

**T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TOPRAK BİLİMİ VE BİTKİ BESLEME ANABİLİM DALI**

**BAZI BİTKİ ÖRNEKLERİNİN TRIACONTANOL  
İÇERİKLERİNİN KROMATOĞRAFİK ANALİZLERİ**

**Hazırlayan  
Serap ARIK**

**Danışman  
Prof. Dr. Serkan ŞAHAN**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Temmuz 2025  
KAYSERİ**



**T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TOPRAK BİLİMİ VE BİTKİ BESLEME ANABİLİM DALI**

**BAZI BİTKİ ÖRNEKLERİNİN TRIACONTANOL  
İÇERİKLERİNİN KROMATOĞRAFİK ANALİZLERİ**

**(Yüksek Lisans Tezi)**

**Hazırlayan  
Serap ARIK**

**Danışman  
Prof. Dr. Serkan ŞAHAN**

**Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi  
tarafından FYL-2024-13662 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Temmuz 2025  
KAYSERİ**

## BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Serap ARIK

İmza

**“Bazı Bitki Örneklerinin Triacontanol İçeriklerinin Kromatografik Analizleri”** adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ ne uygun olarak hazırlanmıştır.

**Hazırlayan**

Serap ARIK

**Danışman**

Prof. Dr. Serkan ŞAHAN

**Toprak Bilimi ve Bitki Besleme ABD Başkanı**

Prof. Dr. Adem GÜNEŞ

## TEŞEKKÜR

Bana çalıőmalarım süresince her türlü yardımı ve fedakârlığı sağlayan, bilgi ve kıymetli tecrübelerini bana aktarmaya çalıőan ve büyük bir sabırla yanımda olan danıőmanım Prof. Dr. Serkan ŞAHAN hocama sonsuz teőekkürlerimi sunuyorum.

Çalıőmalarım sürecinde bana destek sağlayan ve yardımcı olan bu süreçte yanımda olan sayın hocam Ar. Gör. Turan TEMİR'e katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Son olarak ise çalıőmalarım sürecinde desteğini ve yardımlarını hiçbir zaman eksik etmeyen, beni sabırla dinleyip tecrübeleri ile hep yanımda olan abim Cuma ARIK'a, teőekkürlerimi sunarım. Hayatım boyunca maddi ve manevi olarak her zaman destekçim olan sevgili babama, bana sevgi ile yaklaőıp dualarıyla güç veren desteğini hiçbir zaman esirgemeyen kıymetli anneme, her anımda yanımda olan canım kardeőime ve kıymetli eőime sonsuz teőekkürlerimi sunarım. Tez yazımlarımda yanımda olan ve bana yardım eden ablam Serpil ve yeğenim Bilal Batu'ya teőekkürlerimi bir borç bilirim.

Serap ARIK

Temmuz 2025, KAYSERİ

## BAZI BİTKİ ÖRNEKLERİNİN TRIACONTANOL İÇERİKLERİNİN KROMATOĞRAFİK ANALİZLERİ

Serap ARIK

Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü  
Yüksek Lisans Tezi, Temmuz 2025  
Danışman: Prof. Dr. Serkan ŞAHAN

### ÖZET

Triacontanol bitkiler için bir gelişim düzenleyicisidir. Triacontanol,  $C_{30}H_{62}O$  formüllü bir yağ alkolüdür ve mirisil alkol de denilmektedir. Bitkilerin katı madde miktarını artırır, bitkileri renklendirir, çiçeklendirir, köklendirir ve bitkilerin büyümesini dengeler. Bitkinin verimliliğini artırır. Ayrıca triacontanol bitkinin hastalık ve zararlılara karşı direncini arttırmada önemli bir rol oynar. Triacontanol bir fitohormondur ve bitkilerin yaprakları, yaprak damarları, çiçekleri ve tohumlarında bulunabilir. Genellikle bitki büyümesini teşvik etmek, çiçeklenmeyi ve verimi artırmak amacıyla tarım alanında kullanılır. Triacontanolün bu öneminden dolayı doğal kaynak olarak kullanılmak üzere çeşitli bitkilerdeki triacontanol içeriklerinin belirlenmesine yönelik birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda kullanılan yöntemlerden birisi de kromatografik analizlerdir. Bu çalışmada yonca bitkisinde triacontanol analizi için kromatografik analiz yöntemlerinden HPLC-RID yöntemi geliştirilerek uygulanmıştır. Yöntem literatürde ilk defa uygulanmış olup, Agilent HPLC cihazı, RID dedektörü, C18 kolonu kullanılmış, mobil faz olarak  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$  akış hızında 50 - 50 (%) metanol-su karışımı kullanılmıştır. Yöntemde hassasiyet, doğruluk, tekrarlanabilirlik gibi validasyon parametreleri çalışılmış 1,8 % BSS,  $0,02 - 25 \text{ mg L}^{-1}$  dinamik aralık,  $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  gözlenebilme sınırı ve  $33 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  tayin sınırı ile yöntem yonca bitkisinde triacontanol analizi için uygulanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** UHPLC-RID, Triacontanol, Kromatografik Analiz, Yonca Bitkisi

# CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF TRIACONTANOL CONTENT OF SOME PLANT SAMPLES

Serap ARIK

Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences

Master Thesis, July, 2025

Supervisor: Prof. Dr. Serkan ŞAHAN

## ABSTRACT

Triaccontanol is a plant growth regulator. Triaccontanol, with the chemical formula  $C_{30}H_{62}O$ , is a fatty alcohol and also known as a primary alcohol. It increases the dry matter content of plants, enhances coloration, promotes flowering, supports rooting, and balances plant growth. It improves crop yield. Additionally, triaccontanol plays a significant role in increasing plant resistance against diseases and pests. As a phytohormone, triaccontanol is found in leaves, leaf veins, flowers, and seeds of plants. It is generally used in agriculture to promote plant growth, induce flowering, and improve yield. Due to its importance, triaccontanol is often applied through organic sources, and various studies have been conducted to determine its content in different plant materials. One of the methods used in these studies is chromatographic analysis. In this study, triaccontanol analysis in alfalfa (*medicago sativa*) was performed using chromatographic techniques. An HPLC-RID method was developed and optimized. The method was applied for the first time in the literature, using an agilent HPLC system, RI detector, and C18 column. The mobile phase consisted of a 50–50% methanol–water mixture, with a flow rate of  $0.5 \text{ ml min}^{-1}$ . Method validation parameters such as sensitivity, accuracy, and reproducibility were evaluated. The dynamic range was found to be  $0.02\text{--}25 \text{ mg l}^{-1}$ , with a detection limit of  $10 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ , a quantification limit of  $33 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$  and relative standard deviation of 1.8%. This method was successfully applied for the analysis of triaccontanol in alfalfa.

**Keywords:** HPLC-RID, Triaccontanol, Chromatographic Analysis, Alfalfa Plant

## İÇİNDEKİLER

### BAZI BİTKİ ÖRNEKLERİNİN TRIACONTANOL İÇERİKLERİNİN KROMATOĞRAFİK ANALİZLERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK.....	iii
KABUL VE ONAY .....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ÖZET .....	vi
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER .....	viii
KISALTMALAR.....	xi
TABLolar LİSTESİ.....	xiv
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	xv
GİRİŞ .....	1

## 1. BÖLÜM

### GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR ÇALIŞMASI

1.1. Kromatografik Metotların Sınıflandırılması.....	4
1.1.1. Ayırma Mekanizmasına Göre Sınıflandırma.....	4
1.1.2. Hareketeli Faza Göre Sınıflandırma.....	6
1.1.3. Uygulanan Tekniğe Göre Sınıflandırma .....	7
1.1.4. Kullanım Amacına Göre Sınıflandırma .....	8
1.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	8
1.2.1. HPLC'nin Kullanım Alanları.....	8
1.2.2. HPLC'nin Avantajları.....	9
1.2.3. HPLC Cihazı ile Çalışma Basamakları .....	10
1.2.4. HPLC'nin Kısımları .....	10
1.2.5. HPLC'de Çözücüler .....	15
1.2.6. HPLC'de Faz Seçimi .....	16
1.3. Kromatografi Sistemleri İçin Numune Hazırlama Yöntemleri .....	18
1.4. Sıvı Kromatografi (HPLC) Sisteminde Önemli Parametreler.....	22
1.4.1. Alıkonma Zamanı (tR) .....	22
1.4.2. Rezolusyon (Rs).....	23

1.4.3. Alıkonma/Kapasite Faktörü ( $k'$ ) .....	23
1.4.4. Etkinlik/Teorik Plaka Sayısı (N) .....	24
1.4.5. Seçicilik/Ayırım Faktörü ( $\alpha$ ) .....	25
1.4.6. Basınç .....	25
1.4.7. van Deemter Eğrileri .....	26
1.4.8. Gradient Denklemi .....	26
1.5. HPLC Analizlerinde Anormal Pik Şekilleri ve Olası Hata Kaynakları.....	26
1.5.1. Kolonun Bozulması.....	27
1.5.2. Numune Çözücüsünün Seçimi ya da Enjeksiyon Hacmine Bağlı Hatalar .....	27
1.5.3. Akış Hatlarındaki Ölü Bölümler .....	28
1.5.4. Kolonlardaki Sıcaklık Değişimleri .....	28
1.5.5. Dedektörün Sinyal Ayarının Uygun Olmaması.....	29
1.6. C18 Kolonu .....	29
1.6.1. C18 Kolonunun Avantajları .....	29
1.6.2. C18 Kolonu Çalışma Prensipleri.....	30
1.7. HPLC'de Metot Geliştirme .....	31
1.8. HPLC Sisteminde Analitik Metot Validasyonu ve Önemi .....	31
1.9. Problem Durumu.....	33
1.10. Araştırmanın Amacı.....	33
1.11. Araştırmanın Önemi .....	33
1.12. Literatür .....	34

## 2. BÖLÜM

### YÖNTEM VE MATERYAL

2.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler.....	38
2.2. Kimyasallar .....	38
2.3. Çözeltilerin Hazırlanması.....	38
2.4. Bitki Örneklerinin Hazırlanması .....	39
2.5. Kromatografik Şartların Optimizasyonu .....	39
2.6. Kalibrasyon Doğrusu Hazırlanması .....	40
2.7. Validasyon Çalışmaları.....	40
2.7.1. Doğrusallık .....	40
2.7.2. Seçicilik .....	40

2.7.3. Doğruluk.....	40
2.7.4. Kesinlik .....	41
2.7.5. Gözlenebilme Sınırı ve Tayin Sınırı .....	41
2.7.6. Kararlılık .....	41
2.7.7. Stabilite .....	41

### 3. BÖLÜM BULGULAR

3.1. Yöntem Optimizasyonu .....	42
3.1.1. Mobil faz bileşimi ve akış hızı.....	42
3.1.2. Örnek enjeksiyon hacmi.....	42
3.1.3. Kolon cinsi ve sıcaklığı .....	43
3.1.4. Optimum Kromatografik Koşullar .....	44
3.2. Yöntem Validasyon Bulguları .....	44
3.2.1. Kromatogramın Değerlendirilmesi.....	44
3.2.2. Doğrusallık ve Dinamik Aralık.....	46
3.2.2. Doğruluk.....	47
3.2.3. Kesinlik .....	47
3.2.4. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ) .....	48
3.2.5. Stabilite .....	48
3.3. Bitki Analizleri.....	48

### 4. BÖLÜM TARTIŞMA-SONUÇ ve ÖNERİLER

KAYNAKÇA .....	51
ÖZGEÇMİŞ.....	55

## KISALTMALAR

ASE	: Accelerated Solvent Extraction (Hızlandırılmış Solvent Ekstrasyonu)
C1	: Maddenin birinci faz içerisindeki derişimi
C18	: 18 Carbon (karbonlu) Kolon
C2	: Maddenin ikinci faz içerisindeki derişimi
CAD	: Charge Aerosol Detector (Yüklü Aerosol Dedektörü)
CH <sub>3</sub> OH	: Metanol
DAD	: Diode Array Detector (Diyot Dizi Dedektörü)
DDG	: Dried Distiller's Grains (Kurutulmuş Damıtıcı Taneleri)
DDPH	: Radikal Süpürme Kapasite Tayini
dp	: Partikül Çapı
ELISA	: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (antikor-antijen ilişkisini ölçen kantitatif test)
ELSD	: Evaporative Light Scattering Detector (Buharlaştırıcı Işık Saçım Dedektörü)
F	: Akış Hızı
FLD	: Fluorescence Detector (Floresan Dedektörü)
GC	: Gas Chromotography (Gaz Kromotografisi)
GFC	: Gel Filtration Chromotography (Jel Filtrasyon Kromotografisi)
GPC	: Gel Permeation Chromotography (Jel Geçirgenlik Kromotografisi)
H	: Plaka Yüksekliği
HPLC	: High Performance Liquid Chromotography (Yüksek Performanslı Sıvı Kromotografisi)
IC	: İon Change (İyon Değişimi)
IP	: İon Pair (İyon Çifti)
K*	: Gradient Alıkonma
k'	: Kapasite Faktörü
L	: Kolon Uzunluğu
LC	: Liquid Chromotography (Sıvı Kromotografisi)
LED	: Light Emitting diode (Işık Yayan Diyet)
LLE	: Liquid-Liquid Extraction (Sıvı- Sıvı Ekstrasyonu)
LOD	: Gözlenebilme Sınırı
LOQ	: Tayin Sınırı
MMP	: Metalloproteinaz

MS	: Kütüphane dedektörü
MWD	: Multi Wavelength Detector (Çoklu Dalga Boyu Dedektörü)
N	: Plaka Sayısı
n	: Solvent Vizkositesi
NP	: Normal Phase ( Normal Faz)
Ø	: Çap
ΔP	: Basınç Değeri
P	: Purge (Temizleme)
PC	: Paper Chromotography (Kağıt Kromatografisi)
PCA	: Principal Component Analysis (Temel Bileşen Analizi)
PLE	: Pressurized Liquid Extraction (Basınçlı Sıvı Ekstraksiyon)
ppb	: Parts Per Billion (Milyarda Bir- Nano)
Ppm	: Parts Per Million (Milyonda bir)
ppt	: Parts Per Thousand (Binde Bir-Mili)
r	: Kolon Yarıçapı
RI	: Refractive Index (Kırılma endeksi)
RID	: Refractive Index Detector (Kırılma Endeksi Dedektörü)
RP	: Reserve Phase ( Ters Faz)
Rs	: Rezolusyon
RT	: Alınma Zamanı
S	: Denklem Sabiti
SEC	: Size Exclusion Chromotography (Boyut Dışlama Kromatografisi)
SHS	: Static Headspace (Statik Üst Boşluk)
SLE	: Solid- Liquid Extraction (Katı- Sıvı Ekstraksiyonu)
SPE	: Solid Phase Extraction (Katı Faz Ekstraksiyonu)
SPME	: Solid Phase Micro Extraction (Katı Faz Mikro Özütleme)
T	: Trap (Yakalama)
tG	: Gradient Süresi
TLC	: Thin Layer Chromotography (İnce Tabaka Kromatografisi)
to	: Mobil fazın alınma zamanı
TRIA	: Triacetonol
u	: Lineer Hız
V0	: Jel gözeneklerinin dışında kalmış alanın hacmi

- V<sub>g</sub> : Jelin kaplamış olduğu alan  
V<sub>i</sub> : Jel gözeneklerinin içerisinde tutulmuş çözücünün hacmi  
V<sub>m</sub> : Kolon Ölü Hacmi  
VOC : Volatile Organic Compounds (Uçucu Organik Bileşikler)  
V<sub>t</sub> : Dondurulmuş kolon hacmi  
VWD : Variable Wavelength Detector (Değişken Dalga Boyu Dedektörü)  
W<sub>t</sub> : Pik genişliği



## TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2.1.	Standartlar için ilave edilen ana stok çözelti miktarları ve derişimleri.....	40
Tablo 3.1.	Kolon seçimi için yapılan çalışma verileri. ....	43
Tablo 3.2.	Gerçek örnek analizleri ve ekleme - geri kazanma çalışma sonuçları.....	47
Tablo 3.3.	Stabilite çalışmasından elde edilen sonuçlar. ....	48
Tablo 3.4.	Örnek analiz sonuçları. ....	48



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Örnek bir kolon tanımlanması. ....	12
Şekil 1.2.	Faz ayırım görüntüsü. ....	16
Şekil 1.3.	Alıkonma grafiği.....	24
Şekil 1.4.	Normal pik ve anormal piklerin görüntüleri.....	27
Şekil 1.5.	Numune çözücüsüne ya da enjeksiyon hacmine bağlı oluşan hatalar sonucunda oluşan pik görüntüleri. ....	28
Şekil 3.1.	Triacantanol pikinin çıkış zamanı. ....	45
Şekil 3.2.	Dinamik aralık çalışmasına ait kromatogram. ....	46
Şekil 3.3.	Triacantanol kalibrasyon eğrisi. ....	46
Şekil 3.4.	Ekleme-geri kazanma çalışmasına ait örnek bir kromatogram.....	47

## GİRİŞ

Triacantanol bitkilerin gelişiminde etkili olan bir düzenleyicidir. Bitkinin sahip olduğu katı maddenin miktarını arttırır, bitkiyi renklendirir, çiçeklendirir, köklendirir ve ayrıca bitkinin büyümesini dengeler [1]. Bitkinin verimliliğini artırır ve bitkinin hastalık ve zararlılara karşı olan direncinin artmasında önemli rol oynar [2].

Triacantanolün tek başına bırakılması ilk olarak 1933 yılında olmuştur. Bu yalıtımın sağlanabilmesinde triacantanol alfalfa mumundan yararlanılmıştır. Triacantanolün ayrıştırılmasının sonucunda doymuş düz bir zincire sahip birincil alkol şeklinde olduğu tanımlanmıştır [3]. Çeşitli kara bitkilerinde bitki kütikülünün dış yüzeyini kaplayan epikütikular mumun küçük bileşeni şeklinde bulunan triacantanolün, buğdayda yapraktaki mumun %3 veya %4'ünü oluşturduğu görülmüştür [4].

Triacantanol, normalinden daha büyük kök ve sürgün geliştiren bir bitkinin hücre bölünmesini hızlandırmaktadır. Triacantanolün, bitkinin en verimli büyüme döneminde yeterli miktarda uygulanması durumunda, köklerde gerçekleşen enzimatik aktivite ve hormon işlevselliğinde artış gerçekleştirerek bitkinin fonksiyonlarını artırdığı görülmüştür [3]. Ayrıca triacantanol bitkinin fotosentezini hızlandırarak, glikoz üretimini arttırmaktadır. Triacantanol bakıldığında bitkinin büyüme ve gelişiminde olumlu bir etki göstermesine rağmen bazı bitkiler için hiçbir etki göstermez ya da yüksek doz olması bazı bitkilerde olumsuz etkiler yapabilmektedir. Triacantanolün doz miktarının belirlenmesi için kromatografik analizlerden yararlanılmaktadır [4].

Kromatografi, farklı ayırma tekniklerinden oluşan genel bir terimdir. Bu teknikler, bir hareketli fazın hareketsiz bir faz ile arasında oluşan etkileşimlere dayanır. Hareketli faz, gaz veya sıvı olabilirken, hareketsiz faz sıvı ya da katı olabilmektedir [5]. Bu yöntemler, bileşenlerin hareket hızlarının farklılıklarına göre ayrılmasını sağlamaktadır. Kromatografi terimi, Yunanca "renk yazımı" anlamına gelmektedir. "Chroma" renk, "graphe" ise yazı anlamına gelmektedir. Günümüzde ise kromatografi, bir karışımın

içerdiği maddelerin fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre çözünerek ayrıldığı ayırma işlemlerine toplu olarak verilen bir isimdir [1].



