



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KESTANE KABUĞUNDA BULUNAN ELLAJİK ASİT
TÜREVLERİNİN HİDROLİZİ
ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

İRFAN BAŞI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Güler Yalçın

2015-İSTANBUL



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KESTANE KABUĞUNDA BULUNAN ELLAJİK ASİT
TÜREVLERİNİN HİDROLİZİ
ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

İRFAN BAŞI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Güler Yalçın

2015-İSTANBUL

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Yüksek Lisans
Anabilim Dalı : Analitik Kimya
Tez Sahibi : İrfan Bahşi
Tez Başlığı : Kestane Kabuğunda Bulunan Ellajik Asit Türevlerinin Hidrolizi Üzerine Çalışmalar
Sınav Yeri : Analitik Kimya Anabilim Dalı
Sınav Tarihi : 03/12/2014

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

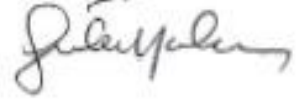
Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof.Dr.Güler Yalçın

Kurumu

M.Ü., Eczacılık Fakültesi,
Analitik Kimya Anabilim Dalı

İmza



Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof.Dr.Azize Şener

M.Ü., Eczacılık Fakültesi,
Biyokimya Anabilim Dalı

Yrd.Doç.Dr.Dilek Bilgiç Alkaya

M.Ü., Eczacılık Fakültesi,
Analitik Kimya Anabilim Dalı



Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 11/02/2015 tarih ve 35 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

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

BEYAN

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

15.04.2014
İrfan BAŞİ



ÖNSÖZ

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

Huzurlu ve rahat bir çalışma ortamı sağladıkları için Sayın Nuray Yüktaş'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda ve hayatımda aldığım tüm kararlarlarda beni yalnız bırakmayan Fatma Özer'e tüm kalbimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER TABLOSU

ÖNSÖZ	i
SEMBOLLER.....	v
KISALTMALAR.....	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
RESİM LİSTESİ	xii
TABLO LİSTESİ	xiii
ÖZET	1
1. GİRİŞ.....	3
1.1. Amaç ve Kapsam	3
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Kestane.....	6
2.1.1. Kestane genel özellikleri	6
2.2. Polifenoller.....	8
2.2.1. Ellajik asit ve özellikleri.....	8
2.2.2. Ellajik asidin farmakolojik özellikleri.....	11
2.2.3. Ellajik asit ile yapılan diğer çalışmalar	11
2.3. Hızlandırılmış Çözücü Ekstraksiyonu (ASE)	12
2.4. Kromatografi.....	18
2.4.1. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC).....	19
2.4.1.1. Çözücü dağıtma sistemi.....	21
2.4.1.2. Kolonlar	23
2.4.1.3. Dedektörler	23
2.5. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler	26
2.5.1. Aritmetik ortalama	26

2.5.2. Standart sapma	26
2.5.3. % Bağıl standart sapma	26
2.5.4. Geri kazanım	26
2.6. Yöntem Doğrulaması (Validasyon)	26
2.6.1. Özgünlük	27
2.6.2. Doğrusallık	28
2.6.3. Konsantrasyon aralığı	28
2.6.4. Doğruluk	28
2.6.5. Kesinlik	29
2.6.6. Dedeksiyon limiti	29
2.6.7. Kantitatif tayin limiti	29
2.6.8. Sağlamlık	30
2.6.9. Sistem uygunluk testleri	30
3. TEZ ÇALIŞMALARI	31
3.1. Gereç Ve Yöntem	31
3.1.1. Kimyasal maddeler	31
3.1.2. Cihaz ve analitik koşullar	31
3.1.3. Çözeltiler	32
3.1.4. Örnek hazırlama	33
3.1.5. Hızlandırılmış çözücü ekstaksiyonu (ASE) ile yapılan çalışmalar	34
3.1.6. Kromotagrofik Koşullar	34
3.2. Bulgular	35
3.2.1. HPLC yöntemi için ön denemeler	35
3.2.1.1. HPLC yöntem 1	35
3.2.1.2. HPLC yöntem 2	37
3.2.1.3. HPLC yöntem 3	39

3.2.1.4. HPLC yöntem 4.....	41
3.2.1.5. HPLC yöntem 5.....	43
3.2.2. Hidroliz reaksiyonu yöntemi için ön denemeler:	48
3.2.2.1. Hidroliz reaksiyonu yöntemi 1	48
3.2.2.2. Hidroliz reaksiyonu yöntemi 2	50
3.2.2.3. Hidroliz reaksiyonu yöntemi 3	52
3.2.2.4. Hidroliz reaksiyonu yöntemi 4	53
3.2.2.5. Hidroliz reaksiyonu yöntemi 5	55
3.2.2.6. Hidroliz reaksiyonu yöntemi 6	57
3.3. Geliştirilen Tayin ve Hidroliz Yöntemi	60
3.4. Geliştirilen Tayin Yönteminin Doğrulanması	61
3.4.1. Yöntemin özgünlüğünün belirlenmesi	61
3.4.2. Yöntemin doğrusallığının belirlenmesi.....	62
3.4.2.1. Ellajik asitin ölçü eğrisinin doğrusallığının belirlenmesi.....	62
3.4.2.2. Yöntemin çalışma aralığının belirlenmesi.....	64
3.4.2.3. Dedeksiyon limiti (LOD) ve kantitatif tayin limiti (LOQ).....	64
3.4.2.4. Yöntemin doğruluğunun belirlenmesi.....	64
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	66
5. KAYNAKLAR.....	70
ÖZGEÇMİŞ	78

SEMBOLLER

$^{\circ}\text{C}$	: Santigrad derece
L	: Litre
mL	: Mililitre
μL	: Mikrolitre
mm	: Milimetre
μm	: Mikrometre
nm	: Nanometre
psi	: Basınç
bar	: Basınç
mg	: Miligram
g	: Gram
%	: Yüzde
Rf	: Örneğin aldığı yol/ Çözücünün aldığı yol
mol.L^{-1}	: Konsantrasyon
dak	: Dakika
s	: Saniye
g.mol^{-1}	: Mol kütlesi

KISALTMALAR

HPLC : High Performance Liquid Kromatografisi

ASE : Hızlandırılmış Çözücü Ekstraksiyonu

UV : Ultraviyole

Ellajik asit : EA

Gallik asit : GA

Trifloroasetik Asit : TFAA

Hidroklorik Asit : HCl

Kestane Meyvesi : KME

Kestane Meyvesinin Kabuğu : KMK

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Ellajik asidin açık formülü.....	8
Şekil 2.2. Ellajitanenlerin hidrolizi ile Ellajik Asit oluşumu.....	9
Şekil 2.3. Serbest haldeki Ellajik Asit (sol üst), heksahidroksidifenikasit formunda şeker bağlı olarak bulunan Ellajik Asit (sağda), Ellajik Asit glikoziti (sol alt).....	10
Şekil 2.4. Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu cihazı şematik gösterimi.....	14
Şekil 2.5. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazının şematik gösterimi.....	21
Şekil 3.1. Standart EA çözeltisinin kromatogramı. Kolon: Water 5µ C18(2) 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH ₂ PO ₄ (0,025 M pH=3); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; λ=254 nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µL; Rt: 9,729 dak.....	36
Şekil 3.2. Standart EA çözeltisinin HPLC-DAD dedektörle alınan UV spektrumu. Şekil 3.1' de verilen kromatografik koşullar uygulanmıştır.....	36
Şekil 3.3. Standart EA çözeltisinin kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH ₂ PO ₄ (0,005 M pH=2,5); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; λ=254 nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µL; Rt: 15,428 dak.....	38
Şekil 3.4. Kestane meyve kabuğu çözeltisinin kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH ₂ PO ₄ (0,005 M pH=2,5); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; λ=254 nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µL; Rt: 15,380 dak.....	38
Şekil 3.5. Standart EA çözeltisinin kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: %50 NH ₄ H ₂ PO ₄ (0,03 M pH=3.0) + %50 Metanol; hareketli faz B: NH ₄ H ₂ PO ₄ (0,03 M pH=3.0) ; dedektör: DAD; λ=254 nm; akış hızı: 1,000 ml/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µl; Rt: 27,675 dak.....	40

Şekil 3.6. Kestane meyve kabuğu çözeltilisinin kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: %50 NH ₄ H ₂ PO ₄ (0,03 M pH=3.0) + %50 Metanol; hareketli faz B: NH ₄ H ₂ PO ₄ (0,03 M pH=3.0) ; dedektör: DAD; λ=254 nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µL; Rt: 27,635 dak.....	40
Şekil 3.7. Standart EA çözeltilisinin HPLC-DAD dedektörle alınan UV spektrumu.....	41
Şekil 3.8. Standart EA çözeltilisinin kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH ₂ PO ₄ (0,005 M pH=2.5); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; λ=254 nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µL; Rt: 7,67 dak.....	42
Şekil 3.9. Kestane meyve kabuğu çözeltilisinin kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH ₂ PO ₄ (0,005 M pH=2.5); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; λ=254 nm; akış hızı: 1,00 mL/dak; enjeksiyon hacmi:20 µL; Rt: 7,61dak.....	42
Şekil 3.10. Standart EA çözeltilisinin kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH ₂ PO ₄ (0,005 M pH=2.5); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; λ=254 nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µL; Rt: 11,009 dak.....	44
Şekil 3.11. Kestane meyve kabuğu çözeltilisinin kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH ₂ PO ₄ (0,005 M pH=2.5); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; λ=254 nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µL; Rt: 11,026 dak.....	44
Şekil 3.12. Standart EA çözeltilisinin ve KMK çözeltilisinin HPLC-DAD dedektörle alınan çakışık UV spektrumu. Şekil. III. 10'de verilen kromatografik koşullar uygulanmıştır.....	45
Şekil 3.13. Standart EA çözeltilisinin kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH ₂ PO ₄ (0,005 M pH=2.5); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; λ=254 nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µL; Rt: 16,100 dak.....	46

- Şekil 3.14. Kestane meyve kabuğu çözeltilisinin kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH₂PO₄ (0,005 M pH=2.5); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; λ=254 nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µL; Rt: 16,115 dak.....46
- Şekil 3.15. Standart EA çözeltilisinin kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH₂PO₄ (0,005 M pH=2.5); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; λ=254 nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µL; Rt: 27,878 dak.....47
- Şekil 3.16. Kestane meyve kabuğu çözeltilisinin kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH₂PO₄ (0,005 M pH=2.5); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; λ=254 nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µL; Rt: 27,833 dak.....47
- Şekil 3.17. KMK karşılaştırma çözeltilisinin kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH₂PO₄ (0,005 M pH=2.5); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; λ=254 nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µL; Rt: 10,831 dak.....49
- Şekil 3.18. KMK çözeltilisinin hidrolizi sonucunda alınan kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH₂PO₄ (0,005 M pH=2,5); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; λ=254 nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µL; Rt: 10,898 dak.....49
- Şekil 3.19. KMK karşılaştırma çözeltilisinin kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH₂PO₄ (0,005 M pH=2.5); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; λ=254 nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µL; Rt: 11,196 dak.....51
- Şekil 3.20. KMK çözeltilisinin hidrolizi sonucunda alınan kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH₂PO₄ (0,005 M pH=2.5); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; λ=254 nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µL; Rt: 11,044 dak.....51

Şekil 3.21. KMK karşılaştırma çözeltisinin kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH ₂ PO ₄ (0,005 M pH=2.5); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; λ=254 nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µL; Rt: 10,925 dak.....	52
Şekil 3.22. KMK çözeltisinin hidrolizi sonucunda alınan kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm. 4,6 mm; hareketli faz A: KH ₂ PO ₄ (0,005 M pH=2.5); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; λ=254 nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µL; Rt: 10,898 dak.....	53
Şekil 3.23. KMK karşılaştırma çözeltisinin kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH ₂ PO ₄ (0,005 M pH=2.5); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; λ=254 nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µL; Rt: 11,891 dak.....	54
Şekil 3.24. KMK çözeltisinin hidrolizi sonucunda alınan kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH ₂ PO ₄ (0,005 M pH=2.5); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; λ=254 nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µL; Rt: 11,124 dak.....	54
Şekil 3.25. KMK karşılaştırma çözeltisinin kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH ₂ PO ₄ (0,005 M pH=2.5); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; λ=254 nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µL; Rt: 10,925 dak.....	56
Şekil 3.26. KMK çözeltisinin hidrolizi sonucunda alınan kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH ₂ PO ₄ (0,005 M pH=2.5); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; λ=254 nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µL; Rt: 10,988 dak.....	56
Şekil 3.27. KMK karşılaştırma çözeltisinin kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH ₂ PO ₄ (0,005 M pH=2.5); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; λ=254 nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µL; Rt: 10,925 dak.....	57

Şekil 3.28. KMK çözeltisinin hidrolizi sonucunda alınan kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH ₂ PO ₄ (0,005 M pH=2.5); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; λ=254 nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µL; Rt: 10,648 dak.....	58
Şekil 3.29. Hidroliz reaksiyonu 6'nın zamana karşı pik alanı değişimi.....	59
Şekil 3.30. Hidroliz reaksiyonu 6'nın sıcaklığa karşı pik alanı değişimi.....	60
Şekil 3.31. KMK karşılaştırma çözeltisinin kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH ₂ PO ₄ (0,005 M pH=2.5); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; λ=254 nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µL; Rt: 10,925 dak.....	61
Şekil 3.32. KMK çözeltisinin hidrolizi sonucunda alınan kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH ₂ PO ₄ (0,005 M pH=2.5); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; λ=254 nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µL; Rt: 10,648 dak.....	61
Şekil 3.33. Ellajik asit standartı spektrumu (379), Hidroliz öncesi KMK örneği spektrumu (371), Hidroliz sonrası KMK spektrumu (354).....	62
Şekil 3.34. EA'e ilişkin dedektör sinyalinin konsatrasyona karşı grafiği.....	64

