöntemlerinin kullanılmasıyla aydınlatılabilir. Geliştirdiğimiz yeni on-line HPLC indikatör yöntemi, ekonomik, çevre dostu ve toksisitesi daha az olan doğal pH indikatörlerinin daha kısa süren çalışmalarla tespitini sağlamaktadır ve bundan dolayı kullanım potansiyeli yüksektir. Ayrıca on-line HPLC indikatör yönteminde tubing boyu uzunluğunun ve ikinci pompadan gönderilen NH_3 konsantrasyonunun sonuçları etkilemediği gözlenmiştir. Daha düşük asit ve baz konsantrasyonlarıyla yöntem üzerinde optimizasyonlar yapılabilir.

5. KAYNAKLAR

- Ahmadiani, N., Robbins, R.,J., Collins, T.,M., and Giusti,M.,M., 2014. Anthocyanins Contents, Profiles, and Color Characteristics of Red Cabbage Extracts from Different Cultivars and Maturity Stages, Journal of Agriculture Food Chemistry., 62, 30, 7524–7531.
- Aktaş Karaçelik, A., Küçük, M., İskefyeli, Z., Aydemir, S., Smet, D.,S., Miserez, B., ve Sandra, P., 2015. Antioxidant components of *Viburnum opulus L.* determined by on-line HPLC–UV–ABTS radical scavenging and LC–UV–ESI-MS methods, Food Chemistry, 175, 106–114.
- Akyüz, E., 2007. Polygonum bistorta ssp. carneum Bitki Ekstraktlarının Kromatografik Yöntemlerle Kimyasal Bileşiminin Belirlenmesi ve Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktiviteleri, Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Bingöl, N., 2009. Kuru Göz Tanılı Hastaların Epidemiyolojik Araştırılması, T.C. Sağlık Bakanlığı, Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Göz Hastalıkları Kliniği, İstanbul.
- Bondre,S., Patil, P., Kulkarni, A., ve Pillai, M.,M., 2012. Study On Isolation And Purification Of Anthocyanins and Its Application As pH Indicator, International Journal of Advanced Biotechnology and Research, 3, 3, 698-702.
- Burnaz Arslan, N. 2013. On-Line Hplc-Frap Antioksidan Aktivite Tayin Yönteminin Geliştirilmesi Ve Bazı Doğal Ürünlere Uygulanması, Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Burungale, H.,S., ve Mali, A., V., 2014. Natural indicator as a eco-friendly in acid base titration, Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 6, 5, 901-903.
- Deshpande, A., Jadge, D., Dhawale, S., Patrakar, R., ve Gadgul, A., 2010. Flower Extract of *Ixora coccinea* as a Natural Indicator in Acid Base Titration, Journal of Pharmacy Research, 3, 10, 2512-2513.
- Emir D., S., 2011. Aletli Analiz Laboratuvarı, Anadolu Üniversitesi Yayınları, Eskişehir.
- Gauravi, P., Kumar, J., N., Narendra, N., ve Chatap V. K., 2010. Bougainvillea glabra -A Natural Indicator, Pharmacognosy Journal, 2, 25-28.

- Gündoğdu, A., Bulut, V.,N., Duran, C., Kemer, B., Bekircan, O., Soylak, M., 2008. A new pH İndicator Based On 2,5-Diaryl-1-Salicylideneamino-1,3,4-Trizaole Derivative, Chinese Journal of Chemistry, 26, 143-145.
- Haşimi, D., 2013. Yeni Amid-Silika Kolon Dolgu Maddesi Kullanılarak Sitokinlerin HPLC ile Ayrılması ve Optimizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.
- Klotz, E., Doyle, R., Gross, E., and Mattson, B., 2011. The Equilibrium Constant for Bromothymol Blue: A General Chemistry Laboratory Experiment Using Spectroscopy, Journal of Chemical Education, 88, 637–639.
- Li, DQ., Zhao, J., Xie, J. ve Li SP., 2014. A novel Sample Preparation and On-Line HPLC-DAD-MS/MS-BCD Analysis for Rapid Screening and Characterization of Specific Enzyme İnhibitors in Herbal Extracts : Case Study of α -Glucosidase, J Pharm Biomed Anal, 88, 130-135.
- Öztürk, Y., 2008. Peptik Ülser Hastalığı ve Helicobacter Pylori, Çocuk Gastroenteroloji, Beslenme veMetabolizma Ünitesi, İzmir.
- Patil, B.,S., Kondawar, M.,S., Ghodke, D.,S., Naikwade, N.,S., ve Magdum, C.,S., 2009. Use of Flower Extracts as an Indicator in Acid-Base Titrations, Research Journal Pharmacy And Technology, 2, 2, 421-422.
- Ramamoorthya, S., Mudgala, G., Rajesha, D., Khanb, F.,N.,Vijayakumarb, V., and Rajasekarana, C., 2009. Characterisation of novel pH indicator of natural dye *Oldenlandia umbellata L.* , Natural Product Research, 23, 1210–1217.
- Skoog D.A.,Holler F.J., ve Nieman T.A., 1998. Principles of Instrumental Analysis, Saunders College Publishing, Fifth Edition, Kılıç E., Köseoğlu F., ve Yılmaz H., Bilim Yayıncılık, Ankara.
- Skoog, D.A., Holler, F.J., West, D.M., ve Crouch, S.R., 2002. Fundamentals of Instrumental Analysis, Eight Edition, Kılıç E. ve Yılmaz H., Thomson Brooks/cole Publishing, Bilim Yayıncılık, Ankara.
- Suzuki, C., 1991. Making Colorful Patterns on Paper Dyed with fled Cabbage Juice, Journal of Chemical Education, 68, 7, 588-589.
- T.C. Millî Eğitim Bakanlığı, Tıbbı Laboratuvar Mikroorganizmaların Kültür ve Doğrulama Testleri-2, Ankara.
- Tewodros , A., 2010. Spectroscopic pH Measurement Using Phenol Red Dye, Addis Ababa Üniversitesi, Etiyopya.

URL-1, <http://global.britannica.com/EBchecked/topic/108717/chemical-indicator>, 2015.

URL-2, www.lisanskimya.balikesir.edu.tr/~f10429/analitik/indikatorler.doc, 2015.

URL-3, <http://www.bilgiustam.com/kirmizi-lahanada-bulunan-antosiyeninler-veozellikleri/>

URL-4, http://en.wikipedia.org/wiki/Red_cabbage, 2015

Zarei, K., Atabati, M., ve Abdinasab, E., 2009. Spectrophotometric Determination of Conditional Acidity Constant of Some Sulfonephthalein Dyes as a Function of Anionic, Neutral and Cationic Surfactants Concentrations Using Rank Annihilation Factor Analysis, Eurasian J. Anal. Chem., 4, 3, 314-327.

ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Cihanbeyli'de doğdu. Çorum Anadolu Lisesi'nde öğrenimini tamamladı. 2006 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümüne kayıt yaptırdı. Bir yıl İngilizce hazırlık alıp, 2011 yılında bu bölümden Kimyager ünvanıyla mezun oldu. Lisansüstü program öncesi bir yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi'nde yabancı dil eğitimi aldı ve aynı üniversitenin Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Programına başladı. 2012 yılında Polis Akademisi Güvenlik Bilimleri Adli Bilimler Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Programına başladı ve halen de eğitimine devam etmektedir. İngilizce bilmektedir.