## 1. BÖLÜM

### GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR ÇALIŞMASI

Kromatografi, 1900'lü yıllara uzanan bir teknik olmakla beraber zaman içerisinde bilim dünyasında önemli bir yere gelmiştir. Kromatografinin temelleri, Rus botanik bilimcisi Mikhaıl Tswett ile atılmıştır. Tswett, 1903'de bitkilerde bulunan pigmentlerin ayrılması için kağıt kromatografisi kullanmış olup bu tekniğe "kromatografi" demiştir [6]. Pigmentlerin farklı renklerde ayrılmasını ele alan bu teknik yunanca "chroma" (renk) ve "graphein" (yazmak) kelimelerinden türetilmiştir. Kromatografinin kullanımının yaygınlaşması ise, 1930'lu ve 1940'lı yıllarda bilim insanlarının bu tekniği daha fazla keşfetmesiyle başlamıştır [7]. Richard Kuhn, Edgar Lederer ve Archer Martin gibi araştırmacılar, özellikle yağ asitleri ve amino asitler olmak üzere biyokimyasal maddelerin ayrılması ve analizinde kromatografi tekniğini kullanmışlardır. 1940'lı yıllarda Archer Martin ve Richard Syngé, sıvı-sıvı ayırma tekniğini geliştirmişler ve yaptıkları bu çalışmaları ile 1952 yılında Nobel Kimya Ödülü'nü kazanmışlardır. Gaz kromatografisi de bu dönemde gelişmiş olup 1950'li yıllarda James ve Martin ilk gaz kromatografisi cihazını icat etmişlerdir. 1960'lı yıllarda ve sonrasında, kromatografi teknikleri hızla gelişmiş ve çeşitlenmiştir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), ince tabaka kromatografisi (TLC), iyon değişim kromatografisi ve diğer modern teknikler bu dönemlerde geliştirilmiştir. Bu gelişmeler, kromatografinin kimya, biyokimya, çevre bilimleri, ilaç geliştirme ve birçok alanda bir analiz yöntemi olarak önemli bir hale gelmesini sağlamıştır [6].

Kromatografinin temel amacı, numunenin ayrıştırılması ve miktarının ölçülmesidir. Bu yöntem, çeşitli maddelerin bir hareketli faz yardımıyla sabit bir faz üzerinde farklı hızlarla hareket etmeleri veya sürüklenmeleri prensibine dayanır. Çözücü, hareketli olup incelenen karışımı sabit bir ortam boyunca taşır. Mobil yani hareketli faz, kromatografi tekniğine göre sıvı ve gaz olabilirken, sabit faz çeşitli materyallerden oluşabilir. Karışım,

destek ortamı boyunca ilerlerken, moleküller destek ortamındaki fonksiyonel gruplarla etkileşime girer [5].

Kromatografinin temelinde bilinmesi gereken terimler şöyledir:

Mobil faz: diğer bir deyişle hareketli faz olarak bilinir ve analizde kullanılan çözücüyü içeren bileşendir. Numuneyi, sabit faz boyunca taşıyan, farklı fiziksel ve kimyasal özelliklerdeki çözücü karışımlarıdır. Mobil fazın seçiminde, analiz edilecek numunenin bileşenlerinin özellikleri, kullanılacak sabit fazın özellikleri ve dedektörün karakteristikleri gibi parametreler dikkate alınmalıdır [1].

Hazırlanması basit gibi görünse bile oldukça hassas bir süreçtir.

Sabit Faz: “Durgun faz” olarak da adlandırılır. Numunenin bileşenlerinin, mobil fazın içerisinde etkileşime girmesi ile belirli bir ölçüde alıkonuldukları bir fazdır.

Alıkonma: Numunenin mobil faz içerisindeki bileşenleri sabit faz ile etkileşime girerek ve belirli bir oranda alıkonulup yavaşlatılmasıdır. Bu sayede, bileşenler sabit fazı daha geç terk ederler. Bu özellikten yola çıkarak, her kimyasal madde için belirli analitik koşullar altında elde edilen alıkonma zamanı (RT), bir tür parmak izi niteliği taşır ve tanımlanır [1].

## **1.1. Kromatografik Metotların Sınıflandırılması**

### **1.1.1. Ayırma Mekanizmasına Göre Sınıflandırma**

**a. Adsorpsiyon kromatografisi:** Adsorpsiyon kromatografisi keşfedilmiş olan ilk kromatografi çeşididir. İnce bir tabaka ve klasik bir kolon kromatografisi prensibinden bilinmektedir [8]. Sabit faz polar olarak kullanılıp malzeme genellikle silika olmaktadır. Fakat silika dışında magnezyum ve alüminyum oksit malzeme de kullanılmaktadır. Adsorpsiyon kromatografisi karışımdaki sıvı ve gaz haldeki maddelerin bir katı faz üzerinde farklı kuvvetlerle tutulması ile birbirlerinden ayrıldıkları kromatografi türüdür [7].

**b. Dağılma (partition) kromatografi:** Dağılma (partition) kromatografisinde maddeler sabit faz ve mobil (hareketli) faz arasında gerçekleşmektedir. Sabit faz sıvı halde olmalıdır fakat mobil faz sıvı veya gaz olabilmektedir [1]. Bu iki faz birbirine karışmaz ve fazın içerisine konulan madde fazlardaki çözünürlük derecesine bağlı olarak bu iki faz arasında dağılıp bir dengeye ulaşmaktadır. Sistemde iki faz arasında dağılımı sabit olan maddenin dağılım katsayısı (Kd); maddenin birinci faz içerisindeki derişiminin (C1) maddenin ikinci faz içerisindeki derişimine (C2) oranıdır [8].

**c. İyon değiştirme kromatografi (veya iyon kromatografi):** Bir maddenin iyon grubu ile iyon değiştiricinin iyon grubunun eşdeğer miktarlarının karşılıklı olarak yer değiştirilmesidir [9]. İyon değiştirici olarak kullanılan iyon anyon ise ‘Anyon Değiştirme Kromatografisi’, katyon ise ‘Katyon Değiştirme Kromatografisi’ diye isimlendirilmektedir. Mobil (hareketli) fazın asitlik-bazlık durumu, mobil fazın değişimi ve karmaşıklık oluşturucu etkiler iyon değiştirmeyi etkilemektedir [7]. Bu kromatografi ayrılmaları zor olan bazı tür iyonların ve asitlerin ayrılmasında, aminoasitlerin ayrılmasında, seyreltilmiş olan iyon çözeltilerinin deriştirilmesi için kullanılmaktadır. Ayrıca asitin ve bazın elde edilmesinde de bu kromatografi yöntemi kullanılmaktadır [9].

**d. Jel geçirgenlik veya jel süzme (moleküler-exclusion veya size-exclusion) kromatografi:** Karışmış halde bulunan moleküllerin birbirinden molekül büyüklüklerine göre ayrılmasını sağlayan kromatografidir [8].

Su veya bir çözücü ile şişirilen jel ile doldurulmuş olan kolonun hacmi ( $V_t$ )

$$V_t = V_g + V_i + V_0$$

$V_g$ : Jelin kaplamış olduğu alan,

$V_i$ : Jel gözeneklerinin içerisinde tutulmuş olan çözücünün hacmi,

$V_0$ : Jel taneciklerinin dışında kalmış olan hacimdir.

**e. Zone elektroforez:** Genellikle nükleik olan asitlerin ayrılmasında ve analizinde kullanılan bu kromatograf, elektrik alanı etkisinde yüklü iyonların ayrılmasını sağlanmaktadır. Protein, DNA karbonhidratları ve diğer biyomoleküllerin analiz ve ayrılması için de kullanılmaktadır [8].

**f. Affinite (veya Bioaffinite) kromatografi:** Bu kromatografik yöntemin seçiciliği fazladır ve nu yöntem protein saflaştırılmasında kullanılmaktadır. Kolon dolgu maddesine seçici protein ile kompleks yapmaya yatkın bir ligand bağlanarak yapılan bu kromatografi de bağlanan ligand ile kompleks yapılan seçici protein katı olan bir desteğe bağlanma yaparak kolonda tutulur ve böylece serbest hale gelen protein de kolondan ayrılır [8].

**g. Kiral kromatografi:** Enantiomerlerin ayrılması için kullanılan bu teknikte bir enantiomerden daha aktif olan ve daha fazla reaksiyona girme gücüne sahip chiral bir sabit faz kullanılmaktadır [8].

### 1.1.2. Hareketeli Faza Göre Sınıflandırma

**a. Sıvı kromatografisi (LC):** Bu kromatografi verimli olmakla birlikte seçiciliği yüksek bir kromatografidir. Geniş bir kullanım alanı bulunan sıvı kromatografisinde miktarı az olan örneklerle çalışılabilmektedir ve üzerinde çalışılan örnek bozulmadan kalabilmektedir. Kantitatif analizlerde, uçucu özellikte olmayan ve ısıl kararlılığı bulunmayan örnekler için uygulanabilmektedir. Ayrıca inorganik halde bulunan iyonların analizlerinin yapılabilmesinde kullanılmaktadır [1].

**b. Gaz kromatografisi (GC) :** Gaz kromatografisinde yapılan analizin sonuçları hızlı bir şekilde alınmaktadır. Kullanılan cihazlar genellikle basit yapılıdır ve düşük maliyetlidir. Uçuculuğu yüksek, moleküler ağırlığı düşük ve termal kararlılığa sahip olan bileşiklerin ayrılmasında kullanılan bir kromatografidir. Gaz, katı ve sıvı halde bulunan numunelerin analizi için yüksek etkinlikteki bir analitik tekniktir [7].

Analizlerde genellikle mobil fazın durumuna göre kullanılacak kromatografik cihaz seçilmektedir. Analizlerde kullanılan gaz kromatografisi numune karışımının kimyasal bileşenlerini ayırmak ve bu bileşenlerin bulunurluk veya miktar durumunu belirlemek için kullanılabilir [7]. Bu bileşenler genellikle organik moleküller veya gazlardan oluşur. GC'nin verimli bir şekilde çalışabilmesi için, analiz edilen bileşenlerin uçucu, genellikle 1250 Da'nın altında moleküler ağırlığına sahip ve termal olarak kararlı olmaları gerekmektedir, yani yüksek sıcaklıklarda bozulmamalıdır. Gaz kromatografisi (GC), çeşitli sektörlerde ve endüstrilerde kalite kontrol ve analiz amaçlı yaygın olarak kullanılır [9]. Kimyasal ve petrokimyasal ürünlerden ilaçlara, göktaşı analizinden doğal ürünlere,

çevresel numunelerden mikroplastiklere, gıda ve şaraptan adli tıpa kadar geniş bir uygulama alanı bulunur. Gaz kromatografileri, kimyasal bileşenleri tespit etmek ve tanımlamak için sıklıkla kütle spektrometreleri (GC-MS) ile birlikte kullanılmaktadır. Bu kombinasyon, kimyasal bileşenlerin daha hassas ve detaylı analizine olanak sağlamaktadır. Gaz kromatografisi (GC), ayırma işleminde bir taşıyıcı gaz kullanmaktadır ve bu gaz mobil faz görevini üstlenmektedir. Taşıyıcı gaz, numune moleküllerini GC sistemi boyunca taşıyarak cihaz bileşenlerine zarar vermeden ya da numune ile reaksiyona girmeden işlemi tamamlar [8]. Numune, genellikle şırınga ile gaz kromatografine enjekte edilmektedir veya otomatik numune alma cihazından aktarılmaktadır. Bu cihazlar, numuneyi mobil fazı kaybetmeden enjeksiyon için GC girişine yönlendiren bir septum aracılığıyla çalışmaktadır. GC'nin analitik kolonu, uzunluğu 10 ila 50 metre arasında değişebilen ve iç çapı 0,1 ila 0,53 mm arasında olan kapiler silika borudan veya iç duvarları kaplanmış metal bir borudan oluşmaktadır [1]. Kolon, daha az uçucu bileşenleri ayırmak için analiz sırasında ısıtılan bir kolon fırınında tutulmaktadır. Kolonun çıkışı, kimyasal bileşenlere tepki vererek bir sinyal üreten dedektörle bağlantılıdır. Elde edilen sinyal, analiz verilerini oluşturmak için bilgisayara kaydedilmektedir kromatogram oluşturmak için cihaz yazılımı tarafından işlenmektedir [7].

### 1.1.3. Uygulanan Tekniğe Göre Sınıflandırma

**a. Kolon kromatografisi:** İki tipi vardır; gaz kromatografisi (GC) sıvı kromatografisi (LC).

**b. Düzlem kromatografisi:** Düzlem kromatografisinde bir damla örnek çözeltisi sabit faz düzleminin yüzeyi üzerindeki herhangi bir noktaya damlatılmaktadır ve çözücünün buharlaşmasının ardından, yüzey üzerinde kalan hareket etmesini kapiler kuvvetlerin sağladığı mobil (hareketli) bir faz (yıkayıcı, developer) akışıyla kromatogram yıkanmaktadır [7]. Genellikle sabit faz olarak su veya polar bir sıvı kullanılmaktadır. Bir düzlem kromatografisi olan ince tabaka kromatografisi (TLC) iyi bir şekilde öğütülen partiküllerden oluşan ince ve yapışık olan bir tabaka ile kaplanan cam, plastik veya alüminyumdan yapılmış düzgün haldeki plakalarda gerçekleştirilirken, basit ve en eski yöntemlerden biri olan kâğıt kromatografisinde (PC) uzun lifli bir yapıya sahip bir kromatografi kâğıdı kullanılmaktadır. Bu kâğıt saf selülozdan yapılmıştır ve bir süzgeç

görevindedir. Bu sayede su ve polar yapıda olan diğer çözücülerle hidrojen bağları oluşturur ve bunları belli bir oranda yüzeyinde tutabilmektedir (absorbe eder) [8].

#### 1.1.4. Kullanım Amacına Göre Sınıflandırma

**a. Analitik kromatografi (kalitatif kromatografi ve kantitatif kromatografi);** kalitatif kromatografide bir madde hangi element, hangi bileşiklerden meydana geldi gibi sorulara cevap bulunmaktadır, kantitatif kromatografisinde ise ayırım yapmak amaçlanmıştır ve örnek bileşenlerine ayrılarak her bir bileşen miktar esasına göre analiz edilir [7].

**b. Preparatif uygulamalar (karışımlardan saf madde elde etme) ;** Mobil fazın gravitasyon etkisi ile durgun faz üzerinde bileşenlerin ayrılıp ayrı ayrı kaplara toplanarak saf maddelerin fiziksel olarak elde edildiği bir kromatografidir [7].

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

Fen bilimleri alanlarında yaygın olarak kullanılan gelişmiş bir kromatografi tekniğidir. HPLC, ilaç endüstrisinden tarıma kadar birçok sektörde analiz ve ayırıştırma için önemli bir rol oynamaktadır. Bu teknik, numuneleri yüksek basınç altında sıvı mobil fazın kolon üzerinden geçirerek bileşenlerinin ayrılmasını sağlamaktadır ve böylelikle detaylı analizlerin yapılmasını sağlamaktadır [9].

Çözünür hale gelebilen bütün bileşikler (aminoasitler, vitaminler, şekerler, pestisitler, antibiyotikler, gıda tatlandırıcıları ve renklendiricileri ile bunların türevleri gibi) HPLC tekniği ile hızlı ve güvenilir bir şekilde kantitatif olarak tespit edilebilmektedir [10].

##### 1.2.1. HPLC'nin Kullanım Alanları

HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi), geniş bir uygulama alanına sahip bir analiz tekniğidir. Bu tekniğin kullanıldığı alanlar şu şekilde gösterilebilir [11]:

- **İlaç Analizleri:** Antibiyotikler, sedatifler, steroidler ve analjezikler gibi ilaçların analizi.
- **Biyokimyasal Analizler:** Amino asitler, proteinler, karbonhidratlar, lipitler, hormonlar, vitaminler, Vanilmandelikasit, metanefrin, 5-Hidroksi İndol Asetik

Asit, katekolaminler, ketosteroidler, porfirin, homosistein, Hemoglobin A1C testi gibi biyomoleküllerin analizi.

- **Gıda Analizleri:** Antioksidanlar, aflatoksinler, yapay tatlandırıcılar, gıda katkı maddeleri, hormon ve pestisit kalıntıları ile su analizleri.
- **Adli Tıp ve Toksikoloji:** Uyuşturucu ilaçlar, narkotikler ve zehirlerin analizi.
- **Klinik Biyokimya:** Safra asitleri, üre ekstraktları ve ilaç metabolitlerinin analizi.
- **Gıda ve Çevre Kirleticileri:** Pestisitler, herbisitler ve fenoller gibi kirleticilerin analizi.
- **Endüstriyel Analizler:** Polimerler, boyalar, yüzey aktif maddeler, çok halkalı aromatikler ve petrokimya uygulamaları gibi endüstriyel maddelerin analizi.

Bu geniş kullanım alanları sayesinde HPLC, kimya, biyokimya, çevre bilimi, tıp ve endüstri gibi birçok alanda kritik bir analiz yöntemi olarak kabul edilmektedir [1].

### 1.2.2. HPLC'nin Avantajları

- HPLC cihazında küçük boyutta paslanmaz çelik yapıda bir kolon kullanılmaktadır bu da kullanılan kolonun ömrünü artırmaktadır.
- Kullanılan sabit fazın 3,5-10 µm kadar küçük partikül boyutlarında olması tıkanma riskinin azalmasını sağlamaktadır.
- HPLC cihazında iç basınç yüksek olaması sebebiyle kontrollü bir faz akışı sağlanabilmektedir.
- HPLC cihazı sürekli akış yapan dedektörlere sahiptir ve böylece az miktardaki analizinin yapılabilmesini sağlamaktadır.
- HPLC cihazında yapılacak analizler için az miktarda örnek olması yeterlidir. Böylece çok miktarda bir örneğe ihtiyaç duyulmamaktadır.
- HPLC cihazı otomasyon yapılmaya müsaittir.
- HPLC cihazı analizlerin hızlı yapılabilmesini sağlayarak zaman tasarrufu sağlamaktadır ve cihaz yüksek ayırma gücüne sahip olduğu için analizlerin sonuçları daha doğru ve açık çıkmaktadır.

### 1.2.3. HPLC Cihazı ile Çalışma Basamakları

- *Biyomolekülün uygun bir çözücüde çözünmesi:* Protein, peptit veya diğer moleküller, organik veya uygun bir çözücü kullanılarak çözülmemektedir.
- *Bileşenlerin ayrımı:* Sabit faz olarak adlandırılan kolonda gerçekleşmektedir. Çözünen karışım, kolona enjekte edilmekte ve basınç uygulanarak kolon boyunca mobil fazın etkisiyle ayrılmaktadırlar.
- *Bileşenlerin ve miktarlarının tayini:* Ayrılan bileşenlerin, detektörler kullanılarak miktarları belirlenmektedir. Numunenin özelliklerine bağlı olarak UV, floresans, iletkenlik, kütle gibi farklı detektörler tercih edilmektedir.
- *Kromatogramların analizi:* Dedektörden elde edilen kromatogramlar, çeşitli bilgisayar programları ile kolaylıkla yorumlanabilmektedir.

### 1.2.4. HPLC'nin Kısımları

**a. Mobil faz (çözücü):** Tipik olarak bir HPLC cihazında bir veya daha fazla cam veya paslanmaz çelikten yapılmış mobil faz (çözücü) şişesi bulunur. Çalışma sürecinde, sulu tamponlardan hidrokarbonlara kadar değişen polaritelerde çözücüler kullanılabilir. Bu nedenle, bu şişelerin kalitesi son derece önemlidir. Ayrıca, kullanılan çözeltilerin saf olması gereklidir. Bu şart sağlanmazsa, kolon veya numunenin yanlış etkilenmesine ve hatalara neden olabilir [11].