RESİM LİSTESİ

Resim 2.1. Kestane (Castanea)	6
Resim 2.2. Ekstraksiyon hücresi	15
Resim 2.3. Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu cihazı	16
Resim 3.1. Kestane meyve kabuğu Tüylü kısım	33
Resim 3. 2. Kestane meyve kabuğu İnce kısım	33
Resim 3. 3. Stuart Block ısıtıcı	50

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Ellajik asidin organik çözücülerde kalitatif olarak çözünmesi	10
Tablo 2.2. Sıvı ekstraksiyon tekniklerinin kıyaslanması	13
Tablo 2.3. ASE kullanılan genel çözücü hacimleri	16
Tablo 2.4. Dioksin ve Furan ekstraksiyon koşulları (Çevresel örnekler)	17
Tablo 2.5. Normal-faz ve ters-faz sıvı kromatografisi kolon özellikleri	20
Tablo 3.1. Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu (ASE) çalışma koşulları	34
Tablo 3.2. İzokrotik elüsyon sistemi	34
Tablo 3.3. Dereceli Elüsyon Sistemi 1	36
Tablo 3.4. Dereceli Elüsyon Sistemi 2	37
Tablo 3.5. Dereceli Elüsyon Sistemi 3	39
Tablo 3.6. Hidroliz Reaksiyonu Yöntemi 6'nın hidroliz koşulları	58
Tablo 3.7. Hidroliz Reaksiyonu Yöntemi 6'nın hidroliz koşulları	59
Tablo 3.8. Ellajik Asit'e ilişkin ölçü eğrisinde elde edilen pik alan değerleri	63
Tablo 3.9. Ellajik asit için ölçü eğrisinden elde edilen doğruların eğim, kayım ve R^2 değerleri	63
Tablo 3.10. EA içeren karışımdan geri kazanım testi sonuçları	65

KESTANE KABUĞUNDA BULUNAN ELLAJİK ASİT TÜREVLERİNİN HİDROLİZİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR

İrfan BAHŞİ, Prof. Dr. Güler YALÇIN
Analitik Kimya Anabilim Dalı

ÖZET

Amaç:

Bu çalışmada, kestane meyve kabuğunda bulunan ve bir polifenol olan ellajik asidin (EA) miktarında hidroliz sonucu ortaya çıkan değişimin izlenmesi planlanmıştır.

Gereç ve Yöntem:

Bu aşamada eşit miktarda öğütülmüş, elenerek aynı büyüklüğe getirilmiş kestane kabuğu ve perikaptan eşit miktarda alınarak hızlandırılmış çözücü ekstraksiyon cihazı (ASE 100) ile ekstrakte edildi. Hidroliz Reaksiyonu Yöntemi: Ekstraksiyon işlemi ile elde edilen ekstrakttaki metanolün tamamı uçuruldu, 4 N trifloraasit ile 110 °C de 2.5 saat hidroliz işlemi uygulandı. EA standart çözeltisi ve hidroliz reaksiyonu ile artışın miktarının tespiti için bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir. RP-HPLC-DAD Yöntemi: Kolon: ODS V3; mobil faz: % 82 5 mM pH=2,5 KH₂PO₄ çözeltisi, % 18 asetonyitril, RT_{EA}: 10,52 dak. analiz süresi: 28,0 dak. basınç: 135 bar, sıcaklık: 25, °C.

Bulgular:

Hidroliz öncesi ve sonrası yapılan HPLC analizleri sonucunda EA pik alanında 4.07 kat artış gözlenmiştir. Ayrıca, EA'den daha kısa alıkonma zamanına (RT_{X1} =2,49 dak RT_{X2} =3,28 dak) sahip ve ellajitanen olması muhtemel bileşiklerin pik alanlarında azalma gözlenmiştir.

Sonuçlar:

Yapılan çalışmalar sonucunda, dış standart ekleme yöntemi ile 3 kez oluşturulan ölçü eğrisinin doğru denklemi: $y = 61,448x + 153,57$ ve $r^2=0,9986$ olarak bulunmuştur. Geri kazanım değeri: %89,20 olarak bulunmuştur.

Bu çalışmada, en uygun ve verimli hidroliz reaksiyonu şartları belirlemek için, hidroliz koşullarından sıcaklık ve zaman parametreleri değiştirilerek artış miktarı belirlendi ve geliştirilen HPLC metodu valide edildi.

Anahtar kelimeler: Ellajik asit, Kestane, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC), Hızlandırılmış Çözücü Ekstraksiyonu (ASE).

A STUDY ON HYDROLYSIS OF ELLAGIC ACID DERIVATIVES IN CHESTNUT PEEL

İrfan BAHŞI, Prof. Dr. Güler YALÇIN
Department of Analytical Chemistry

SUMMARY

Objective:

In this study, it is planned to observe the change in the amount of a polyphenol, ellagic acid (EA) exists in chestnut peel and pericarp after acid hydrolysis.

Material and Methods:

At this step chestnut peel and pericarp are grinded and sieved to have similar granule size. Equal amounts were taken from both samples and extracted by Accelerated Solvent Extractor (ASE 100). Hydrolysis Reaction Method: All remaining methanol in the extract was evaporated and the extract was hydrolyzed with 4N trifluoro acetic acid at 120 °C for two hours. An HPLC method is developed to determine the increase in ellagic acid amount after hydrolysis. RP-HPLC-DAD Method: Column: ODS V3, mobile phase: % 82 5 mM pH=2.5 KH₂PO₄ solution, % 18 acetonitrile, RT_{EA}: 10,52 min, analysis time: 28.0 min, pressure: 135 bar, temperature: 25 °C.

Results:

As a result of HPLC analysis, 4.07 fold increase was observed at EA peak area after hydrolysis. Additionally, a decrease was observed in the peak area of compounds which have shorter retention time than EA (RT_{X1} =2,49 min TR_{X2} =3,28 min) and are likely to be ellagitannins.

Conclusion:

As a result of this study, calibration curve was constructed three times by standard addition method and found to be $y = 61,448x + 153,57$ and $r^2=0,9986$. Recovery value was determined as 89,20%.

In this study, in order to find optimum hydrolysis conditions; hydrolysis parameters such as temperature and time were varied, the amount of increase was determined and the developed HPLC method was validated.

Keywords: Ellagic acid, chestnut, High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Accelerated Solvent Extraction (ASE).

1. GİRİŞ

1.1. Amaç ve Kapsam

Bu çalışmada, kestane meyve kabuğu örneğinin uygun koşullarda ekstraksiyonu yapılmıştır. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazı için uygun kromatografik sistem geliştirildi. Elde edilmiş ekstreler belirlenen sistemde işleme tabii tutularak, ellajik asit miktarı belirlendi. Sonrasında kestane meyve kabuğu ekstraktları için, hidroliz reaksiyonu yöntemi geliştirilip diğer polifenoller ellajik aside dönüşümü sağlandı. Geliştirilen kromatografik sistemle artış miktarı belirlendi. Çalışılan kromatografik yöntem valide edildi.

Polifenoller acılık, renklilik gibi duyuşal özelliklere sahip olup, sağık üzerine olası etkilerinden dolayı önemli kimyasal bileşiklerdir (Amokura ve ark., 2000). Genel olarak polifenollere çay, kırmızı şarap, çeşitli meyveler ve bazı tıbbi bitkilerde rastlanır (Häkkinen ve ark., 2000; Bala ve ark., 2006). Polifenolik bileşiklerden olan ellajitanenler, bir veya daha fazla sayıdaki heksahidroksidifenol grubu taşıyan bir molekül ile şeker molekülünün (genellikle glukoz) esterleşmesiyle oluşun ve hidrolize olabilen bileşiklerdir (Lee, 2004). Ellajitanenler, asit veya bazlarla hidrolize uğradığında ester bağları hidrolize olarak heksahidroksidifenik asit ve glukoz ara ürünlerini verir, heksahidroksidifenik asit kendiliğinden laktonize olarak suda az çözünun ellajik aside dönüşür (Häkkinen ve ark., 2000; Clifford ve ark., 2000; Mullen ve ark., 2002). Ellajik asit, aynı zamanda gallik asidin kondanse dimeridir (Amakura ve ark., 2000; Kawamoto ve ark., 1997). Zayıf bir asit olan ellajik asit, doğada birçok bitkide (çilek, ahududu, böğürtlen, nar, yaban mersini, ananas gibi meyvelerde ve ceviz, kestane, gibi sert kabuklu yiyeceklerde) serbest halde bulunabildiğı gibi, glikozitleri halinde, ya da heksahidroksidifenik asit olarak da bulunur (Mullen ve ark., 2002). Hidrofilik kısmı temsil eden dört fenolik ve iki lakton grubu ve lipofilik alanı temsil eden dört halka ile termodinamik olarak oldukça kararlı bir moleküldür. Lipofilik üstünlük gösteren molekülün dört halkası nedeniyle ısıya oldukça dayanıklıdır. Suda az çözünür; metanol, etanol ve dimetil sülfoksitte iyi çözünür (Bala ve ark., 2006; Cuartero ve ark., 2011; Aguilera-Carbo ve ark., 2007).

Ellajik asidin 1960'lı yıllarda kan pıhtılaşması ve cilt beyazlatma etkileri, hemostatik aktivitesi üzerinde çalışılmıştır. İlerleyen yıllarda kanser oluşumu; daha sonraki yıllarda ise olası antimutajenik, antiviral ve antikanserojenik etkileri nedeniyle ellajik aside olan ilgi artmıştır. Özellikle laboratuvar hayvanlarında çalışılmıştır. Buna karşın literatürde insanlarda yapılan çalışmalara daha az rastlanmaktadır (Akagi ve ark., 1995; Sigman ve ark., 1984; Bhargava ve ark., 1968; Mandal ve ark., 1990; Wood ve ark., 1982; Khandurja ve ark., 1999; Wilson ve ark., 1990). Ayrıca, ellajik asidin oldukça düşük toksititesi ve bitkilerde yaygın olarak bulunan bir ellajitanen olması nedeniyle, kansere karşı kimyasal koruma olarak kullanılmasına yönelik araştırmalar yapılmıştır. Yutak, akciğer, dil, kolon ve cilt kanserinde engelleyici olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Mandal ve ark., 1990; Stoner ve ark., 1997; Mukhtar ve ark., 1986; Rao ve ark., 1991). Sentetik antioksidanların kanserojen özelliklerinden dolayı kullanımlarına kısıtlamalar getirilirken, gıda ve ilaç endüstrisinde doğal bitkilere, antioksidan olarak kullanımlarına, kansere karşı koruyucu özelliklerine olan ilgi artmıştır (Mahdavi ve ark., 1995). Yapılan araştırmalarla, ellajik asitin kansere, kalp hastalıklarına ve diğer tıbbi problemlere yararlı etkileri göz önünde bulundurulmuştur. Besin takviyesi olarak pazarlanmasına başlanmıştır (Bravo, 1998; Sellapan ve ark., 2002). Bu nedenle de ellajik asit gibi doğada bulunan ve başta antioksidan olmak üzere birçok özelliğe sahip bileşiklerin hangi gıdalarda ne kadar bulunduğu, elde edilmeleri, saflaştırılmaları ve hidroliz ile miktarlarının arttırılması önem kazanmıştır (Cuartero ve ark., 2011).

Ellajik asit bir çok bitki ve meyvede tayin edilmiş, bu amaçla kromatografik, spektroskopik, elektroforetik ve polarografik tekniklerle ve son olarak ellajik asidin redüksiyonuna bağlı voltametrik teknikle çalışılmıştır (Zhou ve ark., 2008; Thakur ve ark., 2008; Mullen ve ark., 2003; Chang ve ark., 1996). Buna karşın, yapılan hidroliz çalışmaları çok az sayıdadır. Demokratik Kongo Cumhuriyeti'nin belirli bir bölgesinden toplanmış *Anisophyllea dichostyla* R.Br. kök kabukları örneklerinde NMR, HPLC-ESI-MS ve nano-ESI-MS-MS yöntemleri kullanılarak bir çalışma yapılmıştır (Khallouki ve ark., 2007). Bu çalışmada, ellajik asit türevleri, kateşinler ve prosiyanidinlerin kalitatif ve kantitatif analizlerine ilişkin sonuçlar rapor edilmiş olup ellajik asidin 8 türevi tanımlanmıştır.

Diğer bir çalışmada, yeni bir yaklaşımla otomatik yeniden kristallendirme yöntemi ile tekrarlanan saflaştırmalar yapılarak mutlak safsızlık belirlenmiştir. Ticari ellajik asit örnekleri 4 kez yeniden kristallenerek safsızlık yüzdeleri bulunmuştur (Nara, 1997). Hindistan’da yetişen Triphala Churanam formülasyonunda Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (HPTLC) yöntemi ile ellajik asit ve gallik asit miktarları tayin edilmiştir (Jeganathan ve ark., 2008). Vasconcelos’un çalışmasında kestanenin farklı dokularında polifenol içeriğine bakılmış, düşük molekül ağırlıklı ellajik asit ve gallik asit bulunduğunu belirlemiştir (Maria do Carmo ve ark., 2010). Gonçalves çalışmasında kavrulmuş, haşlanmış ve ham kestane örnekleri ile çalışmış haşlanmış kestane örneklerinin daha yüksek ellajik asit ve gallik asit içeriğine sahip olduğunu saptamıştır (Berta ve ark., 2010). Gonçalves yapmış olduğu çalışmada sıcaklıkla madde arttırımının olduğunu belirlemiştir. Ancak hidroliz reaksiyonu ile miktar arttırım çalışmalarına pek rastlanmamıştır. Bu çalışmada kestane meyve kabuğunun Hızlandırılmış Çözücü Ekstraksiyonu (ASE) ile ekstraksiyonu yapılmıştır. Bu ekstrelerde bulunan fenolik bileşiklerden ellajik asitin miktarının belirlenmesi için uygun Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) sistemi geliştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kestane

2.1.1. Kestane genel özellikleri

Kestane (*Castanea*), Fagaceae (kayıngiller) familyasındandır (Resim 2.1). Bu türlerin doğal yayılma alanları Doğu Asya (Çin, Kore, Japonya), Türkiye, Güney Avrupa ve Kuzey Amerika'dır (Subaşı, 2004).



