



T.C.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜRKİYE'DE YETİŞEN CEVİZ AĞAÇLARINDAKİ JUGLON
EKSTRAKSİYONU VE KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLE ANALİZİ**

MERVE YURTCU
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Güler Yalçın

2014-İSTANBUL



T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜRKİYE'DE YETİŞEN CEVİZ AĞAÇLARINDAKİ JUGLON
EKSTRAKSİYONU VE KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLE ANALİZİ**

MERVE YURTCU
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Güler Yalçın

2014-İSTANBUL

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Yüksek Lisans
Anabilim Dalı : Analitik Kimya Anabilim Dalı
Tez Sahibi : Merve Yurtcu
Tez Başlığı : Türkiye'de Yetişen Ceviz Ağaçlarındaki Juglon Ekstraksiyonu ve Kromatografik Yöntemle Analizi
Sınav Yeri : Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Sınav Tarihi : 02.04.2014

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)	Kurumu
Prof Dr Güler Yalçın	MÜ Eczacılık Fakültesi
Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)	
Prof Dr Ş. Güniz Küçüköztel	MÜ Eczacılık Fakültesi
Yrd Doç Dr Ayşen Kurt Cileli	MÜ Eczacılık Fakültesi

İmza
Güler Yalçın
Ş. Güniz Küçüköztel
Ayşen Kurt Cileli

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 09/04/2014 tarih ve 8. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

F. Arıcıoğlu
Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

-Sınav evrakları 3 iş günü içinde 3'er nüsha halinde Enstitüye teslim edilmelidir.
-Bu form bilgisayar ortamında doldurulacaktır.

BEYAN

Bu tez çalışmasının bütünüyle kendi çalışmam olduğunu, tezin tüm aşamalarında hiçbir şekilde etik dışı davranışta bulunmadığımı, tez çalışmasının içerdiği tüm bilgileri akademik ve etik kurallar içinde sağlayıp sunduğumu, tez çalışmamda elde edemediğim tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesiyle sunduğumu, tez çalışması boyunca patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

15.04.2014

Merve YURTCU

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın her aşamasında yardımını ve desteğini aldığım danışmanım Sayın Prof. Dr. Güler Yalçın'a teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Huzurlu ve rahat bir çalışma ortamı sağladıkları için Sayın Nuray Yüктаş ve Prof. Dr. Türkan Yurdun'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda ve hayatımda aldığım tüm kararlarımda beni yalnız bırakmayan annem Hatice Zehra Yurtcu, babam Bülent Yurtcu, kardeşim Kübra Yurtcu ve nişanlım Necdet Bahadır Buluk'a tüm kalbimle teşekkür ederim.

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından SAG-C-YLP-080212-0018 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
SEMBOLLER	iv
KISALTMALAR.....	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
TABLO LİSTESİ	ix
ÖZET	1
SUMMARY	2
BÖLÜM 1. GİRİŞ VE AMAÇ	3
1.1. Giriş	3
1.2. Amaç	4
BÖLÜM 2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Ceviz.....	5
2.1.1. Ceviz ağacının genel özellikleri	5
2.2. Juglon.....	5
2.2.1. Juglon ve özellikleri	5
2.2.2. Juglon ile yapılan diğer çalışmalar	7
2.3. Hızlandırılmış Solvent Ekstraksiyonu (ASE)	7
2.4. Kromatografi	12
2.4.1. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC).....	13
2.4.1.1. Çözücü dağıtma sistemi	16
2.4.1.2. Kolonlar	17
2.4.1.3. Dedektörler	18
2.5. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler	20
2.5.1. Aritmetik ortalama.....	20
2.5.2. Standart sapma	20
2.5.3. % Bağıl standart sapma.....	21
2.5.4. Geri kazanım.....	21

BÖLÜM 3. GEREÇ ve YÖNTEM	22
3.1. Kimyasal maddeler.....	22
3.2. Cihaz ve analitik koşullar	22
3.3. Çözeltiler	23
3.4. Ekstraksiyon işlemleri.....	24
3.5. Kromatografik koşullar	24
BÖLÜM 4. BULGULAR.....	25
4.1. Ön Denemeler	25
4.1.1. Çözünürlük çalışmaları	25
4.1.2. Juglon standardının kromatogramı	27
4.1.3. Kuru ceviz yapraklarının analizi	32
4.1.4. Yaş ceviz yapraklarının analizi.....	37
4.1.5. Standart juglon ile yaş ceviz yaprağında bulunan juglon spektrumlarının karşılaştırılması	39
4.1.6. Standartta ait pik parametreleri.....	40
4.2. Ölçü Eğrisi Oluşturulması	40
4.3. Örneklerdeki Juglon Miktarı	44
4.3.1. Örneklerin kromatogramları.....	47
4.3.2. Örneklerin spektrumu ile seyreltik juglon spektrumu kıyaslaması.....	51
4.4. Geri Kazanımın Hesaplanması	53
BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ	55
KAYNAKLAR.....	59
ÖZGEÇMİŞ.....	65

SEMBOLLER

$^{\circ}\text{C}$: Santigrad derece
L	: Litre
mL	: Mililitre
μL	: Mikrolitre
mm	: Milimetre
μm	: Mikrometre
nm	: Nanometre
mg	: Miligram
g	: Gram
%	: Yüzde
R_t	: Alıkonma zamanı
mol.L^{-1}	: Konsantrasyon
dak	: Dakika
s	: Saniye
g.mol^{-1}	: Mol kütlesi

KISALTMALAR

HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
DAD	: Diod Array Dedector
ASE	: Hızlandırılmış Çözücü Ekstraksiyonu
RP-HPLC	: Ters Fazlı Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HAc	: Asetik asit
NaOH	: Sodyum hidroksit
UV	: Ultraviyole
UV-VIS	: Ultraviyole görünür bölge
FT-IR	: Fourier transform infrared spektrometresi
ppb	: Milyarda bir birim
SD	: Standart sapma
RSD	: Bağıl standart sapma
SSS	: Seyreltik Stok Standart
A₀	: Alanların ortalaması
ACN	: Asetonitril

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Juglon' un açık formülü.....	6
Şekil 2.1. Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu cihazı şematik gösterimi.....	9
Şekil 2.2. Ekstraksiyon hücresi.....	10
Şekil 2.3. Toplama kabı.....	11
Şekil 2.4. Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu cihazı.....	11
Şekil 3. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazının şematik gösterimi.....	15
Şekil 4.1. Juglon' un metanoldeki spektrumu.....	25
Şekil 4.2. Juglon' un NaOH çözeltisindeki spektrumu.....	27
Şekil 5.1. Hareketli faz % 0,5 HAc içeren ultra distile su (A) ve % 0,1 HAc içeren metanol (B) karışımı; 45:55 (A:B) ve akış hızı 1 mL/dak olan sistemde Stok 2' nin 252.4 nm' deki kromatogramı.....	28
Şekil 5.2. Hareketli faz % 0,5 HAc içeren ultra distile su (A) ve % 0,1 HAc içeren metanol (B) karışımı; 30:70 (A:B) ve akış hızı 1 mL/dak olan sistemin 209.4, 252.4 ve 420.4 nm' deki kromatogramları.....	29
Şekil 5.3. Gradient sistemin 209.4, 252.4 ve 420.4 nm' deki kromatogramları. Konsantrasyon 6.9×10^{-5} mol.L ⁻¹ , R _t : 6.775 dak.....	30
Şekil 5.4. Hareketli faz % 0.5 HAc içeren ultra distile su (A) ve % 0.1 HAc içeren metanol (B) karışımı; 45:55 (A:B) ve akış hızı 1 mL/dk olan sistemin 209.4, 252.4 ve 420.4 nm' deki kromatogramı.....	31

Şekil 6.1. Hareketli faz % 0.5 HAc içeren ultra distile su (A) ve % 0.1 HAc içeren metanol (B) karışımı; 45:55 (A:B) ve akış hızı 1 mL/dak olan sistemde, çalkalama yöntemiyle ekstrakte edilen kuru ceviz yapraklarının 209.4, 252.4 ve 420.4 nm’ deki kromatogramları.....	33
Şekil 6.2. Hareketli faz % 0.5 HAc içeren ultra distile su (A) ve % 0.1 HAc içeren metanol (B) karışımı; 45:55 (A:B) ve akış hızı 1 mL/dak olan sistemde, çalkalama yöntemiyle ekstrakte edilen kuru ceviz yapraklarının 1:3 seyreltilmesi sonucu 209.4, 252.4 ve 420.4 nm’ deki kromatogramları.....	34
Şekil 6.3. Hareketli faz % 0.5 HAc içeren ultra distile su (A) ve % 0.1 HAc içeren metanol (B) karışımı; 45:55 (A:B) ve akış hızı 1 mL/dak olan sistemde, ASE ile ekstrakte edilen kuru ceviz yapraklarının 1:3 seyreltilmesi sonucu 209.4, 252.4 ve 420.4 nm’ deki kromatogramları.....	35
Şekil 6.4. Hareketli faz % 0.5 HAc içeren ultra distile su (A) ve % 0.1 HAc içeren metanol (B) karışımı; 45:55 (A:B) ve akış hızı 1 mL/dak olan sistemde, ASE ile ekstrakte edilen kuru ceviz yapraklarının asetonda çözülmesi sonucu 209.4, 252.4 ve 420.4 nm’ deki kromatogramları.....	36
Şekil 7.1. Hareketli faz % 0.5 HAc içeren ultra distile su (A) ve % 0.1 HAc içeren metanol (B) karışımı; 45:55 (A:B) ve akış hızı 1 mL/dak olan sistemde, ASE ile ekstrakte edilen yaş ceviz yapraklarının 209.4, 252.4 ve 420.4 nm’ deki kromatogramları.....	37
Şekil 7.2. Hareketli faz % 0.5 HAc içeren ultra distile su (A) ve % 0.1 HAc içeren metanol (B) karışımı; 45:55 (A:B) ve akış hızı 1 mL/dak olan sistemde, ASE ile ekstrakte edilen yaş ceviz yapraklarının metanolle 1:4 seyreltilmesi sonucu 209.4, 252.4 ve 420.4 nm’ deki kromatogramları. R _t : 6.314.....	38
Şekil 8.1. Konsantrasyonu 1.15×10^{-4} olan seyreltik juglon standardının 252.4 nm’ deki spektrumu (Alan: 792, R _t : 6.045).....	39

Şekil 8.2. Örneğin spektrumu (Alan: 208.1, R_t : 6.054).....	39
Şekil 8.3. Seyreltik juglon standardı ve yaş yaprak ekstresinin spektrumları.....	40
Şekil 9.1. C1 isimli ölçü eğrisinin grafiği ($y = 52.729x - 25.581$).....	41
Şekil 9.2. C2 isimli ölçü eğrisinin grafiği ($y = 56.276x - 44.452$).....	42
Şekil 9.3. C3 isimli ölçü eğrisinin grafiği ($y = 56.204x - 40.164$).....	43
Şekil 10.1. Örnek 1 ve Örnek 2' nin üç paralel tartımının HPLC sistemindeki alan değerleri.....	44
Şekil 10.2. Örnek 2 ve Örnek 3' ün üç paralel tartımının HPLC sistemindeki alan değerleri.....	45
Şekil 10.3. Örnek 4 ve Örnek 5' in üç paralel tartımının HPLC sistemindeki alan değerleri.....	45
Şekil 11.1. Örnek 2.1' in ilk tartımının kromatogramı.....	47
Şekil 11.2. Örnek 3.1' in ilk tartımının kromatogramı.....	48
Şekil 11.3. Örnek 4.1' in ilk tartımının kromatogramı.....	49
Şekil 11.4. Örnek 5.1' in ilk tartımının kromatogramı.....	50
Şekil 12.1. Örnek 1.3, Örnek 1.1 ve SSS spektrumları.....	51
Şekil 12.2. Örnek 2.3, Örnek 2.1 ve SSS spektrumları.....	51
Şekil 12.3. Örnek 3.3, Örnek 3.1 ve SSS spektrumları.....	52
Şekil 12.4. Örnek 4.3, Örnek 4.1 ve SSS spektrumları.....	52
Şekil 12.5. Örnek 5.3, Örnek 5.1 ve SSS spektrumları.....	52
Şekil 12.6. Örnek 6.3, Örnek 6.1 ve SSS spektrumları.....	53

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1. Sıvı ekstraksiyon tekniklerinin kıyaslanması.....	8
Tablo 1.2. Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonunda kullanılan genel çözücü hacimleri.....	11
Tablo 1.3. Diyoksin ve Furan ekstraksiyon koşulları (Çevresel örnekler).....	12
Tablo 2. Normal-faz ve ters-faz sıvı kromatografisi kolon özellikleri.....	14
Tablo 3. Gradient tablo.....	30
Tablo 4. Ase koşulları.....	35
Tablo 5.1. C1 isimli ölçü eğrisinde elde edilen pik alanları, pik alanlarının ortalamaları (A_0), standart sapmaları (SD) ve bağıl standart sapmaları (RSD).....	41
Tablo 5.2. C2 isimli ölçü eğrisinde elde edilen pik alanları, pik alanlarının ortalamaları (A_0), standart sapmaları (SD) ve bağıl standart sapmaları (RSD).....	42
Tablo 5.3. C3 isimli ölçü eğrisinde elde edilen pik alanları, pik alanlarının ortalamaları (A_0), standart sapmaları (SD) ve bağıl standart sapmaları (RSD).....	42
Tablo 5.4. Ölçü eğrilerine ait doğru denklemlerinin eğim, kayım değerlerinin standart sapma (SD) ve bağıl standart sapma (RSD) değerleri.....	43
Tablo 6.1. Örnek 6.1, Örnek 6.2, Örnek 6.3'ün stok çözelti eklenmeden ve eklendikten sonraki alan değerleri.....	54
Tablo 6.2. Geri kazanım değerleri.....	54

ÖZET

Türkiye’de Yetişen Ceviz Ağaçlarındaki Juglon Ekstraksiyonu ve Kromatografik Yöntemle Analizi

Merve Yurtcu, Prof. Dr. Güler Yalçın

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Bu çalışmada Türkiye’de yetişen ceviz ağaçlarının bazı türlerinde bulunan juglon, hızlandırılmış solvent ekstraksiyonu (ASE) kullanılarak ekstrakte edilmiş, miktarları ters fazlı-yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve diyod dizi dedektör (HPLC-DAD) yardımıyla kalitatif ve kantitatif olarak tayin edilmiştir.

Çalışmada hareketli faz olarak % 0.5 asetik asit içeren su çözeltisi ve % 0.1 asetik asit içeren metanol kullanılıp izokratik elüsyon yapılmıştır. Kromatografik koşullar; Phenomenex Luna C8, 150 mm × 4.6 mm, 5 µm özellikte kolon, bant genişliği 4 nm, dalga boyu (λ) 252.4 nm ve juglonun alıkonma zamanı 6.1 dak olarak belirlenmiştir.

Hızlandırılmış solvent ekstraksiyonunda çözücü olarak metanol (%100) kullanılmıştır. Cihazdaki koşullar sıcaklık 25 °C, statik zaman 10 dakika, temizleme hacmi % 60, yıkama zamanı 90 saniye, statik devir 3 olarak ayarlanmıştır.

Bu çalışmalar sonucunda Türkiye’de yetişen ceviz ağacı türleri Şebin (Örnek 1), Yalova 1 (Örnek 5), Yalova 2 (Örnek 3), Yalova 3 (Örnek 6), 198/110 (Örnek 2) yapraklarında bulunan juglon hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu (ASE) yöntemi ile ekstrakte edilerek, ters fazlı-yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile tayin edilmiştir. Bu türlerde 1 g yaş yaprakta 0.134- 1.230 mg aralığında juglon bulunmuştur. ASE yöntemi ile geri kazanım değeri ortalama % 93 (RSD = 1.35) olarak belirlenmiştir. Hızlı ve etkin bir ekstraksiyon yöntemi olan ASE’nin önceki çalışmalardan farklı olarak, juglonu bozundurmadağı kanıtlanmıştır.

Anahtar Sözcükler: Hızlandırılmış Çözücü Ekstraksiyonu (ASE), HPLC, Ceviz Yaprığı, Juglon, Kalitatif Analiz, Kantitatif Analiz

SUMMARY

Extraction of Juglone from Walnut Trees Grown in Turkey and the Analysis of Juglone by Chromatographic Method

Merve Yurtcu, Prof. Dr. Güler Yalçın

Department of Analytical Chemistry

The juglone in the leaves of some walnut species grown in Turkey has been extracted, identified and assayed by Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography (HPLC-DAD) in this study.

The mobile phase is % 0.5 acetic acid in ultra distilled water (A) and % 0.1 acetic acid in methanole (B) with volume percentage of 45:55 (A:B) and isocratic elution has been applied. Chromatographic conditions are determined as Phenomenex Luna C8, 150 mm × 4.6 mm, 5 µm column, bandwidths 4 nm, wave length (λ) 252.4 nm, the retention time of juglone is 6.1 min.

Methanole has been used as solution in Accelerated Solvent Extraction (ASE). The conditions of ASE; temperature 25°C, static duration 10 minutes, purge volume % 60, washing duration 90 seconds, static cycle 3.

The juglone in the leaves of the walnut species of Şebin (Sample 1), Yalova 1 (Sample 5), Yalova 2 (Sample 3), Yalova 3 (Sample 6), 198/110 (Sample 2) grown in Turkey has been extracted, identified and assayed by RP-HPLC-DAD. Juglone has been founded between 0.134- 1.230 mg/1 g of wet leaves. Recovery is found % 93 (RSD = 1.35). It has been proved that the juglone is not degraded during extraction with ASE which is an efficient and fast method of isolation.

Key Words: Accelerated Solvent Extraction (ASE), HPLC, Walnut Leaf, Juglone, Qualitative Analysis, Quantitative Analysis

BÖLÜM 1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. Giriş

Ceviz (*Juglans regia L.*) bitkisi Juglandales takımının Juglandaceae familyasından, Juglans cinsine mensuptur. Ceviz, 10–25 m yüksekliğinde, oldukça geniş taçlı ve gevşek dallı bir ağaçtır (1).

Ceviz ağacının yaprak, meyve ve meyve kabukları dokuma kilim ipliklerinin boyanmasında kullanılır. Juglon doğal boyar madde olduğu için cevizle boyanmış kilimler tercih sebebidir. Ceviz yapraklarının yün elyaf renklendirilmesinde kullanılabileceği kesin olarak tespit edilmiştir (2).

Ceviz yeşil kabuk ve yaprak aksamaları geleneksel tıpta halk arasında damar kuvvetlendirici, kanama durdurucu, antihelmintik, antidiyaretik, antifungal, hipoglisemik, hipotansif ve sedatif özellikleri ile bilinmekte ve kullanılmaktadır. Özellikle kurutulmuş ceviz yaprağı, bazı Avrupa ve Asya ülkelerinde kırsal kesimlerde çay şeklinde yaygın olarak tüketilmektedir. Yeşil kabuk ve yaprak aksamaları fenolik maddeler ve flavonoidler açısından oldukça zengindir (3,4). En iyi bilinen etken madde ise taze yeşil yapraklarda fazla miktarda bulunan juglon (5-hidroksi-1,4-naftokinon) maddesidir (3-6). Bu madde, çok güçlü antioksidan ve antimikrobiyal özelliğe sahiptir (7). Değişik çalışmalarda cevizin özellikle ağaç kabuğu, yaprak ve yeşil meyve kabuğunda juglon maddesinin antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir (7-13).

Aynı zamanda; günümüzde juglon (5-hidroksi-1,4-naftakinon) gibi naftakinonların anti-kanser ajan olarak da kullanımı araştırılmaktadır. Juglon, melanoma, kolon kanseri, lösemi ve mide kanseri gibi in vitro insan tümör çeşitlerinde güçlü sitotoksik ajan olarak bilinir (14-17).

1.2. Amaç

Bu çalışmada Türkiye’de yetişen ceviz ağacı yapraklarında bulunan juglon’un kalitatif ve kantitatif tayininin yapılması amaçlanmıştır. Ceviz yapraklarındaki bu maddenin hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu (ASE) yöntemi ile izole edilerek, yüksek geri kazanımlı, ucuz, basit ve kolay bir ekstraksiyon yöntemi geliştirilmesi hedeflenmiştir.

BÖLÜM 2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ceviz (*Juglans Regia* L.)

2.1.1. Ceviz ağacının genel özellikleri

Türkiye'deki ceviz ağaçları, adi ceviz (*Juglans regia*) olarak bilinmekte ve juglandaceae (cevizgiller) familyasından gelmektedirler. Kışın yapraklarını döken, genç sürgünlerinin içi bölmeli halde olan ağaçlardır. Yaprakçık sayısı türlere göre üç ile yirmi beş arasındadır. Ağacın odununun özü koyu, dış kısmı açık renklidir. Ağır ve güzel cila kabul eden odunlar türüdür.

2.2. Juglon

2.2.1. Juglon ve özellikleri

Juglon adi cevizin (*Juglans regia*; İngiliz cevizi, İran cevizi ve Kaliforniya cevizi), boz cevizin (*Juglans cinerea*; akceviz) ve karacevizin (*Juglans nigra*) yaprakları, kökleri, ağaç kabuğu ve gövdesinde bulunur (18). Polimerizasyon nedeniyle juglon'un kuru yapraklarda çok az miktarda bulunduğu belirlenmiştir, bu da kuru bitki için juglon'un kalite kontrolde kullanımının elverişli olmadığı anlamına gelmektedir (6).