**b. Pompa:** Mobil fazı numune ile birlikte kolona ve dedektöre ileten sistemdir. HPLC'nin kalbi olarak kabul edilmektedir. Akışın sabit bir basınçta tutulması gerekmektedir ve bu da pompanın düzenli bakımını zorunlu kılmaktadır. Tampon çözelti içeren mobil fazların kullanımını sonrasında pompanın verimli çalışmasını sağlamak için pompanın 30-45 dakika saf çözücü ile durulama yapılarak temizlenmesi önerilmektedir. Aksi takdirde, bir sonraki kullanımda pompanın tıkanması ve temizlenmek için sökülmesi gerekebilir, bu da ciddi bir zaman kaybına yol açar [12].

Pompa, sıvının sistem içinde dolaşımını sağlamaktadır ve dakikada akışı mL cinsinden belirler. Pompanın temel özellikleri arasında yüksek basınç altında çalışabilme, düşük basınç dalgalanması, akış doğruluğu ve tekrarlanabilirlik önemlidir. Ayrıca, pompanın kendi üzerinden kontrol edilebilme yeteneği de bir pompa sistemi için gereklidir [11].

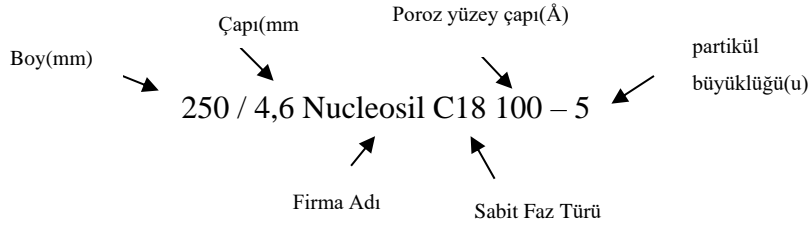
HPLC donanımında bulunan pompalama sistemleri, bir dizi farklı kriterlere göre sınıflandırılabilir. Bu kriterler arasında akış hızı (mikrobore, standart bore ve preparatif pompa sistemleri), pompanın yapıldığı malzeme (metalik, ametalik), pompanın mobil fazı iletim mekanizması (şırınga tipi, piston pompalar) ve tipi (izokratik/tek kanallı, binary/ikili, quaternary/gradyen 4 kanallı pompa sistemleri) bulunmaktadır [1].

İzokratik ve gradyen sistem pompaları, HPLC çalışmalarında moleküler ayırım ve metod geliştirme açısından önemli bir rol oynamaktadır. İzokratik sistem, bir deney sırasında değişmeyen sabit bir akış sağlar. Basit ayırımlar için uygundur ve moleküllerin ayrılmasını sağlamaktadır. Gradyen sistemde ise hareketli faz bileşimi zamanla değişir. Bu sistem, kompleks karışımların ayrılması ve bilinmeyen karışımlar için metod geliştirme süreçlerinde tercih edilmektedir [1].

**c. Kolon etüvü:** Çalışmalar için önem arz eder. HPLC cihazlarında kolonun bulunduğu ortamın sabit bir sıcaklıkta tutulmasını sağlamaktadır. Hava sirkülasyonlu ve blok ısıtıcılı olmak üzere iki tür kolon fırını bulunmaktadır [11].

**d. Kolon:** HPLC donanımının en önemli parçalarından biridir. Bileşenlerin karmaşık örneklerde birbirinden iyi çözünürlükle ayrılmasından sorumlu sabit fazdır. Kolon iç yüzeyinde kullanılan malzemenin kimyasal ve fiziksel özellikleri oldukça çeşitlidir.

Analizde kullanılmak üzere seçilecek malzeme, kullanılacak mobil fazın ve uygulanacak HPLC metodunun gereksinimlerine ve analiz edilecek örneğin bilinen kimyasal ve fiziksel özelliklerine bağlı olarak belirlenmelidir bu malzeme genellikle yüksek basınçlara dayanıklı paslanmaz çeliktir. Analitik kolonların iç çapı genellikle 2-5 mm arasında değişmektedir. Kolon iç çapı büyüdükçe akış hızı ve iç doldurma hacmi de artmaktadır fakat bu durumda piklerin çözünürlüğü azalır ve duyarlılık düşer. Kolon uzunlukları genellikle 30-300 mm arasında değişir. Kolonun uzunluğu arttıkça örnek bileşenlerinin daha iyi ayrılması sağlanır, ancak analiz süresi uzar ve daha fazla mobil faz kullanılır. Bu nedenle, analizler için uygun kolon seçimi son derece önemlidir. Kolon boyutlarını tanımlamak için uluslararası standartlar belirlenmiştir. Bu standartlara göre, kolon boyutları önce mm cinsinden uzunluk ve çap ile belirtilir ardından firma adı, sabit faz türü, Ångström türünden poroz yüzey çapı ve mm cinsinden partikül büyüklüğü bilgileri verilir [13].



Şekil 1.1. Örnek bir kolon tanımlanması.

Kolon seçimi sürecinde kolon dolgu maddeleri ve kolonun özellikleri, partikül boyutu ve şekli, por çapı, fonksiyonel grupların bağlanma şekilleri, karbon yükü, endcapping özelliği, silika saflığı gibi terimler ve parametreler sıkça karşımıza çıkmaktadır ve çalışmamızı doğrudan etkilemektedir [9].

HPLC'de kullanılan kolonun ve mobil fazın etkileşimleri dikkate alınarak farklı ayırma teknikleri geliştirilmiştir. Bu teknikler arasında Normal Faz (Normal Phase; NP), Ters Faz (Reverse Phase; RP), Ters Faz İyon Çifti (Reverse Phase Ion Pairing; IP), İyon Değişim (Ion Exchange; IC), Boyut Eleme (Size Exclusion; SEC (GPC/GFC)) ve Kiral Ayırma (Chiral Separation) teknikleri bulunmaktadır [1].

**e. Degazör (gaz giderme sistemi):** Defazör mobil faz kolona ulaşmadan önce sistemde oluşabilecek hava kabarcıklarını ortadan kaldıran, mobil faz içinde bulunan eriyik gazların uzaklaştırılması için kullanılan bir sistemdir. Tüm çözücülerin gazının alınması önemlidir aksi takdirde kolonda kabarcık oluşumu, pik genişlemesine veya gerçek zamanın kaymasına neden olabilir [12].

Gaz giderme işlemi, çözücülerin ısıtılması, karıştırılarak vakuma maruz bırakılması, ultra ses dalgaları ile çözücülerin işlenmesi veya solvent şişesine helyum gazı verilmesi gibi çeşitli yöntemlerle gerçekleştirilebilir. Fakat, ilerleyen teknoloji ile birlikte, bu işlev cihazda standart bir modül haline gelmiştir [10].

**f. Oto örnekleyici ve enjektörler:** numuneyi belirlenen miktarda alarak mobil fazla birlikte kolona iletir.

Geçmişte, HPLC cihazlarında manuel enjeksiyon kullanılırdı, bu hem hata riskini artırır hem de kullanıcıyı cihazın başında beklemek zorunda bırakırdı. Manuel olarak kontrol

edilen enjektörlerden ziyade bilgisayar kumandalı oto-enjektörler de kullanılmaktaydı. Günümüzde ise oto-enjektör birimlerinde soğutma, ısıtma, seyreltme ve karıştırma gibi özellikler bulunmaktadır, bu da daha hassas ve verimli analizler için olanak sağlamaktadır [7]. Oto örnekleyici özelliği olan bir HPLC sistemi, tek seferde 90 numuneye kadar yükleme yapma ve cihazı otomatik çalıştırma imkânı sağlar. Bu sistemle çalışırken dikkat edilmesi gereken tek şey, çalışmanın ortasında mobil fazın bitmemesini sağlamaktır. Bazı HPLC sistemlerinde, cihazın otomatik kapanması için bir zamanlayıcı ayarlayarak laboratuardan çıkmak bile mümkündür [1].

**g. Dedektörler:** numunedeki analitleri ölçülebilir sinyallere dönüştürerek kantitatif analiz yapmayı mümkün kılar. Dedektör, kolondan çıkan bileşenleri görüntülememizi ve bunların ayrımını ve miktarını belirlememizi sağlar. Maddeler, dedektörden geçtikten sonra bir kaydedici tarafından kaydedilir ve zamanla dedektör cevabına bağlı bir grafik oluşturulur. Bu grafik, **kromatogram** olarak adlandırılır [1]. Birkaç çeşit dedektör vardır: UV dedektör, Dizi Düzenlemeli Dedektör (DAD), floresans dedektör (FLD), kırılma indisi dedektörü (RID), elektrokimyasal dedektör ve iletkenlik dedektörü gibi. Son yıllarda HPLC sistemlerine kütle dedektörü (MS) bile eklenmiştir. Hangi dedektörün kullanılacağı, yapılan analize göre değişir. Örneğin, şekerli bileşikler (glukoz, fruktoz, sakkaroz) analiz etmek için RID dedektörü gereklidir. Fenolik bileşikler, antibiyotikler veya pestisitler gibi analizlerde ise UV veya DAD dedektörleri kullanılabilir. DAD dedektörleri UV dedektörlerden daha hassastır [8].

HPLC'de dedektör çeşitliliği, çoğu zaman kafa karışıklığına neden olabilir. Dedektörler, HPLC'nin işlevselliğinde kritik bir rol oynar. Yanlış bir dedektör seçmek, analitin konsantrasyonunu doğru göremememize veya ölçemememize yol açabilir. Ayrıca, molekül yapınıza uygun olmayan bir dedektör seçimi, sinyal alamama gibi sorunlarla karşılaşmanıza neden olabilir [10].

HPLC dedektörleri, farklı amaçlar için kullanılır. Uygun bir dedektör seçmeden önce, analitin ne olduğunu ve bileşiğin fizikokimyasal özelliklerini anlamak gerekir. Ayrıca, analiz etmek istediğiniz bileşiğin en düşük tespit edilebilir miktarını tahmin etmelisiniz. Dedektörler farklı özelliklerine göre çeşitlilik göstermektedir [9].

- *Yüklü Aerosol Dedektörü (CAD)*: geniş bir yelpazede molekül analizi yapabilir. İlaçlar (hem küçük hem de büyük moleküller), biyomoleküller, yiyecekler, içecekler, polimerler

gibi farklı bileşikleri ölçme kapasitesine sahiptir. Bu dedektör tipi, kromoforu olmayan analitleri tespit edebilir. Aynı zamanda uçucu olmayan veya yarı uçucu analitleri de saptayabilir. Üstelik CAD, referans standardına ihtiyaç duymadan bağıl ölçümler için kullanılabilir. CAD'in bir diğer avantajı, diğer dedektör türlerinde sıkça karşılaşılan sapma sorununu ortadan kaldırmasıdır. Bu dedektörün hassasiyeti yüksektir ve pikogram (pg) seviyesinde algılama yapabilir [13].

- Diyot Dizi Dedektörü (DAD): analit saflığını veya safsızlık piklerinin elüsyonunu analiz etmek için kullanılır ve nanogram (ng) seviyesinde bir saptama sınırına sahiptir. Bu dedektör, kromoforlu analitleri tespit etmek için tek bir UV-VIS absorpsiyon dedektörünü kullanır. Metot geliştirme çalışmalarında, pik saflıklarını tespit etmek ve en uygun dalga boyunu belirlemek gibi amaçlar için özellikle uygundur. DAD, 3 boyutlu tarama yaparak bileşiklerin karakteristik spektrumunu, yani parmak izini, tanımlar. Bu özellik sayesinde piklerin saflığını değerlendirmek mümkün olur. Diyot dizi yapısı, aynı anda birden fazla dalga boyunu algılamayı sağlar ve bu da 3D formatında veri üretimine olanak tanır. DAD, hassasiyeti artırır ve tekdüze bir yanıt sunar. Ayrıca, kirletici ve kalıntı analizleri için de uygundur [12].

- Değişken Dalga Boyu Dedektörü (VWD): birden fazla dalga boyundaki ışığın emilimini ölçer. Tek bir LED ile çalışabilir. VWD'nin analiz ettiği bileşiklerin çalışma prensibi ve türleri Diyot Dizi Dedektörü (DAD) ile benzerdir. Ancak VWD, DAD'dan daha yüksek doğrusalılık ve sağlamlık sunar. Ayrıca, VWD dört dalga boyunu eş zamanlı olarak analiz edebilir. VWD, bir nanogram algılama sınırına sahiptir ve bu da kalite kontrol analizleri için onu ideal kılar. Hem VWD hem de DAD, kullanım kolaylığı ve uygun maliyetli olmasıyla öne çıkar [13].

- Çoklu Dalga Boyu Dedektörü (MWD): Değişken Dalga Boyu Dedektörü (VWD) ve Diyot Dizi Dedektörü (DAD) gibi, UV-Vis dedektörlerinin bir parçasıdır. Bu nedenle, analiz edilen numunenin kromofor içermesi gerekir. Bu dedektör, belirli bir dalga boyundaki ışık ile bir madde arasındaki etkileşimi temel alarak çalışır. MWD'nin alım frekansı 100 Hz ile sınırlıdır. VWD'den farklı olarak, MWD, aynı anda sekize kadar dalga boyunu analiz edebilir. VWD'nin saptama limiti nanogram (ng) düzeyindedir.

- Floresan Dedektörü (FLD); UV-VIS dedektörlerinden üç ila altı kat daha yüksek hassasiyet sunar. Bu dedektör, aynı anda birden fazla dalga boyu çiftini algılayarak çalışır. Ancak, analiz edilen analitin bir florofor içermesi veya floresan özellikler gösterebilmesi ya da floresan bir türevle işlenebilmesi gerekir. FLD'nin saptama sınırı femtogramdan pikograma kadar değişir [12].

- Kırılma Endeksi Dedektörleri (RID); çözeltilerdeki ışığın kırılma yönü üzerinden bileşenleri tanımlar. RID, mobil fazın kırılma indeksi ile numunenin sapması arasındaki farkı Snell yasasına dayanarak ölçer. Özellikle zayıf kromofor grupları, şekerler ve polimerler gibi bileşenlerin analizinde etkilidir. RID'nin algılama sınırı mikrogram ( $\mu\text{g}$ ) seviyesindedir. Gradyan yöntemlere uygun değildir ve hassasiyeti diğer dedektörlere göre daha düşüktür. Bununla birlikte, RID analizi için kromofor gruplarının varlığına gerek olmadığı için kromoforu olmayan analitleri analiz edebilir.

- Kütle Spektrometresi (MS); dedektörünün temel amacı, düşük pikogram (pg) seviyesindeki bileşikleri tespit etmek ve tanımlamaktır. MS, nano, mikro, kılcal ve analitik bileşikleri saptamak için farklı sıvı kromatografi akışlarını kullanabilir. Bu dedektör, bileşikleri kütle/yük oranlarına göre tespit eder ve son derece hassas ölçümler yapabilir. Dolayısıyla, bileşiklerin tespitinde ve analizinin kapsamında büyük bir esneklik sağlar [11].

- İletkenlik Dedektörleri; iyonlaşabilen bileşikleri tespit etmek için ideal dedektörlerdir ve iletkenliği ölçmek için kullanılır. Bu dedektörler, biyofarmasötiklerin izole edilmesinde, antikor ve proteinlerin analizinde ve saflaştırılmasında kullanılabilir [13].

### 1.2.5. HPLC'de Çözücüler

Bir HPLC kromatografisinde:

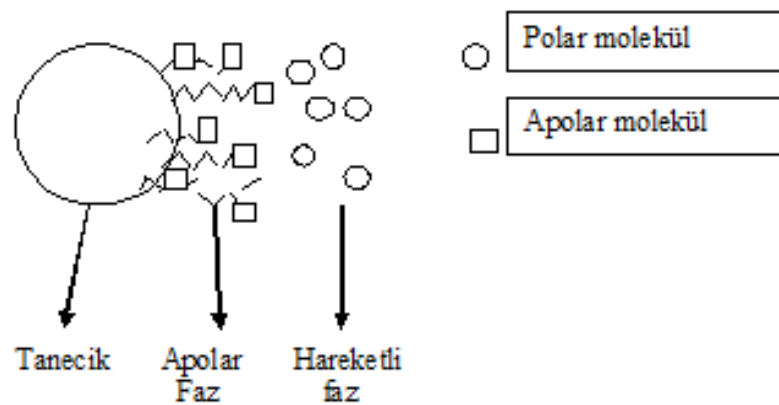
- Normal bir HPLC cihazı asgari olarak 500 mL çözücü alabilmektedir.
- Kullanılacak çözücü yüksek saflık derecesine sahip olmalıdır.
- Farklı polaritelere sahip çözücü ya da çözücü karışımları HPLC analizleri için kullanılabilir.
- HPLC analizinde kullanılacak çözücülerin kullanılmadan önce gazlarının alınması gerekmektedir. Eğer analiz için kullanılacak çözücülerin gazları alınmaz

ise analiz sonucu pikler geniş çıkabilir ya da pompada ve kolonda çeşitli sorunlar çıkabilir.

- Çözücülerin gazlarının alınabilmesi için önce çözücünün ısıtılması ve sonrasında karıştırılarak vakuma maruz kalması gerekmektedir. Vakum altında kalan çözücülere ultra derecede sonifikasyon ya da helyum verilmelidir [6].

### 1.2.6. HPLC'de Faz Seçimi

Her kolon için her faz kullanılamaz, her faz için de her kolon uygun olmamaktadır. Kolon sabit faz polaritesine sahip olursa normal faz yüksekten ortaya bir faz akışı olmaktadır. Bu durum ters faz için ortadan düşüğe şeklinde olmaktadır. Kolon çözücü polaritesi ise normal fazda ortadan düşüğe olup ters fazda yüksekten ortaya şeklindedir. Kolon örnek çıkış yerinde bulunuyorsa normal faz önce apolarıda olup ters fazda bu durum önce polardır [8]. Mobil yani hareketli faz ise polar olup (su, asetonil, tampon, metanol vb.) kolon apolar ise (alkil zincirleri bağlı partiküller), bu kromatografi türüne **ters faz kromatografisi** (silika yüzeyine 18 C'lu hidrokarbonun kovalent olarak bağlandığı faz) denir ve bu en yaygın kullanılan kromatografi türüdür. Eğer mobil faz apolar (oktanol, hekzan vb.) ve kolon da polar ise bu da **normal faz kromatografisi** (silika jel) olarak adlandırılır [11].



Şekil 1.2. Faz ayırım görüntüsü.