Resim 2.1. Kestane (*Castanea*)

Kestane ağaçları, güzellik, barınak ve yakacak için dünyada 6000 yıldan beri yetiştirilmektedir (Subaşı, 2004). Yayılış merkezinin neresi olduğu kesin olarak bilinmemektedir. Anadolu'nun bu türün anavatanı olduğu ihtimali kuvvetlidir. Verimliliği, hasat kolaylığı, yeme için hazırlığının basit olması ve gelir sağlaması insanları kestane yetiştirmeye sevk etmiştir (Subaşı, 2004).

Kestanenin odunu düzgün yapılı ve çürümeye dayanıklıdır. Kütüğünün sağlamlığı nedeniyle mobilya ve gemi sanayinde önemli bir yere sahiptir. Birçok yapı işlerinde, elektrik direklerinde ve demiryolu raylarının döşenmesinde kullanılır. Kestane uzun ömürlü bir ağaç türü olarak 200-500 yıl kadar yaşayabilmektedir. Yaşlanan ve verimden düşmüş kestane ağaçlarının kereste olarak değerlendirme imkanı mevcuttur.

Kestane üretiminin büyük bir kısmı Ege ve Karadeniz Bölgelerinde yoğunlaşmıştır. Toplam ağaç sayısı ve kestane üretimi olarak Aydın ili ilk sıradadır. Türkiye kestane üretimi yönünden kendine yeterli olup, kestane ithalatı söz konusu değildir. Kestane ihracatı yıllık 7-8,5 ton arasında değişmektedir.

Kestanelerin kimyasal bileşimi genel olarak diğer sert kabuklu meyvelere göre sağlığa daha uygundur ve yağ oranı düşük kültür çeşitleri kızartma ve haşlama ile kolaylıkla hazmedilebilir. Bu nedenle birçok rejim reçetelerinde kestane bulunmaktadır (Subaşı, 2004). Kestanenin çok düşük miktarlarda yağ içermesi kalp ve damar hastalıklarını önlemede ileri yaşlarda ve şişmanlık sorunu olanlar için önem taşımaktadır (Connor, 1997).

Kestane meyvesi normal koşullarda % 40-45 su, % 35-40 karbonhidrat, %15-20 nişasta, % 5-10 şeker, % 3-6 protein, % 3-5 yağ ve kalsiyum, potasyum, magnezyum, fosfor, demir, sodyum gibi mineraller içerir (Subaşı, 2004). Kestane içerdiği potasyum nedeniyle sinir sistemi ve kalp kaslarının çalışması üzerinde etkili olmaktadır. Fosfor ve kalsiyum varlığı ile kemik ve diş oluşumuna olumlu etki yapmakta iskelet sisteminin yapısına girmektedir. Sodyum içermesi ile potasyum-sodyum dengesi sağlanmaktadır. Kestanede sodyum miktarının azlığı nedeniyle yüksek tansiyon hastaları tarafından tercih edilmektedir (Işık, 2003).

Ayrıca B ve C vitaminlerinin de olduğu kaydedilmektedir (Barros Ana ve ark., 2011). Kestanenin içerdiği B1 vitamini enerji, büyüme, iştah, öğrenme kapasitesi üzerinde olumlu etkiler yaparken vücudu yaşlanmaya, sigara ve alkolün zararlarına karşı korumaktadır. Vitamin B2 vücutta antikör üretimi, büyüme ve kataraktın önlenmesi bakımından önemlidir. Nikotinik asit sağlıklı bir cilt için gereklidir.

Pantotenik asit karbonhidratlar, yağ ve proteinin enerjiye dönüşmesi için gereklidir. Vücudu güçlendirici özelliği bulunmaktadır (Işık, 2003).

Kestanenin doku yapısını oluşturan lifler vücut tarafından sindirilememekte ancak bağırsak hareketini düzenlemekte ve hızlandırmaktadır. Yine bağırsak florasının gelişmesinde önemli rol oynadığı kaydedilmektedir. Zararlı maddelerin vücuttan atılmasında ve kandaki kolesterol düzeyinin düşürülmesinde etkili olduğu belirtilmektedir. Beslenme diyetlerinde kestanenin de dikkate alınması önem taşımaktadır (Işık, 2003).

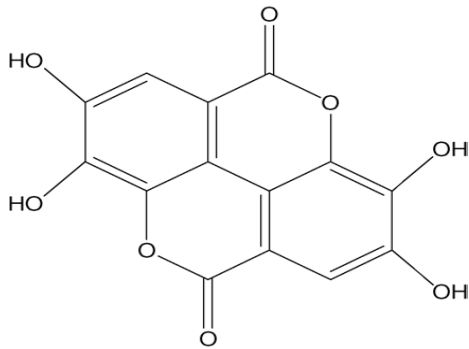
Kestanelerin; meyve, şekerleme ve kereste olarak kullanımının yanı sıra meyve kabukları tanin üretiminde, yaprak ve çiçekleri ilaç ve kozmetik sanayinde kullanılmaktadır (Berta ve ark., 2010).

Kestane tüketimi başlıca iki ana grupta toplanır. Bunlar taze (sofralık) tüketim ve işlendikten sonra tüketim (şekerleme, kestane hamuru, jöle vb.) Türkiye’de genel olarak sofralık ve şekerleme halinde tüketim yaygındır (Subaşı, 2004).

2.2. Polifenoller

Şarap, çay, çilek, böğürtlen, elma, vişne, patates, soya gibi birçok gıdada çeşitli polifenoller görülmektedir. Antioksidan, antikanserojen gibi etkileri nedeniyle önemlidirler. Polifenoller yapılarına göre birçok farklı şekillerde sınıflandırılırlar. Taşıdıkları aromatik halka sayılarına ve hidroksil gruplarına göre: fenolik asitler, flavonoidler olarak ayrılırlar. EA, GA fenolik asit grubuna dahil olan polifenollerdir (Häkkinen ve ark.,1998).

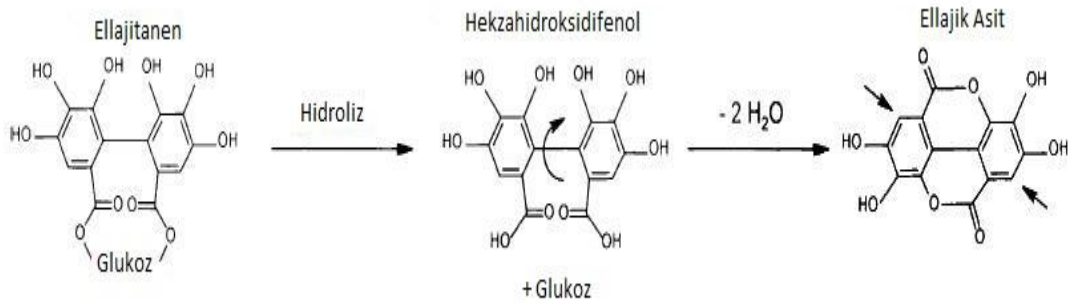
2.2.1. Ellajik asit ve özellikleri



Şekil 2.1. Ellajik asidin açık formülü

EA IUPAC ismi	:2.3.7.8-tetrahydroxy[1]benzopyrano[5,4,3-cde][1]benzopyran-5,10- dione
Kapalı formülü	:C ₁₄ H ₆ O ₈
Molekül ağırlığı	:302.197 g/mol
Görünüşü	:açık sarı renkte, toz, katı

Polifenolik bileşiklerden olan ellajitanenler, bir veya daha fazla sayıdaki heksahidroksidifenol grubu taşıyan bir molekül ile şeker molekülünün (genellikle glukoz) esterleşmesiyle oluşan ve hidrolize olabilen bileşiklerdir (Lee, 2004). Ellajitanenler, asit veya bazlarla hidrolize uğradığında ester bağları hidrolize olarak heksahidroksidifenik asit ve glukoz ara ürünlerini verir, heksahidroksidifenik asit kendiliğinden laktonize olarak suda az çözünen ellajik aside dönüşür (Şekil 2.2), (Okuda ve ark., 1995; Shahrzad ve ark.,1996).



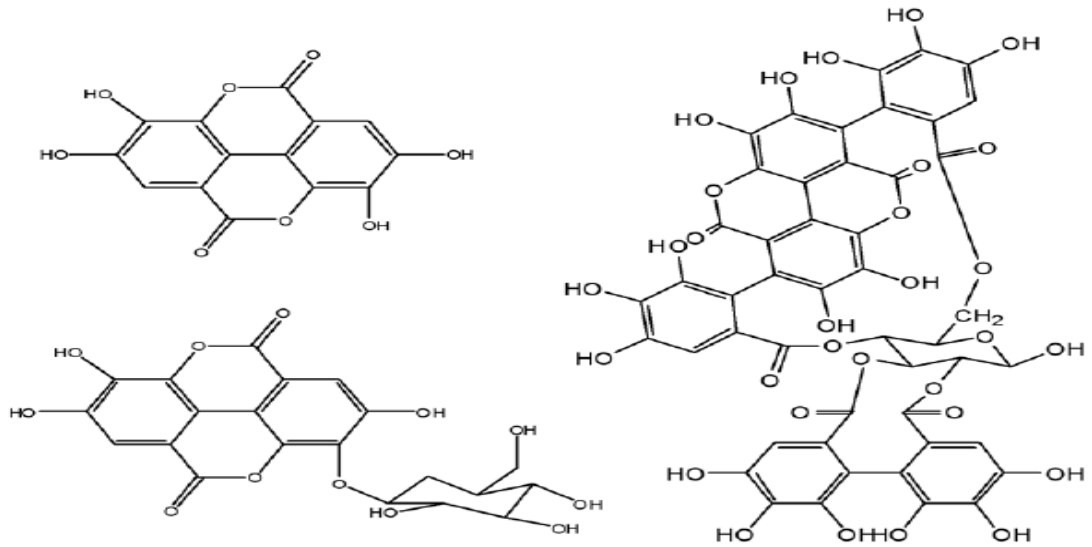
Şekil 2.2. Ellajitanenlerin hidrolizi ile Ellajik Asit oluşumu.

Ellajik asit zayıf bir asit olup yüksek erime noktası ile kararlı bir bileşiktir. Hidrofilik kısmı temsil eden dört fenolik ve iki lakton grubu ve lipofilik alanı temsil eden dört halka ile termodinamik olarak oldukça kararlı bir moleküldür. Lipofilik üstünlük gösteren molekülün dört halkası nedeniyle ısıya oldukça dayanıklıdır. Suda az çözünür; metanol, etanol ve dimetil sülfoksitte iyi çözünür (Bala ve ark., 2006; Cuartero ve ark., 2011; Uzuner, 2008). Ellajik asit birçok besin maddesinde bulunmaktadır. Ayrıca yapılan çalışmalarda meşe, ceviz gibi ağaç türlerinde de ellajik asit içeriğine rastlanmıştır (Tablo 2.1) (Bianco ve ark., 1998).

Tablo 2.1. Ellajik asidin organik çözücülerde kalitatif olarak çözünmesi (Häkkinen ve ark., 2000).

Çözücü	5 mg EA'ı çözmek için çözücü miktarı (ml)
Etanol	25
Piridin	2,5
NMP	0,2
Triethanolamine + 50 µl su	0,15
DMSO	2,0
PEG 400	0,6

Ellajik asit çeşitli bitki ve meyvelerde üç farklı şekilde bulunabilir: Serbest halde, heksahidroksidifenikasıit formu şeker ile birlikte veya ellajik asit glikoziti (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Serbest haldeki Ellajik Asit (sol üst), heksahidroksidifenikasıit formunda şeker bağılı olarak bulunan Ellajik Asit (sağda), Ellajik Asit glikoziti (sol alt).

Denek hayvanları üzerinde ellajik asit ile yapılan çalışmalarda bu maddenin kolon, gırtlak, karaciğer, akciğer, dil ve deri kanseri oluşumlarını önemli ölçüde engellediği belirlenmiş ve ellajik asidin kanser tedavisinde kullanılabilecek potansiyel bir kemoterapi ajanı olabileceği ortaya konmuştur (Rommel ve ark., 1993; Wilson ve ark., 1990; Hayatsu ve ark., 1998; Okuda, 2005). Değişik mikroorganizmalar üzerinde gerçekleştirilen çalışmalarda da taninlerin önemli bir antimutajen madde olduğu bildirilmektedir. Ellajik asidin antikanserojenik ve antimutajenik etkileri sahip oldukları antioksidatif özelliklere bağlanmaktadır (Chung ve ark., 1998; İşyapan, 2011). Tanenler içerisinde yer alan ellajik asit kan pıhtılaştırıcı olarak kullanılabilmektedir. Ayrıca ellajik asidin kan basıncını düşürücü yönde etkileri de mevcuttur (Bhargava ve ark., 1968; Wood ve ark., 1982; Strube ve ark., 1993).