Juglon'un bir diğer özelliği ise allelokimyasal oluşudur. Bir allelokimyasal bir bitki türüne olumsuz, bir diğerine ise olumlu etki gösterebilir. Amerika'da doğal olarak yayılım gösteren kara ceviz ağaçlarının (*Juglans nigra*) dibinde ekilen yonca otlarının yağmurlardan sonra kısa zamanda öldükleri, ceviz yapraklarından damlayan yağmur sularının saksılardaki domateslere verilmesiyle domateslerin öldükleri, ceviz ağaçlarına yakın olan elma ağaçlarının cevizden tarafta olan dal ve köklerinin kurdukları, buna mukabil ceviz dibinde üçgül ve çayır otlarının çok iyi gelişebildikleri rapor edilmiştir (19).

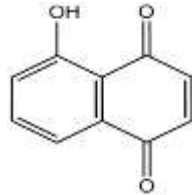
Bitki türlerinin juglon'a olan hassasiyetleri çok farklıdır. Juglon'a en hassas bitkilerin başında; tere, domates, yonca, elma, armut, böğürtlen, kızıl çam ve beyaz

çam gelir. Juglon'a toleranslı bitkiler ise; kavun, üçgül, düğün çiçeği, çuha çiçeği, süsen, zambak, üzüm, meşe ve ardıç gibi bitkilerdir (20-23).

Juglon yalnızca birçok bitkiye karşı allelokimyasal oluşu; tohum çimlenmesini ve gelişimini bastırıcı olarak değil, aynı zamanda çingene güvesi *Lymantria dispar* ve promethean güvesi *Callosamia promethea*' yı da içeren böceklere karşı toksik etkisi ile de bilinir (24,25).

Juglon'un köklerde sentezlenip ksilem vasıtasıyla bitkinin yapraklarına taşındığı ve juglon'un bitkide hidrojuglon şeklinde bulunduğu ancak daha sonra bunun oksitlenmesiyle toksik karakterli juglon'a (5-Hidroksi-1,4-Naftakinon) dönüştüğü belirtilmiştir (26). Cevizde juglon köklerden toprağa geçebileceği gibi yapraklardan da yağmurla yıkanarak toprağa geçebilir ayrıca yaprakların dökülmesi ile de toprağa karışır (27,28).

Ülkemizde yaygın ceviz türü olan *Juglans regia* L. de ise ceviz çöğürlerinin kabuk dokusunda juglon miktarının mevsimlik değişimi incelendiğinde kışın en düşük düzeyde iken, ilkbahar başlangıcından Nisan sonuna kadar düzenli bir artış, daha sonra Haziran sonuna kadar bir azalma ve Temmuz başından Ağustos ortasına kadar tekrar bir artış gösterdiği belirlenmiştir (29).



Şekil 1. Juglon'un açık formülü

EA IUPAC ismi : 5-hidroksi-1,4-naftakinon

Kapalı formülü : C₁₀H₆O₃

Molekül ağırlığı : 174.2 g/mol

Görünüşü : Koyu sarı renkte, toz, katı

2.2.2. Juglon ile yapılan diğer çalışmalar

Ceviz yapraklarındaki juglon bileşeninin miktar tayini ile ilgili az sayıda çalışma yapılmış olmasıyla birlikte kromatografik analiz için önceki çalışmalarda kullanılan sistemler genellikle ters fazlı HPLC sistemi olup dereceli elüsyon uygulanmıştır. HPLC analizi için literatürde fluorometrik ve spektrometrik sistemlerin kullanıldığı görülmektedir (30,31). Bunların dışında;

LiChrospher 100 RP-18 end-capped kolon (125 mm x 4 mm, 5 µm) ve fotodiyot dedektör, hareketli faz olarak su : fosforik asit (95.5 : 0.5, v/v) ve ACN : su (90 : 10, v/v) karışımı dereceli elüsyon uygulanmıştır (32).

Zorbax C18-AAA kolon (150 mm x 4.6 mm, 3.5 µm, 40°C) ve UV-VIS dedektör (40°C), hareketli faz asetik asit : metanol (35 : 65) kullanılmıştır (33,34).

Purospher RP18e analitik kolon (125 mm x 4 mm, 5 µm), RP 18e ön kolon (4 mm x 4 mm, 5 µm) ve UV-VIS dedektör, hareketli faz olarak ACN : su : HCOOH (25 : 72 : 3, v/v/v) kullanılmıştır (35).

Waters Assoc.milford C18 kolon (250 mm x 4.6 mm, 10 µm) ve UV dedektör, ACN : su (50 : 50) kullanılmıştır (36).

Zorbax Eclips XDB C18 kolon (150 mm x 2.1 mm, 3.5 µm), %0.5 H₃PO₄ : %90 ACN (65 : 35, v/v) ve UV dedektör kullanılmıştır (2).

2.3. Hızlandırılmış Çözücü Ekstraksiyonu (ASE)

Örnek ekstraksiyon teknikleri:

- 1) Sokslet
- 2) Otomatik sokslet
- 3) Sonikasyon
- 4) Mikrodalgalı ekstraksiyon
- 5) Süper kritik akışkanlı ekstraksiyon
- 6) Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu

Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonun kullanılan diğer yaygın adları:

- 1) Basınçlı çözücü ekstraksiyonu
- 2) Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu
- 3) Basınçlı akışkan ekstraksiyonu
- 4) Basınçlı sıcak çözücü ekstraksiyonu
- 5) Yüksek basınçlı çözücü ekstraksiyonu
- 6) Yüksek basınç yüksek sıcaklıkta çözücü ekstraksiyonu
- 7) Subkritik çözücü ekstraksiyonu (37)

Son yıllarda analitik ekstraksiyonlarda kullanılan tehlikeli organik çözücü miktarını azaltma ihtiyacı, yeni ekstraksiyon tekniklerinin geliştirilmesine katkı sağlamıştır (38). Son otomatikleştirilmiş ekstraksiyon teknikleri daha az çözücü kullanır ve gelişmiş analitik kararlılık verir (39). Bu tekniklerden biri katı ve yarı katı örneklerden analitlerin tam ekstraksiyonunu kısa zamanda elde etmek için yüksek sıcaklık ve basınç altında, küçük hacimlerde çözücü kullanımına dayanan hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonudur (ASE) (Şekil 2.4) (40, 41). ASE sokslet ve ultrasonik ekstraksiyon gibi tekniklerden daha kısa ekstraksiyon zamanı ve daha az çözücü tüketimine sahip bir ekstraksiyon tekniğidir (42) (Tablo 1.1). Sokslet ekstraksiyonu için kullanılan ekstraksiyon çözücüleri ASE içinde kullanılabilir. Bundan dolayı, ASE klasik ekstraksiyon tekniklerinin yerine geçerek geliştirilmiştir (43).

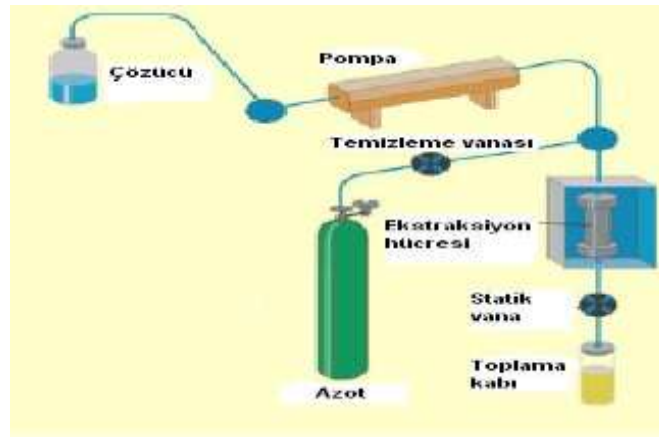
Tablo 1.1. Sıvı ekstraksiyon tekniklerinin kıyaslanması.

Teknik	Örnek Miktarı (g)	Çözücü Hacmi (mL)	Örnek/Çözücü(x10)
Sokslet	10-30	300-500	0,33-0,60
Sonikasyon	30	300-400	0,75-1,00
Mikrodalgalı ekstraksiyon	5	30	1,67
Çalkalama	50	300	1,67
Otomatik sokslet	10	50	2,00
ASE	10-100	15-120	6,67

Son yıllarda, ASE katı atıklar (44), toprak (45-47), yosun ve çam ağacı (48), hayvan yemi, yiyecek matrisleri (49) ve tortu (50) gibi farklı matrislerden organoklor pestisitlere, poliklorlu bifenillere, polisiklik aromatik hidrokarbonlara, poliklorlu dibenzodiyoksinlere ve furanlara, polibromlu bifenil eterlere ekstraksiyon uygulamıştır. Ayrıca, poliklorlu bifeniller ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi çevresel atıkların basınçlı çözücülerle, 100° C' nin üzerinde etkili ve hızlı ekstraksiyon gerçekleştirdiğini rapor edilmiştir (39).

Genel olarak; ASE' nin ekstraksiyon verimi, ASE' nin ekstraksiyon parametreleri olan ekstraksiyon basınç ve sıcaklığından etkilenir (51). Ek olarak, örnek matrisi ekstraksiyon verimini etkiler (52). Bundan dolayı, ASE' nin ekstraksiyon davranışı sade değildir ve işletme koşullarının optimizasyonu yorucudur. Süper kritik akışkanlı ekstraksiyon, klasik ekstraksiyon tekniklerine alternatif olarak önerilen başka bir ekstraksiyon tekniğidir (43).

Süper kritik akışkanlı ekstraksiyon tarım ilaç kalıntı analizleri için adapte edilmiş bir tekniktir. Tarım ilaçları mikrodalga etkili ekstraksiyondan sonrada analiz edilebilir (39).



Şekil 2.1. Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu cihazı şematik gösterimi

Hızlandırılmış Çözücü Ekstraksiyonu (ASE) Cihazının Özellikleri

ASE' de, çelik bir kap içerisine yerleştirilen (Şekil 2.2) katı ya da yarı-katı örneğin, çözücü ile bir fırın içerisinde 50-200°C arasında değişen sıcaklıklarda ısıtılması ile başlar ve ısıtma sırasında fırına 500-3000 psi değerleri arasında basınç

uygulanır. Ekstraksiyonun 5-10. dakikalarında ortama yeni çözücü pompalanarak örneğin ve kabın yıkanması sağlanmaktadır. Sistem içerisindeki bütün çözücü genellikle nitrojen gazı kullanılarak bir şişe içerisinde (Şekil 2.3) toplanmaktadır (53).



Şekil 2.2. Ekstraksiyon hücresi

1) Yüksek sıcaklık ve basınç kullanılarak çözücü tüketimi ve ekstraksiyon zamanını azaltır.

2) 1-50 g örnek ekstraktı için 15-150 mL çözücü kullanır.

3) Ekstraktlar otomatik filtrelendir ve doğrudan enjeksiyon için yada son temizlik için hazırlanır.

4) Kolay kullanılan toplama kapları mevcuttur.

5) Kullanım kolaylığı için uygun çoklu yöntem hafızası vardır.

6) Uygun ön panel işlemi otomatik yöntemi çalıştırır.

ASE katı ve yarı katı örneklerin sıvı çözücülerle ekstraksiyonu için bir tekniktir.

Yüksek sıcaklık ve basınçta ekstraksiyon işlemlerinin verimini yükselterek uygun sıvı çözücüler kullanır. Yüksek basınç çözücüyü kaynama noktasının altında tutarken artmış sıcaklık ekstraksiyon kinetiğini hızlandırır, böylece hızlı ekstraksiyon gerçekleştirilir. Yüksek basınç, çözücünün, deney materyalinin iç kısımlarına kadar nüfuz etmesine imkân sağlamaktadır.



Şekil 2.3. Toplama kabı

ASE geleneksel sıvı ekstraksiyon yöntemlerinden daha hızlıdır ve daha az çözücü (Tablo 1.2) kullanır. ASE geleneksel yöntemlerde halen kullanılan çözücülerini kullanır. Bundan dolayı metot geliştirmek basittir.



Şekil 2.4. Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu cihazı

Tablo 1.2. Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonunda kullanılan genel çözücü hacimleri.

Ekstraksiyon Hücresi	Çözücü Hacmi
1 mL	5 mL
5 mL	7-8 mL
11 mL	12-15 mL
22 mL	25-30 mL
33 mL	35-45 mL
66 mL	70-90 mL
100 mL	120-150 mL

ASE ve sokslet ekstraksiyonu arasındaki önemli fark ekstraksiyon sıcaklığıdır (Tablo 1.3). ASE’ de ekstraksiyon sıcaklığı çözücünün normal kaynama noktası üzerinde kullanılır. Aksine, sokslet ekstraksiyonunda ekstraksiyon sıcaklığı kullanılan çözücünün kaynama noktası ile sınırlıdır. Yüksek sıcaklıklarda, polimer partiküllerinin içinden bileşenlerinin difüzyonu yüzeylerinde artırılmıştır. Ayrıca, ekstraksiyon çözücüsü içinde partiküllerin yüzeyden transferi daha hızlı olacaktır. Buna ek olarak, ekstraksiyon sıvısındaki bileşenlerin çözünürlüğü yüksek sıcaklıkta çalışıldığı zaman yükseltilebilecektir. Bundan dolayı yüksek sıcaklıktaki ekstraksiyon değeri anlamlı ölçüde yüksek olacaktır (54).

Tablo 1.3. Dioksin ve Furan ekstraksiyon koşulları (Çevresel örnekler).

	ASE	Sokslet
Örnek Miktarı	4-10 g	4-10 g
Çözücü	Toluen, 15 mL	Toluen, 250 mL
Sıcaklık	150-180° C	Kaynama noktası altında
Süre	2x10 dak.	18 saat
Analitik Yöntem	GC-MS	GC-MS

2.4. Kromatografi

Kromatografi, bir karışımda bulunan maddelerin, biri sabit diğeri hareketli faz olmak üzere birbirleriyle karışmayan, iki fazlı bir sistemde ayrılması ve saflaştırılması yöntemidir. Çeşitli maddelerin hareketli faz yardımıyla, sabit faz üzerinde, değişik hızlarla hareket etmeleri veya sürüklenmeleri esasına dayanır. Kromatografinin sınıflandırılması:

a) Ayrılma mekanizmalarına göre:

- 1) Adsorpsiyon kromatografisi
- 2) Partisyon (dağılma) kromatografisi
- 3) İyon değiştirme kromatografisi
- 4) Jel filtrasyon (Moleküler eleme) kromatografisi
- 5) İyon çifti kromatografisi
- 6) Afinite kromatografisi

b) Uygulama biçimine göre

1) Düzlemsel kromatografi

-Kağıt kromatografisi

-İnce tabaka kromatografisi

2) Kolon kromatografisi

-Gaz kromatografisi

-Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)

c) Faz tipine göre:

1) Sıvı kromatografisi

-Sıvı-Katı kromatografisi

-Sıvı-Sıvı kromatografisi

2) Gaz kromatografisi

-Gaz-Katı kromatografisi

-Gaz-Sıvı kromatografisi

2.4.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi, bütün analitik ayırma teknikleri arasında en yaygın kullanılanıdır. Yöntemin bu kadar yaygın olmasının sebepleri, duyarlılığı, doğru kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, uçucu olmayan türlerin veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen türlerin ayrılmasına uygun olması ve hepsinden de önemlisi sanayinin, birçok bilim dalının ve halkın birinci derecede ilgilendiği maddelere geniş bir şekilde uygulanabilirliğidir. Bu maddelere örnek olarak; amino asitler, proteinler, nükleik asitler, hidrokarbonlar, karbohidratlar, ilaçlar, terpenoidler, pestisitler, antibiyotikler, steroidler, metal-organik türler ve çeşitli inorganik bileşikler sayılabilir.

HPLC günümüzde kimya, biyokimya, biyoteknoloji, farmakoloji, tıp kimyası, bitki kimyası, tarım ve kimya mühendisliğini içeren alanlarda ayırma ve analiz için vazgeçilmez bir araç olarak kabul edilmektedir. Bilhassa, diğer kromatografik tekniklere uygun olmayan bileşiklerin ayrılması ve analizi için uygundur. Çevre

sıcaklığında termal olarak kararsız bileşikleri ve yüksek polarlıktaki bileşikleri herhangi bir türevlendirme olmaksızın ayırabilir ve analiz edebilir (55).

HPLC'nin avantajları:

- HPLC kolonu, rejenerasyon gerekmeksizin pek çok kez kullanılabilir.
- HPLC tekniği kullanıcının becerisine daha az bağımlıdır ve tekrarlanabilirlik daha yüksektir.
- Nicel analiz için kullanılabilir.
- Analiz süresi kısadır.
- Duyarlılık yüksektir.

a) Normal Faz Sıvı Kromatografisi:

Polar sabit faz ve apolar veya düşük polariteye sahip hareketli fazdan oluşur.

b) Ters Faz Sıvı Kromatografisi:

Sabit faz apolar, hareketli faz ise polardır. Kolon ve çözücü sistemindeki polar ve apolar sistemin yer değiştirilerek geliştirilmiş olduğu bir sistemdir (Tablo 2). Bu sistemde kolon apolar, mobil faz ise metanol, asetonitril ve su gibi polar çözücüler kullanılır. Geliştirilen bu teknikte örnek ve kolon hidrofobik bir etkileşim oluşturur. C18, C8, C4, C2, fenil gibi kolonlar ters faz sıvı kromatografisinde kullanılan kolon çeşitleridir.

Tablo 2. Normal-faz ve ters-faz sıvı kromatografisi kolon özellikleri.

Kolon	Normal-faz	Ters-faz
Sabit Faz Polaritesi	Yüksekten Ortaya	Ortadan Düşüğe
Çözücü Polaritesi	Ortadan Düşüğe	Yüksekten Ortaya
Örnek Çıkış Yeri	Apolar Önce	Polar Önce

Ters faz kromatografisinin avantajları:

1. Normal faz kromatografide, sıvı fazın kontrolü çok önemli ve kritiktir. Hareketli faz bileşimindeki küçük değişiklikler kromatogramda belirgin farklılıklara neden olabilir.

2. Dengeye ulaşma normal faz kromatografide çok yavaştır.
3. Normal faz kromatografide polar maddelerin elüsyonu çok yavaştır ve yayvan piklere sebep olur.
4. Apolar çözücüler çok pahalıdır, ayrıca nemden uzak tutmak zordur.

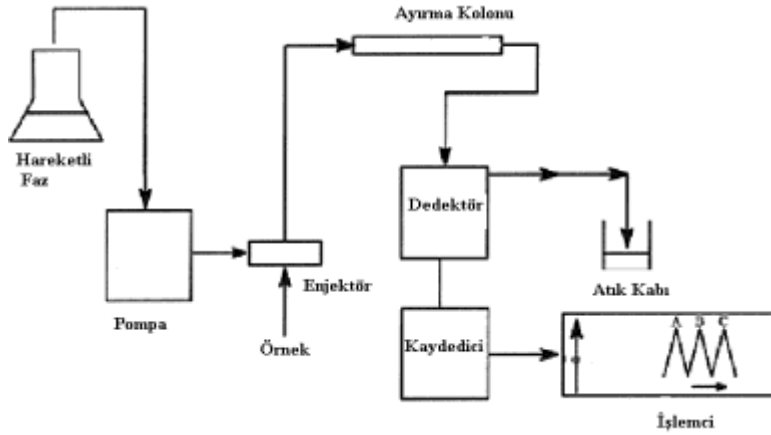
HPLC tekniğinde üç çeşit sistem mevcuttur:

İzokratik sistem: Bu sistemde tek pompa ve tek çözücü kullanılır. Kullanılan çözücü bir karışım olabilir. Bu sistemdeki ayırım yetersizdir.

Düşük basınçlı dereceli sistem: Bu sistemde tek pompa, polariteleri önemli derecede birbirinden farklı maksimum dört farklı hareketli faz vardır. Ayırım, izokratik sistemden daha iyidir.

Yüksek basınçlı dereceli sistem: Bu sistemde iki yada üç pompa ve polariteleri önemli derecede birbirinden farklı iki yada üç hareketli faz vardır. Karışma pompadan sonra meydana gelir.

HPLC cihazı çözücü dağıtma bölümü, ayırma kolonu, dedektör ve kaydedici sistem olmak üzere başlıca üç bölümden oluşur (Şekil 3).



Şekil 3. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazının şematik gösterimi

2.4.1.1. Çözücü dağıtma sistemi

Çözücü pompalama sistemi HPLC’de en önemli kısımlardan biridir. Kolon giriş ve çıkışı arasında oluşturulması gereken yüksek basınç farkı, kolon girişine bir pompa yoluyla uygulanan basınç ile sağlanır. Pompanın performansı, analitik sonuçlardaki tekrarlanabilirliği, nicel değeri, gözlenebilme sınırı vb. değerleri büyük ölçüde etkiler.

Pompalama sistemlerinin farklı tipleri şunlardır:

- Doğrudan gaz basınç pompaları
- Pnömatik hızlandırıcı pompalar
- Pistonlu pompalar
- Şırınga tipi pompalar

Doğrudan gaz basınç pompalarında, yüksek basınçta sıvı akışının sağlanması, genellikle azot veya helyum gazının kullanılmasıyla olur. Gaz basıncı, hareketli fazın yüzeyine doğrudan veya bir diyafram yoluyla uygulanır. Bu sistem sınırlı bir hacme sahiptir, bu yüzden durdurularak tekrar çözücü ile doldurulmalıdır. Avantajı, ucuz ve tek hareketli faz kullanıldığında güvenilir olmasıdır.