Moleküllerin polar veya apolar olması molekülün üzerinde bulunan yükün dağılımının simetrisine bağlıdır. Molekülün üzerinde bulunan yükün dağılımı simetrik olduğunda molekül apolar olup, bileşke kuvvet sıfır değerinden büyük bir değerde ise molekül polar yapıda olmaktadır [8].

a. Polar molekül; molekülün üzerinde bulunan yükün dağılımı simetrik olmadığında molekül polar yapıda olmaktadır, bu ise polar moleküllerde kutuplaşma görüldüğünün göstergesidir. HCl (Hidroklorik Asit), NH<sub>3</sub> (Amonyak), H<sub>2</sub>O (Su) gibi moleküllerin yapısında yükler simetrik biçimde dağılmamıştır, bu sebeple molekülün üzerinde hem negatif hem de pozitif yük yoğunlukları oluşmaktadır. Bundan dolayı da molekül polar yapıda olmaktadır [14].

b. Apolar molekül; moleküle ait olan bağların tümünün oluşturduğu bileşke kuvvet sıfır olduğunda molekül apolar yapıda olmaktadır. Diğer bir deyişle molekül kutupsuz olmaktadır. Apolar yapıya sahip olan moleküllerde bağ elektronlarının eşit bir kuvvet ile çekilmesinden ötürü kutuplaşma olmamaktadır. Apolar moleküllere örnek olarak H<sub>2</sub> (Hidrojen), N<sub>2</sub> (Azot), O<sub>2</sub> (Oksijen), CO<sub>2</sub> (Karbondioksit), CH<sub>4</sub> (Metan), BF<sub>3</sub> (bortriflorür) verilebilmektedir [15].

c. Normal faz kromatografisi; mobil yani hareketli faz kloroform, etileter, hekzan gibi apolar olup ya da düşük polarite gücüne sahip olan bir bileşen olup, sabit faz silikajel-Polimer ve silikajel veya polimerin üzerine bağlanmış olan -siyanür, -OH (Diol) veya -NH<sub>2</sub> (amin) dolgu maddeleri gibi polar bir bileşendir. Normal faz kromatografik analizlerde düşük polariteye sahip olup mobil yani hareketli fazda alıkonma zamanları uzundur fakat polaritesi arttırılmış yani yüksek polariteye sahip mobil diğer bir deyişle hareketli fazda alıkonma zamanları kısa olmaktadır [14].

d. Ters faz kromatografisi; Ters faz kromatografisinde sabit faz silikajel -polimer ve bunların üzerlerine bağlanmış olan metil, etil C18, oktil ya da fenil grupları ve bunların yanında amin gruba sahip dolgu maddeleri gibi apolar yapıda olup, mobil faz ise asetonitril, metanol, tetrahidrofuran gibi polar yapıdadırlar [9]. Ters faz kromatografik analizlerde yüksek polariteye sahip olup mobil yani hareketli fazda alıkonma zamanları uzundur. Polaritesi azaltılmış yani düşük polariteye sahip mobil diğer bir deyişle hareketli fazda alıkonma zamanları kısa olmaktadır. Alıkonma zamanının kısaltılabilmesi için mobil faz yani hareketli faz polaritesinin azaltılması sağlanır. Eğer alıkonma zamanının arttırılması isteniyorsa da mobil yani hareketli fazın polaritesi artırılabilir [14].

Kromatografide mobil (hareketli) fazların uygulanması değişiklik göstermektedir; izokratik, gradiyent ve politipik olarak üç farklı formda olabilmektedir. *İzokratik elüsyon* yönteminde, bileşenler sabit bileşimli tek bir çözücü kullanılarak elüze edilir. Tüm

bileşenler kolonda farklı hızlarda, aynı anda hareket ederler. *Gradyent elüsyonda*, polarlıkları farklı olan iki veya daha fazla çözücü sisteminin kullanıldığı bir tekniktir. Bu yöntemde, çözücü bileşimi sürekli veya basamaklı bir şekilde değiştirilir. *Politipik mobil elüsyonda* ise karışık tipteki kromatografiler için tercih edilebilir. Aynı kolon kullanılarak birden fazla kromatografik tekniğin gerçekleşmesini sağlar. Bu yöntemler sayesinde ayırım işlemi gerçekleştirilebilmektedir [15]. Ayırım işlemi kolonda gerçekleştiğinden, doğru kolon seçimi kritik öneme sahiptir. Farklı analiz türlerine yönelik çeşitli kolonlar bulunmaktadır; C8, C18, C amin (amonyak), kiral kolon gibi. Kolonların uzunluğu, çapı ve dolgu maddesinin por çapı da farklılık gösterebilir. HPLC'ye verilecek her örneğin hava kabarcıkları ve partiküllerden arındırılmış olması gerekir. Bu, hem kolonun ömrünü uzatır hem de analizin hassasiyetini artırır. Örnek hazırlama sırasında gösterilen özen, kolonun ne kadar dayanıklı olacağını belirlemektedir. Mobil fazdaki hava kabarcıklarını ultrasonik banyoda gidermek ve örnekteki mikroskobik partikülleri filtrelemek için 0.22 veya 0.45 mikronluk enjektör ucu filtrelerinin kullanılması önemlidir [11].

HPLC'de bir bileşiği analiz etmek için, o bileşiğe ait dalga boyu, akış hızı, kolon tipi, sıcaklık ve dedektör türü gibi bilgilere ihtiyaç vardır. Eğer tüm bu bilgilere sahipseniz ve laboratuvarınızdaki HPLC konfigürasyonu (dedektör, pompa, kolon vb.) bu gereksinimleri karşılıyorsa, analiz yapılabilir. Bunun için, aranan bileşiğin standart örneğiyle en az 5 noktalı bir standart eğri oluşturmak gerekir. Standartlarla, hedef bileşiğin alıkonma zamanı (retention time,  $t_R$ ) belirlenir. Aynı koşullar altında analiz edildiğinde, aynı dakikada ortaya çıkan pik için bu bileşik olduğu söylenebilir. Son aşamada, örneklerin kantitatif analizi için, elde edilen veriler bu standart eğri ile karşılaştırılır [13].

### 1.3. Kromatografi Sistemleri İçin Numune Hazırlama Yöntemleri

Numune hazırlama, kromatografi sistemlerinde analitik sürecin kritik bir aşamasıdır. Uygun numune hazırlama yöntemleri, kontaminasyon riskini azaltır, doğruluğu artırır ve hatalı sonuç olasılığını düşürür [13].

Laboratuarda analiz edilecek yüzlerce farklı örnek türü olabilir. Bu örneklerin çeşitliliği, farklı matrislerle çalışmak anlamına gelir ve her matris, farklı numune hazırlama tekniklerini gerektirir. Analistler, sıvı-sıvı ekstraksiyonu (LLE), katı faz ekstraksiyonu (SPE), katı-sıvı ekstraksiyonu (SLE) ve diğer kromatografik yöntemleri içeren çeşitli numune hazırlama tekniklerini kullanabilir [12].

**a.Sıvı-sıvı ekstraksiyonu (LLE);** numune hazırlama teknikleri arasında en çok bilinen ve yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir. Birçok kişi üniversitede LLE yöntemini sıkça deneyimlemiştir. LLE, sıvı bir çözücü kullanarak sıvı bir matristen analiti elde etmeyi amaçlar. Bu teknik, iki farklı çözücüde farklı çözünürlüklere sahip bileşikleri ayırmaya dayanır. Ayırma sürecinde genellikle ayırma hunisi kullanılır. Ayırma hunisi, bileşikleri polarite farklarına göre ayırır. LLE, damıtma sırasında bir azeotrop oluşumu nedeniyle damıtma imkânsız olduğunda özellikle yararlıdır [10].

Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu (LLE) yöntemi, antibiyotikler, vitaminler, parfümler, tuzlar ve petrol ürünleri gibi numunelerin hazırlanmasında kullanılır. Bu nedenle, LLE, GC veya HPLC cihazları için numune hazırlamada en yaygın kullanılan tekniklerden biri haline gelmiştir [12].

LLE yönteminin bazı avantajları şunlardır: ekstraksiyon süreci oldukça basittir, cam eşyalar ucuzdur, organik çözücüler tekrar kullanılabilir ve ekstrakte edilen karboksilik asitler yüksek saflıkta elde edilebilir. Ancak, LLE'nin bazı dezavantajları da vardır. Numunenin çözünmesi zaman alabilir ve karıştırma işlemi yoğun olduğunda, kırılması zor bir emülsiyon oluşabilir. Ayrıca, bu yöntem çok fazla organik çözücü kullanır, önemli miktarda cam eşya gerektirir ve büyük miktarda atık üretir [10].

**b.Katı-sıvı ekstraksiyonu (SLE);** katı bir matrisin sıvı bir çözücü ile çözüldüğü bir ayırma işlemidir. SLE'nin çalışma prensibi, kahve tavelerinin sıcak suda çözünmesiyle kafein elde edilen kahve demleme süreci ile benzerdir. Laboratuvar ortamında, analitleri numunedan çıkarmak için genellikle bir Soxhlet ekstraktörü kullanılır. LLE'de olduğu gibi, SLE de HPLC veya GC ekipmanı için uygundur. SLE, genellikle gıda, ilaç ve kimya endüstrilerinde kullanılır. Ayrıca, petrol cevherlerinden yağı ayırmak ve cevherlerden metalik tuzları çıkarmak için de kullanılır [10].

SLE'nin avantajlarından biri, karışım olmadan çalıştığı için emülsiyon oluşma riskinin olmamasıdır. Ayrıca, düşük reaktif maliyetleri, yüksek verim, doğru sonuçlar, yüksek numune kapasitesi ve LLE'ye göre daha az çözücü kullanımı gibi faydalar sağlar [12].

Buna karşılık, SLE'nin bazı dezavantajları da vardır. Sert dokulu numuneler için uygun değildir ve kalın bir ekstrakt elde etmek için döner bir buharlaştırıcı ile buharlaştırma gerektiğinden işlem karmaşık olabilir [13].

**c. Katı faz ekstraksiyonu (SPE);** LLE yönteminde devrim yaratan bir numune hazırlama teknolojisidir. SPE'nin ayırma ilkesi, SPE kolonunun durağan fazının analitleri solüsyonda tutmasına dayanır. Analitler, daha sonra bir çözücü kullanılarak konsantre hale getirilerek ayrılır [11].

SPE'nin avantajları şunlardır: SPE ekstraksiyonu için gereken süre genellikle yaklaşık 30 dakika gibi nispeten kısadır, süreç basittir ve manuel veya otomatik olarak uygulanabilir. Ayrıca, SLE ve LLE'ye kıyasla daha iyi geri kazanım sağlar, emülsiyon oluşumunu engeller, daha az organik çözücü kullanır ve seçicilik ve tekrarlanabilirlik düzeyini artırır. SPE, analitlerin katı durağan faz ile etkileşime girerek ayrılması prensibiyle LLE'den farklıdır. SPE'nin üç türü vardır: normal faz, ters faz ve iyon değişimi. Bu türler sırasıyla polar, apolar ve yüklü bileşenlerin ayırımında kullanılır [10].

SPE, çevre, endüstri, ilaç, gıda ve denizcilik gibi birçok sektörde yaygın olarak kullanılır. İdrar, kan, yumurta, bal, anne sütü ve kırmızı şarap gibi matrislerden analit ayırmak için idealdir. Bu ekstraksiyon yöntemi, daha sonra GC veya HPLC ile daha fazla analiz yapmak için kullanılır. Ancak, SPE'nin dezavantajları da vardır; bazı araştırmacılar, bu yöntemin zaman alıcı ve karmaşık olduğunu ve kartuş değiştirmenin zahmetli olabileceğini belirtmişlerdir [13].

Aşırı cam eşya kullanımı, yüksek işçilik gereksinimleri ve düşük verimlilik, araştırmacıları daha verimli ekstraksiyon yöntemleri aramaya yöneltti. QuEChERS, "Hızlı, Kolay, Ucuz, Etkili, Dayanıklı ve Güvenli" anlamına gelir ve genellikle dağıtıcı Katı Faz Ekstraksiyonu (SPE) olarak bilinir. Bu yöntem, özellikle kartuş maliyeti gibi SPE'nin dezavantajlarının üstesinden gelmek için geliştirilmiştir [10].

QuEChERS'in avantajları arasında yüksek geri kazanım, doğru sonuçlar, büyük numune hacmi, düşük çözücü ve cam malzeme kullanımı, daha az işçilik ve düşük reaktif maliyetleri yer alır. Ancak, düşük nem veya yüksek yağ içeriğine sahip numunelerde temizleme etkinliği ideal değildir, ekstraksiyon verimliliği düşebilir ve temizleme işlemi bazı eksiklikler gösterebilir. Bu yöntem, kan, zeytinyağı, tahıl, süt, balık ve ilaç gibi çeşitli gıdalarda pestisit kalıntılarını tespit etmek için uygundur. QuEChERS, özellikle GC analizi için tasarlanmıştır [12].

**d. Hızlandırılmış solvent ekstraksiyonu (ASE);** katı veya yarı katı matrislerden organik bileşikleri sıvı bir çözücü ile ayıran bir ekstraksiyon yöntemidir. Bu yöntem, bal, pestisitler, toplam petrol hidrokarbonları (TPH), portakal kabuğundaki hesperidin ve dioksin içeren numuneleri ekstrakte etmek için uygundur [11].

ASE'nin avantajları arasında, otomatik bir sistem olması, Soxhlet ve ultrasonik ekstraksiyona göre daha hızlı ekstraksiyon süresi, kullanım kolaylığı, diğer ekstraksiyon yöntemlerine kıyasla daha az solvent kullanımı ve daha az insan gücü gereksinimi yer alır [11].

*-Numunenin Enjekte Edilmesi:* Yüksek basınç altında yapılan numune enjeksiyonunda enjekte edilen numune bu basınç altında mobil faza karışarak kolonun üst kısmına mobil faz içerisinde çözülmüş olarak ulaşır. Enjeksiyonla 5 -1000 µL hacme sahip numune tek seferde kolon içerisine enjekte edilebilir [10].

#### **a. Uçucu maddeler için numune hazırlık yöntemleri**

**Statik Üst Boşluk (SHS);** kapalı bir kromatografi şişesinin gaz fazı veya buhar kısmıdır. SHS, uçucu ve yarı uçucu analitleri sıvı veya katı numunelerden ayırmak için kullanılır ve genellikle Gaz Kromatografisi (GC) ekipmanında uygulanır. SHS yöntemi, numunenin kapalı bir şişeye konulup ısıtılmasıyla çalışır. Isıtıldığında, uçucu bileşenler matristen şişenin üst kısmına geçer. Daha sonra, bu üst boşluktan bir miktar gaz alınarak analiz için GC'ye iletilir. Bu teknik, kandaki alkol seviyesini, ilaç çözücü kalıntılarını, gıda ve içeceklerdeki tat bileşenlerini, parfüm ve deterjanlardaki aromaları tespit etmek için kullanılır [9].

SHS'nin avantajlarından biri, işlemin kolay ve hızlı olmasıdır, bu nedenle az miktarda solvent ve reaktif kullanılır. Ayrıca, SHS genellikle çok yoğun numuneler için ek bir tarama yöntemi olarak da kullanılabilir [13].

**Temizle ve Yakala (Purge and Trap, P+T) tekniği;** gaz Kromatografisi (GC) ekipmanı kullanarak uçucu organik bileşikler (VOC'ler) analiz etmek için kullanılır. 1970'lerde Cincinnati'de geliştirilen bu teknik, üç ana adımdan oluşmaktadır. Bu üç adım ekstraksiyon (temizleme), adsorpsiyon (yakalama) ve desorpsiyon (ısıtma)dur [11].

P+T, VOC'ler içeren bir numuneyi bir inert gaz kullanarak bir adsorban tuzağına aktarma sürecini içerir. VOC'ler, tuzak tarafından yakalandıktan sonra ısıtılarak serbest bırakılır ve GC kolonuna iletilir [11].

Bu yöntem, VOC'leri sudan, topraktan ve çamurdan ayırmak ve konsantre etmek için idealdir. P+T, Statik Üst Boşluk (SHS) yönteminden daha hassastır ve daha fazla numunenin analizine olanak tanır. P+T, parçacık başına milyar (ppb) veya trilyon (ppt) seviyesinde tespit limitleri sunarak iz analizi için uygundur. Bununla birlikte, P+T ekipmanı, SHS'ye göre daha karmaşıktır [12].

**Katı Faz Mikro Özütleme (SPME);** 1987'de Pawliszyn ve Liu tarafından geliştirilmiştir. SPME, katı-sıvı ekstraksiyonunun (SLE) bir varyasyonu olarak solvent kullanılmadan numune hazırlama imkanı sunar. Bu teknik, kan, serum, kanalizasyon, yeraltı suyu ve kas dokusu gibi farklı numunelerden uçucu ve yarı uçucu bileşikler izole etmek için silika liflerini kullanır [11].

SPME'nin uygulama alanları, çevre, biyoloji, farmasötikler, yiyecek ve içecek, tatlar ve parfümler, adli tıp ve toksikoloji gibi birçok sektörü kapsar. SPME'nin avantajlarından bazıları, solvent kullanılmaması, otomasyona kolayca uyarlanması, numuneye zarar vermemesi, hemen hemen her matriste çalışabilmesi, kullanılan liflerin ucuz ve tekrar kullanılabilir olması, küçük boyutuyla saha çalışmaları için uygun olması ve GC veya HPLC ile uyumlu olmasıdır [12].

#### **1.4. Sıvı Kromatografi (HPLC) Sisteminde Önemli Parametreler**

##### **1.4.1. Alıkonma Zamanı (tR)**

Kolon içerisine giren maddenin kolonu terk ederek dedektörde sinyal oluşturma süresidir. Kolona verilen enjeksiyonun, verildiği süreden dedektöre varıp kromatogramda oluşturduğu pikin tepe noktasının x eksenindeki yerini ifade eder. Kolondan ayrılacak olan maddenin kolon ile olan etkileşimini, buna istinaden alıkonma zamanına etki eden önemli parametreler şunlardır; kullanılan kolonun özellikleri, kullanılan kolonun sıcaklığı, kullanılan mobil fazın bileşim durumu, kullanılan sabit fazın tip ve özellik durumu, kullanılan sabit faz ve kullanılan hareketli faz arasında bulunan moleküller arasındaki etkileşimler [15].

### 1.4.2. Rezolusyon (Rs)

Rezolusyon piklerin arasındaki ayırımın ölçüsü olmakla birlikte kolonun pikleri ayırmasının kapasitesini belirtir. Rezolusyon yüksekliği ile iki pik arası taban çizgi ayırımı birbirleriyle bağlantılıdır. Rezolusyon, “Seçicilik/Ayrım Faktörü ( $\alpha$ )” “Alıkonma/Kapasite Faktörü ( $k'$ )” ve “Etkinlik/Teorik Plaka Sayısı ( $N$ )”, parametreleri ile ilgilidir. Aralarındaki bu ilişki şöyle formülize edilmektedir [15].

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{(\alpha-1)}{\alpha} \frac{k'}{(k'+1)} \quad (\text{Eşitlik 1}) \quad (1.1)$$

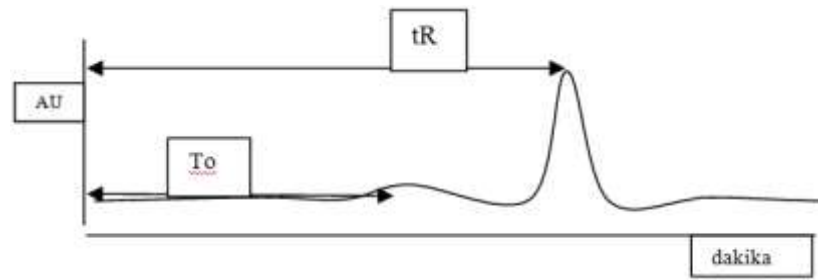
Etkinlik faktörünün akışının hızı; kolonun uzunluğu ya da dolguda kullanılan maddelerin partikülünün boyutuna bağlı olarak değişebilmektedir. Etkinlik kontrolü pik genişliği ile ilgilidir. Rezolusyon arttıkça pik genişliği düşer.

Etkinlik/Teorik plaka sayısı ( $N$ ) şeklinde gösterilmektedir ve pikin çıkış zamanı ile pikin genişliğinin kullanılmasıyla hesaplanmaktadır. Rezolusyon etkinlik/teorik plaka sayısındaki ( $N$ ) büyük derecedeki artışlar rezolusyon değerinde küçük miktarda değişikliklere sebep olmaktadır [12].