2.2.2. Ellajik asidin farmakolojik özellikleri

Sert gövdeli ağaçlarla çalışma esnasında en çok korkulan etkilerden biri ağaç tozu kaynaklı mesleki sinonasal kanseridir (Daniel ve ark., 1989). EA'nın yapı taşı olan gallik asit esterleri DNA'ya direkt olarak toksik etki gösterirken (Rommel ve ark., 1993), EA'nın deney farelerinde yapılan çalışmalarda kanser üzerine yararlı bir kimyasal etki gösterdiği saptanmıştır (Versari ve ark., 1997). Bu özelliklerinin yanı sıra kolon kanseri (Häkkinen ve ark., 1999), akciğer ve yemek borusu kanserlerini (Bala ve ark., 2006) de önleyici etkisi olduğuna dair araştırmalar da bulunmaktadır. Hemostatik etkisi ve deriyi beyazlatıcı etkisi de bulunan EA'nın kanser oluşumuna etkisiyle ilgili yaklaşık on yıldır çalışmalar yayımlanmıştır (Okuda ve ark., 1995; Lee, 2004; Versari ve ark., 1997).

Antioksidan işleviyle Japonya'da, izinli olarak, gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. (Bianco ve ark., 1998; Vekiari ve ark., 2008). Bu nedenle tavin metotları gıda hijyeni ve sağlık açısından da önem taşımaktadır (Pinto ve ark., 2008).

2.2.3. Ellajik asit ile yapılan diğer çalışmalar

İnce toz edilmiş meşe ve ceviz ağacı örneklerinde ekstraksiyon işlemi metanol kullanılmış ve sonikasyon uygulanmıştır (Narayanan ve ark., 1999). Taze meyvelerle yapılan bir çalışma metanolde homojenizasyon yapılmış ve homojenat refluks edilerek süzölmüş; seyreltik. HCl çözeltisi ilave edilerek katı faz

ekstraksiyonu uygulanmıştır (Häkkinen ve ark., 2000). Kestane kabuğundan ekstraksiyonda ise Bianco MA ve arkadaşlarının kullandığı yöntem (1998) modifiye edilmiş ve çözücüye azot gazı akımı altında kurutma uygulanmış, metanol trifloroasetik asit karışımı ile 2 saat 85°C’de refluks ile hidrolize edilmiştir (Cuartero ve ark., 2011).

Kromatografik analiz için önceki çalışmalarda kullanılan sistemler genellikle ters fazlı HPLC sistemi olup dereceli elüsyon uygulanmıştır. 254 nm dalgaboyunda ve dizi diyod dedektörlerle (DAD) çalışılmıştır. HPLC analizi için literatürde sınırlı sayıda farklı sistemin kullanıldığı görülmektedir. Bunlar;

Hypersil ODS kolon (200 mm x 4 mm I.D.) ve DAD dedektör (Narayanan ve ark., 1999);

Hypersil ODS kolon (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) ve UV dedektör, hareketli faz olarak KH₂PO₄ (pH: 2,5) ve ACN dereceli elüsyon uygulanmış (Aguilera-Carbo ve ark., 2007);

C18 LiChro CART kolon (125 mm x 3 mm I.D, 5 µm), UV dedektör (260 nm) ve çözücü olarak %1 sulu formik asit ile ACN dereceli elüsyon uygulanmış (Okuda ve ark., 1995);

Prodigy ODS3 kolon (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) ters faz silika, DAD dedektör, hareketli faz olarak su: tetrahidrofuran: trifloroasetikasit (98:2:0,1) ile ACN dereceli elüsyon (Charrier ve ark., 1992);

40°C’de ısıtılmış polietilen glikol (PEG) kolon (250 mm x4,6 mm, 5 µm), UV dedektör, hareketli faz olarak KH₂PO₄ (pH: 2,5) ve ACN (20:80, v/v) (Häkkinen ve ark., 2000) kullanılmıştır.

2.3. Hızlandırılmış Çözücü Ekstraksiyonu (ASE)

Ekstraksiyon teknikleri:

1) Sokslet

2) Otomatik sokslet

- 3) Sonikasyon
- 4) Mikrodalgalı ekstraksiyon
- 5) Süper kritik akışkanlı ekstraksiyon
- 6) Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu

Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonun kullanılan diğer yaygın adları:

- 1) Basınçlı çözücü ekstraksiyonu
- 2) Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu
- 3) Basınçlı akışkan ekstraksiyonu
- 4) Basınçlı sıcak çözücü ekstraksiyonu
- 5) Yüksek basınçlı çözücü ekstraksiyonu
- 6) Yüksek basınç yüksek sıcaklıkta çözücü ekstraksiyonu
- 7) Subkritik çözücü ekstraksiyonu (Sharma ve ark., 1994)

Son yıllarda analitik ekstraksiyonlarda kullanılan tehlikeli organik çözücü miktarını azaltma ihtiyacı, yeni ekstraksiyon tekniklerinin geliştirilmesine katkı sağlamıştır (Harttig ve ark., 1996). Son otomatikleştirilmiş ekstraksiyon teknikleri daha az çözücü kullanır ve gelişmiş analitik kararlılık verir (Corthout ve ark., 1991). Bu tekniklerden biri katı ve yarı katı örneklerden analitlerin tam ekstraksiyonunu kısa zamanda elde etmek için yüksek sıcaklık ve basınç altında, küçük hacimlerde çözücü kullanımına dayanan hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonudur (ASE) (Şekil 2.4) (Kalt ve ark., 1999; Stoner ve ark., 1997). ASE sokslet ve ultrasonik ekstraksiyon gibi tekniklerden daha kısa ekstraksiyon zamanı ve daha az çözücü tüketimine sahip bir ekstraksiyon tekniğidir (Okuda, 2005) (Tablo 2.2). Sokslet ekstraksiyonu için kullanılan ekstraksiyon çözücüleri ASE içinde kullanılabilir. Bundan dolayı, ASE klasik ekstraksiyon tekniklerinin yerine geçerek geliştirilmiştir (Boukharta ve ark., 1992).

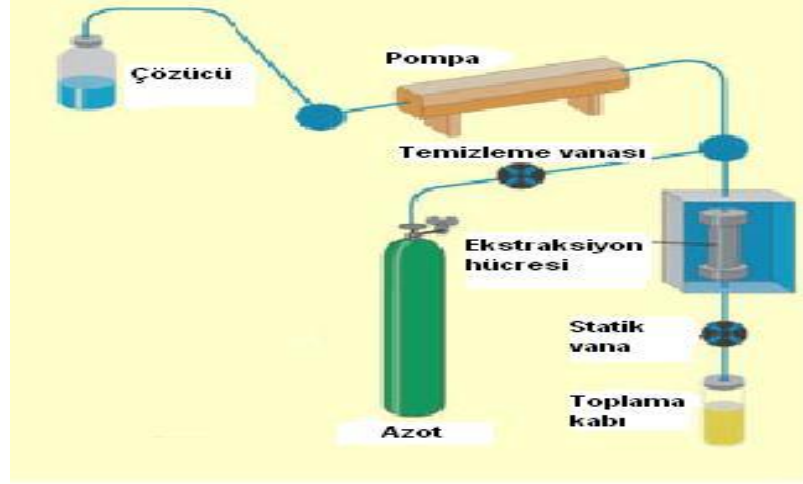
Tablo 2.2. Sıvı ekstraksiyon tekniklerinin kıyaslanması.

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

Son yıllarda, ASE katı atıklar (Tanaka ve ark., 1993), toprak (Mukhtar ve ark., 1986; Rao ve ark., 1991; Mahdavi ve ark., 1995), yosun ve çam ağacı (Bravo, 1998), hayvan yemi, yiyecek matrisleri (Sellapan ve ark., 2002) ve tortu (Garcia del Moral ve ark., 2007) gibi farklı matrislerden organoklor pestisitlere, poliklorlu bifenillere, polisiklik aromatik hidrokarbonlara, poliklorlu dibenzodiyoksinlere ve furanlara, polibromlu bifenil eterlere ekstraksiyon uygulamıştır. Ayrıca, poliklorlu bifeniller ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi çevresel atıkların basınçlı çözücülerle, 100° C' nin üzerinde etkili ve hızlı ekstraksiyon gerçekleştirdiğini rapor edilmiştir (Corthout ve ark., 1991).

Genel olarak; ASE' nin ekstraksiyon verimi, ASE' nin ekstraksiyon parametreleri olan ekstraksiyon basınç ve sıcaklığından etkilenir (Venkat Ratman ve ark., 2006). Ek olarak, örnek matriksi ekstraksiyon verimini etkiler (Mullen ve ark., 2003). Bundan dolayı, ASE' nin ekstraksiyon davranışı sade değildir ve işletme koşullarının optimizasyonu yorucudur. Süper kritik akışkanlı ekstraksiyon, klasik ekstraksiyon tekniklerine alternatif olarak önerilen başka bir ekstraksiyon tekniğidir (Boukharta ve ark., 1992).

Süper kritik akışkanlı ekstraksiyon tarım ilaç kalıntı analizleri için adapte edilmiş bir tekniktir. Tarım ilaçları mikrodalga etkili ekstraksiyondan sonrada analiz edilebilir (Corthout ve ark., 1991).



Şekil 2.4. Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu cihazı şematik gösterimi

Hızlandırılmış Çözücü Ekstraksiyonu (ASE) Cihazının Özellikleri

ASE’ de, çelik bir kap içerisine yerleştirilen (Şekil 2.4) katı ya da yarı-katı örneğin, çözücü ile bir fırın içerisinde 50-200 $^{\circ}\text{C}$ arasında değişen sıcaklıklarda ısıtılması ile başlar ve ısıtma sırasında fırına 500-3000 psi değerleri arasında basınç uygulanır. Ekstraksiyonun 5-10. dakikalarında ortama yeni çözücü pompalanarak örneğin ve kabın yıkanması sağlanmaktadır. Sistem içerisindeki bütün çözücü genellikle nitrojen gazı kullanılarak bir şişe içerisinde toplanmaktadır (Chang ve ark., 1996).



Resim 2.2. Ekstraksiyon hücresi

- 1) Yüksek sıcaklık ve basınç kullanılarak çözücü tüketimi ve ekstraksiyon zamanını azaltır.
- 2) 1-50 g örnek ekstraktı için 15-150 mL çözücü kullanır.

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

4) Kolay kullanılan toplama kapları mevcuttur.

5) Kullanım kolaylığı için uygun çoklu yöntem hafızası vardır.

6) Uygun ön panel işlemi otomatik yöntemi çalıştırır.

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

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



Resim 2.3. Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu cihazı

Tablo 2.3. Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonunda kullanılan genel çözücü hacimleri.

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

ASE ve sokslet ekstraksiyonu arasındaki önemli fark ekstraksiyon sıcaklığıdır (Tablo 2.4). ASE’ de ekstraksiyon sıcaklığı çözücünün normal kaynama noktası üzerinde kullanılır. Aksine, sokslet ekstraksiyonunda ekstraksiyon sıcaklığı kullanılan çözücünün kaynama noktası ile sınırlıdır. Yüksek sıcaklıklarda, polimer partiküllerinin içinden bileşenlerinin difüzyonu yüzeylerinde artırılmıştır. Ayrıca, ekstraksiyon çözücüsü içinde partiküllerin yüzeyden transferi daha hızlı olacaktır. Buna ek olarak, ekstraksiyon sıvısındaki bileşenlerin çözünürlüğü yüksek sıcaklıkta çalışıldığı zaman yükseltilebilecektir. Bundan dolayı yüksek sıcaklıktaki ekstraksiyon değeri anlamlı ölçüde yüksek olacaktır (Gómez-341 Caravaca ve ark., 2008).

Tablo 2.4. Dioksin ve Furan ekstraksiyon koşulları (Çevresel örnekler).

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

2.4. Kromatografi

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

a) Ayrılma mekanizmalarına göre:

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

b) Uygulama biçimine göre

- 1) Düzlemsel kromatografi
 - Kağıt kromatografisi
 - İnce tabaka kromatografisi
- 2) Kolon kromatografisi
 - Gaz kromatografisi
 - Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) (HPLC)

c) Faz tipine göre:

- 1) Sıvı kromatografisi
 - Sıvı-Katı kromatografisi
 - Sıvı-Sıvı kromatografisi

2) Gaz kromatografisi

-Gaz-Katı kromatografisi

-Gaz-Sıvı kromatografisi

2.4.1. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)

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

HPLC günümüzde kimya, biyokimya, biyoteknoloji, farmakoloji, tıp kimyası, bitki kimyası, tarım ve kimya mühendisliğini içeren alanlarda ayırma ve analiz için vazgeçilmez bir araç olarak kabul edilmektedir. Bilhassa, diğer kromatografik tekniklere uygun olmayan bileşiklerin ayrılması ve analizi için uygundur. Çevre sıcaklığında termal olarak kararsız bileşikleri ve yüksek polarlıktaki bileşikleri herhangi bir türevlendirme olmaksızın ayırabilir ve analiz edebilir (Thakur ve ark., 2008).

HPLC'nin avantajları:

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

a) Normal Faz Sıvı Kromatografisi:

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

b) Ters Faz Sıvı Kromatografisi:

Sabit faz apolar, hareketli faz ise polardır. Kolon ve çözücü sistemindeki polar ve apolar sistemin yer değiştirilerek geliştirilmiş olduğu bir sistemdir (Tablo 2.5). Bu sistemde kolon apolar, mobil faz ise metanol, asetonitril ve su gibi polar çözücüler kullanılır. Geliştirilen bu teknikte örnek ve kolon hidrofobik bir etkileşim oluşturur. C18, C8, C4, C2, fenil gibi kolonlar ters faz sıvı kromatografisinde kullanılan kolon çeşitleridir (Jeganathan ve ark., 2008).