En basit pnömatik (havalı) pompalarda, sıvı hareketli, sıkıştırılmış bir gaz ile basınçlandırılabilen bir kap içine yerleştirilmiş, portatif bir kap içine konur. Bu tip pompalar, pahalı değildir ve pulssuzdur, ancak kapasitesi sınırlı olup, çıkış basıncı düşüktür ve çıkış hızı çözücü viskozitesine ve kolon geri basıncına bağlıdır. Ayrıca bunlar, dereceli elüsyona uygun değildir. Ve basınçları 135 atm’ den daha düşüktür.

Pistonlu (sabit akış) pompalar genellikle motor kontrollü bir pistonun ileri ve geri hareketiyle çözücünün pompalandığı küçük bir silindirden meydana gelmiştir. Sırasıyla açılıp kapanan iki tane küresel kontrol musluğu, çözücünün silindir içine giriş ve çıkış akışını kontrol eder. Çözücü piston ile doğrudan temas etmektedir. Bir alternatif olarak, basınç, gidip-gelen pistonla hidrolik olarak kumanda edilen esnek bir diyafram yardımıyla çözücüye iletilir. Pistonlu pompaların üstünlüğü; küçük iç hacimleri (35-400 µL), yüksek çıkış basıncı (700 atm’ e kadar), dereceli elüsyona uyarlanmaya hazır oluşları ve kolon geri basıncından ve çözücü viskozitesinden büyük ölçüde bağımsız olan sabit akış hızlarıdır.

Şırınga tipinde pompalarda, elektriksel olarak hareket eden kurşun vida, verilen çözücü hacmini yeterli basınçta tutan bir pistonu hareket ettirir. Bu pompaların başlıca avantajı, yüksek basınçta (7500 psi'a kadar) serbest pulslu akış sağlama yetenekleridir ve akış hızı, çalışılan basınçtan bağımsızdır.

2.4.1.2. Kolonlar

HPLC cihazı kolonları normal olarak düzgün iç çaplı paslanmaz çelik borulardan yapılır. Kolonların büyük çoğunluğu 10-30 cm arasındadır.

Bir kromatografik sistemin performansı, kolonda gerçekleştirilen ayırma ile yani, kolon dolgu maddesinin seçilmesi ve kullanılmasıyla tayin edilir.

İyi bir kolon dolgu maddesi kararlı olmalıdır ve hem hareketli faz çözücülerine hem de örnek çözeltilere karşı inert olmalıdır. Geniş yüzey alanına, düzgün olarak dağılmış ve hareketli faza kolay erişebilir açık yapısal yüzeye sahip olmalıdır. Yüksek basınç ve yüksek akış hızlarından etkilenmemelidir.

Normal fazlı HPLC çalışmalarında sabit faz olarak genellikle silika jel kullanılır. İçerdiği SiOH grupları nedeniyle zayıf asidik özellik gösteren silika jel, bazik özellik gösteren bileşiklere bazlık kuvvetlerine göre tutar. Yani, kuvvetli bazlar silika jel kolonlarda zayıf bazlara oranla daha kuvvetli tutulurlar. Silika jel doğrudan dolgu maddesi olarak kullanıldığı gibi bir katı yüzeyine film halinde kaplanabilir. Bu katının cam boncuk olması durumunda bu ince tabaka, yüzeye kimyasal bağlarla bağlanır. Asidik özellik gösteren bileşiklerin ayrılmasını sağlayan, yani bazik özellik taşıyan bir kolon dolgu maddesi de alüminadır. Bu dolgu maddesi de katı bir yüzeye film halinde kaplanarak kullanılır.

Analitik kolonun ömrünü artırmak amacıyla, analitik kolondan önce genellikle kısa bir kolon (emniyet kolonu) yerleştirilir. Bu kolonun görevi, sadece partikül haldeki maddeleri ve çözücü içindeki yabancı maddeleri tutmak değil, aynı zamanda numune içinde bulunan ve durgun faza tersinmez olarak bağlanan bileşenleri de tutmaktır. Emniyet kolonundaki dolgu maddesinin bileşimi, analitik kolondakine çok benzer olmalıdır; bununla beraber, basınç düşüşünü en aza indirmek için tanecik boyutu genellikle daha büyüktür.

Birçok uygulama için kolon sıcaklığının yakından kontrolü gerekli değildir ve kolonlar oda sıcaklığında kullanılırlar. Ancak, çoğu zaman, kolon sıcaklığı, derecenin onda birkaçı hata ile sabit tutulduğu zaman daha iyi kromatogramlar elde edilmektedir. Birçok modern ticari cihaz, kolon sıcaklığını oda sıcaklığından, 100-150°C' ye kadar her sıcaklıkta onda birkaç derece hata ile sabit tutabilen kolon ısıtıcıları ile donatılmıştır (56).

2.4.1.3. Dedektörler

Dedektör HPLC' de aletin en önemli kısımlarından birini oluşturur. Kolondan çıkan maddelerin derişimi kolon çıkışına yerleştirilen uygun bir dedektör ile ölçülür. Dedektör seçimi doğru ve hassas bir analiz yapabilmek için son derece önemlidir.

Bir dedektörde bulunması gereken önemli karakteristikler:

- Duyarlılık
- Doğrusallık
- Seçici cevap
- Doğru cevap, koşulların değişiminden etkilenmeme
- Numuneyi tahrip etmeme
- Ucuzluk ve kolay kullanım

Dedektörlerin bazıları, numunedeki bütün bileşenlere karşı duyarlıdır. Bazı dedektör türleri ise bileşenlerden sadece bazılarını seçici olarak ölçer.

HPLC dedektörlerinin iki tipine rastlamak mümkündür.

1. Genel dedektörler
2. Seçici dedektörler

Genel dedektörler, hareketli faz ve örnek çözeltisinin özelliklerindeki değişimi ölçer. Seçici dedektörler ise yalnız örnek çözeltisi için duyarlık ve seçicilik gösterir. Genel özellikli dedektörlere örnek olarak kırılma indisi ölçen dedektörler ve kütle spektrofotometreleri verilebilir. Seçici dedektörlere örnek olarak da UV, FT-IR, floresans, elektrokimyasal, radyokimyasal, iletkenlik dedektörleri verilebilir.

Dedektörün görevi örnek konsantrasyonu ile orantılı elektriksel bir cevap üretmektir.

Dedektör seçimi örneğin kimyasal yapısına ve metodun gereksinimlerine göre değişir. Örnek bileşenleri kromofor (UV veya görünür alandaki ışığı absorplayan fonksiyonel gruplar) gruplar içeriyorsa ilk tercih doğal olarak UV-VIS dedektör olacaktır. Bununla birlikte bir veya daha fazla bileşen UV-VIS ışığı absorplamıyorsa alternatif dedektörler de düşünülmelidir.

UV-VIS dedektör, kolondan ayrılarak dedektöre ulaşan bileşenlerin ultraviyole bölgede yaptığı absorbansın ölçümüne dayanır. Tek bir dalga boyunda çalışan dedektörler kullanılabilirdiği gibi bir monokromatör ile çeşitli dalga boylarını seçerek çalışan dedektörler de vardır. Tek dalgaboyunda çalışan dedektörlerde ışık kaynağı olarak genellikle 254 nm' de ışımaya yapan Hg (civa) lambası, çeşitli dalga boylarını ölçebilen dedektörlerde ise döteryum lambası kullanılır.

UV-VIS dedektörler içerisinde fotodiyot array dedektör son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır. UV-VIS dedektörden farkı, her elementin ayrı bir dalga boyundaki absorbansını eş zamanlı olarak ölçebilmesidir. Bu sayede üç boyutlu kromatogramlar almak ve istenilen her pikin çok hızlı spektrum taramasını görebilmek ve farklı dalga boyunda absorbans yapan türleri aynı anda tayin etmek olasıdır. Ayrıca, istenilen dalga boyu aralığında çalışabilmesi bu dedektörün sağladığı bir diğer önemli avantajdır. Kullanılan ışık kaynağı döteryum veya tungsten lambadır.

Eser miktardaki analizlerde (örnek derişimi 1 ppb den daha düşükse) floresans veya elektrokimyasal dedektörler kullanılmalıdır. Floresans özellikleri taşıyan bileşiklerin analizinde spektrofotometrik dedektörlere oranla duyarlılığı daha fazla olan floresans dedektörlerin kullanılması mümkündür. Bu dedektör ile 10^{-11} g.mL⁻¹ gibi çok düşük gözlenebilir sınırlarına inilebilmektedir. Luminesans özelliğine sahip olan ilaçların, aminoasitlerin tayini yapılabilir yâda bazı biyokimyasal bileşikler floresant bir madde ile tepkimeye sokulup, yeni bir floresans ürün veya etiketlendirilmiş ürün oluşturulur.

Gözlenebilir sınıırı 10^{-11} - 10^{-12} g.mL⁻¹ değerine ulaşılın elektrokimyasal dedektörler, elektroliz sonucu akım ölçülmesi ilkesine göre çalışır. Burada ölçülen akım, örnek maddesinin elektrolizi sonucu oluştuğundan kullanılan çözücünün

elektrik akımı vermemesi gerekir. Elektrokimyasal redoks tepkimelerine cevap veren ve polarografi ilkesine dayanan HPLC dedektörü de yaygın olarak kullanılır.

İletkenlik dedektörleri kolondan çıkan iyonik haldeki bileşenlerin ölçümünde kullanılır. Bu dedektör organik sistemler için pek uygulanabilir değildir. Daha çok sulu sistemlere uygundur.

Tüm bileşenleri ölçebilen, yani seçimli olmayan kırılma indisi dedektörü ile yapılan ölçümlerde, kırılma indisi sıcaklıkla değiştiğinden, çok iyi bir sıcaklık kontrolü yapılmalıdır. Çok yönlülüğü mükemmeldir, fakat duyarlılığı vasat olduğundan eser analizler için ideal değildir. Bunların dışında amperometrik dedektör, elektrik iletken dedektör, kütle spektrometrisi dedektörü ve daha az kullanılmakla birlikte iyon seçimli elektrotlarla yapılan potansiyometrik, fotoakustik, indüktif eşleşmiş plazma ve atomik absorpsiyon ölçümlerine dayanan dedektörler de vardır (56).

2.5. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

2.5.1. Aritmetik Ortalama

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$$

2.5.2. Standart Sapma

$$S_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

2.5.3. % Bağıl Standart Sapma

$$\% \text{RSD} = \frac{S_x}{\bar{X}} \cdot 100$$

2.5.4. Geri Kazanım

$$\% \text{ Geri kazanım} = \frac{m_2}{m_1} \times 100$$

m_1 : Ekstrakte edilecek katı madde miktarı

m_2 : Ekstraksiyon sonucunda elde edilen katı madde miktarı

BÖLÜM 3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kimyasal Maddeler

<u>Kimyasalın adı:</u>	<u>Firma:</u>
Juglon (97%)	Sigma-Aldrich
Metanol (Gradient Grade)	Merck
Asetonitril (for liquid Chr.)	Merck

3.2. Cihaz ve Analitik Koşullar

- 1) DIONEX ASE 100 hızlandırılmış çözücü ekstraktörü
- 2) Memmert UM 400 etüv
- 3) Millipore Milli Q RG deiyonize su cihazı
- 4) Adam d=0,0001 g dijital terazi
- 5) Heidolph VV 2000 döner vakumlu evaporatör
- 6) Heidolph WB 2000 su banyosu
- 7) KNF LAB, Laboport vakum cihazı
- 8) Falc instruments manyetik karıştırıcı
- 9) Arzum Mulino /AR 151 kahve öğütücü
- 10) Nuair -85° C Ultralow Freezer soğutucu

HPLC Donanımı:

- 1) Agilent 1100 seri HPLC sistemi (Agilent Technologies, Hewlett-Packard, Germany)
- 2) G1311 Quat model pompa

- 3) G1322 Degasser vakum
- 4) G1329B model ALS SL otosampler
- 5) G1316A COLCOM kolon ısıtıcı
- 6) G1315A model DAD detektör
- 7) Phenomenex Luna (C8) 5 μ , 150mm \times 4.6 mm kolon

HPLC koşulları:

Kolon: Phenomenex Luna (C8) 5 μ , 150mm \times 4.6 mm kolon

Hareketli Faz A: % 0.5 HAc içeren su çözeltisi (5.72 mL HAc/ 1000mL suda)

Hareketli Faz B: % 0.1 HAc içeren metanol (0.5 mL HAc/ 500mL metanolde)

Dedektör : DAD UV λ : 252.4 nm

Akış Hızı : 1.000 mL/dak

Kolon sıcaklığı : 24° C

Enjeksiyon hacmi: 10 μ L

Dalga boyu : 252.4 nm (bant genişliği: 4 nm)

3.3. Çözeltiler

Hareketli Faz A: % 0.5 HAc içeren su

Hareketli Faz A'nın Hazırlanışı: 5.72 mL HAc 1000mL'lik balon jodede hacimce ultra distile su ile tamamlanır.

Hareketli Faz B: % 0.1 HAc içeren metanol

Hareketli Faz B'nin Hazırlanışı: 0.5 mL HAc 500 mL'lik balon jodede hacimce metanol ile tamamlanır.

3.4. Ekstraksiyon İşlemleri

Yaş ceviz yaprağı çalışmalarında aynı koşullar için üç paralel tartım alınarak çalışma yapıldı. HPLC piklerine ait alan değerleri için hesaplanan % RSD değerleri üç örnek (tartım) için hesaplandı.

ASE Koşulları: 1.0000 g \pm 0.0005 g ceviz yaprağı örneği ve 1.0000 g \pm 0.0005 g diatom toprak tartılarak filtre kağıdıyla sarıldı, 10 mL' lik ekstraksiyon hücresine yerleştirildi.

Sıcaklık	: 25°C
Statik zaman	: 10 dak.
Temizleme hacmi	: % 60
Yıkama zamanı	: 90 s.
Statik devir	: 3

3.5. Kromatografik Koşullar

Ekstrakt çözücüleri 60° C' de kuruluğa kadar uçuruldu. Kalıntılar metanol (10 mL) ile çözüldü. Membran filtreden (0.45 μ m) süzüldü. Bulgularda ayrıntılı şekilde verilen farklı hareketli faz oranlarındaki HPLC sistemlerine enjekte edildi.

BÖLÜM 4. BULGULAR

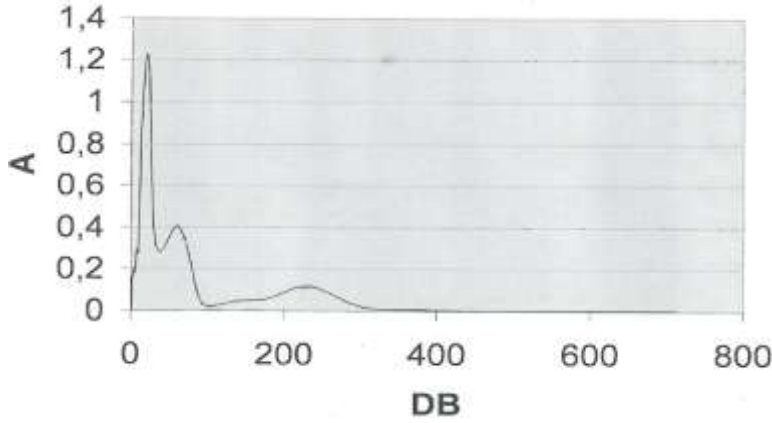
4.1. Ön Denemeler

Juglon standardı ile aşağıda verilen ön denemeler yapıldı.

4.1.1. Çözünürlük Çalışmaları

Juglon' un 10 mg miktarı sırasıyla 25°C, 50°C ve 100°C 10 mL ultra distile suda çözünürlükleri gözlemlendi. 25°C ve 50°C' de 10 mL ultra distile suda çözünme gerçekleşmezken; 100°C 10 mL ultra distile suda az miktarda çözünme gerçekleşti ve çözeltilerde açık sarı renk oluşumu gözlemlendi.

Juglon' un 5 mg miktarı 5 mL metanolde safsızlık olarak tahmin edilen parçacıklar kalacak biçimde çözüldü. Juglon'un 5 mL metanol ile 7 mL metanoldeki çözünürlüğünün aynı olduğu ve çözeltilerde açık turuncu renk oluşumu gözlemlendi. İlgili spektrum Şekil 4.1' de verilmiştir.



Şekil 4.1. Juglon' un metanoldeki spektrumu.

Juglon' un 5 mg miktarı 0,5 mL kloroformda hiçbir partikül kalmayacak şekilde; tamamen çözüldüğü ve açık turuncu bir renk oluştuğu gözlemlendi.

Juglon' un 5 mg miktarı 200 µL dimetilsülfoksitte hiçbir partikül kalmayacak şekilde; tamamen çözüldüğü ve açık turuncu bir renk oluştuğu gözlemlendi.

Juglon' un 5 mg miktarı 200 µL dimetilformamimde hiçbir partikül kalmayacak şekilde; tamamen çözüldüğü ve açık turuncu bir renk oluştuğu gözlemlendi.

Juglon' un 5 mg miktarı 0,4 mL asetonda safsızlık olarak tahmin edilen kum şeklinde küçük partiküller kalacak şekilde çözüldüğü ve açık sarı bir renk oluştuğu gözlemlendi. Çözeltinin hacmi 14 mL tamamlandığında dahi bu partiküllerin çözünmediği gözlemlendi.

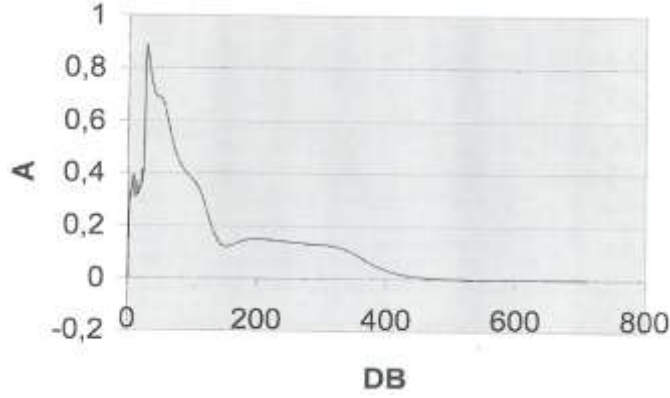
Juglon' un 3 mg miktarı 0,5 mL etanolde safsızlık olarak tahmin edilen kum şeklinde küçük partiküller kalacak şekilde çözüldüğü ve açık sarı bir renk oluştuğu gözlemlendi. Çözeltinin hacmi 14 mL tamamlandığında dahi bu partiküllerin çözünmediği gözlemlendi.

Juglon'un 3 mg' ı 0,5 mL diklorometanda hiçbir partikül bırakmayacak şekilde tamamen çözüldüğü gözlemlendi.

Juglon'un 3 mg miktarı 0,5 ve 0,1 M hidroklorik asit çözeltilerinde çözünmediği gözlemlendi. 0,1 M HCl çözeltisinde partiküllerin daha iri olduğu ve çözelti renginin sarı olduğu gözlemlendi.

Juglon' un 5 mg miktarı 0,5 ve 0,1 M amonyak çözeltilerinde çözünmediği gözlemlendi. 0,1 M NH₃ çözeltisinde partiküllerin daha az olduğu ve çözelti renginin her iki çözeltide de başlangıçta koyu mor, sonrasında koyu kahve renkte olduğu gözlemlendi.

Juglon' un 5 mg miktarı 0,5 M sodyum hidroksit çözeltisinin 0,3 mL'sinde tamamen çözüldüğü ve kırmızı-mor renk oluşturduğu gözlemlendi. İlgili spektrum Şekil 4.2' de verilmiştir.



Şekil 4.2. Juglon' un NaOH çözeltisindeki spektrumu (batokromik kayma).