Rezolusyon değerini önemli derecede etkileyen bir diğer parametre de Seçicilik/Ayrım Faktörüdür ( $\alpha$ ). Seçicilik/ayrım faktörü ( $\alpha$ ) mobil faz ve sabit faz bileşimine bağlı olarak değişebilmektedir. Rezolusyonu derecesini arttırmanın en kolay yolu budur [13].

### 1.4.3. Alıkonma/Kapasite Faktörü ( $k'$ )

Alıkonma diğer bir deyişle kapasite faktörü ( $k'$ ), kullanılacak olan kimyasal içeriğin kromatografik kolonda ne kadar süre kaldığını ölçebilmek amacıyla kullanılan parametredir. Kapasite/Alıkonma faktörünü; sabit faz ve mobil fazın türü ile maddenin yapısı belirler [14].



Şekil 1.3. Alıkonma grafiği.

Kapasite Faktörü ( $k'$ ) :  $(t_R - t_0) / t_0$

$t_0$ : Mobil faz (çözücü) pikinin alıkonulma zamanı

$t_R$ : Kullanılan kimyasal içeriğin (sabit faz ) pikinin alıkonulma zamanı

$k'$  : Kapasite/Alıkonma faktörü

Hareketli-Mobil faz (ölü hacim) piki ( $t_0$ ) enjeksiyon yapılmasının ardından temel çizgi üzerindeki görülen ilk kırılmadır.

Uygun kapasite/alıkonma faktörü  $10 > k' > 1$  aralığında olmalıdır.

- ( $k'$ ) değeri 0-1 aralığında olduğunda rezolusyon (Fark edilebilir en küçük değişim ölçüsü) sınırlı olur.
- ( $k'$ ) değeri artmaya başladıkça rezolusyonda artmaktadır.
- ( $k'$ ) değeri 2 ile 10 arasında olduğunda iyi bir rezolusyon sağlanmış demektir.
- ( $k'$ ) değerini daha çok artırmak rezolusyonu arttırmaz fakat ayırma için geçen süreyi arttırır.
- ( $k'$ ) değeri 20 ve üzeri olursa rezolusyonda meydana gelen artış azalmaktadır.

#### 1.4.4. Etkinlik/Teorik Plaka Sayısı (N)

Etkinlik ya da diğer adıyla teorik plaka sayısı; farklı olan kolonların sahip oldukları etkinliklerin karşılaştırabilmesi için kullanılmaktadır. Kolonun etkin olup olmadığı elde edilen pikin genişliğiyle ilgilidir. Eğer kolonlarda dar pikler elde ediliyorsa bu o kolonların etkinliklerinin yüksek olduğunu gösterir. Eğer kolonların pikleri geniş ise bu o kolonların etkinliklerinin düşük olduğunu gösterir. Kolon etkinliğinin yüksek olduğu kolonlarda maddelerin ayırımı daha kolay olmaktadır. Kolon performansının nasıl olduğunun anlaşılabilmesi için sık kullanılan parametrelerden biriside etkinlik yani teorik plaka sayısıdır. Etkinliğin yani teorik plaka sayısı şu şekilde gösterilir [12]:

$$N=16(t_R/w_t)^2 \quad (\text{Eşitlik 2}) \quad (1.2)$$

N:Etkinlik/teorik plaka sayısı

$t_R$ :Alıkonma zamanı

$W_t$ :Pik genişliği

#### 1.4.5. Seçicilik/Ayrım Faktörü ( $\alpha$ )

Seçicilik diğer bir deyişle ayırım faktörü iki pikin en yüksek seviyesi arasındaki zaman veya mesafenin ölçüsüdür. Seçicilik yani ayırım faktörün üzerinde meydana gelen küçük bir değişiklik bile rezolüsyon üzerinde büyük bir etki yaratabilir. Seçicilik faktörü mobil faz ve sabit faz bileşimi ile değişebilmekte olup sıcaklıkta seçicilik faktörünü etkileyen diğer bir faktördür [15].

Eğer seçicilik yani ayırım faktörü ( $\alpha$ )=1 ise iki pikin kolonda tutunma süreleri aynı olup aynı elüsyona (Kromatografi işlemiyle, bir maddeyi, başka maddelerden ayırma işlemi) sahiptirler. Seçicilik/Ayrım Faktörü ( $\alpha$ ) şu formül ile ifade edilmektedir.

$$\alpha = k_2/k_1 \quad (\text{Eşitlik 3}) \quad (1.3)$$

$\alpha$ :Seçicilik/Ayrım faktörü

$k_1$ :Birinci pikin kapasite faktörü

$k_2$ :İkinci pikin kapasite faktörü

#### 1.4.6. Basınç

Bir sıvı kromatografisinin sisteminde basıncın denklemi akış hızı (F), kolon yarıçapı (r), partikül çapı (dp), solvent viskozitesi ( $n$ (*akışkan bir maddenin akma durumuna karşı gösterdiği direncin ölçütüdür*)) ve kolon uzunluğu (L) parametreleri ile belirlenmektedir [15].

$$\Delta P = \frac{nFL}{K^0 \pi r^2 d_p^2} \quad (\text{Eşitlik 4}) \quad (1.4)$$

$\Delta P$ : Basınç değişimi

$n$ : viskozite  $F$ : Akış hızı

$L$ : Kolon uzunluğu

$K^0$ : Kolon geçirgenliği

$\pi r^2$ : Kolon yarıçapı

$d_p^2$ : Partikül çapı

### 1.4.7. van Deemter Eğrileri

Van Deemter denklemi ve eğrileri verimliliği değerlendirmektedir ve bunu lineer hız (u) ya da akış hızına bağlı bir fonksiyon olarak değerlendirmektedir. Bu eğrilerin denklemi şu şekilde ifade edilmektedir [15].

$$H=L/N \quad (\text{Eşitlik 5}) \quad (1.5)$$

H:Plaka yüksekliği      L: Kolon uzunluğu      N:Plaka Sayısı

Plaka yüksekliği ile plaka sayısı doğru orantılıdır. Plaka yükseklik değeri artış gösterdikçe kromatografik çözünürlükte artmaktadır. Farklı tür kolonların performanslarının değerlendirilmesi için ve optimum doğrusal hızın belirlenmesi için van Deemter eğrileri çizilmektedir [12].

### 1.4.8. Gradient Denklemi

Gradient ayırım sayesinde daha dik ve dar yapıda pikler sağlanabilmektedir.

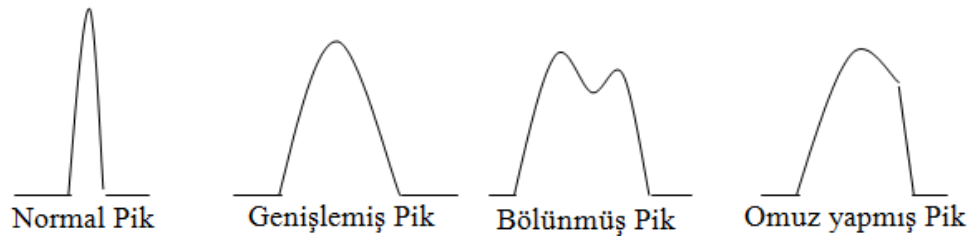
$$k^* = \frac{t_G F}{s\Delta\phi V_m} \quad (\text{Eşitlik 6}) \quad (1.6)$$

K\*: Gradient alıkonma       $t_G$  : Gradient süresi      F: Akış hızı      S: Denklem sabiti  
 $\Delta$ : Mobil faz B hacmindeki değişiklik       $V_m$ : Kolon ölü hacmi       $\phi$ : Çap

Gradient denkleminde, S sabitinin değeri kolondan ayrılan molekülün boyutuna bağlıdır. Eğer molekül boyutları küçük ise S sabiti 4 ile 6 arasında olmaktadır. Peptit bağları ve proteinlerde bu değer 10 ile 1,000 arasında olmaktadır.

### 1.5. HPLC Analizlerinde Anormal Pik Şekilleri ve Olası Hata Kaynakları

Sıvı kromatografik analizlerde pikteki anormallikler, pikin genişlemesi (aşırı derecede kuyruklanması), pikin omuz yapması ve pikin bölünme yapması gibi durumlar sıvı kromatografik analizlerde (Hplc) rastlanan hatalardır [9].



Şekil 1.4. Normal pik ve anormal piklerin görüntüleri

Bu anormal piklerin görülmesinin ana sebepleri şunlardır:

### 1.5.1. Kolonun Bozulması

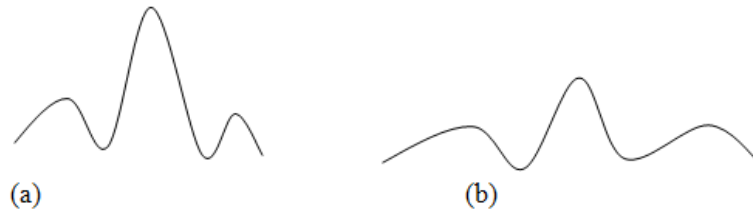
Analitik olan kolonun ön bölümüne bir guard kolon takılmış olabilir, guard kolon çıkarılıp pik şekilleri tekrar kontrol edilebilir. Eğer pik şekilleri normal haline dönerse, piklerdeki bozulmanın sebebi guard kolon demektir [11].

Kolonun bozulma sebebi kolon dolgu maddesinde yapılmış olan bir değişim veya kolonda biriken kirletici bileşenleri olabilmektedir. Kolon dolgusunda kullanılan madde uzun süre basınca maruz kalmış ya da kullanılan bozulmuş olabilir (silika jelin çözünmesi gibi). pikin omuz yapmasına ya da pikin bölünmesine kolonun girişinde bulunan dolgu maddesi içerisinde meydana gelen hafifçe bir boşlu da sebep olabilir. Ayrıca kolon içerisine giren bileşenlerin kirletici olması ve bu kirli bileşenleri kolon girişinde ya da kolon girişinin yakın bölgelerinde biriktirmesi ve bu birikintinin filtreleri tıkaması piklerde anormal şekillere sebep olabilmektedir [8].

Kolonun bozulduğu düşünülüyorsa kolon kullanım kılavuzunda yazan yıkama talimatları doğrultusunda yıkayıp, kolonun çalışıp çalışmadığı tekrar kontrol edilebilir. Eğer ki bu işlem sonrasında da piklerde istenilen sonuçlara ulaşılmıyorsa kolonlar üzerinde backflush (yıkama çözeltisi kullanılarak kolon içinin düşük ve zıt bir akışla geri yıkanması demektir) yapılabilir. Eğer bunlar işe yaramazsa kolon işlevini kaybetmiş demektir [9].

### 1.5.2. Numune Çözücüsünün Seçimi ya da Enjeksiyon Hacmine Bağlı Hatalar

Enjeksiyon hacminin ya da numunenin çözücü bileşiminin değiştirilmesi analiz sonucunda çıkan piklerin anormal özellikte olmasına sebep olabilmektedir. Numunenin çözücüsünün ve enjeksiyon hacminin istenen pik için uygun düzeyde ayarlanmalıdır [9].



Şekil 1.5. Numune çözücüsüne ya da enjeksiyon hacmine bağlı oluşan hatalar sonucunda oluşan pik görüntüleri.

(a) kromatografik analizinde mobil yani hareketli faz olarak sitrat tampon çözeltisi 3, asetonitril 1 yani 3'e oranında veya organik çözeltideki numune çözücüsü olarak sitrat tampon çözeltisi yerine 3 oranında su ve yine aynı şekilde (su / asetonitril = 3/1) ile yapılan çalışmayı, oranında asetonitril kullanılmıştır. İkinci yani (b) kromatografik analizinde ise terz faz modu hedef alınarak tek başına çözücü olarak asetonitril kullanılmıştır. Asetonitril ise çok güçlü bir çözücüdür. Analiz için kullanılan çözücünün gücü ve oranı yükseldikçe pik şeklinde genişleme olmaktadır [9].

### 1.5.3. Akış Hatlarındaki Ölü Bölümler

Aynı iç çap ölçüsüne sahip farklı kolonlar kullanıldığında analiz sonucunda oluşan pikler genişlemiş ise bu durumun sebebi kolon bağlantılarında yani numune enjeksiyon ünitesi ya da dedektör ve kolon arası olan hacmin ölü yani işlev yeteneğini kaybetmiş olması ve böylece numune geçişinde yaşanan sıkıntılara bağlı olabilmektedir. Üreticiye bağlı olarak değişen kolonun uzunluğu kolon bağlantıları için önem arz etmektedir. Konnektöre farklı bir kolon takılırken kolon iyice oturtulmalıdır ve konnektöre oturtulurken uzak olan tarafa doğru bastırılmalıdır [7].

### 1.5.4. Kolonlardaki Sıcaklık Değişimleri

Kolon sıcaklığının, akış hızının yüksek olması ya da iç çapı büyük bir kolon kullanılması sıcaklık değişimlerine neden olabilmektedir. Bu etmenlerin yanı sıra mobil yani hareketli faz yeterli miktarda ısıtılmadan kolondan akıyorsa sıcaklıkta değişim görülebilmektedir. Kolonun orta bölüm sıcaklığı, kolonun iç duvara yakın bölgelerin sahip olduğu sıcaklığa nispeten daha düşüktür. Bu sıcaklık farklılıkları analiz sonucu elde edilen pikin genişlemesine sebebiyet verebilmektedir [9].

Sıcaklık değişiminin meydana getirdiği etkileri mobil yani hareketli fazın ön bir ısıtmadan geçirilmesi analiz sonucu oluşan pikin genişlemesinin önüne geçilebilmektedir. Bu da numune enjeksiyon ünitesi ile paslanmaz çelik bir yapıda olan kolon yerinin arasında bulunan kolon boyunun uzatılması ile mümkün olabilmektedir. Fakat kolonda ön ısıtma yapılması analiz sonucu oluşacak pikin genişlemesine neden olabilmektedir Bu durumdan kaçınmak için kolonun iç çapının ve uzunluğunun optimize edilmesi gerekir [7].

### 1.5.5. Dedektörün Sinyal Ayarının Uygun Olmaması

Gürültü pik genişlemesine sebep olabilmektedir. Dedektörün zaman sabiti olarak adlandırılabilen sinyal ayarları değiştirilerek analiz sonucu elde edilen piklerin genişlemesi azaltılabilmektedir. Sinyal ayarının yavaş olması gürültünün şiddetini azaltabilir yüksek hassasiyetle sahip analizlerin yapılabilmesi için de bu önemlidir. Gürültünün şiddeti azaldıkça analiz sonucunda oluşan piklerin genişlemesi gerçekleşebilmektedir [8].

## 1.6. C18 Kolonu

C18 kolonu silika parçacıkları ile bağlı oktadesilsilan (C18) kimyasal bağı ile bağlıdır ve 18 adet karbon atomu ile oluşmuş uzun boyutlu zincirli yapıda bir alkildir ve bir sabit bir faz türüdür. C18 kolonları çok yönlüdür, kararlı yapıdadır ve yüksek verimliliğe sahiptir. C18 kolonları, organik bileşikleri, ilaçları ve biyoaktif maddelerin analizleri için kullanılmaktadır [1].

### 1.6.1. C18 Kolonunun Avantajları

HPLC analizlerinde en çok kullanılan kolon C18 olup bu kolonun birçok avantajı vardır. Bunlar:

**a. Hidrofobik etkileşimlere sahiptir:** C18 kolonu mobil fazın polar olduğu ters faz kromatografik analizinde polar olmayan bileşiklerin ayrılmasını sağlar ve sabit bir faz ile hidrofobik bağ kurup polar bileşiklerin daha hızlı ayrışmasını sağlamaktadır [9].

**b. Kimyasal stabiliteye sahiptir:** C18 kolonları, 18 adet karbon zincirleri ile bağlanmış ve silika yüzeyinin sahip olduğu sağlam yapı sayesinde kararlı bir yapıdadır. Bu özellik

C18 kolonlarının dayanıklı olmasını sağlamaktadır, Ayrıca sulu ve organik yapıda olan mobil yani hareketli fazlar için de kullanılan çözücü maddeye uyum sağlar ve değişen şartlar altında tutarlı bir performans sağlamaktadır [9].

**c. Geniş bir pH toleransı vardır:** C18 kolonu tamamen kararlı bir yapıdadır. 2 ve 8 arası geniş bir pH aralığı ile asidik durumda da bazik durumda da olan tüm numune türlerinin bozulma olmadan işlenmesini sağlar. Bu sayede C18 kolonu ilaçların analizinin yapılmasını, çevre testlerinin yapılmasını ve gıda güvenliğinin kontrolünü sağlamayı daha kolay bir hale getirmiştir [9].

**d. Güçlü Tutma ve seçiciliğe sahiptir:** C18 kolonu sahip olduğu uzun ve hidrofobik olan alkil zincirleri sayesinde polar olmayan bileşikleri güçlü şekilde tutar ve hafif polar bileşiklerin kolondan daha hızlı geçmesinin sağlar. Böylelikle kolay bir seçicilik ve ayırım gerçekleşir [9].

**e. Yüksek Düzeyde Verimlilik Sağlar:** C18 kolonunun zincirlerinin kontrollü bir şekilde bağlanmasından dolayı kolonlar yüksek bir kalitede kolon dolumu ve tek düzelik sağlamaktadır. Tepe noktalarına yüksek bir çözünürlüğe sahip ayrımları ve iyi bir şekilde tanımlanmasıyla katkıda bulunur [9].

### 1.6.2. C18 Kolonu Çalışma Prensibi

C18 kolonu sabit olan fazın apolar (C18), ve mobil yani hareketli fazın ise su ve sulu olan çözücüler gibi polar olduğu ters faz kromatografisi ilkesi doğrultusunda çalışmaktadır. Ters faz kromatografik analizinde su, asetonitril, metanol gibi veya bunların karışımı polar çözücü mobil faz olarak kullanılır. Polar yapıda olan bu çözücü numune ile birlikte kolon içerisinde kolon boyunca taşınmaktadır [2]. Numune kolon içerisine verildikten sonra numunenin bileşenleri polaritelerine göre bireysel olarak sabit faz ile etkileşim içerisine girmektedir. Numunede bulunan apolar bileşenler ise hidrofobik olan C18 zincirleri ile kuvvetli bir etkileşimde bulunarak kolon içerisinde daha uzun süre tutunabilmektedir. Mobil yani hareketli faz kolon içerisinden geçerken numune bileşenleri C18 sabit faza olan yakınlık derecelerine göre ayrılmaktadır. Bileşiğin polarlığı ile kolonda kalma süresi ters orantılıdır yani bileşiğin polarlık seviyesi azaldıkça kolonda tutunma süresi artmaktadır [2]. Polarlığı yüksek olan bileşikler kolon içerisinden hızla geçmektedir ve uzun süre tutunamamaktadırlar. Bileşikler kolon içerisinden

ayrıldıktan sonra analiz edildikleri bileşiklere göre UV tespiti, floresan yöntemi ve diğer farklı tespit yöntemleri ile tespit edilmektedir.

### **1.7. HPLC’de Metot Geliştirme**

HPLC ile metod geliştirme sürecinde ilk adım, numunenin ve aranan biyomolekülün yapısını, fiziksel ve kimyasal özelliklerini belirlemektir. Daha sonra bu özelliklere uygun mobil faz, kolon, yöntem seçimleri yapılır. Bu seçimler yapılırken, benzer özelliklere sahip kolon boyutları, mobil faz içeriği gibi birçok değişken göz önünde bulundurulmalıdır. Tüm bu değişkenlerin tek tek ele alınıp ayrı ayrı çalışılması gerekir. Bu süreç zaman alabilir. İyi sonuçlar elde etmek için, kaynak taraması yapılmalı, referans metotlar ve makaleler incelenmelidir [1].