Tablo 2.5. Normal-faz ve ters-faz sıvı kromatografisi kolon özellikleri.

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

Ters faz kromatografisinin avantajları:

1. Normal faz kromatografide, sıvı fazın kontrolü çok önemli ve kritiktir. Hareketli faz bileşimindeki küçük değişiklikler kromatogramda belirgin farklılıklara neden olabilir.
2. Dengeye ulaşma normal faz kromatografide çok yavaştır.
3. Normal faz kromatografide polar maddelerin elüsyonu çok yavaştır ve yayvan piklere sebep olur.
4. Apolar çözücüler çok pahalıdır, ayrıca nemden uzak tutmak zordur.

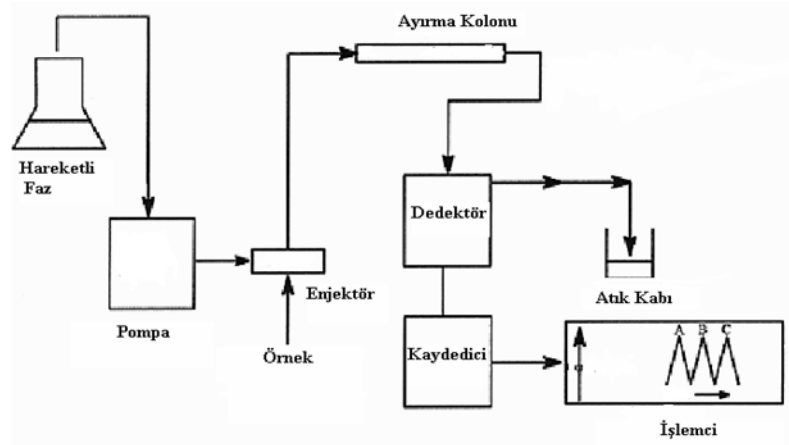
HPLC tekniğinde üç çeşit sistem mevcuttur:

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

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

Yüksek basınçlı dereceli sistem: Bu sistemde iki yada üç pompa ve polariteleri önemli derecede birbirinden farklı iki yada üç hareketli faz vardır. Karışma pompadan sonra meydana gelir (Thakur ve ark., 2008; Khallouki ve ark., 2007; Nara, 1997; Jeganathan ve ark., 2008; Mario do Carmo ve ark., 2010; Berta ve ark., 2010; Zhou ve ark., 2008).

HPLC cihazı çözücü dağıtma bölümü, ayırma kolonu, dedektör ve kaydedici sistem olmak üzere başlıca üç bölümden oluşur (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazının şematik gösterimi

2.4.1.1. Çözücü dağıtma sistemi

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

Pompalama sistemlerinin farklı tipleri şunlardır:

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

Doğrudan gaz basınç pompalarında, yüksek basınçta sıvı akışının sağlanması, genellikle azot veya helyum gazının kullanılmasıyla olur. Gaz basıncı, hareketli fazın yüzeyine doğrudan veya bir diyafram yoluyla uygulanır. Bu sistem sınırlı bir hacme sahiptir, bu yüzden durdurularak tekrar çözücü ile doldurulmalıdır. Avantajı, ucuz ve tek hareketli faz kullanıldığında güvenilir olmasıdır (Sigman ve ark., 1984).

En basit pnömatik (havalı) pompalarda, sıvı hareketli, sıkıştırılmış bir gaz ile basınçlandırılabilen bir kap içine yerleştirilmiş, portatif bir kap içine konur. Bu tip pompalar, pahalı değildir ve pulssuzdur, ancak kapasitesi sınırlı olup, çıkış basıncı düşüktür ve çıkış hızı Pistonlu (sabit akış) pompalar genellikle motor kontrollü bir pistonun ileri ve geri hareketiyle çözücünün pompalandığı küçük bir silindirden meydana gelmiştir. Sırasıyla açılıp kapanan iki tane küresel kontrol musluğu, çözücünün silindir içine giriş ve çıkış akışını kontrol eder. Çözücü piston ile doğrudan temas etmektedir. Bir alternatif olarak, basınç, gidip-gelen pistonla hidrolik olarak kumanda edilen esnek bir diyafram yardımıyla çözücüye iletilebilir. Pistonlu pompaların üstünlüğü; küçük iç hacimleri (35-400 μL), yüksek çıkış basıncı (700 atm' e kadar), dereceli elüsyona uyarlanmaya hazır oluşları ve kolon geri basıncından ve çözücü viskozitesinden büyük ölçüde bağımsız olan sabit akış hızlarıdır. çözücü viskozitesine ve kolon geri basıncına bağlıdır. Ayrıca bunlar, dereceli elüsyona uygun değildir. Ve basınçları 135 atm' den daha düşüktür.

Şırınga tipinde pompalarda, elektriksel olarak hareket eden kurşun vida, verilen çözücü hacmini yeterli basınçta tutan bir pistonu hareket ettirir. Bu pompaların başlıca avantajı, yüksek basınçta (7500 psi'a kadar) serbest pulslu akış sağlama yetenekleridir ve akış hızı, çalışılan basınçtan bağımsızdır (İşyapan, 2011).

2.4.1.2. Kolonlar

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

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

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

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

Analitik kolonun ömrünü artırmak amacıyla, analitik kolondan önce genellikle kısa bir kolon (emniyet kolonu) yerleştirilir. Bu kolonun görevi, sadece partikül haldeki maddeleri ve çözücü içindeki yabancı maddeleri tutmak değil, aynı zamanda numune içinde bulunan ve durgun faza tersinmez olarak bağlanan bileşenleri de tutmaktır. Emniyet kolonundaki dolgu maddesinin bileşimi, analitik kolondakine çok benzer olmalıdır; bununla beraber, basınç düşüşünü en aza indirmek için tanecik boyutu genellikle daha büyüktür (Uzuner, 2008).

2.4.1.3. Dedektörler

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

Bir dedektörde bulunması gereken önemli karakteristikler:

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

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

HPLC dedektörlerinin iki tipine rastlamak mümkündür.

1. Genel dedektörler

2. Seçici dedektörler

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

Dedektörün görevi örnek konsantrasyonu ile orantılı elektriksel bir cevap üretmektir.

Dedektör seçimi örneğin kimyasal yapısına ve metodun gereksinimlerine göre değişir. Örnek bileşenleri kromofor (UV veya görünür alandaki ışığı absorplayan fonksiyonel gruplar) gruplar içeriyorsa ilk tercih doğal olarak UV-VIS dedektör olacaktır. Bununla birlikte bir veya daha fazla bileşen UV-VIS ışığı absorplamıyorsa alternatif dedektörler de düşünülmelidir (Uzuner, 2008; Lee, 1992; Chung ve ark., 1998; İşyapan, 2011).

UV-VIS dedektör, kolondan ayrılarak dedektöre ulaşan bileşenlerin ultraviyole bölgede yaptığı absorbansın ölçümüne dayanır. Tek bir dalga boyunda çalışan

dedektörler kullanılabildiği gibi bir monokromatör ile çeşitli dalga boylarını seçerek çalışan dedektörler de vardır. Tek dalgaboyunda çalışan dedektörlerde ışık kaynağı olarak genellikle 254 nm’ de ışıma yapan Hg (civa) lambası, çeşitli dalga boylarını ölçebilen dedektörlerde ise döteryum lambası kullanılır.

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

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

Gözlenebilme sınırı 10-11- 10-12 g.mL-1 değerine ulaşılan elektrokimyasal dedektörler, elektroliz sonucu akım ölçülmesi ilkesine göre çalışır. Burada ölçülen akım, örnek maddesinin elektrolizi sonucu oluştuğundan kullanılan çözücünün elektrik akımı vermemesi gerekir. Elektrokimyasal redoks tepkimelerine cevap veren ve polarografi ilkesine dayanan HPLC dedektörü de yaygın olarak kullanılır.

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

Tüm bileşenleri ölçebilen, yani seçimli olmayan kırılma indisi dedektörü ile yapılan ölçümlerde, kırılma indisi sıcaklıkla değiştiğinden, çok iyi bir sıcaklık

kontrolü yapılmalıdır. Çok yönlülüğü mükemmeldir, fakat duyarlılığı vasat olduğundan eser analizler için ideal değildir. Bunların dışında amperometrik dedektör, elektrik iletken dedektör, kütle spektrometrisi dedektörü ve daha az kullanılmakla birlikte iyon seçimli elektrotlarla yapılan potansiyometrik, fotoakustik, indüktif eşleşmiş plazma ve atomik absorpsiyon ölçümlerine dayanan dedektörler de vardır (Khallouki ve ark., 2007).

2.5. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

2.5.1. Aritmetik ortalama

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

2.5.2. Standart sapma

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

2.5.3. % Bağıl standart sapma

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

2.5.4. Geri kazanım

$$\% \text{ Geri kazanım} : (m_2/m_1) \times 100$$

m1: Ekstrakte edilecek katı madde miktarı

m2: Ekstraksiyon sonucunda elde edilen katı madde miktarı

2.6. Yöntem Doğrulaması (Validasyon)

Analitik yöntem doğrulaması, yöntemin amaçlanan analitik uygulamanın tüm gereklerini karşıladığının, laboratuvar çalışmaları ile kanıtlanması işlemidir.

Doğrulamanın yapılması gereken durumlar:

- Tanınma testleri
- Safsızlıkların miktar tayini
- Safsızlıkların limit testleri
- Bitmiş üründe etken maddenin (ya da seçilen başka bir maddenin) kantitatif analizi

Analitik Yöntem Parametreleri:

- a) Özgünlük (Specifity)
 - b) Doğrusallık (Linearity)
 - c) Konsantrasyon aralığı (Range)
 - d) Doğruluk (Accuracy)
 - e) Kesinlik (Precision)
- Gün içinde tekrarlanabilirlik (Repeatability)
 - Günler arası tekrarlanabilirlik (Intermediate Precision)
 - Labaratuvarlar arası tekrarlanabilirlik (Reproducibility)
- f) Dedeksiyon limiti (Dedektion Limit –LOD)
 - g) Kantitatif tayin limiti (Quantitation Limit-LOQ)
 - h) Sağlamlık (Robustness)
 - j) Sistemin uygunluk testi (System Suitability Testing)

2.6.1. Özgünlük

Validasyonun en önemli parametresidir, metod geliştirilirken ilk yapılması gereken testtir. İki şekilde gerçekleştirilir:

- a) Safsızlıklar ve bozunma ürünleri gibi girişim yapabilecek maddelerin standartları mevcutsa geliştirilen yöntemde bu maddelerin etken maddeden uygun bir ayrılma gücü değerleriyle ayrıldığı ispat edilmelidir.

b) Girişim yapan maddelerin standartları sağlanamıyorsa, örnek ısı ışık, nem, asit, baz, oksidasyon gibi stres şartlarına maruz bırakılıp sonuçlar referans maddeyle karşılaştırılır.

2.6.2. Doğrusallık

Bu test, standart stok çözeltisinin seyreltilmesiyle ve/veya ayrı tartımlar alınarak gerçekleştirilir. Dedektör cevabına karşılık konsantrasyon grafiği çizilir (kalibrasyon eğrisi). Eğrinin doğrusallığı en küçük kareler yöntemi ile değerlendirilir. Doğrunun eğimi, kayım değeri, korelasyon katsayısı doğrusallığı belirler.

2.6.3. Konsantrasyon aralığı

Yöntemin doğruluk, kesinlik, doğrusallık, testlerini geçtiği konsantrasyon aralığıdır ve doğrusallık çalışmalarından metodun sınırları belirlenir. İncelenen konsantrasyon aralığı yöntemin kullanımına göre değişir.

2.6.4. Doğruluk

Bir yöntemin doğruluğu, ölçülen miktarın gerçek değere yakınlığı olarak tanımlanır. Genellikle geri kazanım çalışması yapılmakla beraber, bu test üç yöntemle gerçekleştirilir:

a) Standart ile karşılaştırma: Analiz edilecek madde karışık bir matriks içinde değilse bu yöntemden yararlanılır. Saf standart madde sağlayan kuruluşlardan analiz maddesinin standardı satın alınır. Farklı tartımla hazırlanmış en az 3 farklı konsantrasyondaki çözeltilerden 3 defa ölçüm yapılır, çıkan sonuçlar başka bir yöntemle elde edilen sonuçlarla kıyaslanır ve rapor edilir.

b) Geri kazanım: Analiz edilecek madde karışık bir matriks içinde ise bu yöntemden yararlanılır. Placebo hazırlanır ve etken maddesinin % 50, 75, 100, 125, 150 ‘ sini içeren konsantrasyonlarda çözelti hazırlanır ve geri kazanım hesaplanır.

c) Standart katma yöntemi: Analiz edilecek madde karışık bir matriks içinde ise ve matriks hazırlamak imkansız ya da çok zorsa bu yöntem tercih edilir.

Sonuçlar % olarak veya belirli bir güven aralığında bulunan değer in gerçek değerden farkı şeklinde ifade edilir (İşyapan, 2011).

2.6.5. Kesinlik

Üçe ayrılır:

- a) Gün içi tekrarlanabilirlik: Metodun kısa bir zaman içerisinde aynı uygulama koşullarındaki kesinliğidir. %100 konsantrasyonda hazırlanan tek bir örneğin en az 10 defa enjeksiyonu yapılır veya yöntemin sınırları içerisinde alınan 3 konsantrasyondan 3'er enjeksiyon yapılır. Pik alanı veya pik yüksekliği değerlerinin bağıl standart sapması hesaplanır.
- b) Günler arası tekrarlanabilirlik: Yöntemin farklı analizciyle, farklı cihazda, farklı günlerde uygulanmasıdır.
- c) Laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik: Farklı laboratuvarlarda yöntemin uygulanmasıdır. Pik alanı veya pik yüksekliği değerlerinin standart sapması ve bağıl standart sapması hesaplanır.