4.1.2. Juglon standardının kromatogramı

Kromatografik Koşullar

Kolon: Phenomenex Luna 5 μ C8, 150mm \times 4.6 mm

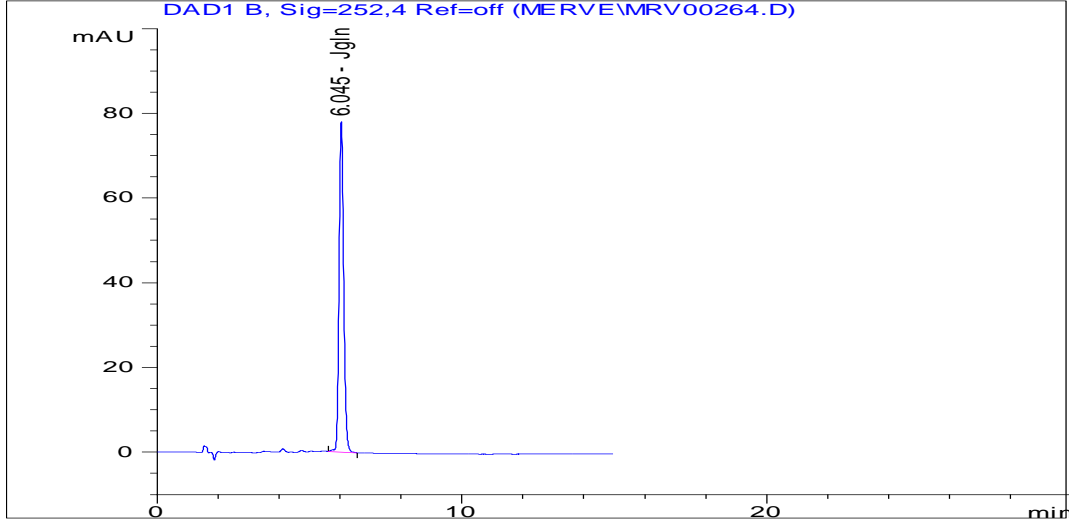
Dedektör: DAD UV λ : 252.4 nm

Akış Hızı: 1.000 mL/dak

Enjeksiyon Hacmi: 10 μ L

Stok 1 (6.9×10^{-4} mol.L⁻¹ konsantrasyonda standart hazırlanması): Juglon standardından 30 mg tartıldı. Saf metanol ile 250 mL'ye tamamlanarak, juglon stok standart çözeltisi hazırlandı. Stok standart çözeltisinden 1.000 mL alınıp saf metanol ile 10 mL'ye tamamlanarak konsantrasyonu 6.9×10^{-5} mol.L⁻¹ olan seyreltik standart çözeltisi (SS1) hazırlandı. Stok 1 önce üç farklı sistem ile çalışılmış ve 3. sistem en uygun bulunmuştur. Her üç sistem Şekil 5.2, Şekil 5.3 ve Şekil 5.4' te verilmiştir.

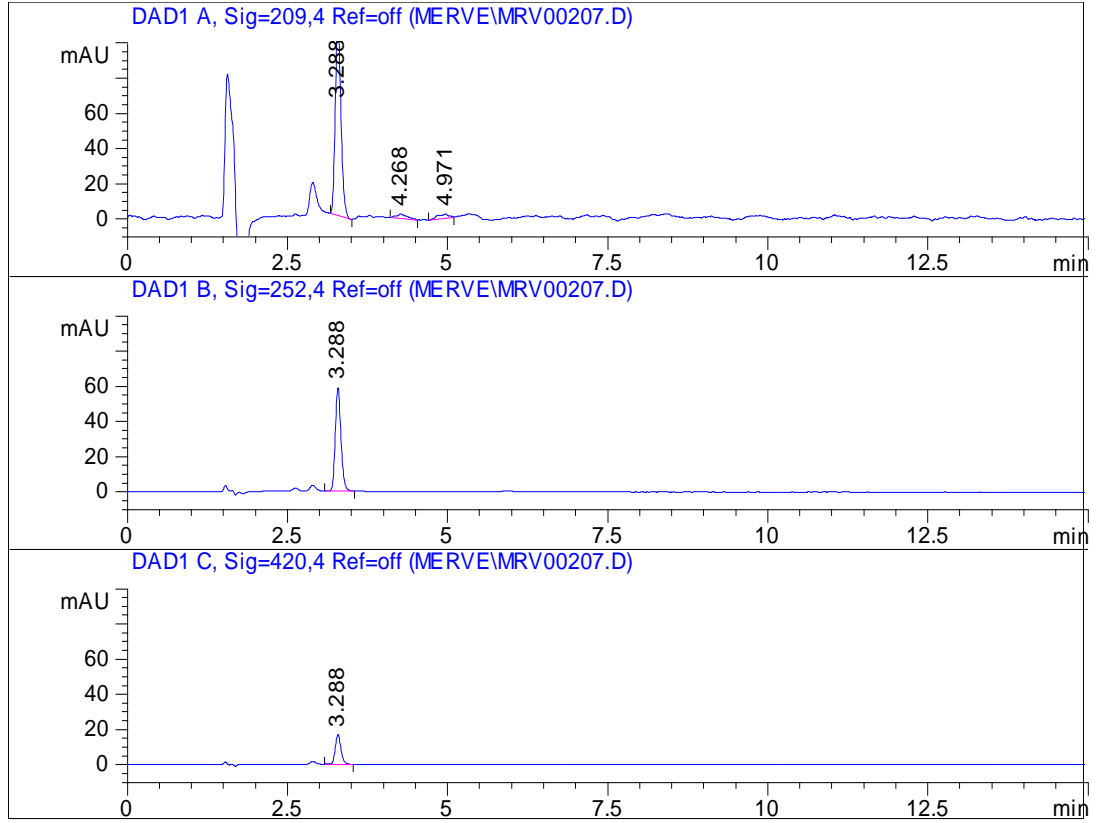
Stok 2 (1.15×10^{-3} mol.L⁻¹ konsantrasyonda standart hazırlanması): Juglon standardından 5 mg tartıldı. Saf metanol ile 25 mL'ye tamamlanarak juglon stok standart çözeltisi hazırlandı. Stok standart çözeltisinden 1 ml alınıp saf metanol ile 10 mL'ye tamamlanarak konsantrasyonu 1.15×10^{-4} mol.L⁻¹ olan seyreltik standart çözeltisi (SS2) hazırlandı. Hareketli faz oranı A:B (45:55) olan 3. Sistem ile çalışmaya devam edildi. İlgili kromatogram Şekil 5.1' de verilmiştir.



Şekil 5.1. Hareketli faz % 0,5 HAc içeren ultra distile su (A) ve % 0,1 HAc içeren metanol (B) karışımı; 45:55 (A:B) ve akış hızı 1 mL/dak olan sistemde Stok 2' nin 252.4 nm' deki kromatogramı. Konsantrasyon 6.9×10^{-5} mol.L⁻¹, R_t: 6.045 dak.

1. Sistem: Konsantrasyonu 6.9×10^{-5} mol.L⁻¹ olan SS1, 0.5 % asetik asit içeren sulu faz (A Fazı) ve 0.1 % lik asetik asit içeren metanol (B Fazı) hareketli fazının oranı 30:70 (A:B) ve akış hızı 1 mL/dak olan HPLC sistemine 25 µL enjekte edildi. 3.288 dakikada gelen pik juglon'a aittir. İlgili kromatogram Şekil 5.2' de verilmiştir.

Bu sistem Babula P. 2005 çalışmasında kullanılan kromatografik sistem temel alınarak modifiye edilmiştir.

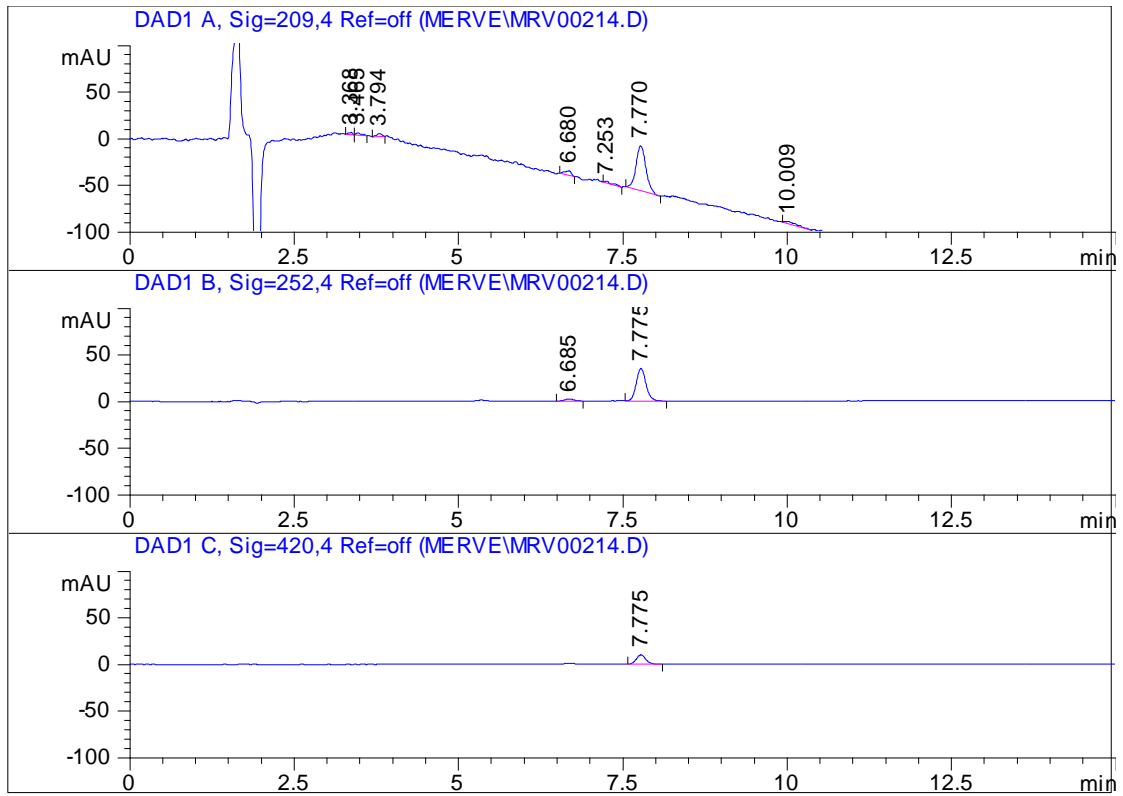


Şekil 5.2. Hareketli faz % 0,5 HAc içeren ultra distile su (A) ve % 0,1 HAc içeren metanol (B) karışımı; 30:70 (A:B) ve akış hızı 1 mL/dak olan sistemin 209.4, 252.4 ve 420.4 nm deki kromatogramları. Konsantrasyon 6.9×10^{-5} mol.L⁻¹, R_t: 3.288 dak.

2. Sistem: Şekil.3'teki kromatogramda standardın önünde standart pikine çok yakın gelen piki ayırmak için Tablo.1'deki gradient tablo uygulandı. Konsantrasyonu $6.9 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ olan SS1, 0.5 % asetik asit içeren sulu faz (A Fazı) ve 0.1 % lik asetik asit içeren metanol (B Fazı) hareketli faz ve akış hızı 1 mL/dak olan HPLC sistemine 25 μL enjekte edildi. Şekil 5.3' te 7.775 dakikada gözlenen pik juglon'a aittir.

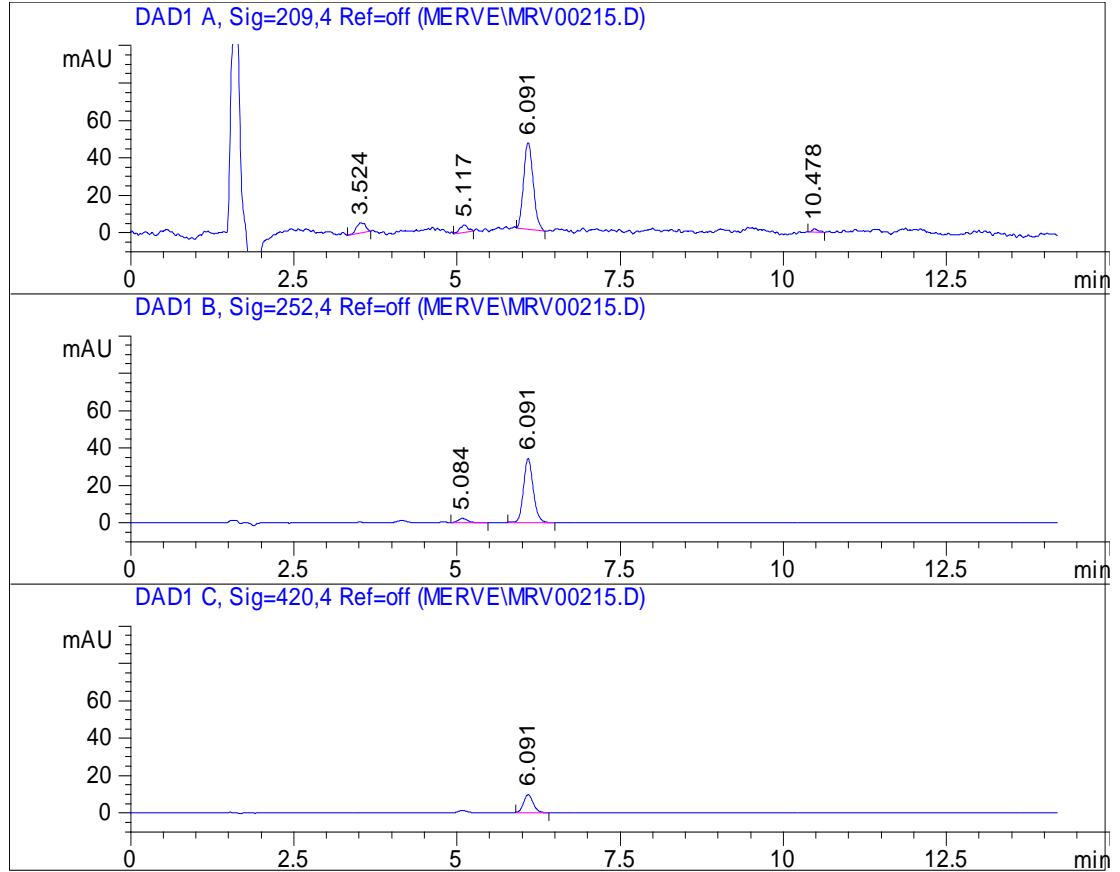
Tablo 3. Gradient tablo

Zaman (Dakika)	A Fazı %
t_0	50
t_{10}	40
t_{20}	30



Şekil 5.3. Gradient sistemin 209.4, 252.4 ve 420.4 nm' deki kromatogramları. Konsantrasyon $6.9 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, R_t : 6.775 dak.

Sistem 3: Analiz süresinin uzaması ve bunun sonucunda daha fazla çözücü tüketimi nedeniyle gradient sistem terkedilerek izokratik çalışmaya devam edildi. Hareketli faz % 0.5 HAc içeren ultra distile su (A) ve % 0.1 HAc içeren metanol (B) karışımı; 45:55 (A:B) ve akış hızı 1 mL/dk olarak belirlendi. Çalışma için en uygun oran 45:55 (A:B) olarak belirlendi. 6.091 dakikada gelen pik juglon'a aittir. İlgili kromatogram Şekil 5.4' te verilmiştir.



Şekil 5.4. Hareketli faz % 0.5 HAc içeren ultra distile su (A) ve % 0.1 HAc içeren metanol (B) karışımı; 45:55 (A:B) ve akış hızı 1 mL/dk olan sistemin 209.4, 252.4 ve 420.4 nm deki kromatogramı. Konsantrasyon 6.9×10^{-5} mol.L⁻¹, R_t: 6.091 dak.

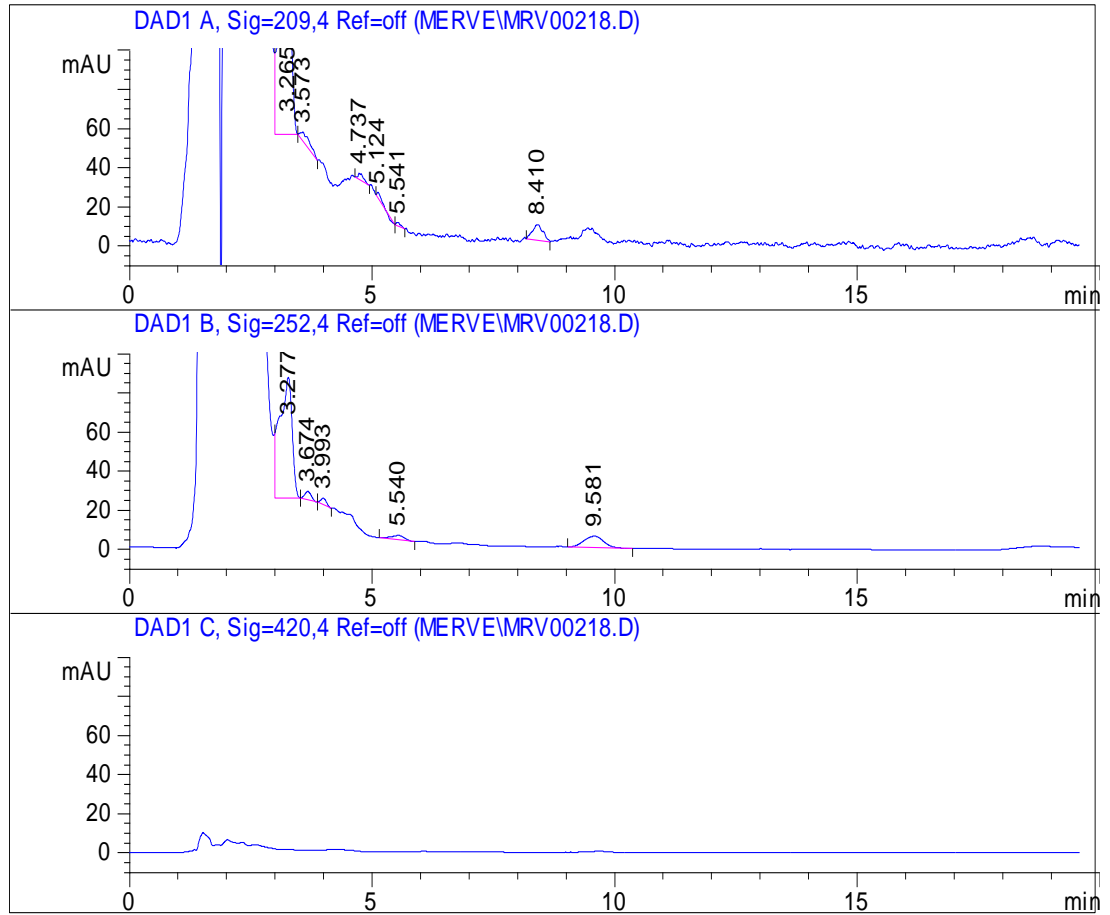
Yüksek uçuculukta olması sebebiyle, bundan sonraki çalışmalarda aseton kullanılmamıştır. Yaş yapraklarda juglon' un tespit edilmesi adına yapılan çalışmalara 2. yöntem baz alınarak devam edilmiştir.

4.1.3. Kuru ceviz yapraklarının analizi

Çalışmamızdaki ceviz örnekleri, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Yaşar Akça'dan sağlanmıştır. Örnekler, Tokat Niksar ilçesi Güvenli Köyü'nde saptanan Niksar 1 isimli türdür. Bu tür, adı geçen öğretim üyesi tarafından aşılansarak yeni bir tür elde edilmiş ve geçici olarak Akça 1 adıyla isimlendirilmiştir. Bu türün özelliği geç yapraklanması ve iç kurduna rastlanmamasıdır. Juglon'un insektisist olarak kullanımı göz önüne alındığında, Akça 1 ceviz türünde bulunma olasılığı yüksektir.

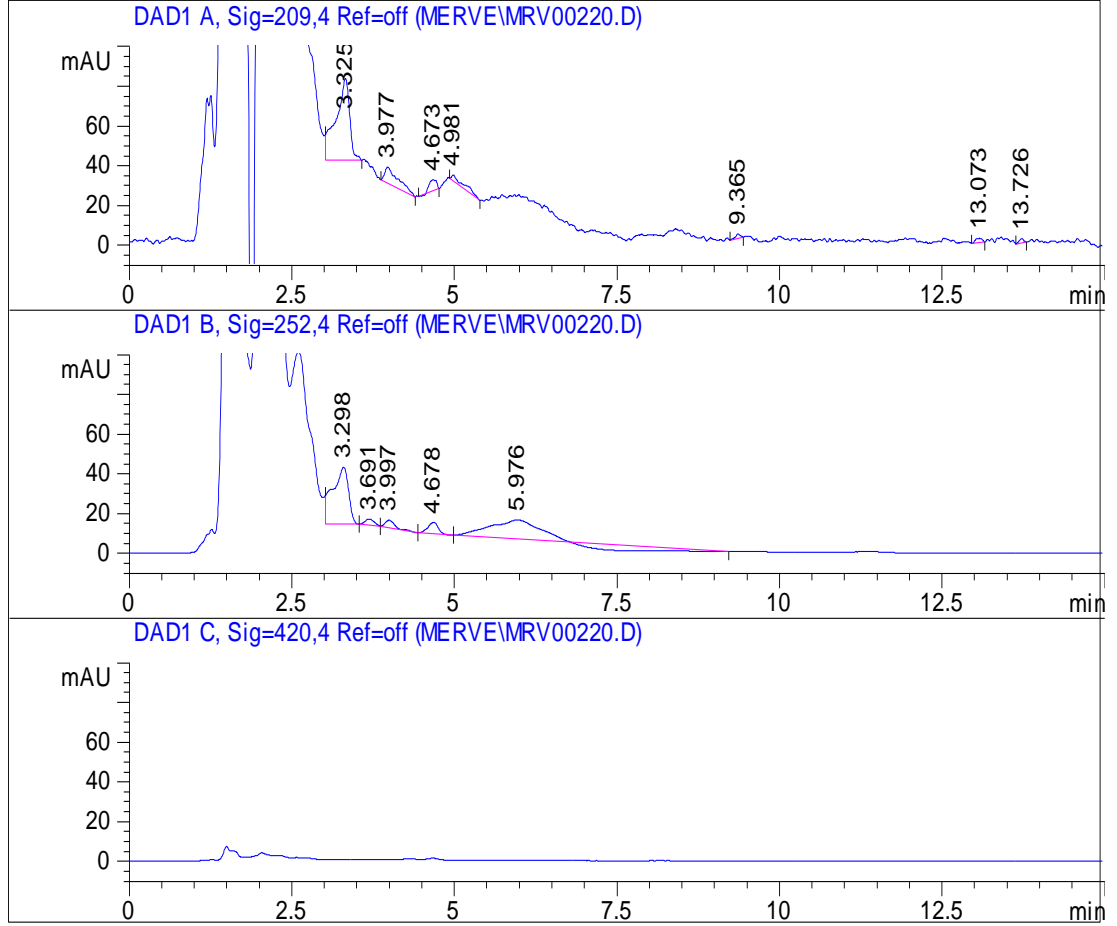
Kuru yapraklarda juglon olup olmadığının belirlenmesi adına ceviz yaprakları etüvde 40°C' de 24 saat bekletildikten sonra farklı ekstraksiyon yöntemleri ve çözücüler ile çalışıldı. 1. yöntemde çalkalayıcı kullanılırken 2. ve 3. yöntemlerde hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu (ASE) kullanılmıştır. 1. ve 2. Yöntemde nihai çözücü olarak metanol kullanılırken 3. yöntemde aseton kullanılmıştır.