### **1.8. HPLC Sisteminde Analitik Metot Validasyonu ve Önemi**

HPLC sisteminde analitik metot validasyonu, belirli bir analitik yöntemin doğruluğunu, hassasiyetini, tekrarlanabilirliğini ve özgüllüğünü değerlendirmek için yapılan kapsamlı bir süreçtir. Bu süreç, bir analitik yöntemin belirli bir uygulama veya analiz görevi için uygunluğunu belirlemeye yöneliktir ve genellikle belirli endüstri standartları ve düzenlemelerine tabidir [12].

Analitik metot validasyonunun temel amacı, güvenilir ve doğru analitik sonuçların elde edilmesini sağlamaktır. Bu, analitik verilerin doğruluğunu ve tekrarlanabilirliğini doğrulayarak, sonuçların güvenilirliğini artırır. Ayrıca, bir analitik yöntemin belirli bir endüstri veya uygulama alanındaki gereksinimlere uygunluğunu belirlemek için yapılır [14].

Bu süreç genellikle standart bir protokol izleyerek gerçekleştirilir. Bu protokol, çeşitli validasyon parametrelerini içerir ve bu parametrelerin değerlendirilmesi sonucunda yöntemin doğruluğu ve güvenilirliği hakkında bilgi sağlar. Analitik metot validasyonu, aşağıdaki nedenlerle önemlidir [15]:

**a. Güvenilirlik:** Analitik sonuçların güvenilir olması, alınan kararların doğru olmasını sağlar. Bu da tüketici güvenini artırır ve ürün kalitesini garanti altına alır.

**b. Kalite kontrolü:** Bir analitik yöntemin belirli bir test veya kalite kontrol görevi için uygunluğunu doğrulamak, ürünlerin standartlara uygunluğunu sağlar ve kaliteyi artırır.

**c. Yasal uyum:** Birçok endüstride, özellikle farmasötik, gıda ve çevre gibi düzenlenmiş sektörlerde, analitik yöntemlerin yasal düzenlemelere ve standartlara uygunluğunu sağlamak gerekir. Analitik metot validasyonu, bu uyumun sağlanmasına yardımcı olur.

**d. Maliyet ve zaman tasarrufu:** Yanlış sonuçlar nedeniyle gereksiz tekrarlamaları önlemek, kaynakların daha verimli kullanılmasını sağlar ve maliyetleri düşürür.

Analitik metot validasyonu çeşitli endüstrilerde yapılır. Bunlar arasında farmasötik, gıda, kozmetik, çevre, tarım ve kimya endüstrileri bulunur. Bu endüstrilerde, ürün kalitesinin ve güvenliğinin sağlanması için analitik yöntemlerin doğruluğu ve güvenilirliği büyük önem taşır.

***Analitik metot validasyonu için temel parametreler şunlardır:***

- **Hassasiyet:** Bir yöntemin ölçüm aralığı içindeki en küçük ölçüm değeri.
- **Doğruluk:** Analitik sonuçların gerçek değerlere ne kadar yakın olduğunun derecesidir.
- **Tekrarlanabilirlik:** Aynı örneği aynı koşullar altında defalarca analiz ettiğinizde sonuçların ne kadar tutarlı olduğunu ifade eder.
- **Özgüllük:** Analitik yöntemin belirli bir bileşiği diğer bileşiklerden ayırma yeteneğidir.
- **Çalışma Aralığı:** Bir yöntemin doğru sonuçlar verme yeteneği için belirlenen konsantrasyon aralığıdır.
- **Gözlenebilme Sınırı:** Bir analitik yöntemin en küçük algılanabilir analit konsantrasyonudur.
- **Lineerlik:** Analitik yanıtların analit konsantrasyonu ile doğrusal bir ilişki gösterme derecesidir.
- Bu parametreler, analitik metotların doğruluğunu ve güvenilirliğini belirlemek için değerlendirilir ve raporlanır. Analitik metot validasyonu süreci, belirlenen parametrelerin belirli bir analitik yöntem için karşılanıp karşılanmadığını belirleyerek, güvenilir ve doğru analitik sonuçların elde edilmesini sağlar.

### 1.9. Problem Durumu

Çeşitli bitkilerdeki triacontanol düzeylerinin belirlenmesine yönelik çok az sayıda çalışmaya rastlanılmıştır. Bu çalışmalar daha çok HPLC-ELSD analiz yöntemine dayanmaktadır, fakat HPLC-RID yöntemi ile ilgili literatürde herhangi bir çalışma yoktur. Birçok laboratuvarında HPLC cihazı içerisinde RID dedektör satın alınıp ELSD dedektör çok özel uygulamalar için alınmaktadır. Bu yüzden RID dedektörün çok yaygın olması bu çalışmanın yapılmasının temelini oluşturmaktadır. Bu tez çalışmasında HPLC-RID yöntemi ile analiz gerçekleştirileceği için elde edilecek değerler literatüre oldukça katkıda bulunacaktır ve ayrıca bu tür çalışmalara yeni bir bakış açısı kazandıracaktır.

### 1.10. Araştırmanın Amacı

Triacontanol, bitki büyümesini teşvik eden bir bileşik olarak tarımsal uygulamalarda kullanılmaktadır. HPLC ile yapılan analizler, triacontanol içeren formülasyonların hazırlanması ve doğru dozajların belirlenmesi için önem arz etmektedir. Triacontanol'un HPLC'de analizine yönelik geliştirilmiş yöntemlerin amacı ve önemi çeşitli şekillerde olabilir. Analitik doğruluk ve hassasiyet açısından HPLC, triacontanol gibi bileşikler için çok düşük konsantrasyonlarda hassas şekilde analiz etme yeteneğine sahiptir. Bu yöntemlerin geliştirilmesi, triacontanol konsantrasyonlarının daha doğru ve hassas bir şekilde belirlenmesini sağlar. Bunun yanında, tarımsal ürünlerde triacontanol içeriğinin belirlenmesi, ürünlerin kalitesinin kontrol edilmesi ve standartlarının oluşturulması için önemlidir. HPLC ile yapılan analizler, ürünlerin kalitesinin sağlanmasına ve standartların belirlenmesine yardımcı olur. Ayrıca Triacontanol'un bitki büyümesi üzerindeki etkilerini daha iyi anlamak ve tarımsal uygulamalarını geliştirmek için yapılan araştırmalarda HPLC ile analiz yöntemleri büyük önem taşır. Bu yöntemler, triacontanol'un bitki fizyolojisi üzerindeki etkilerini incelemek için kullanılır. Triacontanol, tarımsal uygulamalarda kullanıldığından, toprak ve su örneklerindeki kirlilik izleme çalışmalarında da önemli bir bileşiktir. HPLC ile yapılan analizler, triacontanol'un çevresel ve sağlık etkilerini değerlendirmek için kullanılabilir.

### 1.11. Araştırmanın Önemi

Triacontanol bitkilerde bulunan büyümeyi teşvik edici önemli bir bileşiktir. Bundan dolayı bazı bitkilerden elde edilen ekstraktlardan yararlanarak HPLC-RID yöntemi ile

triacantanol düzeyleri incelenecektir. Böylelikle elde edilen veriler ve geliştirilen sistem gelecekte yapılacak analiz çalışmalarına katkıda bulunacaktır. Bu çalışmanın sonucunun literatüre büyük katkıda bulunması beklenmektedir. Geliştirilen bu metot sayesinde hem literatüre henüz girmemiş bir analiz yöntemi kurulacak ve valide edilecek hem de bundan sonraki triacantanol analizlerinde temel oluşturulacak bir yöntem literatüre kazandırılmış olacaktır.

### 1.12. Literatür

TRIA'nın HPLC analizi konusunda literatürde sınırlı veri bulunmaktadır, muhtemelen TRIA'nın yapısında kromofor bulunmaması nedeniyle UV tespitinin uygulanamamasından kaynaklanmaktadır. Bu sorunun üstesinden gelmenin bir yolu, Kırılma İndeksi (RID) veya Buharlaştırıcı Işık Saçılımı (ELSD) dedektörleri kullanılmasıdır. ELSD, gradyan elüsyonunu mümkün kılar ve literatürde özel bir TRIA analizi için ELSD kullanımına dair belirli bir bilgi bulunmamaktadır. Ancak, Hwang ve Coll, tahıl sorgum çekirdekleri ve kurutulmuş damıtılmış tahıllardaki toplam polikozanollerin analizi için silikanın sabit faz olarak kullanıldığı bir HPLC-ELSD yöntemi önermişlerdir. Bununla birlikte, polikozanollerin ayrımının yeterli olmadığını ve karakterizasyonun GC ile yapıldığını belirtmişlerdir. TRIA içeren ürünlerin tarımsal amaçlarla daha yaygın hale gelmesiyle, farklı matris türlerinde belirlenmesine yönelik doğrulanmış bir analitik yöntem olan ihtiyaç artmaktadır. TRIA, bu ürünlerde 10-1000 ppm konsantrasyonlarında bulunabileceği gibi, gübreleme amaçlı suda düşük konsantrasyonlarda (10-50 ppm) dağılmış halde de bulunabilir. Ayrıca, bitkisel matrislerden lipofilik ekstraksiyon yoluyla yüksek miktarlarda (%1-3 kurutulmuş ekstraktlara kadar) elde edilebilir. Kantitatif amaçlarla, Medicago sativa bitki kaynağı olarak kullanılan TRIA'nın analiz yönteminin geliştirilmesi için kurutulmuş bitki materyalleri, enzimatik ekstraktlar, süperkritik CO<sub>2</sub> ve saf Tria kullanılmıştır.

Triacantanol düzeylerinin HPLC analiz yöntemi ile belirlendiği sınırlı çalışmalardan bazıları şunlardır:

Keum et al. [16] 'nin 'Tahıl Sorgum Taneleri ve Kurutulmuş Damıtılmış Tahılların Polikosanol İçeriği ve Bileşimi' adlı yaptıkları çalışmada Tahıl sorgumu kullanılmasının sebebi, yararlı fizyolojik aktiviteler gerçekleştirmek için ideal uzun zincirli yapıda alkol olan polikosanoller için önemli bir kaynak olmasıdır. Etanol üretiminde yan ürün olan

sorgumun kurutulmuş damıtıcı taneleri (DDG), yüksek oranda polikosanol içermektedir. Tahıl sorgumunun çekirdekleri ve damıtıcı tanelerinden ekstrakte edilmiş olan uzun zincirli yapıdaki lipit bağlarında bulunan polikosanollerin içeriği ve bileşimi belirlenmiştir. Uzun zincirli yapıya sahip lipit bağları sıcak hekzan ya da sıcak bir etanol kullanılarak ekstrakte edilmiştir. HPLC cihazı kullanılarak tahıl sorgum çekirdekleri kullanılarak ekstrakte edilmiş olan uzun zincirli yapıdaki lipit bağlarının ana olan bileşenleri polikosanol (%37-44), aldehit (%44-55) ve asitler (%4-5)dir. Kurutulmuş damıtıcı tanelerinden elde edilen uzun zincirli yapıdaki lipitler %52 polikosanol içermektedir, ayrıca bunun yanı sıra %23 aldehit, %6,4 asit ve de %17 mum esterleri/steril esterleri içermektedir. Polikosanalin bileşim aralıkları ise %0-1 C22:0, %0-3 C24:0, %6-8 C26:0, %1 C27:0, %43-47 C28:0, %1-2 C29:0, %40-43 C30:0 ve %1-4 C32:0 şeklinde olmuştur.

Keum et al. [17]'in gerçekleştirdiği 'Kore Kökenli Seçilmiş Tahıllardan Elde Edilen Mum Benzeri Malzemelerdeki Polikosanol İçerikleri ve Kompozisyonları' adlı çalışmada Uzun zincirli yapıda alkollerden olan polikosanollerin yararlı fizyolojik aktiviteler gerçekleştirdiği belirtilmiştir. Bu çalışmada polikosanollerin içerik ve bileşimleri incelenmiştir. Mum ve benzeri malzemeler sıcak bir hekzan vasıtasıyla çıkarılmıştır. Cilalanmamış olan tane halindeki sorgumdan, cilalanmış olan tane halinde bulunan sorgumdan, kahverengi pirinçten, mor renkli pirinçten, buğdaydan ve bunların yanında mısırdan elde edilmiş olan muma benzer malzemelerin verim içerikleri sırasıyla 223, 37, 33, 61, 10 ve 10 mg/100 g kuru çekirdek olarak görülmüştür. HPLC cihazı kullanılarak belirlenmiş olan polikosanol içerikleri ise tahıllardan elde edilmiş olan mum benzeri malzemeler için sırasıyla %33, %29, %6, %0 ve %2 (w/w, db) değerleri saptanmıştır. Tane sorgumdan elde edilmiş olan polikosanoller için temel alkoller oktakosanol ve triakontanol olmuştur.

Mutlu [10] safsızlıkların analizi için yeni bir HPLC metodu geliştirmiştir. Analizde sabit faz olarak fenil kolon, hareketli yani mobil faz olarak ise pH=5.0 0.01 M sodyumasetata, metanol ve asetonitril kullanmıştır. Bunlar 80:15:5 oranıyla karıştırılarak bir çözelti elde etmiş ve elde ettiği bu çözeltiyi kullanmıştır. Tüm bu çalışmaları 261 nm dalga boyu ile yapmıştır.

Kaya [18] Kahramanmaraş ilinde gerçekleştirdiği çalışmada Maraş-1 cinsine ait biber tohumlarını kullanmıştır. Tohumların hücre süspansiyon kültüründe, kapsaisin üretimi üzerinde olan etkisi ve farklı konsantrasyonlarda triakontanol'un farklı zamanlara ait etkilerini incelemiştir. Laboratuvar ortamında ya da yapay koşullarda çimlendirilmiş olan Maraş-1 cinsine ait biber fidelerinin hipokotil eksplantlarından kallus elde edilmiş ve elde edilmiş olan kalluslardan hücre süspansiyonları oluşturmuştur. Hücre süspansiyonları içerisinden kalsiyum aljinat ile tutulmuş hücre süspansiyon kültürleri ve serbest haldeki hücre süspansiyon kültürlerini elde etmiştir. Hem serbest halde olan hem de tutulmuş haldeki hücre süspansiyonlarına triakontanol enzimini (5, 10, 15 ve 30 µg/ml) uyarıcı madde olarak uygulamıştır. Bu dozların yanında birde uyarıcı uygulamadığı kontrol grupları oluşturmuştur. Ekstrasyon için etil asetat kullanarak serbest halde ve tutulmuş olan hücrelerde ve bu hücrelerin süzüntülerinde bulunan kapsaisinin konsantrasyonlarını HPLC cihazında belirlemiştir. Tutuklama işleminin yapılmasının kapsaisin miktarının birikiminde artış sağladığını gözlemlemiştir. Kontrol gruplarında ve uyarıcı uygulaması yapılan örneklerde tutulma gerçekleşen hücrelerdeki kapsaisinin miktarını, serbest hücrelerdeki miktara kıyasla daha yüksek bulmuştur. Uyarıcı günler ve dozları karşılaştırdığında toplam kapsaisin miktarının en fazla olduğu gün ve dozu tutulmuş haldeki hücre süspansiyonlarında 15 µg/ml triakontanol uygulaması ile 12. günde 312,703 µg/g t.a. olarak belirlemiştir.

Sut et al. [13] HPLC-ELSD yönteminin 0,6 mg/L'ye kadar sulu çözeltilerde TRIA'nın saptanmasına izin verecek kadar hassas olduğunu ifade etmişlerdir. Bu araştırmacılar HPLC-ELSD yöntemi ile analiz sonucu olarak *Medicago sativa* bitkisinde yaprak için;  $262 \pm 20$  mg/kg, sap ve yaprak için,  $138 \pm 11$  mg/kg değerlerinin belirlemiştir. Yöntemi yüksek (LOD = 0,2 mg/L, LOQ = 0,6 mg/L) ve iyi hassasiyet (gün içi: <math>\leq 11,2</math>, günler arası: %10,2) ile karakterize etmişlerdir. Geliştirdikleri bu yöntemi tamamen doğrulamışlar ve farklı kurutulmuş bitkisel matrisler ile bitki ekstraktlarını, ve bu örneklerdeki TRIA içeriğini analiz ederek test etmişlerdir.

Chunfeng Wang et al. [19] Beagle köpeği plazmasından triakontanolun belirlenmesi üzerine bir çalışma yapmışlardır. Yapmış oldukları bu çalışmada IS olarak 1-octacosanal kullanıldı. Gaz kromatografisi-MS/MS ve MRM modunda analiz yapıldı. Yöntem lineerlik, doğruluk, hassasiyet, matris etkisi ve stabilite kriterlerini sağladı.

Li et al. [20] PEG-triacontanol (PEG-TA) pro-ilaç formunun fare/plazmasındaki hem PEG-TA hem serbest triacontanol analizini yapmıştır. SALLE ekstraksiyon+tümsüz saponifikasyon+ GC-MS/MS kullanmıştır.

Mori et al. [21] Moso bambu skini kompostundan Triacantanol analizi yapmıştır. Silika jel kolonu ile gaz kromatografisi-MS yapmıştır. Taze ve kaynar ciltlerde triacontanol konsantrasyonunu sırasıyla taze kabuklar ile 13.3 ppm, kaynatıldan sonra 41,7 ppm olarak bulmuşlardır. Kompostta iki hafta sonunda zirve değer olarak 71.3 ppm sonucunu bulmuştur. Olgunlaşma zamanı ise 19.7 ppm olarak bulmuştur. Triacantanolun TLC ile saflaştırılmasının ardından GC-MS ile kantitatif analizleri yapılmıştır.

Gençdal [22] bitkilerde esansiyel olarak bulunmayan ve bitkiler için olumsuz etkiler yaratan bir ağır metal elementi olan kurşun (Pb)'un bir bitki büyüme düzenleyicisi olan triacontanol ile etkisinin azaltılıp bitkinin veriminin ve antioksidan savunma mekanizmalarının gelişmesini sağlayarak bitkinin ağır metal toleransını arttırdığını gözlemlemiştir. Çalışmada poliformizmdeki olası değişimleri RAPD yöntemi ile metilasyon seviyelerindeki değişimleri ise CRED-RA yöntemi ile belirlemiştir.

## 2. BÖLÜM

### YÖNTEM VE MATERYAL

#### 2.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

Triacontanolün analizinde Erciyes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Araştırma Birimi Toprak Kimyası Laboratuvarı'nda bulunan Agilent HPLC cihazı (Agilent Infinity II ), RID (G7162A 1260 RID), C18 kolonu (150 x 4.6 mm 3µm) , Diol (5 µm) kolonu, C18 (5 µm) kolonu ve amin kolonlar kullanılmıştır. Analiz için kullanılacak saf su için ultra saf su cihazı (Smart Healforce) ve pH ölçümleri için Erciyes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Araştırma Birimi Toprak Laboratuvarında bulunan Thermo marka pH metre kullanılmıştır. Hava kabarcıklarının giderilmesi için ultrasonik su banyosu (Nükleon, Ankara, TÜRKİYE) kullanılmıştır. Bu cihazların yanında Thermo marka otomatik pipet serisi, çeşitli cam malzemeler ve örnekleri filtrelemek için Isolab marka 0,45 mikrometre şırınga filtresi gibi laboratuvar malzemeleri kullanılmıştır.

#### 2.2. Kimyasallar

Analiz için mobil faz olarak %99.9'luk Metanol, %95'lik Asetonitril , %99'luk Etanol (Merck) ultra saf su cihazından alınan saf su ve saf halde tedarik edilen triacontanol (Sigma) kullanılmıştır.