2.6.6. Dedeksiyon limiti

Dedeksiyon limitinin hesaplanmasında yöntemin enstrümantal olup olmadığına göre birkaç yaklaşım vardır:

- a) Görsel değerlendirmeye dayanan yöntem: Genellikle enstrümantal olmayan miktar tayini yönteminde kullanılır. Örneğin bilinen konsantrasyonları hazırlanır ve güvenilir bir şekilde ölçülebileceği minimum konsantrasyon bulunur.
- b) Sinyal/Gürültü oranına dayanan yöntem: Düşük konsantrasyonda hazırlanan örnek çözeltisiyle elde edilen sinyalin baseline gürültüsüne oranı 3:1 olmalıdır.
- c) Kalibrasyon eğrisinden yararlanarak istatistiksel hesaplamalara dayanan yöntem.

2.6.7. Kantitatif tayin limiti

Kantitatif tayin limitinin hesaplanmasında yöntemin enstrümantal olup olmadığına göre birkaç yaklaşım vardır:

- a) Görsel değerlendirmeye dayanan yöntem: Genellikle enstrümantal olmayan miktar tayini yönteminde kullanılır. Örneğin bilinen konsantrasyonları hazırlanır ve doğru ve kesin olarak tayin edilebildiği minimum konsantrasyon hesaplanır.

b) Sinyal/Gürültü oranına dayanan yöntem: Düşük konsantrasyonda hazırlanan örnek çözeltisiyle elde edilen sinyalin baseline gürültüsüne oranı 10:1 olmalıdır.

c) Kalibrasyon eğrisinden yararlanarak istatistiksel hesaplamalara dayanan yöntem

2.6.8. Sağlamlık

Yöntem parametreleri üzerinde kasıtlı olarak değişiklik yapıldığında, sonuçların ne kadar etkilendiğinin saptanması amacıyla yapılan testtir. Sıvı kromatografi yönteminde aşağıdaki değişiklikler yapılabilir:

- Hareketli fazın pH'sı
- Hareketli faz bileşeni
- Farklı kolon (farklı lot numaralı veya farklı firmadan)
- Sıcaklık

2.6.9. Sistem uygunluk testleri

Bu testler, analiz edilecek örneğe, analitik uygulamaya, kullanılan cihaza bağlı olarak geliştirilen testlerdir. HPLC yönteminde USP 26'ya göre uygulanması gereken sistem uygunluk parametreleri kapasite faktörü (k'), kolon ayırma gücü (R), pik kuyruklanma faktörü (T), RSD tekrarlanan enjeksiyonların bağlı standart sapmasıdır. k' 1-5 arasında (18), $R > 2$ (19), $T = 1$ (20) $RSD \leq 2$ (20) olmalıdır (İşyapan, 2011; Özgül, 2011).

3. TEZ ÇALIŞMALARI

3.1. Gereç Ve Yöntem

3.1.1. Kimyasal maddeler

<u>Kimyasalın adı</u>	<u>Firma:</u>
Ellajik asit ≥ 95 % powder, from tree bark	Sigma
Gallik asit ≥ 95 %	Sigma
Metanol (Gradient Grade)	Merck
Asetonitril (Gradient Grade)	Merck
KH_2PO_4	Merck
NH_4HPO_4	Merck
CF_3COOH	Sigma
o-Fosforik asit	Sigma

Kestane meyve kabuğu örnekleri Kafkas Pasta Şekerleme San. Tic. A.Ş.'den temin edilmiştir.

3.1.2. Cihaz ve analitik koşullar

- 1) DIONEX ASE 100 (Hızlandırılmış Çözücü Ekstraktörü)
- 2) Memmert UM 400 etüv
- 3) Millipore Milli Q RG deiyonize su cihazı
- 4) Adam d = 0,0001 g dijital terazi
- 5) Heidolph VV 2000 döner vakumlu evaporatör
- 6) Falc instruments manyetik karıştırıcı
- 7) Retsch elek
- 8) Simens kahve öğütücüsü
- 9) Heidolph WB 2000 su banyosu
- 10) Nuavre -85 °C ultralow freezer
- 11) Block heater

HPLC Donanımı:

- 1) Agilent 1100 seri HPLC sistemi (Hewlett-Packard, Germany)
- 2) G1311 Quat model pompa
- 3) G1322 Degasser vakum
- 4) G1329B model ALS SL otosampler
- 5) G1316A COLCOM kolon ısıtıcı
- 6) G1315A model DAD detektör
- 7) Synergi 4µm, Hydro-RP 80A, 150mm×4,6 mm kolon

HPLC koşulları:

Kolon	: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm
Hareketli Faz A	: KH ₂ PO ₄ (0,05 M; pH: 2,5)
Hareketli Faz B	: ACN HPLC grade
Kullanılan elüsyon sistemi	: Hareketli Faz A %82 – Hareketli Faz B %18
Dedektör	: DAD UV λ=254 nm
Akış Hızı	: 1,000 mL/dakika
Kolon Sıcaklığı	: 25 °C
Enjeksiyon Hacmi	: 20 µL
Dalga Boyu	: 254 nm

3.1.3. Çözeltiler**Stok Çözeltilerin Hazırlanması:**

Stok Ellajik Asit Çözeltisi: 20 mg Ellajik asit tartılır. Metanol ile 100 mL'ye tamamlanır. Stok çözeltisinin konsantrasyonu $6,62 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ dir.

Stok Gallik Asit Çözeltisi: 10 mg Gallik asit tartılır. Metanol ile 50 mL'ye tamamlanır stok çözeltisinin konsantrasyonu $1,18 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹ dir.

HPLC Hareketli Faz Çözeltilerin Hazırlanması:

Hareketli Faz A'nın Hazırlanışı: 0,6805 g $\pm$ 0,0005 g KH₂PO₄ tartıldı. 1000 mL ultra distile saf suda çözüldü. Fosforik asitle pH: 2,5'e ayarlandı.

Hareketli Faz B: %100 ACN

3.1.4. Örnek hazırlama

Kestane meyve kabukları oda sıcaklığında kurutuldu. Kahve öğütücüsünden dört kez geçirildi. El ile olabildiğince tüylü kısım ve toz kısım birbirinden ayrıldı. Ayrılan tüylü kısım kaba bir elekten geçirildi. Daha sonra tüylü kısım titreme hızı 80 devir/s olan toplama kabında 10 dak. işleme tabi tutuldu. Böylece tüylü kısım iyice tozundan arındırıldı. Elde edilen tozlu kısım ve tüylü kısım olabildiğince homojen yapabilmek için tekrar ayrı ayrı öğütücüden geçirilip aşağıdaki işlemler uygulandı.

- Tüylü kısım 10 mesh (2,0 mm) elekten, 70 devir/s titreme hızı ile 10 dak. Elendi (Resim 3.1).
- İnce kısım 75 mesh (0,710 mm) elekten 40 devir/s titreme hızı ile 10 dak. Elendi (Resim 3.2).

	<u>İnce kısım</u>	<u>Tüylü kısım</u>
1.Tartım	59,3015 gr	130,0816 gr
2.Tartım	59,2798 gr	130,0115 gr
3.Tartım	59,2750 gr	130,0100 gr

Tüylü ve ince kısım tartılıp 1 saat 60 °C de, etüvde bekletildi. Vakumlu desikatörde soğutulup tekrar tartım alındı ve yeniden etüvde 1 saat 60 °C de bekletildi. Sabit tartıma gelene kadar bu işlemler tekrar edildi.



Resim 3.1. Kestane meyve kabuğu
Tüylü kısım.



Resim 3. 2. Kestane meyve kabuğu
İnce kısım.

3.1.5. Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu (ASE) ile yapılan çalışmalar

Kestane meyve kabuğu (KMK) örneğinden aynı koşullarda 3 tartım alınarak paralel çalışma yapıldı. Bölüm III. 1. 4. deki işlem sonucunda elde edilen toz ve tüylü kısım ayrı ayrı filtre kağıdında $0,5000 \text{ g} \pm 0,5 \text{ mg}$ tartıldı. Toz ve tüylü kısımlar üzerine ayrı ayrı $0,5000 \text{ g} \pm 0,5 \text{ mg}$ diatome toprak ilave edildi. Her iki örnek homojen şekilde karıştırıldı. Filtre kağıtları üst üste konularak katlandı. Ekstraksiyon hücresine yerleştirildi. %100 'lük metanol çözücüsü ile ekstraksiyon gerçekleştirildi (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu (ASE) çalışma koşulları

Sıcaklık	100 °C
Statik Zaman	10 dak
Temizleme Hacmi	% 60
Yıkama Zamanı	90 s
Statik Devir	3

3.1.6. Kromatografik Koşullar

Stok KMK örnek çözeltisi ekstraktları, evaporatörde 60 °C de kuruluğa kadar uçuruldu. Kalıntılar 10 mL metanolde çözündürüldü. 0,45 µm membran filtreden süzüldü.

Tablo 3.2. İzokrotik elüsyon sistemi

Zaman (dak.)	% B	% A
0,00	18,0	82,0
20,00	18,0	82,0

3.2. Bulgular

3.2.1. HPLC yöntemi için ön denemeler

3.2.1.1. HPLC yöntem 1

Standart EA Çözeltisinin Hazırlanması: 20 mg ellajik asit (EA) standardı tartıldı. Saf metanol ile 100 mL'ye tamamlanarak EA stok standart çözeltisi hazırlandı. Seyreltme işlemi mobil faz ile yapıldığında piklerde yayılma ortaya çıkmıştır. Bu nedenle seyreltme işleminde Asetonitril yerine Metanol kullanıldı. Stok standart çözeltisinden 0,36 µL alınıp üzeri 10 mL'ye MeOH - Mobil FazA (50/50, v/v) ile tamamlanarak seyretme yapıldı.

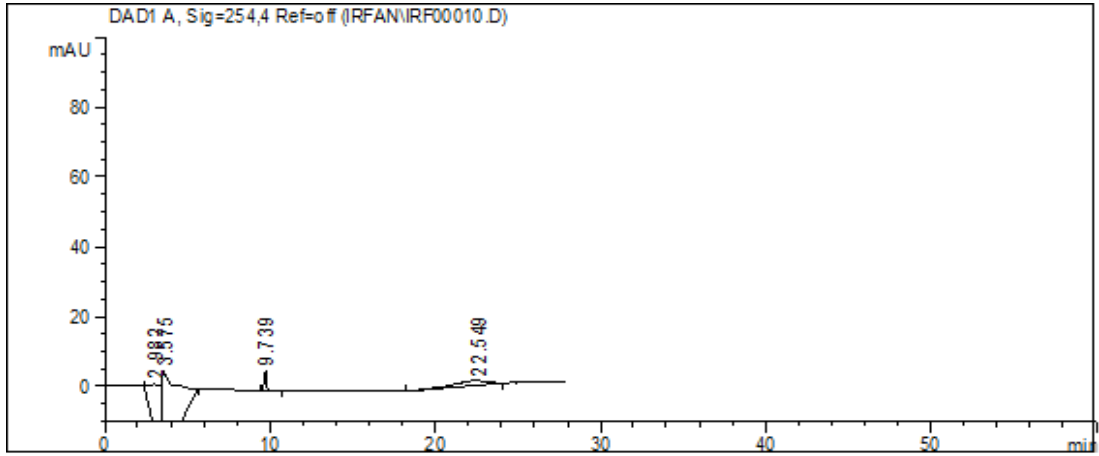
Kestane Meyve Kabuğu Örneğinin Hazırlanması: Kestane meyve kabuğu (KMK) örneğinden aynı koşullarda 3 tartım alınarak paralel çalışma yapıldı. Bölüm 3.1.5 deki işlemler sonucunda elde edilen ekstraktlar, evaporatörde 60 °C de kuruluğa kadar uçuruldu. Kalıntılar 10 mL metanolde çözündü. 0,45 µm membran filtreden süzüldü. Hazırlanan stok KMK çözeltisinden 1 mL alınıp üzeri 10 mL'ye MeOH - Mobil FazA (50/50, v/v) ile tamamlanarak seyretme yapıldı.

Vekiari SA ve ark. (Vekiari ve ark., 2008) uyguladıkları dereceli elüsyon sisteminde değişiklikler yapılarak (Tablo 3.3) kromatogramlar alındı. Şekil 3.1'de standart EA çözeltisinin kromatogramı verilmiştir. Bu çalışmanın kromatografik koşulları aşağıdaki gibidir.