1. Yöntem: İnce kıyılan yapraklardan 1.0000 ± 0.0005 g tartıldı, 20 mL metanolde 1 saat çalkalayıcıda çalkalandı. Evaporatörde 60°C de kuruluğa kadar uçuruldu. Uçurma işleminden sonra kalıntılar 10 mL metanolde çözüldü. Membran filtreden ($0.45 \mu\text{m}$) süzülerek, 0.5 % asetik asit içeren sulu faz (A Fazı) ve 0.1 % lik asetik asit içeren metanol (B Fazı) hareketli fazının oranı 45:55 (A:B) ve akış hızı 1 mL/dak olan HPLC sistemine 25 μL enjekte edildi. İlgili kromatogram Şekil 6.1' de verilmiştir.



Şekil 6.1. Hareketli faz % 0.5 HAc içeren ultra distile su (A) ve % 0.1 HAc içeren metanol (B) karışımı; 45:55 (A:B) ve akış hızı 1 mL/dak olan sistemde, çalkalama yöntemiyle ekstrakte edilen kuru ceviz yapraklarının 209.4, 252.4 ve 420.4 nm deki kromatogramları.

Seyreltme: 1. yöntemle hazırlanan örnek (yukarıdaki) metanolle 1:3 seyreltikten sonra tekrar 0.5 % asetik asit içeren sulu faz (A Fazı) ve 0.1 % lik asetik asit içeren metanol (B Fazı) hareketli fazının oranı 45:55 (A:B) ve akış hızı 1 mL/dak olan HPLC sistemine 25 µL enjekte edildi. İlgili kromatogram Şekil 6.2’ de verilmiştir.

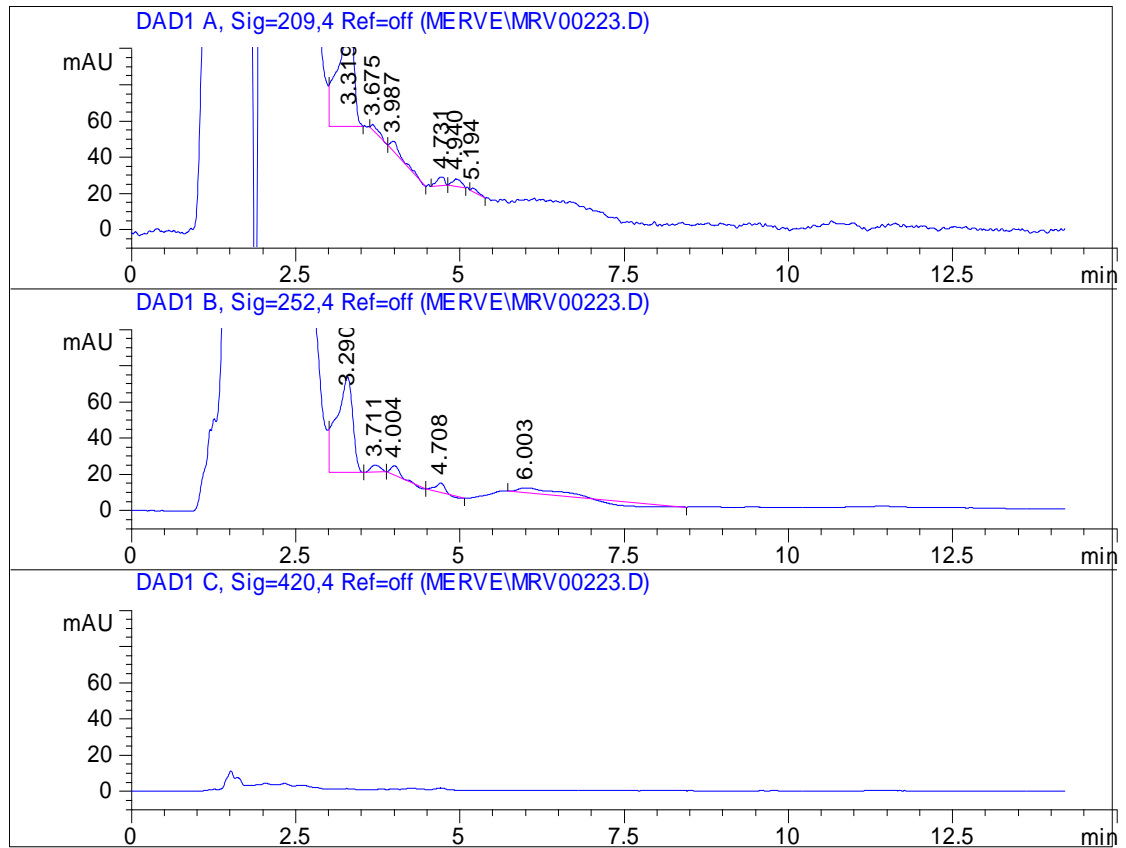


Şekil 6.2. Hareketli faz % 0.5 HAc içeren ultra distile su (A) ve % 0.1 HAc içeren metanol (B) karışımı; 45:55 (A:B) ve akış hızı 1 mL/dak olan sistemde, çalkalama yöntemiyle ekstrakte edilen kuru ceviz yapraklarının 1:3 seyreltilmesi sonucu 209.4, 252.4 ve 420.4 nm deki kromatogramları.

2. Yöntem: 1.0000 ± 0.0005 g ince kıyılan ceviz yaprağı örnekleri ve 1.0000 ± 0.0005 g ekstraksiyon hücresine diatom toprak ilavesiyle, tartılarak filtre kağıdıyla sarıldı. 10 mL'lik ekstraksiyon hücresine yerleştirildi. ASE kullanılarak ekstraksiyon gerçekleştirildi. Ekstre evaporatörde 60°C de kuruluğa kadar uçuruldu. Kalıntılar 10 mL metanolde çözüldü. Bu çözelti metanolle 1:3 seyreltildi. $0.45 \mu\text{m}$ membran filtreden süzülerek % 0.5 % asetik asit içeren sulu faz (A Fazı) ve % 0.1 % lik asetik asit içeren metanol (B Fazı) hareketli fazının oranı 45:55 (A:B) ve akış hızı 1 mL/dak olan HPLC sistemine 25 μL enjekte edildi

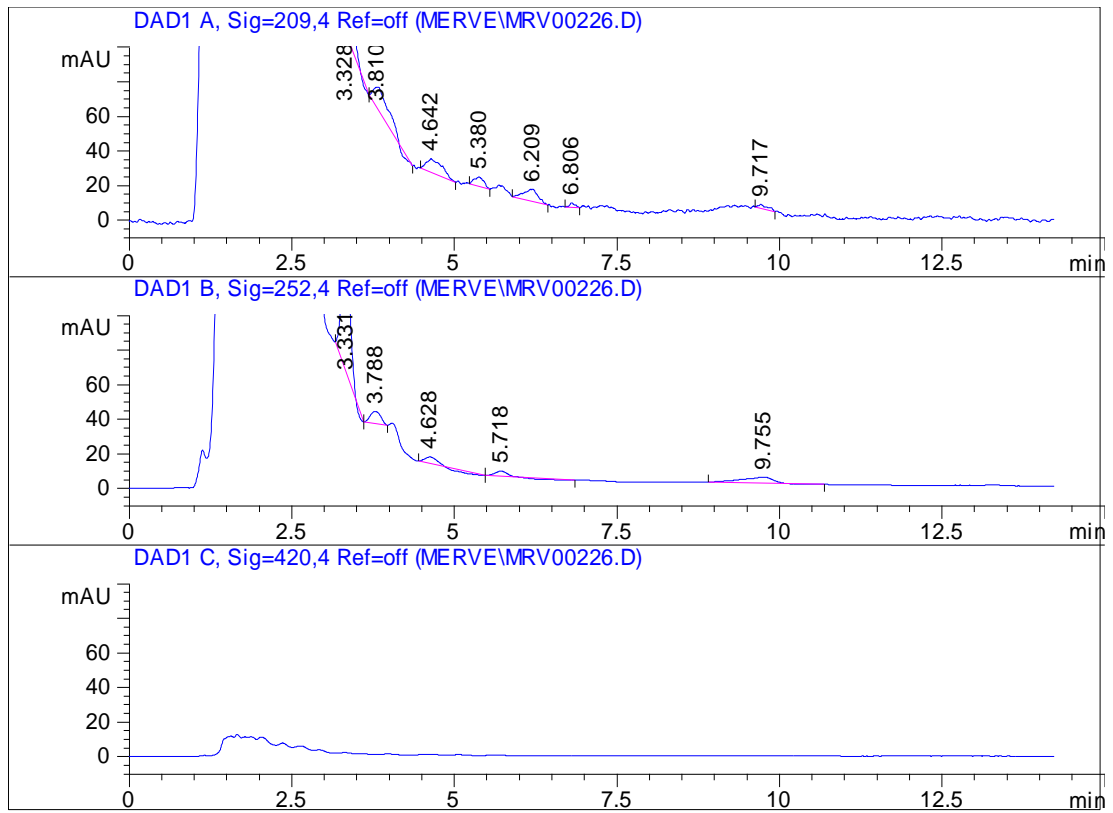
Tablo 4. ASE koşulları

Sıcaklık	Kapalı
Statik Zaman	10 dk
Temizleme Hacmi	60%
Yıkama Zamanı	90 s
Statik Devir	3



Şekil 6.3. Hareketli faz % 0.5 HAC içeren ultra distile su (A) ve % 0.1 HAC içeren metanol (B) karışımı; 45:55 (A:B) ve akış hızı 1 mL/dak olan sistemde, ASE ile ekstrakte edilen kuru ceviz yapraklarının 1:3 seyreltilmesi sonucu 209.4, 252.4 ve 420.4 nm deki kromatogramları.

3. Yöntem: 1.0000 g \pm 0.0005 g ince kıyılan ceviz yaprağı örnekleri ve 1.0000 g \pm 0.0005 g diatom toprak tartılarak filtre kağıdıyla sarıldı. Nihai çözücü olarak aseton kullanıldı. 10 mL'lik ekstraksiyon hücresine yerleştirildi. ASE kullanılarak ekstraksiyon gerçekleştirildi. Ekstre evaporatörde 60°C de kuruluğa kadar uçuruldu. Kalıntılar 5 mL asetonunda çözüldü. 0.45 μ m membran filtreden süzülerek 0.5 % asetik asit içeren sulu faz (A Fazı) ve 0.1 % lik asetik asit içeren metanol (B Fazı) hareketli fazının oranı 45:55 (A:B) ve akış hızı 1 mL/dak olan HPLC sistemine 25 μ L enjekte edildi. İlgili kromatogram Şekil 6.4' te verilmiştir.

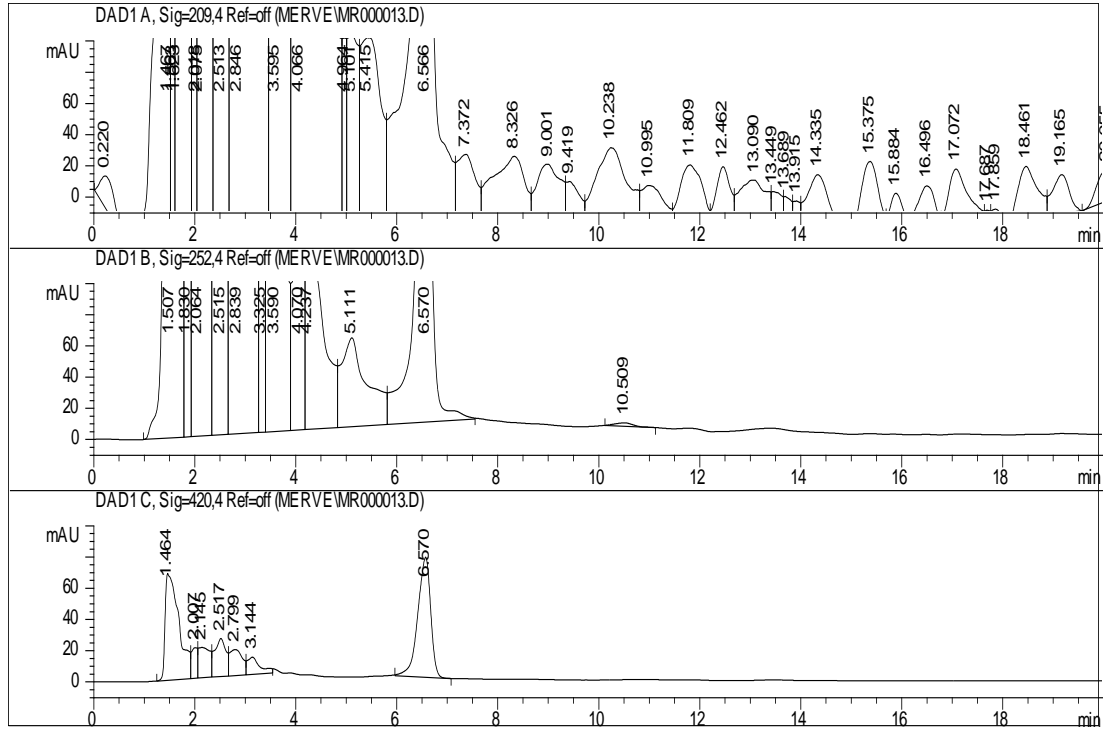


Şekil 6.4. Hareketli faz % 0.5 HAc içeren ultra distile su (A) ve % 0.1 HAc içeren metanol (B) karışımı; 45:55 (A:B) ve akış hızı 1 mL/dak olan sistemde, ASE ile ekstrakte edilen kuru ceviz yapraklarının asetonunda çözülmesi sonucu 209.4, 252.4 ve 420.4 nm deki kromatogramları.

Juglon'un karakteristik olarak yaş ceviz yapraklarında bulunduğunu; bununla birlikte polimerizasyon nedeniyle kuru yapraklarda artık miktarda bulunabileceği rapor edilmiştir (5,6,31). Bu doğrultuda yapılan analizler sonucunda kuru ceviz yapraklarında juglon pikinin tespit edilmemesi sonucu literatür ile uyumluluk göstermektedir.

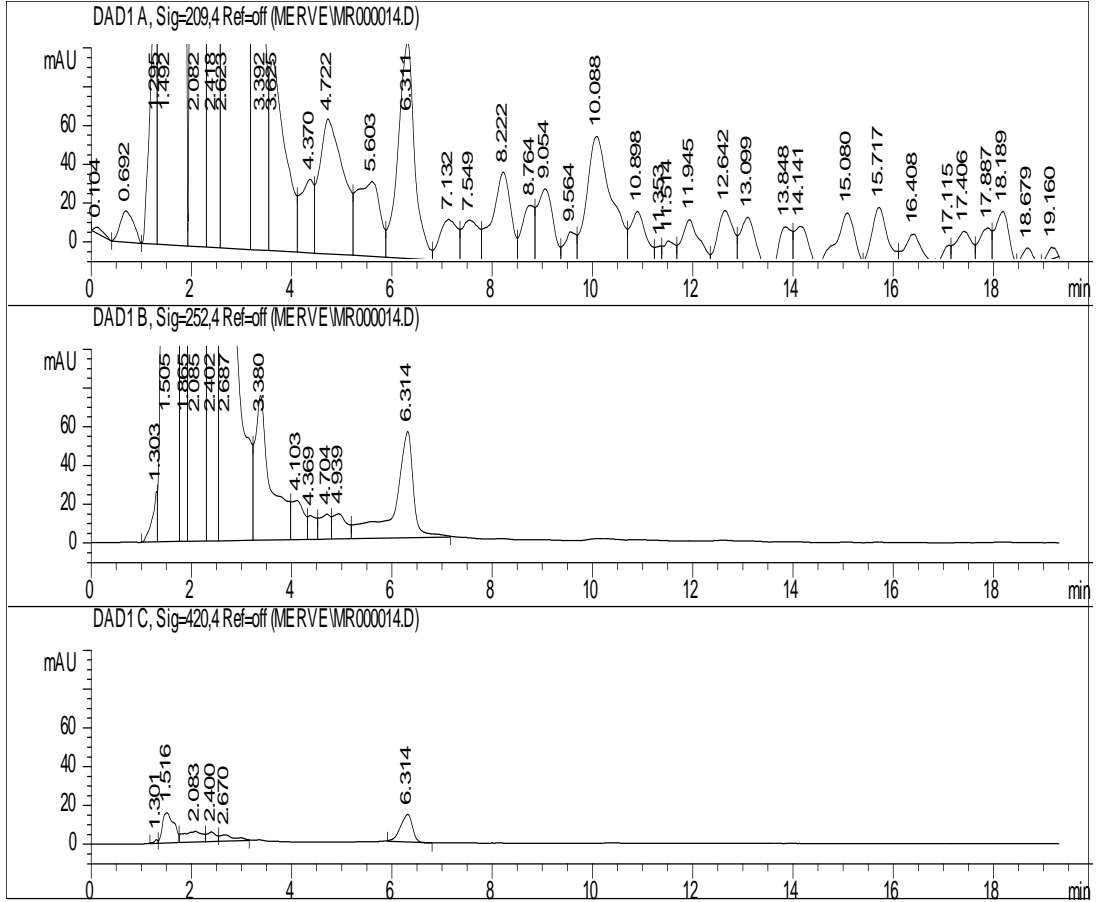
4.1.4. Yaş ceviz yapraklarının analizi

Kasım 2012’de Malatya Meyvecilik Araştırma Enstitüsü’nden toplanılan yaş ceviz yaprakları 1 ay 4°C’ de bekletildikten sonra ince ince kıyıldı. 1.0000 ± 0.0005 g ince kıyılan yaş ceviz yaprağı örnekleri ve 1.0000 ± 0.0005 g diatom toprak tartılarak filtre kağıdıyla sarıldı. 10 mL’lik ekstraksiyon hücresine yerleştirildi. ASE kullanılarak ekstraksiyon gerçekleştirildi (ASE koşulları daha önceki analizlerle aynı). Ekstre evaporatörde 60°C de kuruluğa kadar uçuruldu. Kalıntılar 10 mL metanolde çözüldü. Santrifüjde 25°C de, 2500 rpm hızla 5 dakika boyunca santrifüjlendi. Santrifüjlenme işleminden sonra çözelti aktarıldı ve 0.45 µm membran filtreden süzülerek 0.5 % asetik asit içeren sulu faz (A Fazı) ve 0.1 % lik asetik asit içeren metanol (B Fazı) hareketli fazının oranı 45:55 (A:B) ve akış hızı 1 mL/dak olan HPLC sistemine 25 µL enjekte edildi. İlgili kromatogram Şekil 7.1’ de verilmiştir.



Şekil 7.1. Hareketli faz % 0.5 HAC içeren ultra distile su (A) ve % 0.1 HAC içeren metanol (B) karışımı; 45:55 (A:B) ve akış hızı 1 mL/dak olan sistemde, ASE ile ekstrakte edilen yaş ceviz yapraklarının 209.4, 252.4 ve 420.4 nm’deki kromatogramları.

Örnekte juglon piki gözlemlendi fakat çözelti çok derişik olduğu için seyreltilmesi uygun görüldü. Çözelti 1:4 metanolla seyreltilip tekrar aynı HPLC sistemine 25 µL enjekte edildi. İlgili kromatogram Şekil 7.2’ de verilmiştir. 6.314 dakikada gelen pik juglon’a aittir.



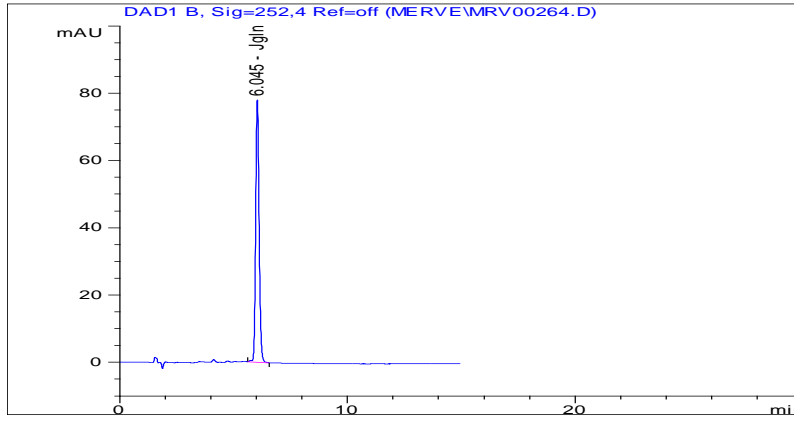
Şekil 7.2. Hareketli faz % 0.5 HAc içeren ultra distile su (A) ve % 0.1 HAc içeren metanol (B) karışımı; 45:55 (A:B) ve akış hızı 1 mL/dak olan sistemde, ASE ile ekstrakte edilen yaş ceviz yapraklarının metanolla 1:4 seyreltilmesi sonucu 209.4, 252.4 ve 420.4 nm’deki kromatogramları. r: 6.314

Elde edilen sonuçlar ışığında hareketli faz 45:55 (A:B) oranında 0.5 % HAc içeren ultra distile su (A) ve 0.1 % HAc içeren metanol (B) karışımı ve dalga boyunu 252.4 nm olan HPLC sisteminde çalışmaların devam ettirilmesine karar verilmiştir.