#### 2.3. Çözeltilerin Hazırlanması

Ana stok çözeltisi için 100 ppmlik bir çözelti hazırlanmıştır. Bunun için 100 mg saf haldeki triacontanol tartılıp 1000 ml etanol içerisinde çözündürülmüştür. Yapılan bu karışımın içerisinde bulunan hava kabarcıklarının dışarıya atılması için 5 dakika kadar 45 °C' lük su banyosunda bekletilip karışım su banyosundan çıkarılmıştır. Hazırlanmış olan bu karışımdan 10 adet standart hazırlanmıştır. Standartların tamamlanmasında önce sadece metanol kullanılmıştır, çıkan piklerin bozuk olması sebebiyle Tablo 3.1 'de elde

edilen uygun mobil faz ile tamamlanmasına karar verilip pik hata oranı en aza indirilmiştir. Bu sebepten standartların tamamlanması ve okunması için %50'si metanol %50'si saf su olacak şekilde bir karışım hazırlanmıştır. Standartların hazırlanmasında ana stok çözeltisinden pipetle çekilip 10 ml'lik balon joje içerisine alınmıştır ve %50'si metanol %50'si su olan mobil faz karışımı ile 10 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan bu 10 standart karışım içerisindeki hava kabarcıklarının çıkması için 45 °C' lük ultrasonik su banyosunda 5 dakika kadar bekletilip alınmıştır. Hazırlanan 10 standart ayrı ayrı olacak şekilde viallere 1000 µl çekilip (her standart için bir vial, toplamda 10 vial) okuma için Agilent marka HPLC cihazına sıra ile (0.02-0.05-0.1-0.2-0.5-1-5-10-25-50) yerleştirilmiştir. Okuma 30°C dedektör sıcaklığında RID' da 3 mikronluk C18 kolonu kullanılarak 40°C kolon sıcaklığında yapılmıştır. Akış hızı 0.5 ml/dakika ve okuma için kullanılan çözelti 10 µl, okuma süresi 5 dakika olarak ayarlanmıştır. Bu ayarlar Tablo 3.1'de yapılan çalışmalar sonucu belirlenmiştir. Okuma için mobil faz olarak Tablo 3.1'de yapılan çalışmalar arasından en iyi sonuca ulaştığımız %50'si metanol %50'si su olacak şekilde bir karışım hazırlanıp kullanılmıştır.

#### **2.4. Bitki Örneklerinin Hazırlanması**

Gerçek örnek okuması için kurutulmuş yonca bitkisi alınıp havanda öğütülerek 2 gram numune tartılmıştır. Tartılan numune 10 ml etanol ile ultrasonik banyo yardımı ile 45 °C sıcaklıkta 30 dakika ekstrakte edilmiştir. 3 adet hazırlanmış olan yonca ekstraktından 10 µl çekilip, 990 µl metanol ile 1000 µl'ye tamamlanmıştır. Ekleme-geri kazanma çalışmaları için diğer viallere 500 µl hacimdeki triacontanol standardından 200 µl, yonca ekstraktından 10 µl çekilip 790 µl metanol ile tamamlanarak hazırlanmıştır.

#### **2.5. Kromatografik Şartların Optimizasyonu**

Okuma 30°C dedektör sıcaklığında RID' da 3mikronluk C18 kolonu kullanılarak 40°C kolon sıcaklığında yapılmıştır. Akış hızı 0.5 ml/dakika ve okuma için kullanılan çözelti 10 µl, okuma süresi 5 dakika olacaktır. Okuma için mobil faz olarak %50'si metanol %50'si su olacak şekilde bir karışım hazırlanıp (C ) kullanılmıştır. Bu yöntem ile elde edilen triacontanol kromatogramı Şekil 3.1. de verilmiştir. Bu kromatografik şartlara Tablo 3.1'de verilen çalışmalar sonucu karar verilmiştir.

## 2.6. Kalibrasyon Doğrusu Hazırlanması

Kalibrasyon doğrusu için artan derişimlerde triacontanol çözeltileri hazırlanmış ve kromatogramları alınmıştır. Standartlar aşağıda verilen tablodaki gibi hazırlanmıştır.

Tablo 2.1. Standartlar için ilave edilen ana stok çözelti miktarları ve derişimleri.

Standart No	Hacim ( $\mu\text{l}$ )	Derişim ( $\text{mg l}^{-1}$ )
1	2	0.02
2	5	0.05
3	10	0.1
4	20	0.2
5	50	0.5
6	100	1
7	500	5
8	1000	10
9	2500	25
10	5000	50

## 2.7. Validasyon Çalışmaları

### 2.7.1. Doğrusallık

Bir analitin sinyali ile konsantrasyonu arasındaki ilişkinin doğrusal olup olmadığını belirler. Kalibrasyon eğrisi (en az 5 farklı konsantrasyon) ,korelasyon sayısı  $r^2 \geq 0.999$  olması tercih edilir [14].

### 2.7.2. Seçicilik

Yöntemin yalnızca hedef analiti ölçtüğünden emin olunmasını sağlar. Matristeki diğer bileşiklerin girişim yapmadığını gösterir [15].

### 2.7.3. Doğruluk

Analitik yönteminin gerçek değere veya gerçek kabul edilen değere ne kadar yakın sonuç verdiğidir. Bilinen miktarda analit matrise eklenir, geri kazanım (%) hesaplanır. %95-105 arası geri kazanım kabul edilir [14].

#### **2.7.4. Kesinlik**

Bir analitik yöntem ile elde edilen sonuçların birbirine olan yakınlığının ifadesidir. % Bağıl standart sapma ile ifade edilir [15].

#### **2.7.5. Gözlenebilme Sınırı ve Tayin Sınırı**

Analitin istatistiksel olarak ayırt edilebilecek en düşük konsantrasyonu gözlenebilme sınırıdır. Tayin sınırı ise, analitin kantitatif olarak ölçülebileceği en düşük konsantrasyondur. Standart sapmaya göre hesaplanırlar [15].

#### **2.7.6. Kararlılık**

Analitin numune içinde zamanla fiziksel veya kimyasal olarak değişime uğramadan sabit kalma yeteneğidir. Kararlılık çalışmaları örneklerin saklanma süresi, koşulları ve taşıma işlemleri sırasında analitin bozulup bozulmadığını gösterir [15].

#### **2.7.7. Stabilite**

Kısa stabilite, uzun stabilite, hazır numune stabilitesi ve çözelti stabilitesi olarak ayrılmaktadır. Stabilite çalışmaları analitik yöntemin yalnızca anlık değil, zaman içinde de güvenilir sonuçlar verdiğini belgelemek için yapılır [14].

## 3. BÖLÜM

### BULGULAR

#### 3.1. Yöntem Optimizasyonu

##### 3.1.1. Mobil faz bileşimi ve akış hızı

Mobil faz olarak öncelikle Asetonitril-su, asetonitril-metanol, metanol-su karışımları kullanılmıştır. Çözücü piki ile analit piki arasındaki mesafe, analit pikinin konumu, pik alanı ve şekli itibari ile en iyi sonuçlar metanol su karışımında elde edilmiştir.

Metanol su karışımından oluşan mobil fazın birleşme oranını tayin etmek amacıyla yapılan çalışmada metanolün artırılması ile pik hacimlerinde ve çözücü piki ile arasındaki mesafede azalma gözlemlenmiştir. Bu istenen bir durum olmadığından metanol oranı % 50 civarında tutulmuştur. Bununla birlikte karışımdaki su oranının artışı analit pikinde yayvanlaşmaya ve çözücü pikinde negatife giden değer ile sonuçlanmıştır. Bu yüzden karışımdaki su oranı %50 olarak belirlenmiştir.

Mobil fazın optimum akış hızının belirlenmesinde yüksek akış hızlarında çözücü ve analit pikleri birbirine çok yaklaşarak pik rezolusyonunu azaltmakta hatta pikler birbirine karışmaktadır. Düşük akış hızlarında ise analit ve çözücü pikleri birbirinden uzaklaşırken analit pikinde genişlemeye ve bu sayede de pik kantitatifliğinde bozulmaya sebebiyet vermiştir. Optimum akış hızı olarak  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$  olarak seçilmiştir.

##### 3.1.2. Örnek enjeksiyon hacmi

Optimum örnek enjeksiyon hacminin tespiti için yapılan çalışmada  $1 \mu\text{L}$  ile  $20 \mu\text{L}$  arasında tarama çalışması yapılmış, düşük hacimlerde gözlenebilme sınırında kötüleşme, yüksek hacimlerde ise pik şeklinde ve lineer aralıkta bozulma gözlenmiştir. Bu yüzden optimum örnek hacmi olarak  $10 \mu\text{L}$  seçilmiştir.

### 3.1.3. Kolon cinsi ve sıcaklığı

Çalışmada kullanılacak kolonun tespiti için 5 mikron C18 kolonu, 5 mikron Diol ve amin kolonlar ile 3 mikron C18 kolon kullanılmıştır. Kolonlarla birlikte mobil faz bileşimi ve akış hızlı gibi parametreler de tekrar taranarak çalışma için en uygun kolon 150 x 4.6 mm boyutunda 3,0 µm tanecik boyutuna sahip C18 kolonu olarak seçilmiştir. Çalışma ile ilgili veriler Tablo 3.1’de gösterilmiştir. Okuma süresi her çalışma için 5 dakikadır.

Tablo 3.1. Kolon seçimi için yapılan çalışma verileri.

Kullanılan kolon	Kullanılan Mobil faz	Akış Hızı mL/dk	Enjeksiyon Hacmi (µl)	Kolon Sıcaklığı <sub>1</sub> (C°)	Pikin çıkış dakikası	Değerlendirme
C18 (5 mikron)	Metanol80/Su (pH7)20	0,5	5	Serbest	1,28	Küçük pik
C18 (5 mikron)	Metanol80/Su (pH3)20	0,5	5	Serbest	1,29	Küçük pik
C18 (5 mikron)	Metanol80/Su (pH7)10/ACN 10	0,5	5	Serbest	1,20	Bozuk pik
C18 (5 mikron)	ACN 30/Metanol70	0,5	5	31	1.4	ACN arttıkça zemin sinyali azalıyor.
C18 (5 mikron)	ACN15/metanol85	0.5	5	31	1.5	Metanol arttıkça zemin kötüleşiyor.
Diol (4,6x150)	ACN 70/Su 30	0,5	5	31	2	Pik bozuk
Diol (4,6x150)	ACN 30/Su 70	0,5	5	31	1,8	Pik çok bozuk
C18 (5 mikron)	ACN 50/Metanol 50	0,5	5	31	1,5	Pik bozuk
C18 (5 mikron)	ACN 30/Metanol70	0,5	5	31	1,5	Pik bozuk
C18 (5 mikron)	ACN 30/Metanol70	0,5	5	31	1,5	Pik bozuk
C18 (5 mikron)	ACN 10/Metanol 90	0,5	5	31	1,4	Pik dalgalı
C18 (5 mikron)	ACN 80/Metanol 20	0,5	5	31	1,4	Küçük pik
C18 (5 mikron)	ACN 70/metanol 20/su 10	0,5	5	31	1,5	Pik küçüldü
C18 (5 mikron)	ACN 20/Metanol60/Su 20	0,5	5	31	1,25	Pik düzgün
C18 (5 mikron)	ACN10/Metanol80/Su 10	0,5	5	31	1,34	Pik normal

Tablo 3.1'in devamı

C18 (3mikron)	Metanol 50/su 50	1	5	30	1,7	Pik yakın ve boyunlu
C18 (3mikron)	Metanol50/Su 50(pH9)	1	5	30	1,6	Pikler birbirlerine yakın, boyunlu ve zemin kötü
C18 (3mikron)	Metanol50/su 50	0,7	5	30	2,5	Pik boyunlu ve çözücü piki yakın
C18 (3mikron)	Metanol50/Su 50	0,4	5	30	2,7	Pikler arası yakın
C18 (3mikron)	Metanol40/Su 60	0,5	5	30	3,2	Pik kötü
C18 (3mikron)	Metanol40/Su 60	0,5	5	40	4	Pik düzgün fakat çözücü piki çıkıyor.
C18 (3mikron)	Metanol50/su 50	0,5	5	40	3,8	Pik düzgün fakat zemin pürüzlü yapıda
C18 (3mikron)	Metanol55/su 45	0,5	5	40	4	Pik düzgün ama zemin düz değil.
C18 (3mikron)	Metanol50/su50	0,5	10	40	4	Pik düzgün fakat zemin düz değil.
C18 (3mikron)	%50-50 metanol-su karışımı tek çözelti	0,5	10	40	4	Pik düzgün ve kullanılabilir.

Optimum koşulların belirlenmesi için çalışmada farklı akış hızı, enjeksiyon hacmi, kolon sıcaklığı ve kolon çeşitleri kullanılarak en iyi sonuca ulaşılmıştır [18].

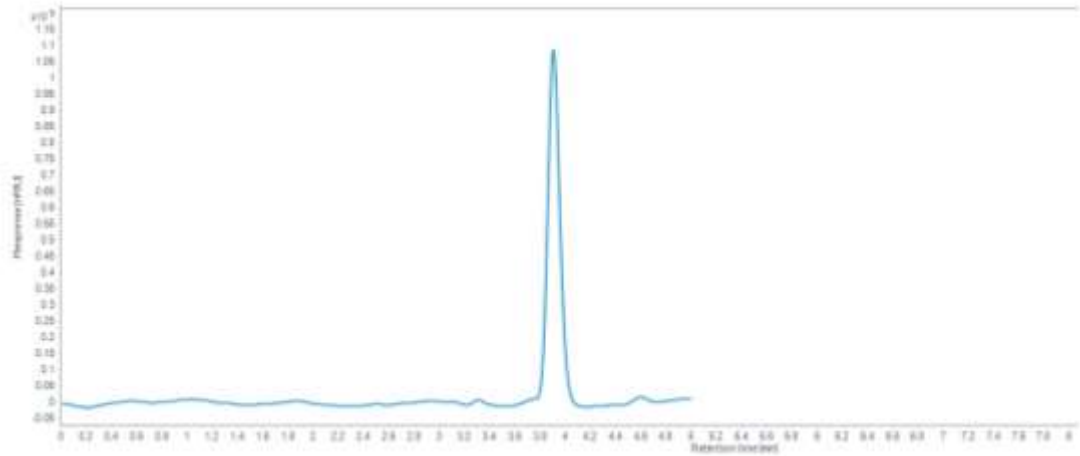
### 3.1.4. Optimum Kromatografik Koşullar

Kolonun 3µm çapında bir C18 kolonu olduğu, kolon sıcaklığı 40 C°, mobil faz olarak %50-50 metanol-su karışımının kullanıldığı, akış hızı 0.5 mL /dk, enjeksiyon hacminin 10 µL olduğu koşullar optimum koşullar olarak seçilmiştir.

## 3.2. Yöntem Validasyon Bulguları

### 3.2.1. Kromatogramın Değerlendirilmesi

Şekil 2.13 de görüldüğü gibi analiz sonuçları doğrultusunda ölçümler doğrusal yol izlemektedir.



Şekil 3.1. Triacontanol pikinin çıkış zamanı.

Bu görselde Triacontanol pikinin 3,9. dakikada çıktığı görülmektedir.

Pikin çıkış aralığı şekildeki gibidir.

Alıkonma faktörü; [12]

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

$$k' = \frac{3,9 - 0,2}{0,2}$$

$$k' = 3$$

Teorik plaka sayısı; [11]

$$N = 16(\text{alıkonma zamanı} \times \text{pik genişliği})^2$$

$$N = 16(3,9 \times (4,1 - 3,8))^2$$

$$N = 21,902 \text{ plt}$$

Metre başına plaka sayısı ise

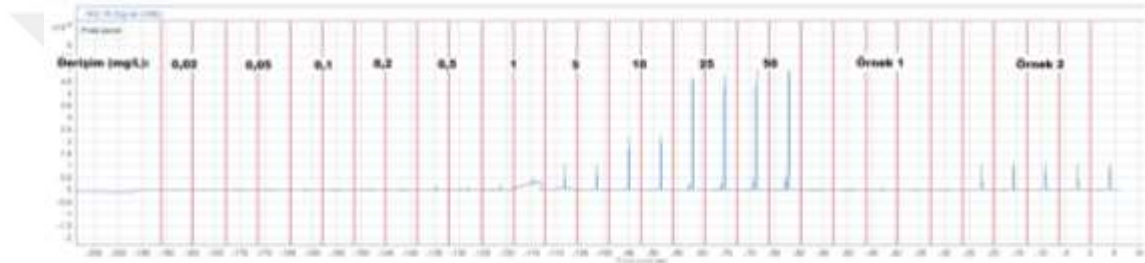
$$= \frac{21,902}{150 \times 1000} = \mathbf{146\ 013 \text{ plt m}^{-1}}$$

$$\text{Plaka Yüksekliği: [12] } H = \frac{L}{N} = \frac{150}{21,902} = 6.85$$

$$H = \frac{150}{146013} = \mathbf{1.027 \times 10^{-03} \text{ mm}}$$

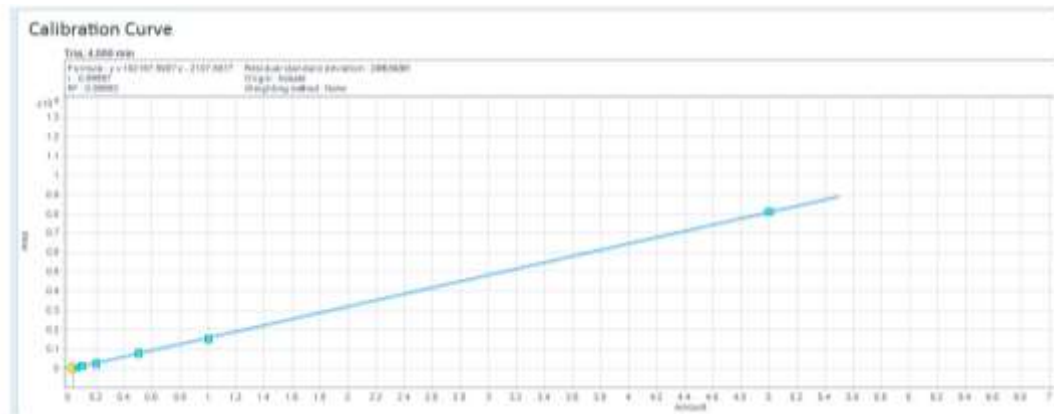
### 3.2.2. Doğrusallık ve Dinamik Aralık

Bu çalışmada değişen derişimlerde standartlar hazırlanarak kromatogramlara alınmıştır.  $5 \mu\text{g l}^{-1}$ 'den başlayan ve  $100 \text{ mg l}^{-1}$  değerine kadar artan standartlar ile çalışılmıştır.  $5 \mu\text{g l}^{-1}$  değerinde pik gözlenmemiş fark edilebilir pik en küçük  $10 \mu\text{g l}^{-1}$  değerinde elde edilmiştir. Bu değer gözlenebilme sınırı( LOD) olarak seçilmiş ve dinamik aralık  $25 \text{ mg l}^{-1}$  aralık değerine kadar devam etmiştir. Elde edilen kromatogram Şekil 3.2. de verilmiştir.



Şekil 3.2. Dinamik aralık çalışmasına ait kromatogram.

Bu sinyaller ile elde edilen kalibrasyon eğrisinin grafiği Şekil 3.3. de verilmiştir.



Şekil 3.3. Triacantanol kalibrasyon eğrisi.