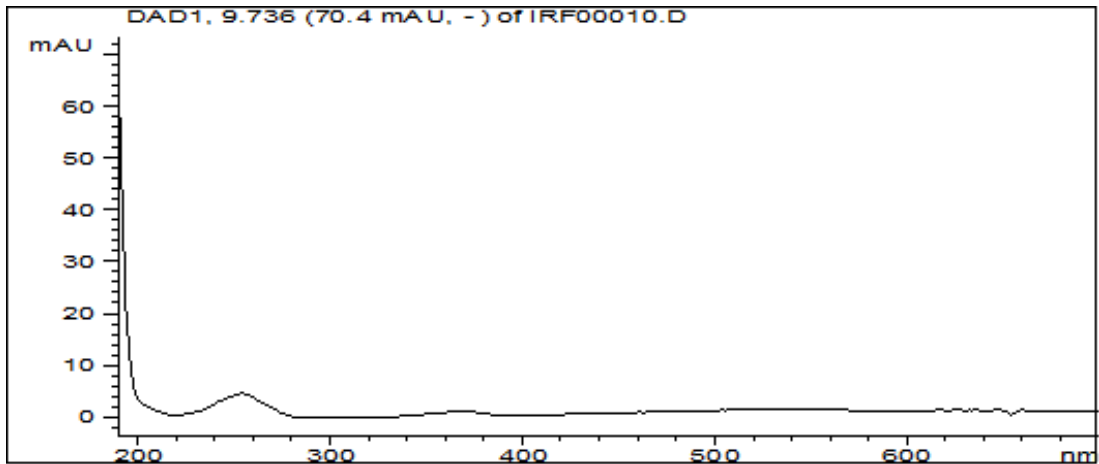
Kolon	: Waters 5µm 250 mm . 4,6 mm
Mobil faz A	: KH ₂ PO ₄ 0,025 M pH=3
Mobil faz B	: ACN
Stop Time	: 28,0 dak
Basınç	: 135 bar
Sıcaklık	: 24.0 °C
R _t	: 9,729 dak

Tablo 3.3. Dereceli Elüsyon Sistemi 1

Zaman (dak)	% B	Akış Hızı (mL/dak)	Mak. Basınç
0	7	1,00	241
8	40	1,00	241
13	50	1,00	241
18	7	1,00	241



Şekil 3.1. Standart EA çözeltisinin kromatogramı. Kolon: Water 5 μ C18(2) 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH₂PO₄ (0,025 M pH=3); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; λ =254 nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 μ L; R_t: 9,729 dak.



Şekil 3.2. Standart EA çözeltisinin HPLC-DAD dedektörle alınan UV spektrumu. Şekil 3.1' de verilen kromatografik koşullar uygulanmıştır.

Bu sistemde; EA piki 9,739 dak alıkonma zamanı ile gelmiştir ve daha polar özellikteki ellajitanenlerin pikleri gözlenememiştir. Ayrıca, EA pikinde ön kuyruklanma görülmüştür. Bu nedenle kolon değiştirilmesine karar verilmiştir.

3.2.1.2. HPLC yöntem 2

HPLC yöntem 1' de kullanılan Waters 5µm, 250 mm . 4,6 mm kolon artık kullanılmayacaktır. Bu ve bundan sonraki bütün çalışmalarda İnertsil ODS V3 5µm, 250 mm . 4,6 mm kolon kullanılmıştır.

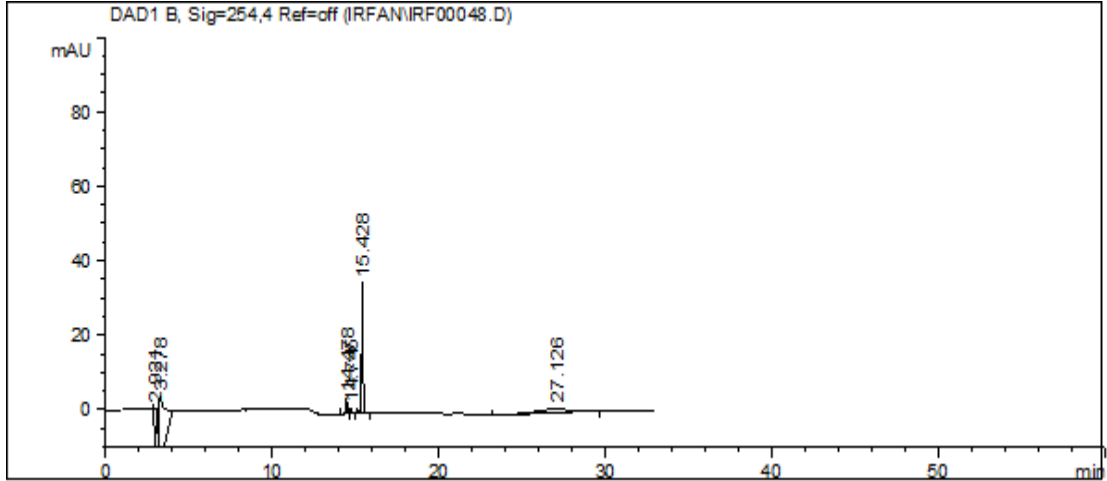
Standart EA çözeltisinin ve kestane meyve kabuğu örneğinin hazırlanması işlemleri HPLC yöntem 1' de anlatıldığı gibi yapılmıştır.

HPLC yöntem 1'de kullanılan Vekiarı SA ve ark. geliştirdikleri Özgül L. (b) tarafından modifiye edilen dereceli elüsyon sistemi kullanılarak (Tablo 3.4) kromotogramlar alındı. Bu çalışmanın kromatografik koşulları aşağıdaki gibidir.

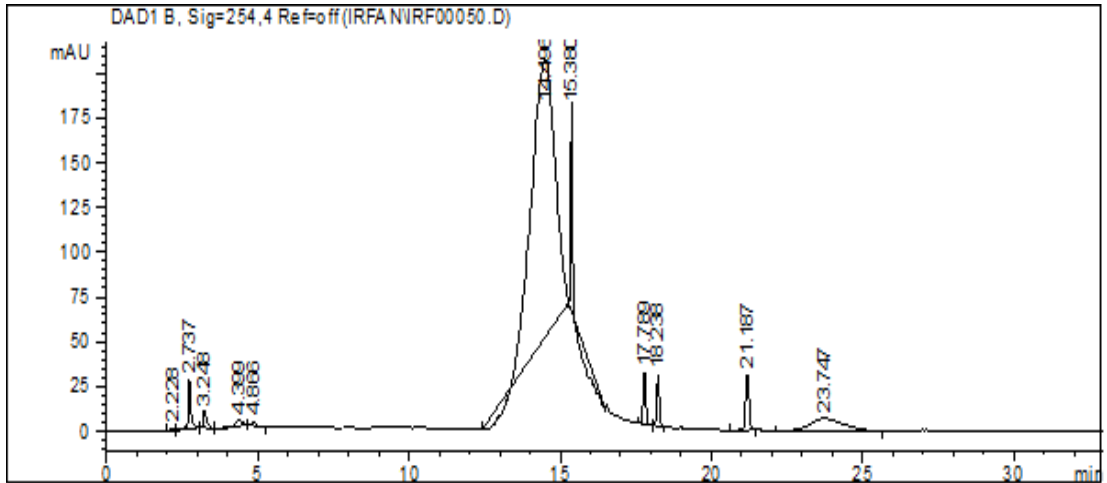
Kolon	: İnertsil ODS V3 5µm, 250 mm . 4,6 mm
Mobil faz A	: KH ₂ PO ₄ (5 mM pH=2.5)
Mobil faz B	: ACN
Basınç	: 135 bar
Sıcaklık	: 25.0 °C
Stop Time	: 35,0 dak
Rt	: 15,428 dak

Tablo 3.4. Dereceli Elüsyon Sistemi 2

Zaman (dak)	% B	Akış Hızı (mL/dak)	Mak. Basınç
0	7	1,00	241
8	7	1,00	241
15	40	1,00	241
20	7	1,00	241



Şekil 3.3. Standart EA çözeltisinin kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH_2PO_4 (0,005 M pH=2,5); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; $\lambda=254$ nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µL; Rt: 15,428 dak.



Şekil 3.4. Kestane meyve kabuğu çözeltisinin kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH_2PO_4 (0,005 M pH=2,5); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; $\lambda=254$ nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µL; Rt: 15,380 dak.

Çalışılan bu HPLC yönteminde, standart EA çözeltisinin enjeksiyonu ile elde edilen kromatogramdan, EA pikinin simetrik olduğu gözlemlendi. HPLC Yöntem 1’ deki gibi hazırlanan KMK örneği enjekte edildi. Yapılan karşılaştırma sonucunda EA piklerinin alıkonma zamanlarının eşit olduğu belirlendi. Ancak KMK örneğinde EA

piki, kendinden bir önceki pikten iyi ayrılmadığı için yeni yöntem denenmesine karar verilmiştir.

3.2.1.3. HPLC yöntem 3

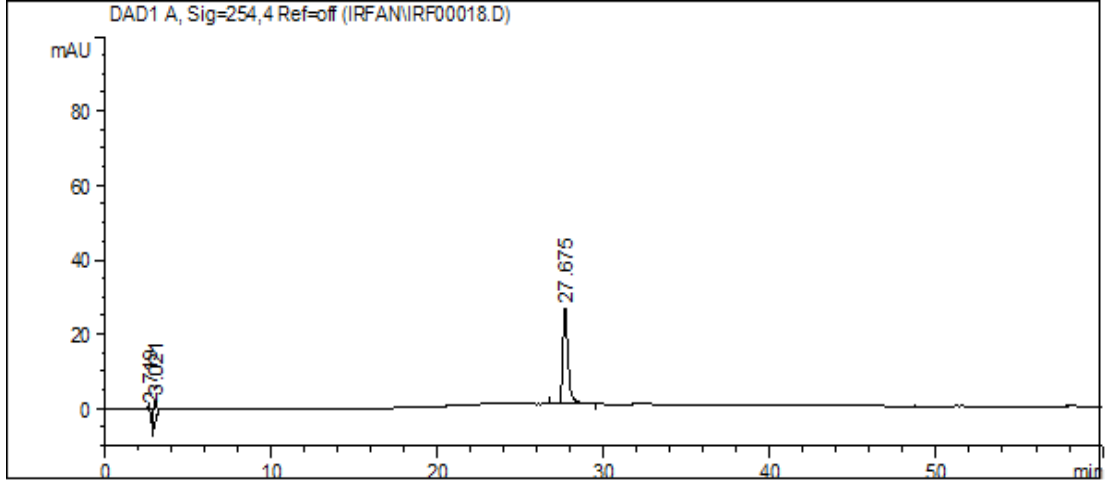
Standart EA çözeltisinin ve kestane meyve kabuğu örneğinin hazırlanması işlemleri HPLC yöntem 1' de anlatıldığı gibi yapılmıştır.

Danial ME ve ark. geliştirdikleri dereceli elüsyon sistemi (Tablo 3.5) uygulanarak Standart EA çözeltisinin (Şekil 3.5) ve Kestane meyve kabuğu çözeltisinin (Şekil 3.6) kromatogramları alındı. Yapılan bu çalışmanın kromatografik koşulları şunlardır.

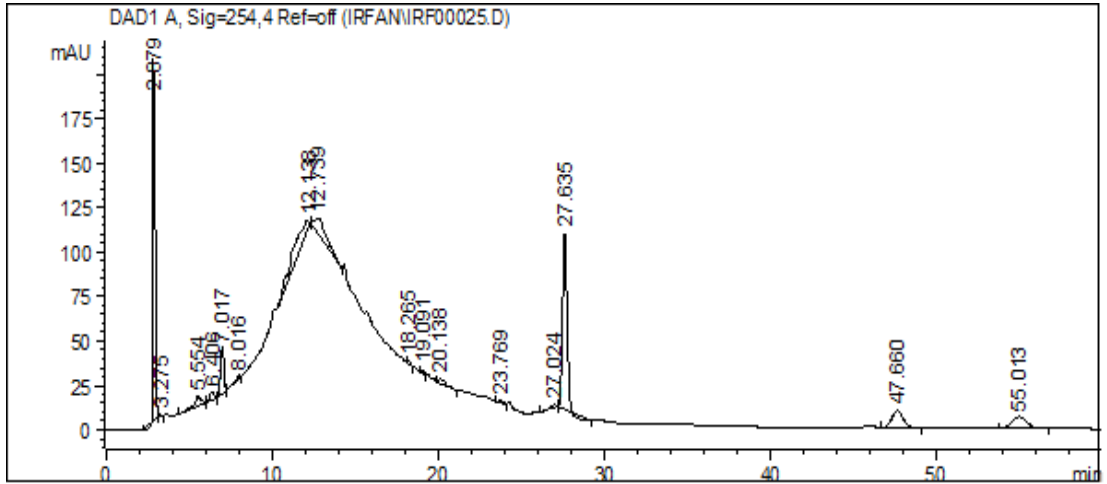
Kolon	: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm
Mobil faz A	: %50 (0,03 M NH ₄ H ₂ PO ₄ pH=3.0) + %50 Metanol
Mobil faz B	: 0,03 M NH ₄ H ₂ PO ₄ pH=3.0
Basınç	: 141 bar
Sıcaklık	: 40.0 °C
Stop Time	: 60,0 dak
Rt	: 27,675 dak

Tablo 3.5. Dereceli Elüsyon Sistemi 3

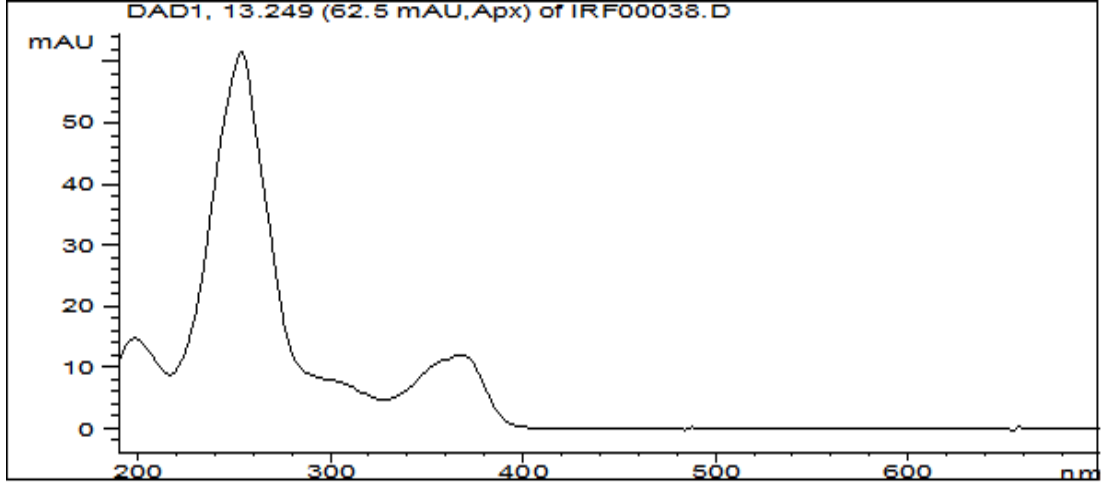
Zaman (dak)	% A	Akış Hızı (mL/dak)	Mak. Basınç
0	30	1,00	241
20	100	1,00	241
40	100	1,00	241
60	30	1,00	241



Şekil 3.5. Standart EA çözeltisinin kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: %50 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (0,03 M pH=3.0) + %50 Metanol; hareketli faz B: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (0,03 M pH=3.0) ; dedektör: DAD; $\lambda=254$ nm; akış hızı: 1,000 ml/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µl; Rt: 27,675 dak.