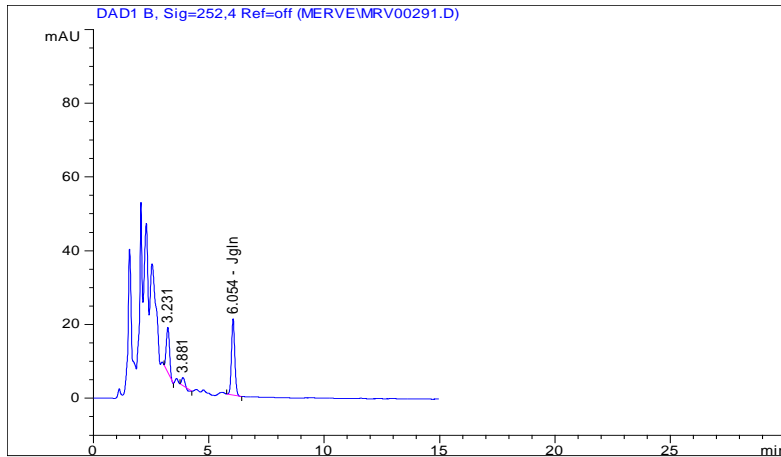
4.1.5. Standart juglon ile yaş ceviz yaprağında bulunan juglon spektrumlarının karşılaştırılması

Bölüm 4.1.4. Yaş ceviz yapraklarının analizinde verilen örnek ekstraksiyonu yöntemi ve HPLC sistemi kullanılarak Şekil 8.2’ deki kromatogram alınmıştır. Seyreltik juglon standardı da yine aynı HPLC sistemine verildikten sonra Şekil 8.1’ deki kromatogram alınmıştır.

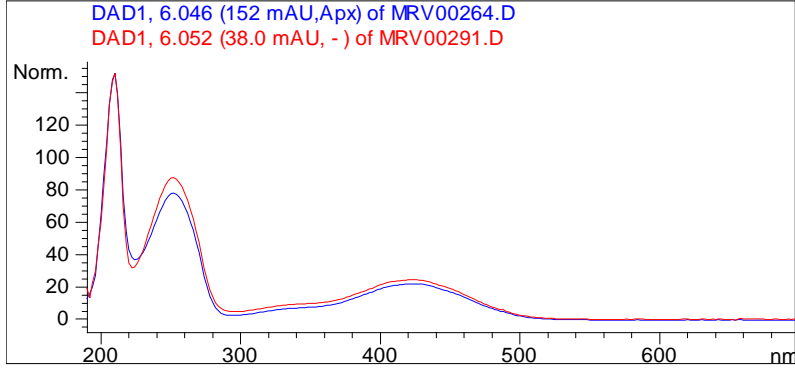
Şekil 8.3’ teki spektrumlarda görüldüğü gibi, standart juglon pikine ait spektrum ile yaş yaprak ekstresi pikinin spektrumu birebir çakışmaktadır. Sonuç olarak, yaş yaprakta bulunan bu maddenin juglon olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 8.1. Konsantrasyonu 1.15×10^{-4} olan seyreltik juglon standardının 252.4 nm’ deki spektrumu.



Şekil 8.2. Örneğin spektrumu.



Şekil 8.3. Seyreltik juglon standardı ve yaş yaprak ekstresinin spektrumları.

4.1.6. Standarda ait pik parametreleri

Standarda ait;

Kuyrulanma faktörü 1.145

Simetri değeri 0.844

Örneğe ait;

Simetri değeri 0.887

Kuyruklanma faktörü 1.063

Resolüsyon (yarı genişlik yöntemi ile) 8.326

4.2. Ölçü Eğrisi Oluşturulması

10 mg juglon tartıldı, metanol ile 10 mL'ye tamamlanarak $5.74 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ konsantrasyonundaki stok standart juglon çözeltisi hazırlandı. Stok juglon çözeltisinden sırasıyla 20, 50, 150, 300, 450 μL alınarak 10 mL'lik balon jöjelerde hacimce metanol ile 10 mL'ye tamamlandı. Bu işlemler üçer kez tekrarlanarak üç farklı ölçü eğrisi oluşturuldu. Ölçü eğrileri beş nokta ile oluşturuldu. Her bir ölçü eğrisi için üç farklı tartım alınarak üç stok juglon çözeltisi hazırlandı. Ölçü eğrilerindeki her bir nokta için üçer enjeksiyon yapıldı.

Her bir ölçü eğrisi ve her bir enjeksiyona ait alanlar, alanların ortalamaları, standart sapmaları (SD) ve bağıl standart sapmaları (RSD) Tablo 5.1, Tablo 5.2 ve Tablo 5.3'te verilmiştir.

Kromatografik Koşullar

Kolon: Luna 5 μ C18(2) 250 mm * 4.6 mm

Hareketli faz A: % 0.5 HAc içeren ultra distile su

Hareketli faz B: % 0.1 HAc içeren ultra distile su

Dedektör: DAD, λ : 252.4 nm

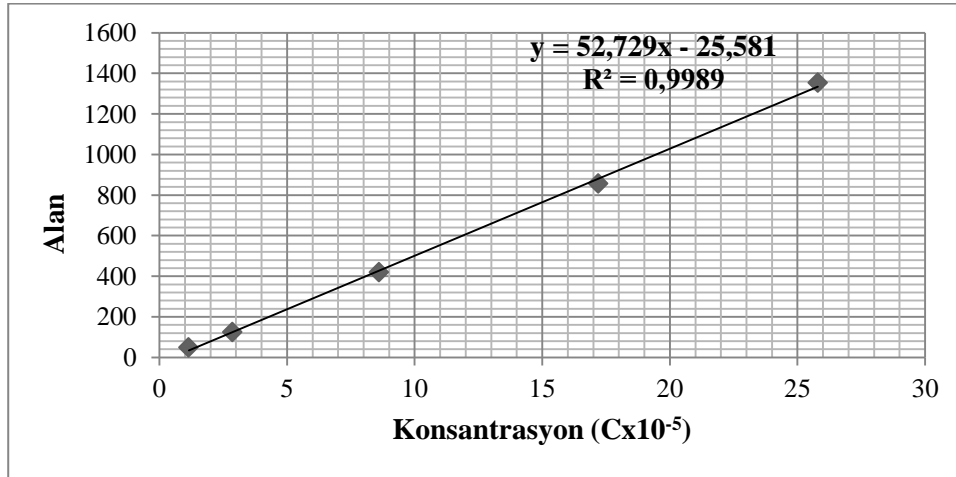
Akış hızı: 1.000 ml/dak

Enjeksiyon hacmi: 10 μ L

Sıcaklık: 25 °C

Tablo 5.1. C1 isimli ölçü eğrisinde elde edilen pik alanları, pik alanlarının ortalamaları (A_0), standart sapmaları (SD) ve bağıl standart sapmaları (RSD).

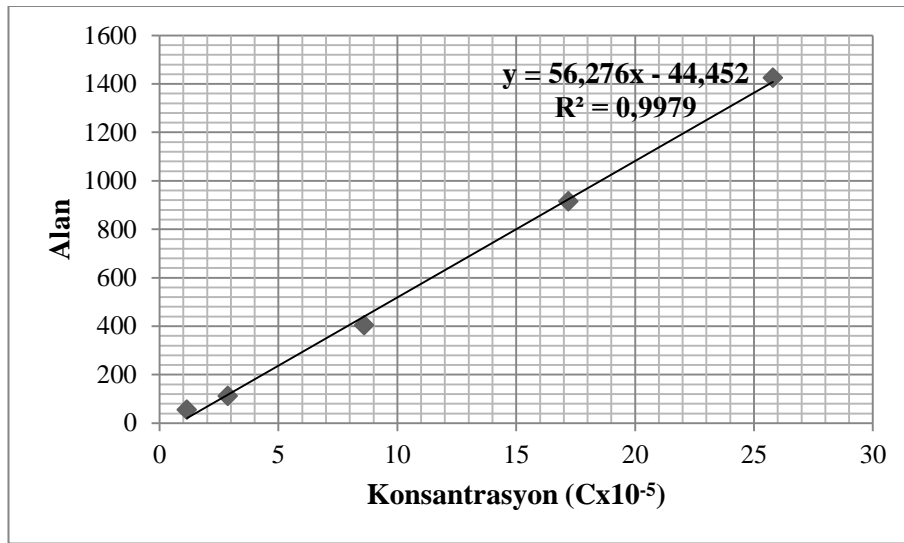
Örnek No	C x 10 ⁻⁵ (mol.L ⁻¹)	Alan Değerleri				SD	RSD
		A ₁	A ₂	A ₃	A ₀		
1	1.15	50,2	50,2	49,3	49,9	0,519	1,041
2	2.87	126	124,2	126,3	125,5	1,135	0,905
3	8.61	423,3	420,3	416,2	419,933	3,564	0,848
4	17.2	861,8	856,2	851,6	856,533	5,108	0,596
5	25.8	1359,1	1352,4	1349,2	1353,567	5,052	0,373



Şekil 9.1. C1 isimli ölçü eğrisinin grafiği ($y = 52.729x - 25.581$).

Tablo 5.2. C2 isimli ölçü eğrisinde elde edilen pik alanları, pik alanlarının ortalamaları (A_0), standart sapmaları (SD) ve bağıl standart sapmaları (RSD).

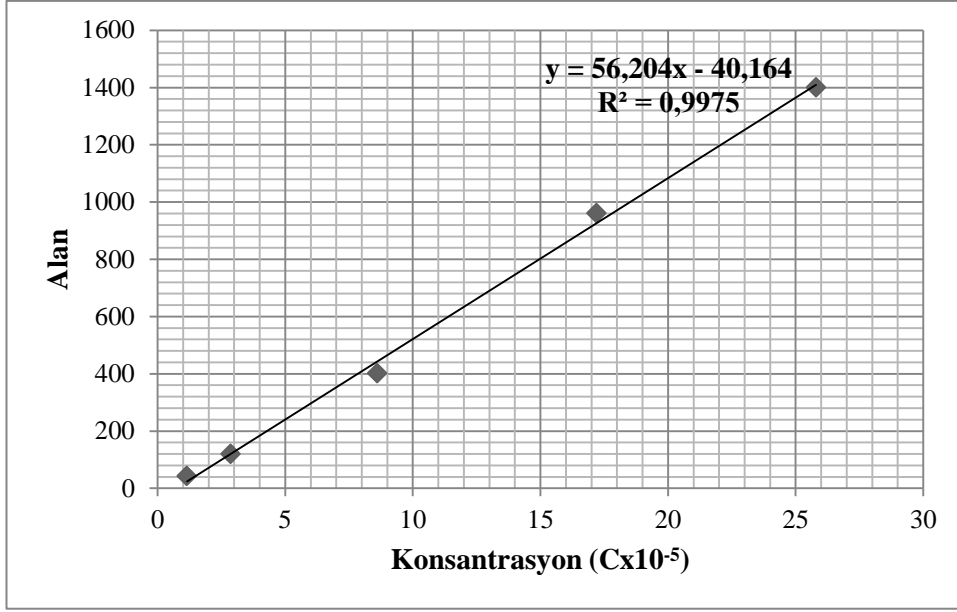
Örnek No	$C \times 10^{-5}$ (mol.L ⁻¹)	Alan Değerleri				SD	RSD
		A_1	A_2	A_3	A_0		
1	1.15	56,5	52,0	54,0	54.17	2.255	4.162
2	2.87	110,9	111,7	111,0	111.2	0.435	0.392
3	8.61	400,2	403,8	406,4	403.467	3.113	0.771
4	17.2	918,2	915,2	911,7	915.03	3.253	0.355
5	25.8	1429,5	1421,5	1422,6	1424.533	4.336	0.304



Şekil 9.2. C2 isimli ölçü eğrisinin grafiği ($y = 56.276x - 44.452$).

Tablo 5.3. C3 isimli ölçü eğrisinde elde edilen pik alanları, pik alanlarının ortalamaları (A_0), standart sapmaları (SD) ve bağıl standart sapmaları (RSD).

Örnek No	$C \times 10^{-5}$ (mol.L ⁻¹)	Alan Değerleri				SD	RSD
		A_1	A_2	A_3	A_0		
1	1.15	44,1	42,5	41,9	42.833	1.137	2.655
2	2.87	129,4	115,7	115,0	120.033	8.119	6.764
3	8.61	402,3	403,0	400,3	401.866	1.401	0.348
4	17.2	961,2	967,7	953,1	960.666	7.314	0.761
5	25.8	1409,9	1409,3	1381,9	1400.367	15.995	1.142



Şekil 9.3. C3 isimli ölçü eğrisinin grafiği ($y = 56.204x - 40.164$).

En küçük kareler yöntemiyle elde edilen doğruların regresyon analizi yapıldı. Doğru denklemi $y = mx + a$ (a : kayım, m : eğim), korelasyon katsayısının karesi r^2 olarak ifade edildi. Doğru denklemleri Şekil 9.1, Şekil 9.2 ve Şekil 9.3' te verilmiştir.

Tablo 5.4'te belirtilen A_1 , A_2 , A_3 ifadeleri alan değerleri olup A_0 ortalama alan değerini belirtir. SD standart sapma değeri olup, RSD ifadesi bağıl standart sapma değeridir.

Tablo 5.4. Ölçü eğrilerine ait doğru denklemlerinin eğim, kayım değerlerinin standart sapma (SD) ve bağıl standart sapma (RSD) değerleri.

	C1	C2	C3	SD	RSD
m (eğim)	52.729	56.276	56.204	2,0274	3,6815
a (kayım)	-25.581	-44.452	-40.164	9,8924	-26,931
r^2 (korelasyon katsayısının karesi)	0.9989	0.9979	0.9975	0,0007	0,0722

Çalışmalar sonucunda doğru denklemi $y = 55.070 x - 36.732$ olarak bulundu.

Tayin konsantrasyon aralığı $1.15 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1} - 25.8 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ olarak belirlenmiştir.

Gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) teorik olarak hesaplanmış ve aşağıda verilen değerler bulunmuştur:

$$\text{LOD} = 1.3 \text{ ng/mL}$$

$$\text{LOQ} = 1.6 \text{ ng/mL}$$

4.3. Örneklerdeki Juglon Miktarı

Bölüm 4.1.4. Yaş ceviz yapraklarının analizi'nde belirtilen HPLC sistemi ve örnek hazırlama yöntemi ile Kasım 2012'de Malatya Meyvecilik Araştırma Enstitüsü'nde 6 farklı ağaçtan toplanılan ve 1 ay 4°C' de bekletilmiş olan yaş ceviz yaprakları HPLC sistemine 10 µL enjekte edilmiştir. 6 adet yaprak örneği Örnek 1 (Şebin türü), Örnek 2 (198/110 türü), Örnek 3 (Yalova 2 türü), Örnek 4 (türü bilinmiyor), Örnek 5 (Yalova 1 türü), Örnek 6 (Yalova 3 türü), olarak isimlendirilmiştir. Her bir örnekten 1.0000 ± 0.0005 g'lık olmak üzere üç ardışık tartım alınmış ve her bir tartım için HPLC sistemine üç enjeksiyon verilmiştir. Örneklere ait alan değerleri Şekil.10.1, Şekil.10.2 ve Şekil.10.3' de verilmiştir.

Örnek 1.1	
Enjeksiyon no	Alan
1. enj.	364
2. enj.	347
3. enj.	344
Örnek 1.2	
1. enj.	342
2. enj.	345
3. enj.	346
Örnek 1.3	
1. enj.	547
2. enj.	548
3. enj.	543

Örnek 2.1	
Enjeksiyon no	Alan
1. enj.	559
2. enj.	560
3. enj.	559
Örnek 2.2	
1. enj.	288
2. enj.	290
3. enj.	289
Örnek 2.3	
1. enj.	288
2. enj.	284
3. enj.	282

Şekil 10.1. Örnek 1 ve Örnek 2' nin üç paralel tartımının HPLC sistemindeki alan değerleri.

Örnek 3.1	
Enjeksiyon no	Alan
1. enj.	559
2. enj.	560
3. enj.	559
Örnek 3.2	
1. enj.	288
2. enj.	290
3. enj.	289
Örnek 3.3	
1. enj.	288
2. enj.	284
3. enj.	282

Örnek 4.1	
Enjeksiyon no	Alan
1. enj.	347
2. enj.	359
3. enj.	351
Örnek 4.2	
1. enj.	1073
2. enj.	1069
3. enj.	1067
Örnek 4.3	
1. enj.	1380
2. enj.	1380
3. enj.	1380

Şekil 10.2. Örnek 3 ve Örnek 4' ün üç paralel tartımının HPLC sistemindeki alan değerleri.

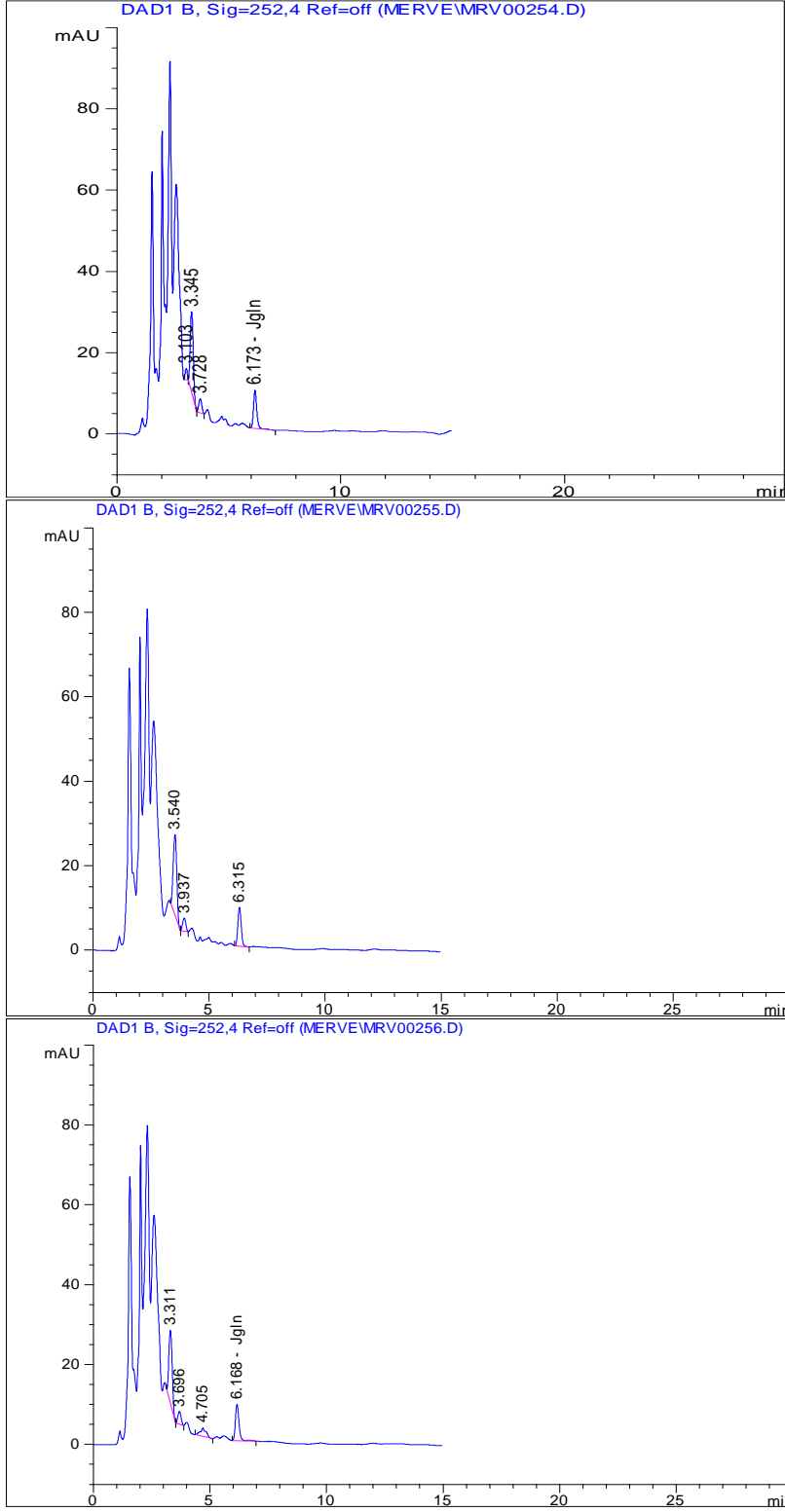
Örnek 5.1	
Enjeksiyon no	Alan
1. enj.	208
2. enj.	208
3. enj.	207
Örnek 5.2	
1. enj.	443
2. enj.	441
3. enj.	435
Örnek 5.3	
1. enj.	822
2. enj.	819
3. enj.	814