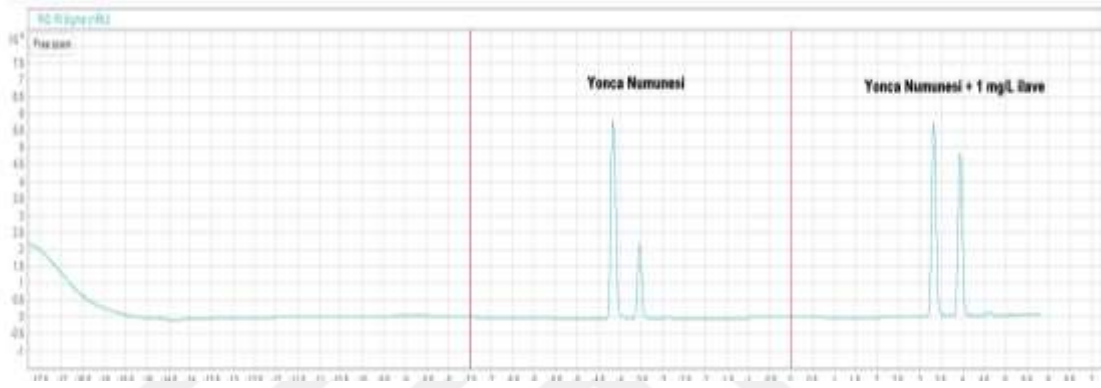
Bu doğrunun denklemi;  $y=162167.9087x - 2107.5577$  'dir.

$r=0.99997$

$R^2=0.99993$  olarak bulunmuştur.

### 3.2.2. Doğruluk

Bu çalışmada hazırlanan gerçek örneklere ekleme- geri kazanma çalışması yapılarak geliştirilen yöntemin doğruluğu test edilmiştir. Bunun için yonca bitkisinden elde edilen ekstraktlar analiz edilmiş daha sonra bu ekstraktlara ekleme yapılarak geri kazanma değerleri hesaplanmıştır. Bu çalışmaya ait örnek bir kromatogram Şekil 3.4’de, veriler ise Tablo 3.2 de verilmiştir.



Şekil 3.4. Ekleme-geri kazanma çalışmasına ait örnek bir kromatogram.

Tablo 3.2. Gerçek örnek analizleri ve ekleme - geri kazanma çalışma sonuçları.

Numune	Eklenen	Bulunan	% Geri Kazanım
1. Yonca	-	0,94	-
	1,0	1,91	%98,5
2. Yonca	-	1,10	-
	1,0	2,11	%100,5
3. Yonca	-	1,14	-
	1,0	2,14	%100

Çalışmada gerçek örneklerde yapılan ekleme geri kazanma sonuçlarına göre %100.5, %100 ile %98.5 arasında geri kazanma değerleri kantitatif olarak elde edilmiştir. Bu da yöntemin yonca örneklerinde doğru çalıştığının bir göstergesidir.

### 3.2.3. Kesinlik

Kesinlik çalışması için 10 adet numune hazırlanmış ve ardı ardına analizleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlardan % Bağıl standart sapma (BSS) değeri hesaplanmıştır. Hesaplanan sonuçlara göre %BSS değeri 1,8 olarak bulunmuştur [13].

### 3.2.4. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)

Çalışmanın bu kısmında LOD ve LOQ değerlerini hesaplamak amacıyla HPLC için çok küçük bir derişim olan  $5 \mu\text{g l}^{-1}$  değerinden başlayarak artan derişimlerde analit çözeltileri HPLC’de okunarak kromatogramlar elde edilmiştir. Zemin sinyalinde farklılaştırılabilen en düşük derişim olarak  $10 \mu\text{g l}^{-1}$  değeri görüldüğü için LOD olarak  $10 \mu\text{g l}^{-1}$  değeri, LOQ değeri olarak da  $33 \mu\text{g l}^{-1}$  değeri hesaplanmıştır [15].

### 3.2.5. Stabilite

Stabilite çalışması için üç farklı durumda aynı örnek analiz edilmiştir. Birinci durumda çözeltiler hazırlanır hazırlanmaz analizi yapılmıştır. İkinci durumda çözeltiler 1 hafta dondurucuda bekletilerek analiz edilmiştir. Son durumda ise çözeltiler 1 hafta dışarıda bekletilerek analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıda Tablo 3.3’de verilmiştir.

Tablo 3.3. Stabilite çalışmasından elde edilen sonuçlar.

Çalışma	Sonuç	%Geri kazanma
1	$0,93 \pm 0,01$	$\%99 \pm 1$
2	$1,01 \pm 0,02$	$\%100 \pm 2$
3	$0,86 \pm 0,02$	$\% 102 \pm 2$

### 3.3. Bitki Analizleri

Hazırlanan yonca örnekleri geliştirilen yöntem ile analiz edilerek katı örnekte bulunan triacontanol miktarları hesaplandı. Elde edilen sonuçlara göre örneklerde bulunan analit miktarları Tablo 3.4’de verilmiştir.

Tablo 3.4. Örnek analiz sonuçları.

Örnek No	Triacontanol derişimi ( %)
1	$\%0,051 \pm 0,001$
2	$\%0,048 \pm 0,001$
3	$\%0,046 \pm 0,001$

## 4. BÖLÜM

### TARTIŞMA-SONUÇ ve ÖNERİLER

Triacontanol,  $C_{30}H_{62}O$  formüllü bir yağ alkolüdür ve mirisil alkol de denilmektedir. Triacontanol bitkinin kütikül mumları içerisinde ve bal mumunda bulunmaktadır. Triacontanol bir bitki büyüme uyarıcısı ve düzenleyicisidir. En çok Asya kıtasında olmak üzere dünya üzerinde çeşitli mahsullerin verim ve kalitesini artırmak amacıyla kullanılmıştır. Triacontanol; fotosentezin gerçekleşmesini sağlamaktadır. Bunun yanında proteinin biyosentezini gerçekleştirmekte ve enzimlerin aktivitelerinin oranlarını arttırmaktadır. Ayrıca triacontanol yani yağ alkolü, bitkilerde hücrelerinin fizyolojik verimliliklerini arttırmakta ve bitkideki besin maddelerinin taşınmasını sağlamaktadır.

Araştırılan literatürler doğrultusunda triacontanol hormonunun bitki büyümesi ve gelişimi için önemli bir rol üstlendiği görülmüştür. Triacontanolün bitkilerde ne kadar bulunduğu bitkilerin gelişimi için önem arz ettiği anlaşılmıştır. Bu yüzden bitkilerdeki triacontanol miktarının belirlenmesi için kromatografik analizler kullanılmaktadır. Literatürlerden yararlanarak bu zamana kadar triacontanol miktarının sadece HPLC-ELSD yöntemi kullanılarak belirlendiği görülmüştür. Triacontanol miktarının ölçülmesinde yeni bir yöntem geliştirilmesinin gerekli olduğu düşünülmüş olup, bu yöntemin hemen hemen her laboratuarda bulunan ve hassas sonuç alınmasını sağlayan HPLC-RID ile olmasına karar verilmiştir. Yapılan bu yüksek lisans tez çalışmasında HPLC-RID kullanılarak triacontanol standartlarının ölçülmesi, kalibrasyon sağlanması ve yöntemin gerçek numuneler üzerinde test edilmesi ile validasyon çalışmalarının yapılması sağlanmıştır.

Yapılan denemelerden elde edilen sonuçlar arasında en iyi sonuç elde ettiğimiz kolon 3 mikronluk C18 kolonu olmuştur. Yöntemin geliştirilmesinde hidrofobik etkileşimlere ve kimyasal stabiliteye sahip olması, geniş bir pH toleransı bulunması, güçlü tutma ve

seçicilik özelliği ve yüksek düzeyde verimlilik sağlaması özelliklerinden dolayı C18 kolonunun kullanılması tercih edilmiştir. Kullanılan kolon SilUR MLC18 150 x 4.6 mm boyutunda, 3,0 µm tanecik boyutuna sahip olan bir C18 kolonudur. Çalışmada mobil faz olarak yarı yarıya metanol-su karışımı (C ) olacak şekilde tek bir hareketli faz kullanılmıştır. 0,5 ml min<sup>-1</sup> akış hızında, 40°C kolon sıcaklığında ve 10 µL enjeksiyon hacminde okumalar yapılmıştır. Okuması yapılmış olan triacontanol piklerinin alıkonma faktörü ( $k' = tR - t_0 / t_0$ ) 3 olarak bulunmuştur ve bu değerin 2 ile 10 arasında olması iyi bir rezolusyon olduğunu göstermektedir. Teorik plaka sayısı 146013 pl<sup>t</sup> m<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur. Triacantanol miktar analizinin yapılabilmesi için geliştirilen HPLC-RID yönteminin validasyon çalışmaları validasyon parametreleri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Bu parametreler doğruluk, kesinlik, doğrusalık, geri kazanım, gözlenebilirlik sınırı ve tayin sınırı ile stabilite parametreleridir. Standartlar ve örnekler en az üç tekerrürlü olacak şekilde okunmuştur ve bu okumalar sonucunda yonca örneklerinde %0,048-0,051 triacontanol tespit edilmiştir. Bu değer literatür ile uyumlu olup analiz sonuçlarının doğruluğu ekleme-geri kazanma değerleri ile test edilmiştir. Çalışma sonucunda literatürde ilk defa geliştirilen bir HPLC-RID yöntemi oluşturulmuş ve başarı ile uygulanmıştır.

Triacantanol gibi bitkiler için önemli bir büyüme düzenleyicisinin zirai alanda önemi görülmektedir. Bitkilerin sahip olduğu triacontanol içeriğinin belirlenmesinin ve sahip oldukları triacontanol içeriklerine göre uygulamalara tabii tutulmasının önemli olduğu anlaşılmıştır. Etkili bir analiz yöntemi ile bitkilerin triacontanol içeriklerinin belirlenmesi son derece önemli olduğu gibi bitkilerden triacontanolun etkili bir şekilde ekstrakte edilmesi de çok önemlidir. Bu ekstraktlarda triacontanolun tayini bu çalışmada geliştirilen bir yöntem gibi sağlam, duyarlı, dinamik aralığı geniş, kolay uygulanabilir bir yöntemin varlığı ile mümkündür. O yüzden her kromatografi laboratuvarında bulunabilen bir reflaktif indeks dedektörü kullanılarak yöntem geliştirilmiştir. Yöntem literatürde ilk defa uygulandığı gibi diğer laboratuvarlarda da kolaylıkla uygulanabilecek referans bir metot olmaya aday bir çalışmadır.

## KAYNAKÇA

- [1] Eser, B., Dinçel, A. S. 2018. Kromatografiye giriş, yüksek performanslı sıvı kromatografi kullanımında basit ipuçları. **Sağlık Hizmetleri ve Eğitimi Dergisi**, **2**(2): 51–57.
- [2] Islam, S., Mohammad, F. 2020. Çeşitli çevre koşullarında bitkiler için dinamik bir büyüme düzenleyicisi olarak triakontanol. **Bitkilerin Fizyolojisi ve Moleküler Biyolojisi**, **26**(5): 871–883.
- [3] Ries, S., Houtz, R. 1983. Triacontanol as a plant growth regulator. **HortScience Journal**, **18**(5): 654–662.
- [4] Hangarter, R., Ries, S. K., Carlson, P. 1978. Effect of triacontanol on plant cell cultures in vitro. **Plant Physiology**, **61**(5): 855–857.
- [5] Ries, S. K., Wert, V., Sweeley, C. C., Leavitt, R. A. 1977. Triacontanol: A new naturally occurring plant growth regulator. **Science**, **195**(4284): 1339–1341.
- [6] Ries, S. K., & Stutte, C. A. 1985. Regulation of plant growth with triacontanol. **Critical Reviews in Plant Sciences**, **2**(3): 239–285.
- [7] Bengü, A. Ş. 2021. HPLC tekniği ve kullanım alanları. **Bingöl Üniversitesi Sağlık Dergisi**, **2**(1): 64–69.
- [8] Swartz, E. M. 2011. 2011’de tanıtılan HPLC sistemleri ve bileşenleri: Kısa bir inceleme. **LCGC Kuzey Amerika Dergisi**, **29**(5): 414–428.
- [9] Yiğit, N., Öktem, Y., & Yentür, G. 2012. Bazı meyve ve sebzelerde pestisit kalıntılarının analizinde yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile çoklu kalıntı analiz metodunun geliştirilmesi. **Plant Protection Bulletin**, **52**(4): 375–394.
- [10] Mutlu, Y. 2005. Flukonazol adlı antifungal ilaç aktif maddesinin sentez kaynaklı safsızlıkları için yeni analitik metot geliştirme [Unpublished doctoral dissertation]. Marmara Üniversitesi.
- [11] Bilskey, S. R., Olendorff, S. A., Chmielewska, K., & Tucker, K. R. 2020. A comparative analysis of methods for quantitation of sugars during the corn-to-ethanol fermentation process. **SLAS Technology: Translating Life Sciences Innovation**, **25**(5): 494–504.

- [12] Ağtaş, Ç. 2019. Rikobendazol hidroklorürün stabilite göstergeli ilgili bileşikler ve miktar tayini için ultra performanslı sıvı kromatografisi ile yöntem geliştirme ve validasyonu [Yüksek Lisans Tezi]. Marmara Üniversitesi.
- [13] Sut, S., Franceschi, C., Peron, G., Poloniato, G., Dall'Acqua, S. 2018. Katı ve sıvı örneklerde 1-triakontanolün miktar tayini için bir HPLC-ELSD yönteminin geliştirilmesi ve doğrulanması. **Molecules**, **23**(11), 2775.
- [14] Costa, P. P., Mendes, T. D., Salum, T. F., Pacheco, T. F., Braga, S. C., de Almeida, J. R. M., & Rodrigues, C. M. 2019. Development and validation of HILIC-UHPLC-ELSD methods for determination of sugar alcohols stereoisomers and its application for bioconversion processes of crude glycerin. **Journal of Chromatography A**, **1589**, 56–64.
- [15] Balkan, T., Budak, D. Ş. 2025. Açık alan koşullarında elmalarda deltametrin ve lambda-sihalotrinin kalıntı davranışlarının belirlenmesi ve sağlık riski değerlendirmesi. **Mikrokimya Dergisi**, **1**(1): 43–91.
- [16] Hwang, K. T., Weller, C. L., Cuppett, S. L., Hanna, M. A. 2004. Policosanol contents and composition of grain sorghum kernels and dried distillers grains. **Cereal Chemistry**, **81**(3): 345–349.
- [17] Saini, R. K., Rengasamy, K. R., Ko, E. Y., Kim, J. T., & Keum, Y. S. 2020. Kore mısır melezleri yağ asidi bileşiminde önemli çeşitlilik gösterir: Sağlıklı bir beslenme için PUFA açısından zengin melezleri belirlemeye yönelik bir araştırma. **Frontiers in Nutrition**, **7**, 578761.
- [18] Kaya, A. S., Aydınşakir, K., & Karagüzel, Ü. Ö. 2019. Maraş-1 cinsi biber tohumlarında triacontanol uygulaması. **Uluslararası Tarım Çevre ve Gıda Bilimleri Dergisi**, **3**(1): 41–45.
- [19] Wang, C., Fan, A., Zhu, X., Lu, Y., Deng, S., Gao, W., Chen, X. 2015. GC-MS/MS ile beagle plazmasındaki 1-triakontanolün eser miktar tayini ve farmakokinetik bir çalışmaya uygulanması. **Biomedical Chromatography**, **29**(5): 749–755.
- [20] Li, N., Lu, X., Fang, M., Qiu, Z., Chen, X., Ren, L., Chen, G. 2018. PEG'lenmiş triacontanol, sıçanlarda triacontanolün farmakokinetiğini önemli ölçüde artırdı. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **66**(33): 8722–8728.
- [21] Mori, Y., Tanaka, A., Nakagawa, T., Amen, Y., Kuwano, Y., Tanizaki, Y., Shimizu, K. 2020. Isolation and quantification of the plant growth regulator 1-triacontanol

from Moso bamboo (*Phyllostachys pubescens*) shoot skin and its compost.

**Poljoprivreda i Sumarstvo**, **66**(3): 81–93.

- [22] Gençdal, L. 2024. Kurşun ağır metal stresine maruz kalan *Triticum aestivum* bitkilerinde triakontanolün genetik ve epigenetik etkilerinin belirlenmesi [Yüksek Lisans Tezi]. Atatürk Üniversitesi.
- [23] Çınar, O., Duman, O., Tunç, S. 2021. *Asparagus lycicus*'taki asparajin etkin maddesinin tayini ve endemik *Asparagus lycicus* türlerinin fitokimyasal karakterizasyonu için yeni bir HPLC yönteminin optimizasyonu ve validasyonu. **Food Analytical Methods**, **14**(10): 2003–2016.
- [24] Zaid, A., Asgher, M., Wani, I. A., Wani, S. H. 2020. Çevresel streslerin üstesinden gelmede triakontanolün rolü. *In* Protective Chemical Agents in the Amelioration of Plant Abiotic Stress: Biochemical and Molecular Perspectives (pp. 491–509). Springer.
- [25] Öz, M., Baltacı, C., Deniz, İ. 2018). Gümüşhane yöresi kuşburnu (*Rosa canina* L.) ve siyah kuşburnu (*Rosa pimpinellifolia* L.) meyvelerinin C vitamini ve şeker analizleri. **Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi**, **8**(2): 284–292.
- [26] Hadjikinova, R., Petkova, N., Hadjikinov, D., Denev, P., & Hrusavov, D. 2017. Development and validation of HPLC-RID method for determination of sugars and polyols. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, **9**(8): 1263–1269.
- [27] Türk, H., & Hanay, Ö. 2017. The evolution of removal mechanism of chlortetracycline by nanoscale zero valent iron from aqueous solution. **Sakarya University Journal of Science**, **21**(5): 1000–1007.
- [28] Naeem, M., Khan, M. M. A., Moinuddin. 2012. Triacontanol: A potent plant growth regulator in agriculture. **Journal of Plant Interactions**, **7**(2): 129–142.
- [29] Köseoğlu Yılmaz, P. 2015. Kahve örneklerinde fenolik asitlerin HPLC ile tayini için metot geliştirilmesi ve validasyonu [Doktora Tezi]. İstanbul Üniversitesi.
- [30] Chen, X., Yuan, H., Chen, R., Zhu, L., Du, B., Weng, Q., He, G. 2002. Isolation and characterization of triacontanol-regulated genes in rice (*Oryza sativa* L.): Possible role of triacontanol as a plant growth stimulator. **Plant and Cell Physiology**, **43**(8): 869–876.

- [31] Chen, X., Yuan, H., Chen, R., Zhu, L., He, G. 2003. Biochemical and photochemical changes in response to triacontanol in rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Growth Regulation**, **40**, 249–256.



## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı Soyadı:** Serap Arık  
**Uyruğu:** Türkiye (T.C)  
**Doğum Tarihi ve Yeri:**  
**Medeni Durum:**  
**e-mail:**

### EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi, Toprak Bilimi ve Bitki Besleme	2025
Lisans	Ankara Üniversitesi, Tarım Ekonomisi	2020
Lise	Necdet Taş Anadolu Lisesi, Kayseri	2016

### YABANCI DİL

İngilizce

### YAYINLAR

1. Arık, S. ark. (2024). Bağlardaki bitki besleme uygulamalarının fitofag akarlar üzerine olası etkileri, *Su Ürünleri ve Ziraat Alanlarındaki Bilimsel Çalışmalar* ss 245-263

2. Arık, S. ark. (2024). Phytoseiid akarların bağcılıkta yeri ve örtücü bitkilerin bu ekosistemdeki önemi *Su Ürünleri ve Ziraat Alanlarındaki Bilimsel Çalışmalar* ss 263-276