Örnek 6.1	
Enjeksiyon no	Alan
1. enj.	486
2. enj.	443
3. enj.	440
Örnek 6.2	
1. enj.	865
2. enj.	909
3. enj.	920
Örnek 6.3	
1. enj.	925
2. enj.	945
3. enj.	943

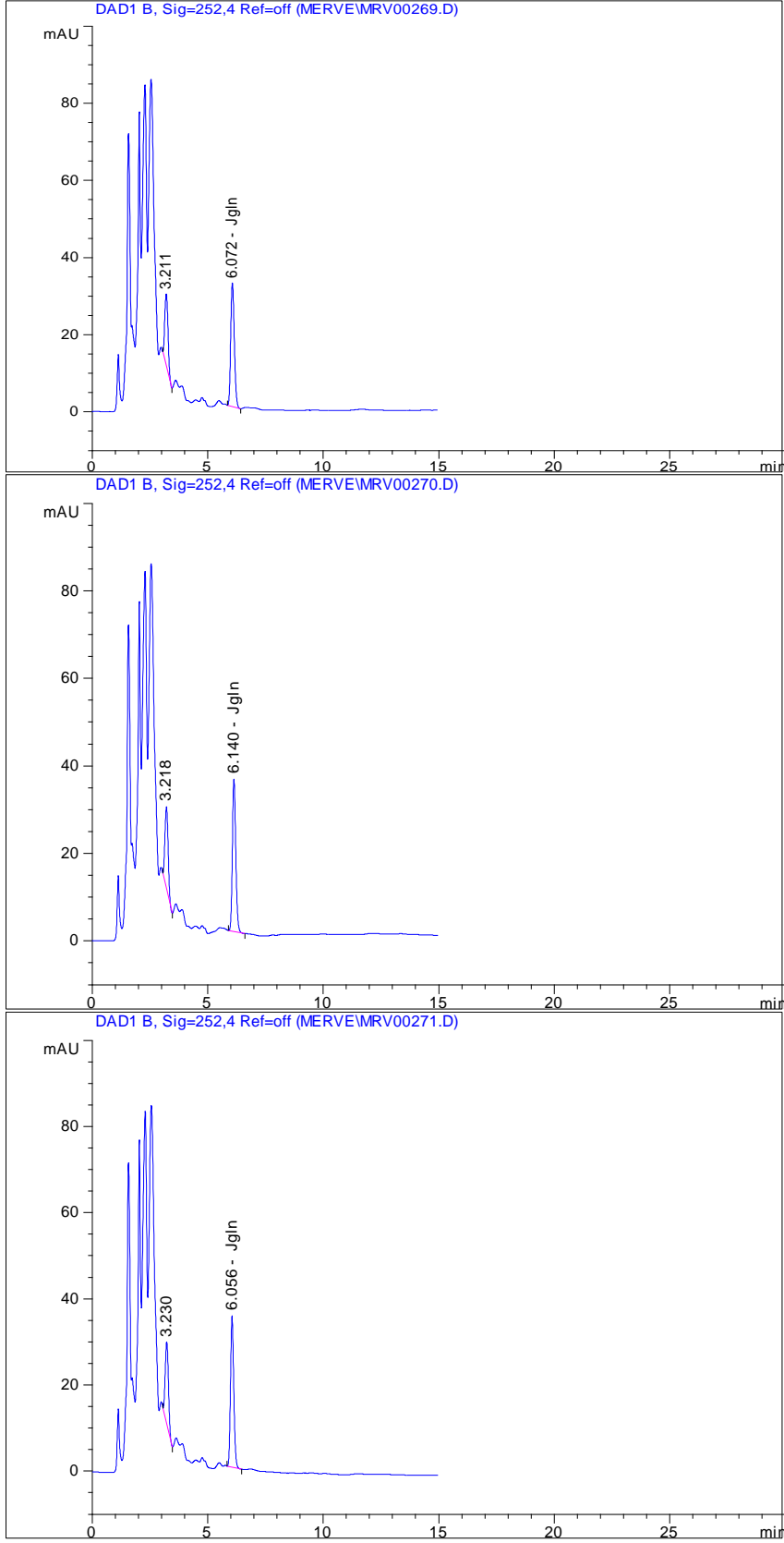
Şekil 10.3. Örnek 5 ve Örnek 6' nın üç paralel tartımının HPLC sistemindeki alan değerleri.

Örneklerde bulunan juglon miktar aralıkları, hesaplanarak aşağıda verilmiştir.

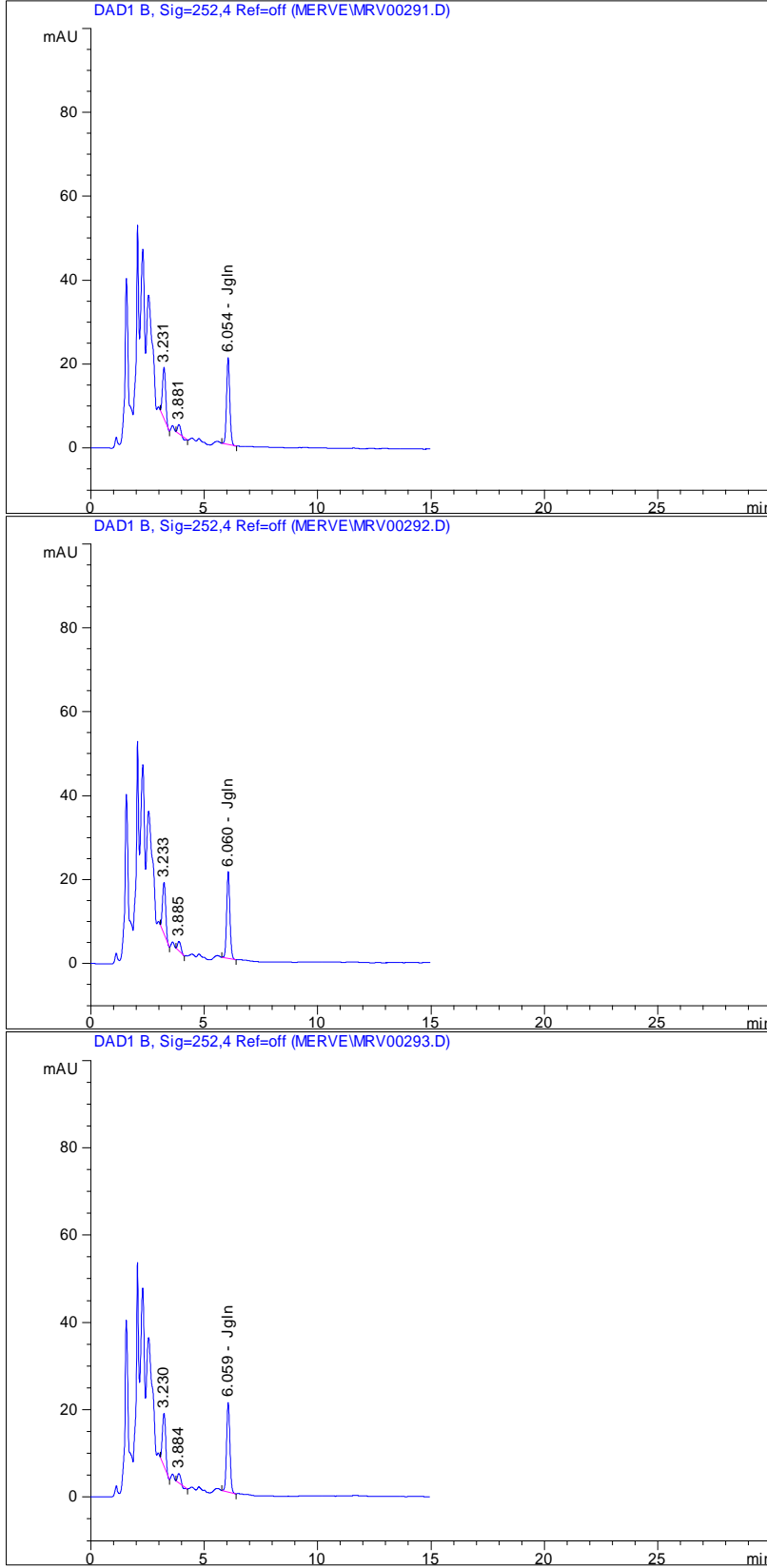
1. örnekte bulunan juglon miktarı: 0.480 - 0.740 mg / 1g yaş yaprak
2. örnekte bulunan juglon miktarı: 0.408 - 0.754 mg / 1g yaş yaprak
3. örnekte bulunan juglon miktarı: 0.134 - 0.170 mg / 1g yaş yaprak
4. örnekte bulunan juglon miktarı: 0.533 - 1.790 mg / 1g yaş yaprak
5. örnekte bulunan juglon miktarı: 0.309 - 1.080 mg / 1g yaş yaprak
6. örnekte bulunan juglon miktarı: 0.624 - 1.230 mg / 1g yaş yaprak



Şekil.11.2. Örnek 3.1' in ilk tartımının kromatogramı.



Şekil.11.3. Örnek 4.1' in ilk tartımının kromatogramı.

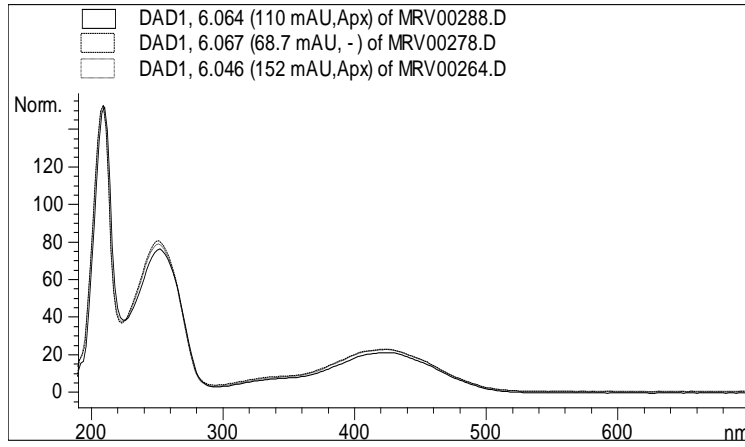


Şekil 11.4. Örnek 5.1' in ilk tartımının kromatogramı.

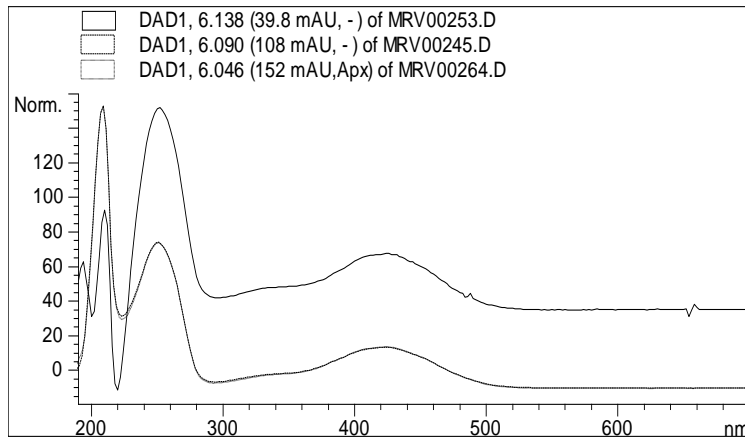
4.3.2. Örneklerin spektrumu ile seyreltik Juglon spektrumu kıyaslaması

Örneklere ait 1. ve 3. tartımların spektrumları seyreltik stok standardının (SSS) spektrumu ile karşılaştırılarak örneklerdeki juglon varlığı ispatlanmış oldu. İlgili spektrumlar Şekil 12.1, Şekil 12.2, Şekil 12.3, Şekil 12.4, Şekil 12.5 ve Şekil 12.6' da verilmiştir.

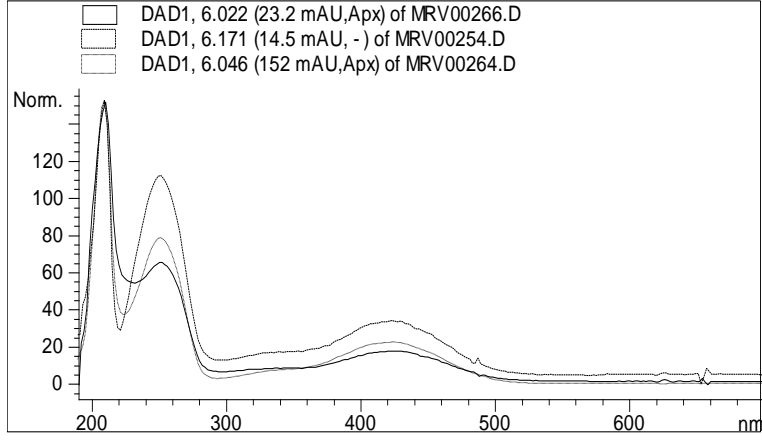
SSS Hazırlanması: 5 mg juglon 25 metanolde çözülerek Stok çözelti hazırlandı. Bu stoktan 1 mL çekilip balon jøjede hacmi 10 mL olan kadar metanol ile tamamlandı.



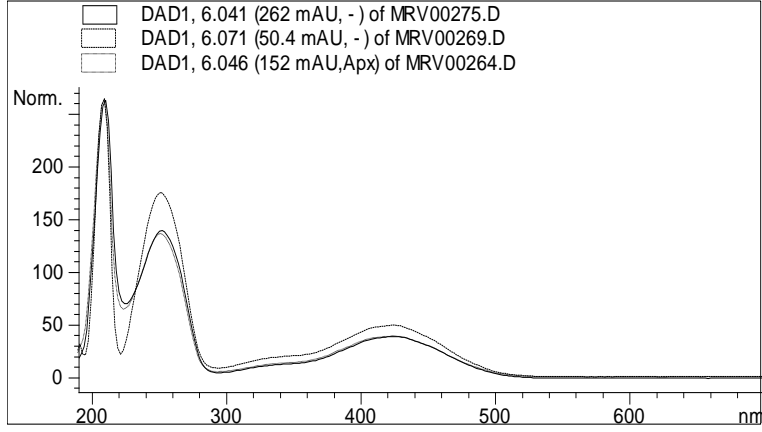
Şekil 12.1. Örnek 1.3, Örnek 1.1 ve SSS spektrumları.



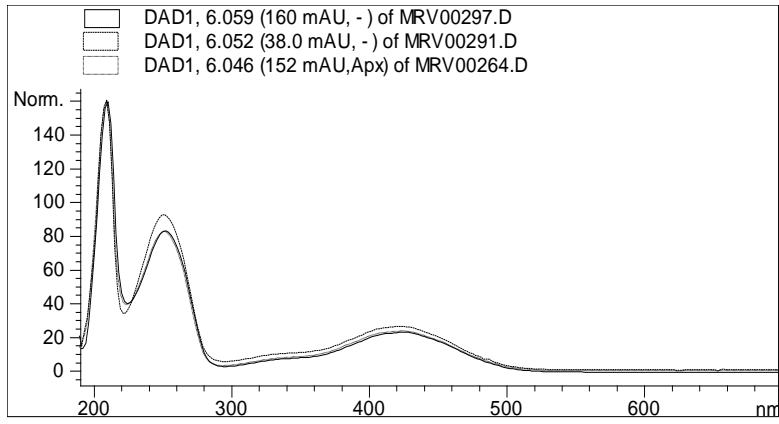
Şekil 12.2. Örnek 2.3, Örnek 2.1 ve SSS spektrumları.



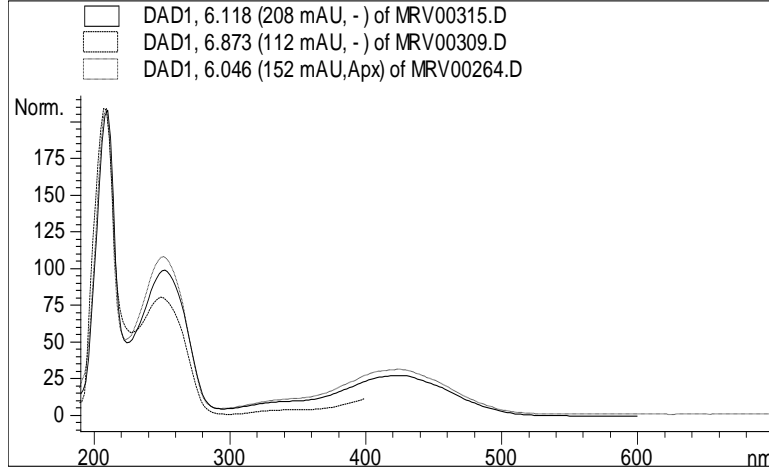
Şekil 12.3. Örnek 3.3, Örnek 3.1 ve SSS spektrumları.



Şekil 12.4. Örnek 4.3, Örnek 4.1 ve SSS spektrumları.



Şekil 12.5. Örnek 5.3, Örnek 5.1 ve SSS spektrumları.



Şekil 12.6. Örnek 6.3, Örnek 6.1 ve SSS spektrumları.

4.4. Geri Kazanımın Hesaplanması

Gerı kazanım hesabı için Örnek 6'dan (Yalova 3) yapılan üç paralel tartım (Örnek 6.1, Örnek 6.2, Örnek 6.3) Bölüm 4.1.4. Yaş ceviz yapraklarının analizi'nde verilen örnek ekstraksiyonu yöntemi kullanılarak izole edilmiş ve yine 4.1.4. bölümünde verilen HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Bu tartımlara ait alan değerleri “boş” olarak tabloda verilmiştir.

Stok çözeltinin hazırlanması: Juglon standardından 10 mg tartılmış ve metanol (10 mL) ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

Örnek 6'dan (Yalova 3) üç paralel tartım daha yapılarak Bölüm 4.1.4. Yaş ceviz yapraklarının analizi'nde verilen örnek ekstraksiyonu yönteminden önce, stok çözeltiden 200 µL çekilerek ekstraksiyon hücresine enjekte edilmiştir. Sonrasında 4.1.4. bölümünde verilen ekstraksiyon yöntemi ile devam edilmiş ve örnekler yine 4.1.4. bölümünde verilen HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Bu tartımlara ait alan değerleri “+200 µL” olarak tabloda verilmiştir.

Tablo 6.1. Örnek 6.1, Örnek 6.2, Örnek 6.3'ün stok çözelti eklenmeden ve eklendikten sonraki alan değerleri.

	Örnek 6.1	Örnek 6.2	Örnek 6.3
Boş	187.8	77.6	67.3
+200 µL	740.3	635	637.5

Tablo 6.2. Geri kazanım değerleri (%).

% Geri Kazanım	
Örnek 6.1	92.7
Örnek 6.2	93.5
Örnek 6.3	95.7

Çıkan değerler sonucunda geri kazanımın bağıl standart sapma değeri (% RSD) 1.35 olarak hesaplanmıştır.

BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Adi Ceviz *Juglans Regia L.* de bulunan naftakinonlardan biri olan Juglon (5-hidroksi-1,4-naftakinon) kimyasal reaktivitesi nedeniyle önemli bir bileşiktir. Geri dönüşlü okside- redüksiyon reaksiyonları sırasında ara ürünler olan serbest radikaller oluşturur (55, 57). Bu serbest radikallerin biyokimyasal süreçlerde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir.

Ceviz bitkisinde ise (Adi Ceviz: *Juglans Regia L.* ve Kara Ceviz: *Juglans Nigra L.*), juglon ile ilişkili iki madde bulunur. Bunlardan biri juglonun indirgenmiş hali olan hidroksijuglon, diğeri ise hidrojuglon glikozididir. Daghish'e göre bu glikozid bir enzim vasıtasıyla hidrolize uğrayarak juglon' u oluşturmakta ve ekstraksiyon sürecinde juglon'a dönüşmektedir (4). Müller ve Leistner'e göre ise hidrojuglon glikozidi ve juglon doğrudan doğruya trihidroksi naftelenden oluşan metabolik son ürünlerdir (58). Diğeri bir görüşe göre ise, hidrojuglon oksidatif koşullar oluştuğunda juglon' a dönüşmektedir (26). Oksidatif koşullar ise, bitki mekanik olarak zarar gördüğünde ya da mikroorganizmalara maruz kaldığında ortaya çıkmaktadır. Bitkinin kendini savunmak için toksik olan juglon' u oluşturduğu anlaşılmaktadır.

Juglon'un bitkinin yaş yapraklarında (3, 5, 6), meyvenin yeşil kabuğunda (10, 30) ve kök iç kabuğunda (59) bulunduğu bildirilmiştir.

Toksik olması, bazı bitkilerin gelişmesini baskılaması ve doğal insektisit olması; çok güçlü antioksidan ve antimikrobiyal özelliğe sahip olması ile önemli bir kimyasal maddedir (7-13).

Ekolojik açıdan önemli olan bir husus ise, bu etkilerinin diğeri canlılara zarar vermeden, sadece etkili olduğu bitki ya da insekti seçerek ortaya çıkması ve ayrıca toksik formunun çok dayanıklı olmaması, kimyasal süreçler sonucunda muhtemelen toksik olmayan türü olan hidrojuglona dönüşmesidir.

Ayrıca, günümüzde naftakinonların anti-kanser ajan olarak kullanımı araştırılmakta olup juglon'un melanoma, kolon kanseri, lösemi ve mide kanseri gibi in vitro insan tümör çeşitlerinde güçlü sitotoksik ajan etkisi de bilinmektedir (14-17).

Juglon' un ceviz ve diğer bazı bitkilerdeki oluşum mekanizmasının, redoks kimyasının ve buna bağlı olarak biyolojik süreçlerde oynadığı rolün anlaşılması için daha fazla sayıda, nitelikli araştırmaya ihtiyaç vardır.

Bu tür araştırmalarda kullanılmak üzere; ayrıca topraktaki miktarlarının belirlenmesi; hayvan ve gelecekteki gönüllü insan denemeleri sonucunda biyolojik sıvılar ve materyaldeki miktarlarının belirlenmesi için güvenilir bir miktar tayini yöntemine ihtiyaç vardır.

Buna karşın, ceviz türlerinde juglon tayini için çok az sayıda çalışma yapılmıştır. 1969 Tarihli bir doktora tezi çalışmasında ekstraksiyon, petrol eteri ile 6 saatte yapılmış ve analiz hareketli faz olarak n-butil alkol- su karışımı kullanılarak kağıt kromatografisi ile gerçekleştirilmiştir. Ölçü eğrisi dört farklı konsantrasyon ile oluşturulmuştur. Sonuçların, standart juglon ile tam olarak uyuşmaması, yazar tarafından juglon'un yüksek saflıkta ayrılmamış olmasına bağlanmıştır (30).

Diğer bir çalışma fluorimetrik olarak yapılmıştır. Dedeksiyon limiti 20 ng/g kloroform olarak verilmiş, fakat yöntem juglon taşıyan herhangi bir örneğe uygulanmamıştır (31).

Hedin, P. A. ve ark gaz sıvı kromatografi metodu önermişler, fakat öncesinde girişim yapan maddelerden ayırmak için ince tabaka kromatografisi uygulamışlardır. Yöntem zaman alıcıdır.

Yaş yapraklarda HPLC ile analiz ilk kez 1998 senesinde ters fazlı dereceli elüsyon sistemi kullanılarak uygulanmıştır. Ekstraksiyon çözücüsü kloroform, HPLC örnek çözücüsü ise metanoldür. Bu çalışmada konsantrasyon aralığı çok dar olup (0.20- 0.50 mg/mL) kalibrasyon eğrisine ilişkin doğru denklemi verilmemiştir. Hata olasılığı yüksek bir yöntemdir (32).

Juglon' un ters fazlı HPLC sistemi ile analizinde iki yaklaşım söz konusudur. juglon ve diğer polifenoller ile antrakinon/ naftakinonların birlikte analiz edildiği yöntemler ki, bu yöntemlerde oldukça apolar olan juglon' un elüe olması uzun bir zaman almaktadır. Çünkü dereceli elüsyon sistemleri öncelikle bağıl olarak polar bileşenlerin elüe olması temeline dayandırılmıştır (35, 60).

Diğer yaklaşım ise, sadece juglon' un analizi üzerine temellenen izokratik sistemlerdir. Bu yöntemlerde analiz süresi daha kısadır (33-36). Bu çalışmada 2. durum tercih edilmiştir.

Literatürde hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu (ASE) ile çalışan sadece bir araştırma gurubu bulunabilmiştir (33, 34). Bu çalışmalardan birinde ASE cihazında uygulanan basınç ve sıcaklığın (40-60°C) juglon' u bozundurduğu rapor edilmiştir (34). Buna karşın bizim çalışmamızda oda sıcaklığı kullanılmıştır. Bu çalışmada ASE uygulanmayan standart spektrumları ile uygulanan örnek spektrumları birbiri ile tamamen çakıştığı için, oda sıcaklığında ASE' nin juglon' u bozundurmadığını göstermektedir. Bu yazarların, ilk çalışmasındaki konsantrasyon aralığı bizim çalışmamızdaki konsantrasyon aralığı ile uyum göstermektedir. 1.7 - 25 µg/mL (33), bu çalışmada 2 - 45 µg /mL' dir. Bizim çalışmamızın konsantrasyon aralığı daha geniştir. Buna karşın, aynı yazarların diğer çalışmasında kimyasal maddeler, kromatografik koşullar tamamen aynı olduğu halde konsantrasyon aralığı 0.1 - 35 µg/mL olarak değişmiş, fakat bunun nedeni açıklanmamıştır (34). Ayrıca, aynı çalışmada metanoldeki juglon standart çözeltisi spektrumu ile örnekteki juglon türevinin metanoldeki çözeltisi üst üste verilmiştir. Bunların maksimum dalga boylarının (biri diğerinden kaymış olarak) 240 nm civarında olduğu gözlenmektedir. Oysa bizim çalışmamızda metanol çözeltisinin maksimum dalga boyu 250 - 252 nm' dedir ki, bu diğer çalışmalardaki maksimum dalga boyları ile uyum içindedir (32, 36).

Bu çalışmada; hem ekstraksiyon, hem de kromatografik analizde çözücü olarak saf metanol kullanılmasının nedeni juglon' un sulu çözeltilerde nötrale yakın ve bazik pH' larda redoks reaksiyonları vermesi ve ortamda birden fazla türün bulunabilmesidir. Juglon' un sulu çözeltide ve özellikle yüksek pH' larda stabil

olmadığı anlaşılmaktadır. Ayrıca, metanolde ve asetonitrilde uzun süre bekletilirse daha kısa sürede bozunduğu rapor edilmiştir.

Yapığımız çalışmada, güvenilir bir miktar tayini yöntemi geliştirilmiş, juglon 6 dakika gibi kısa bir sürede elüe olmuştur. Örneğe ilişkin pik simetri değerlerinin düşük çıkması ve standart spektrumları ile birebir çakışması (Şekil 12.1 – Şekil 12.6), juglon' un analiz koşullarında bozunmadığına işaret etmektedir. Bunda ASE' nin kapalı bir sistem olması, çözücü olarak % 100 metanol kullanılması, önceki çalışmalardan farklı olarak oda sıcaklığında çalışılması belirleyici olmuştur. Yöntem, toprakta ve diğer bitkilerdeki juglon analizinde kullanılmak için uygundur.

Ölçü eğrisinde kayım değerinin negatif olması standardın % 97 saflıkta olmasından kaynaklanabilir. Daha saf bir standart elde etmek için ise, juglon'u yüksek miktarda içeren bir ekstraktan süblimleştirme yoluyla elde etmektir. Bu çalışmada süblimleştirme yapılmamıştır. Pazarda böyle bir standart bulunmadığı için, bu çalışmadakinden daha düşük miktarlarda ve insan sağlığını ilgilendiren bir konuda analiz yapılacağı zaman bu yola başvurulmalıdır.

Yaş yaprak örneklerinde bulunan juglon miktarlarının farklılık göstermesi çeşitli nedenlerden kaynaklanabilir. En önemli faktör, yaş yaprakların tuttuğu su miktarının farklı olması ve örneklerin homojen olarak elde edilememiş olmasıdır. Bunun dışında juglon'un bitkide nasıl oluştuğu konusunda henüz doğrulanmış bir araştırma yoktur. Bu nedenle yapraklardaki miktarın dağılımı konusunda da bir öngörüle bulunulamaz. Örneğin, mekanik bir müdahale sonucu oluşuyorsa, müdahalenin yapıldığı bölgede daha fazla, diğer bir bölgede daha az bulunabilir. Örneklerin liyofilizasyonla kurutulup homojenizatörde karıştırıldıktan sonra, analizinin yapılması bitkide bulunuş şekli hakkında daha çok bilgi verecektir.

KAYNAKLAR

1. Harmancıoğlu M. (1955). Türkiye’de Bulunan Önemli Bitki Boyalarından Elde Olunan Renklerin Çeşitli Müessirlere Karşı Yün Üzerindeki Haslık Dereceleri. Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayın No:7, Ankara.
2. Güngör M. (2007). Kahramanmaraş yöresinde yayılış gösteren ceviz (*Juglans regia* L.) bitkisinin yapraklarından bazı naftakinonların (Juglon ve 1,2 naftakinon) kromatografik izolasyonları ve tekstil boyar maddesi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi.
3. Girzu M, Carnat Privat AM, Fialip J, Carnat AP, Lamaison JL. (1998). Sedative Effect of Walnut Leaf Extract and Juglone, an Isolated, *Pharmaceutical Biology*, Vol. 36, No. 4, pp. 280–286.
4. Daghish C. (1950). The isolation and identification of a hydrojuglone glucoside occurring in the walnut. *Biochem. J.* 47. 452-457.
5. Bruneton J. (1993). *Pharmacologie, phytochimie, plantes me´dicinales*. Tec.& Doc.- Lavoisier, Paris, p. 348.
6. Wichtl M, Anton R. (1999). *Plantes the´rapeutiques*. Tec.& Doc., Paris, pp. 291–293.
7. Clark AM, Jurgens TM (1990). Huff ord CD. Antimicrobial activity of juglone. *Phytother Res* 4:11 14.
8. Ji YB, Qu ZY, Zou X. (2009). Juglone-induced apoptosis in human gastric cancer SGC-7901 cells via the mitochondrial pathway. *Exp. Toxicol. Pathol.* 63:69–78.
9. Alkhawajah AM. (1997) Studies on the antimicrobial activity of *Juglans regia*. *Am J Chin Med* 25:175-180.
10. Amaral JS, Seabra RM, Andrade PB, Valentao P, Pereira JA, Ferreres F. (2004). Phenolic profile in the quality control of walnut (*Juglans regia* L.) leaves. *Food Chem* 88:373-79.
11. Mehrabian S, Majd A, Majd I. (2000). Antimicrobial effects of three plants (*Rubai tinctorum*, *Carthamus tinctorius* and *Juglans regia*) on some airborne microorganisms. *Aerobiologia* 16:455-58.

12. Oliveira I, Sousa A, Ferreira Isabel CFR, Bento A, Estevinho L, Pereira JA. (2008). Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. *Food Chem Toxicol* 2008 doi:10.1016/j.fct.2008.03.017, early online article.
13. Yiğit D, Yiğit N, Aktaş E, Özgen U. (2009). Ceviz yaprak özütleri ve juglonun kavunda vejetatif ve generatif büyüme üzerine etkileri, *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 39 (1-2):7-11.
14. Kamei H, Koide T, Kojima T, Hashimoto Y, Hasegawa M. (1998). Inhibition of cell growth in culture by quinones. *Cancer Biother. Radiopharm.* 13:185–188.
15. Kiran Aithal B, Sunil Kumar MR, Nageshwar Rao B, Udupa N, Satish Rao BS. (2009). Juglone, a naphthoquinone from walnut, exerts cytotoxic and genotoxic effects against cultured melanoma tumor cells. *Cell Biol. Int.* 33:1039–1049.
16. Segura Aguilar J, Jonsson K, Tidefelt U, Paul C. (1992). The cytotoxic effects of 5-OH- 1,4-naphthoquinone and 5,8-diOH-1,4-naphthoquinone on doxorubicin-resistant human leukemia cells (HL-60). *Leuk. Res.* 16:631–637.
17. Zheng HQ, Ji YB, Qu ZY, Zou X. (2009). Induction of mitochondrion-mediated apoptosis of SGC-7901 cells by juglone and Bcl-2/Bax expression. *J. Pharmacol. Sci.* 109:183p–p.
18. Thomson RH. (1971). *Naturally Occurring Quinones*. Academic Press, New York.
19. Hale MG, Orcutt DM. (1987). *The physiology of plants under stress*, Blacksburg, Virginia, USA, 206p.
20. Piedrahita O. (1984). Black walnut toxicity, Factsheet, 11, 7-8.
21. Turan E. (2003). Juglon'un kavun fidelerinde protein ve enzim parametreleri üzerine etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı, Kütahya.
22. Terzi I, Kocaçalışkan I, Benlioğlu O, Solak K. (2003). Effects of juglone on growth of cucumber seedlings with respect to physiological and anatomical parameters, *Biologia Plantarum* 47 (2):317-319.

23. Kocaçalışkan I, Terzi I. (2001). Allelopathic effects of walnut leaf extracts and juglone on seed germination and seedling growth, *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 76, 436-440.
24. Lindroth RL, Anson BD, Weisbrod AV. (1990). Effects of protein and juglone on gypsy moths: growth performance and detoxification enzyme activity. *Journal of Chemical Ecology* 16, 2533–2547.
25. Thiboldeaux RL, Lindroth RL, Tracy JW. (1994). Differential toxicity of juglone (5- hydroxy-1,4-naphthoquinone) and related naphthoquinones to saturniid moths. *Journal of Chemical Ecology* 20, 1631–1641.
26. Segura-Aguilar J, Hakman J, Rydstorm J. (1992). The effect of 5 OH-1,4 naphthoquinone on Norway spruce seeds during germination, *Plant Physiology.*, 100, 1955- 1961.
27. Whittaker RH, Feeny PP. (1971). Allelochemicals: Chemicals interactions between species, *Science*, 171, 757-771.
28. Tukey HB, Mecklenburg RA. (1964). Influence of foliar leaching on root uptake and translocation of calcium-45 to the stems and foliage of *Phaseolus vulgaris* , *Plant Physiology*, 39(4):533-536.
29. Tekintaş E, Tanrısever A, Mendilcioğlu K. (1988). Cevizlerde (*Juglans regia* L.) juglon izolasyonu ve juglon içeriğinin yıllık değişimi üzerinde araştırmalar, *E. Ü. Ziraat Fak. Der.*, 25, 215-225.
30. Lee KC, Campbell RW. (1969). Nature and occurrence of juglone in *juglons nigra* L. *Hort. Sci.* V. 4(4). 297-298.
31. Van Damme JG, De Nevé RE. (1979). Fluorescence Assay of Hydroxynaphthoquinones, *J. Pharm. Sci.*, 68(1):16-9.
32. Girzu M, Fraisse D, Carnat AP, Carnat A, Lamaison J. (1998). High-performance liquid chromatographic method for the determination of juglone in fresh walnut leaves, *Journal of Chromatography A*, 805, 315–318.
33. Babula P, Mikelova R, Potesil D, Adam V, Kizek R, Havel L, Sladky Z. (2005). Simultaneous Determination of 1,4-Naphtaquinone, Lawsone, Juglone and Plumbagin by Liquid Chromatography with UV Detection, *Biomed, Papers* 149 (Supplement 1).

34. Babula P, Mikelova R, Adam V, Kizek R, Havel L, Sladky Z. (2006). Using of liquid chromatography coupled with diode array detector for determination of naphthoquinones in plants and for investigation of influence of pH of cultivation medium on content of plumbagin in *Dionaea muscipula*, *Journal of Chromatography B*, 842, 28-35.
35. Novotna P, Pacakova V, Bosakova Z, Stulik K. (1999). High-performance liquid chromatographic determination of some anthraquinone and naphthoquinone dyes occurring in historical textiles, *Journal of Chromatography A*, 863, 235-241.
36. Hadjmohammadi Reza M. (2006). Determination of Juglone (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone) in *Pterocarya fraxinifolia* by RP-HPLC, *Iran J. Chem. Eng.*, Vol. 25, No. 4.
37. Çam M, Hışıl Y. (2006). Basınçlı Solvent Ekstraksiyonu Ve Uygulamaları. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 3; 79-86.
38. Ken L, Landriault M, Fingas ., Llompart M. (2003). Accelerated solvent extraction (ASE) of environmental organic compounds in soils using a modified supercritical fluid extractor , *J. Hazard. Mat.* 102; 93-104.
39. Obana H, Kikuchi K, Okihashi M, Hori S. (1997). Determination of Organophosphorus Pesticides in Foods Using an Accelerated Solvent Extraction System, *Analyst*, 122; 217–220.
40. Richter BE, Ezzell JL, Felix D, Roberts KA, Later DW. (1995). An accelerated solvent extraction system for the rapid preparation of environmental organic compounds in soil, *Am. Lab.* 27; 24-28.
41. Richter BE. (2000). Extraction of Hydrocarbon Contamination from Soils Using Accelerated Solvent Extraction, *J. Chromatogr. A*, 874; 217-224.
42. Drăgan D, Cucu-man S, Mocuna R, Covaci A. (2007). Accelerated solvent extraction method for the determination of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in soil, *Revue Roumaine de Chimie*, 52(6); 597–601.
43. Yarita T. (2001). Extraction Behavior of Accelerated Solvent Extraction of DDT Metabolite from Fish Matrix, *Analytical sciences*, 17; 913-915.

44. Popp P, Keil P, Moder M, Paschke A, Thuss U. (1997). Application of accelerated solvent extraction followed by gas chromatography, high-performance liquid chromatography and gas chromatography–mass spectrometry for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons, chlorinated pesticides and polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in solid wastes, *J. Chromatogr. A*, 774; 203-211.
45. Hubert A, Wenzel KD, Manz M, Weissflog L, Engewald W, Schüürmann G. (2000). High extraction efficiency for POPs in real contaminated soil samples using accelerated solvent extraction, *Anal. Chem.* 72; 1294-1300.
46. Concha-Graña E, Turnes-Carou MI, Muniategui-Lorezo S, Lopez-Mahia P, Fernández- Fernández E, Prada-Rodriguez D. (2004). Development of pressurized liquid extraction and cleanup procedures for determination of organochlorine pesticides in soils , *J. Chromatogr. A*, 1047; 147-155.
47. Sporning S, Bøwadt S, Svensmark B, Björklund E. (2005). Comprehensive comparison of classic Soxhlet extraction with Soxtec extraction, ultrasonication extraction, supercritical fluid extraction, microwave assisted extraction and accelerated solvent extraction for the determination of polychlorinated biphenyls in soil, *J. Chromatogr. A*, 1090; 1–9.
48. Wenzel KD, Hubert A, Manz M, Weissflog L, Engewald W, Schüürmann G. (1998). Accelerated solvent extraction of semivolatile organic compounds from biomonitoring samples of pine needles and mosses”, *Anal. Chem.*, 70; 4827-4835.
49. Müller A, Björklund E, Holst CV. (2001). On-line clean-up of pressurized liquid extracts for the determination of polychlorinated biphenyls in feedingstuffs and food matrices using gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 925; 197-205.
50. De La Cal A, Eljarrat E, Barceló D. (2003). Determination of 39 polybrominated diphenyl ether congeners in sediment samples using fast selective pressurized liquid extraction and purification, *J. Chromatogr. A*, 1021; 165-173.

51. Schantz MM, Nichols JJ, Wise SA. (1997). Evaluation of Pressurized Fluid Extraction for the Extraction of Environmental Matrix Reference Materials, *Anal. Chem.*, 69; 4210-4219.
52. Kenny DV, Olesik SV. (1998). Extraction of Lignite Coal Fly Ash for Polynuclear Aromatic Hydrocarbons: Modified and Unmodified Supercritical Fluid Extraction, Enhanced-Fluidity Solvents, and Accelerated Solvent Extraction, *J. Chromatogr. Sci.*, 36; 59-65.
53. Kaufmann B, Christen P. (2002). Recent Extraction Techniques For Natural Products: Microwave-Assisted Extraction And Pressurised Solvent Extraction, *Phytochemical Analysis*, 13; 105-113.
54. Lou X, Janssen HG, Cramers CA. (1997). Parameters affecting the accelerated solvent extraction of polymeric samples, *Anal. Chem.* 69; 1598-1603.
55. Munir S, Shah A, Rauf A, Badshah A, Hussain H, Zia-ur-Rehman, Ahmad Z. (2013). Redox behavior of juglone in buffered aq.: Ethanol Media, *Comptes Rendus Chimie*, 16, 1140-1146.
56. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. (1998). *Enstrümantal Analiz*, Bilim Yayıncılık, Edt. Kılıç, E., Köseoğlu, F., Yılmaz, H., Ankara, Türkiye, 725-768.
57. Uchimiya M, Stone AT. (2009) Reversible redox chemistry of quinones: Impact on biogeochemical cycles, Review, *Chemosphere*, 77, 2009, 451-458.
58. Müller WU, Leistner E. (1978). Metabolic relation between naphthalene derivatives in juglone, *Phytochemistry*, 17, 1978, 1935- 1738.
59. Hedin PA, Langhans VH, Graves CH. (1979). Identification of juglone as possible factor of resistance to *Fusicladium effusum*, *J Agric. Food Chem.*, 27 (1), 1979, 92-94.
60. Solar A, Colaric M, Usenic V, Stampar F. (2006). Seasonal variations of selected flavonoids, phenolic acids and quinones in annual shoots of common walnut (*Juglans regia* L.), *Plant Science*, 170, 2006, 453-461.

ÖZGEÇMİŞ

Adı	MERVE	Soyadı	YURTCU
Doğum Yeri	ÜSKÜDAR / İSTANBUL	Doğum Tarihi	28.10.1987
Uyruğu	TC	Tel	0536 968 9740
E-mail	merveyurtcu@hotmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	-	-
Lisans	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi	2010
Lise	Kartal Anadolu Lisesi	2005

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
Kalite Güvence Uzmanı	Mustafa Nevzat İlaç Sanayii	05.2014- devam
-	-	-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
Almanca	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi
İngilizce	İyi	İyi	İyi

Yabancı Dil Sınav Notu

YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
-	-	-	-	-	-	-	-	-

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	75.0	75.0	70.0
(Diğer) Puanı	-	-	-

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS Office	Çok iyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.