Şekil 3.6. Kestane meyve kabuğu çözeltisinin kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: %50 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (0,03 M pH=3.0) + %50 Metanol; hareketli faz B: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (0,03 M pH=3.0) ; dedektör: DAD; $\lambda=254$ nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µL; Rt: 27,635 dak.



Şekil 3.7. Standart EA çözeltisinin HPLC-DAD dedektörle alınan UV spektrumu. Şekil 3.5’de verilen kromatografik koşullar uygulanmıştır.

Çalışılan bu HPLC yönteminde standart EA piki simetrik ve spektrumu literatürdeki EA spektrumu ile aynıdır. Ayrıca ilk kez olası ellajitanen pikleri gözlenmiştir. Buna karşın; R_t :27,635 dak ile analiz süresinin uzun olması ve EA den erken gelen, olası Ellajitanen piklerinin ayrılmaması nedeniyle yöntem terkedilmiştir.

3.2.1.4. HPLC yöntem 4

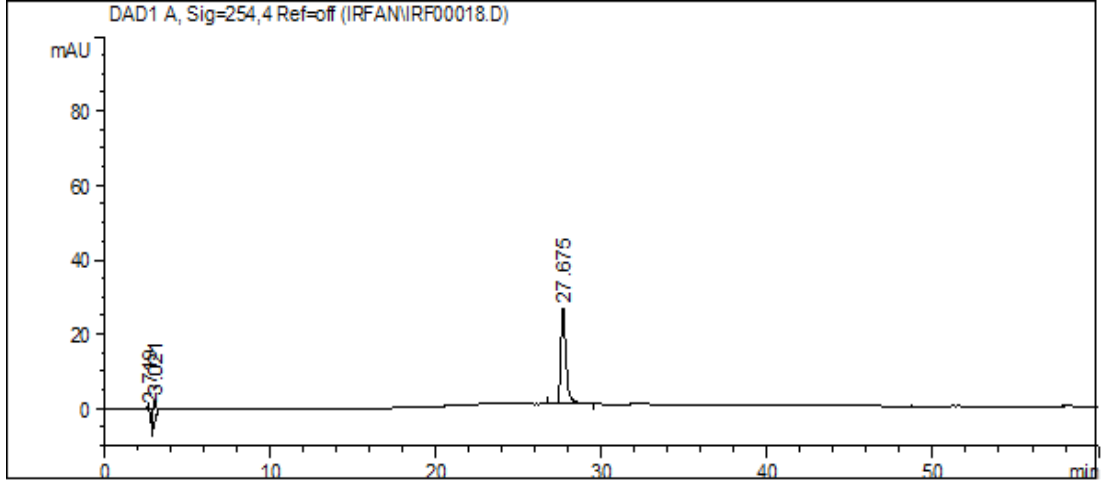
Standart EA çözeltisinin ve kestane meyve kabuğu örneğinin hazırlanması işlemleri HPLC yöntem 1’ de anlatıldığı gibi yapılmıştır.

Amakura Y. ve arkadaşlarının geliştirdikleri izokrotik elüsyon sistemi uygulanarak Standart EA çözeltisinin (Şekil 3.8) ve Kestane meyva kabuğu çözeltisinin (Şekil 3.9) kromatogramları alınmıştır. Yapılan bu çalışmanın kromatografik koşulları şunlardır.

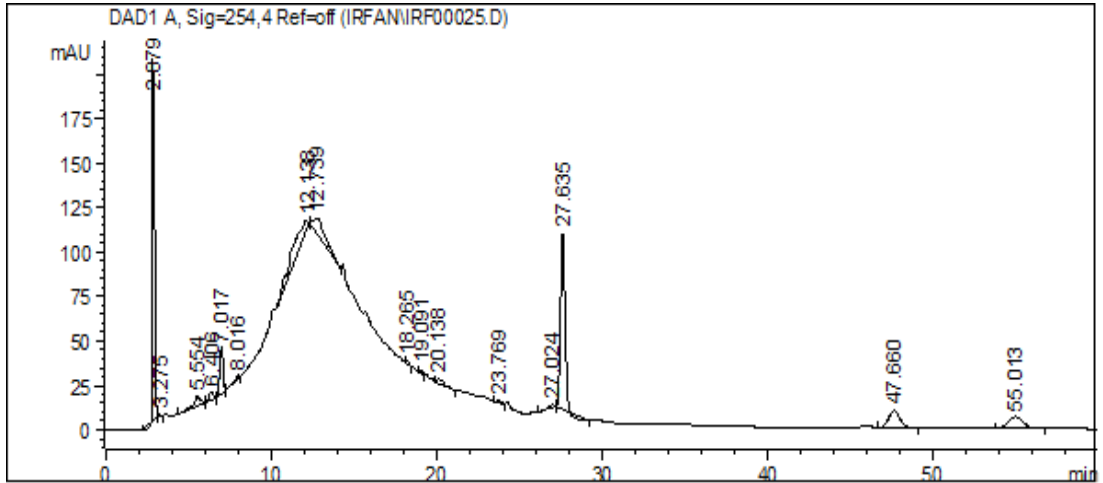
Kolan	: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm
Mobil faz A	: KH_2PO_4 (0,005 M pH=2.5)
Mobil faz B	: % 100 ACN
İzokrotik sistem	: % 82 A -% 18 B
Basınç	: 135 bar
Sıcaklık	: 40.0 °C

Stop Time : 20,0 dak.

Rt : 7,61 dak.



Şekil 3.8. Standart EA çözeltisinin kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH_2PO_4 (0,005 M pH=2.5); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; $\lambda=254$ nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µL; Rt: 7,67 dak.



Şekil 3.9. Kestane meyve kabuğu çözeltisinin kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH_2PO_4 (0,005 M pH=2.5); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; $\lambda=254$ nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µL; Rt: 7,61 dak

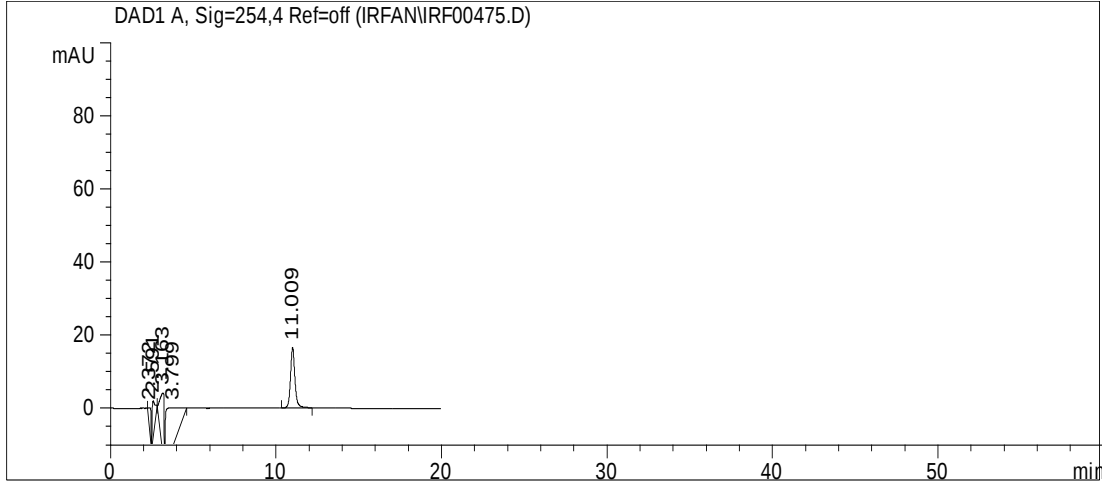
Çalışılan bu izokrotik elüsyon sisteminde EA pikinden önce gelen piklerdeki genişleme ortadan kalkmıştır. Ancak EA piki ile ilgili birbaseline sorunu gözlenmiştir. R_t :7,300 olan alıkonma zamanının uzatılması için daha düşük sıcaklıkla çalışılmasına karar verilmiştir.

3.2.1.5. HPLC yöntem 5

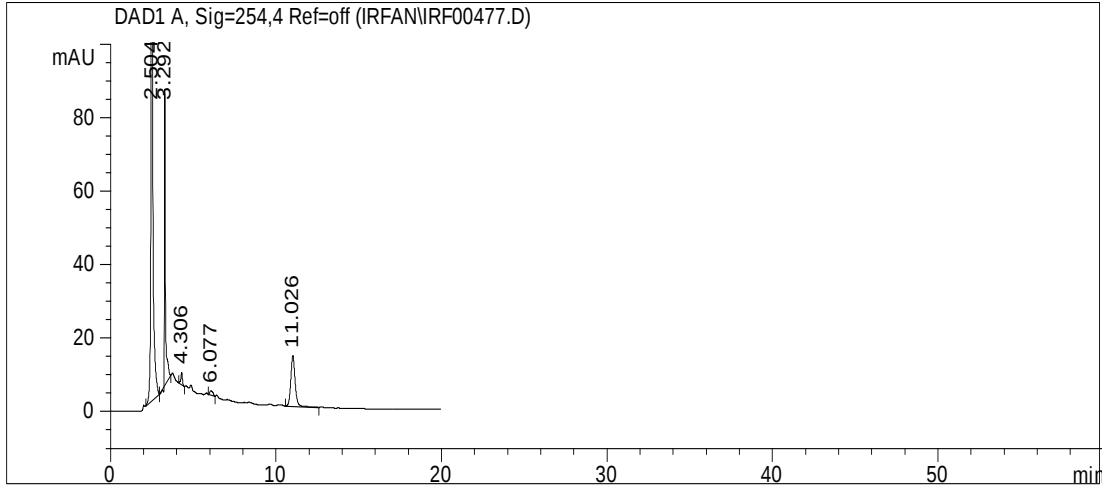
Standart EA çözeltisinin ve kestane meyve kabuğu örneğinin hazırlanması işlemleri HPLC yöntem 1' de anlatıldığı gibi yapılmıştır.

Amakura Y. ve ark geliştirdikleri izokrotik elüsyon sistemi, sıcaklık parametresi değiştirilerek modifiye edildi. Standart EA çözeltisinin (Şekil 3.10) ve Kestane meyve kabuğu çözeltisinin (Şekil 3.11) kromatogramları alındı. Yapılan bu çalışmanın kromatografik koşulları şunlardır.

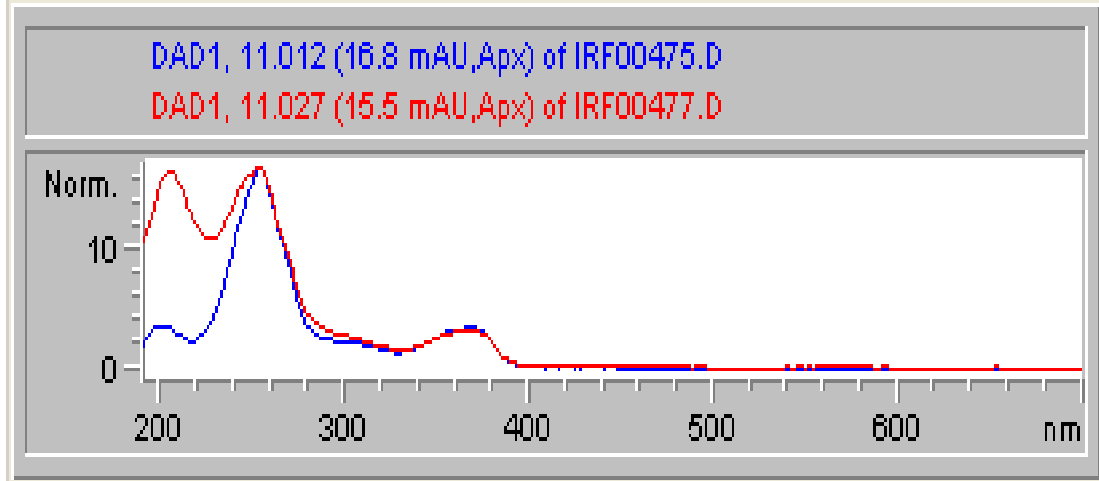
Kolan	: İnertsil ODS V3 5 μ m 250 mm . 4,6 mm
Mobil faz A	: KH_2PO_4 (0,005 M pH=2.5)
Mobil faz B	: %ACN
İzokrotik sistem	: % 82 A -% 18 B
Basınç	: 135 bar
Sıcaklık	: 24,0°C
Stop Time	: 20,0 dak.
R_t	: 11,009 dak.



Şekil 3.10. Standart EA çözeltisinin kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH_2PO_4 (0,005 M pH=2.5); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; $\lambda=254$ nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µL; Rt: 11,009 dak.



Şekil 3.11. Kestane meyve kabuğu çözeltisinin kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH_2PO_4 (0,005 M pH=2.5); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; $\lambda=254$ nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µL; Rt: 11,026 dak.



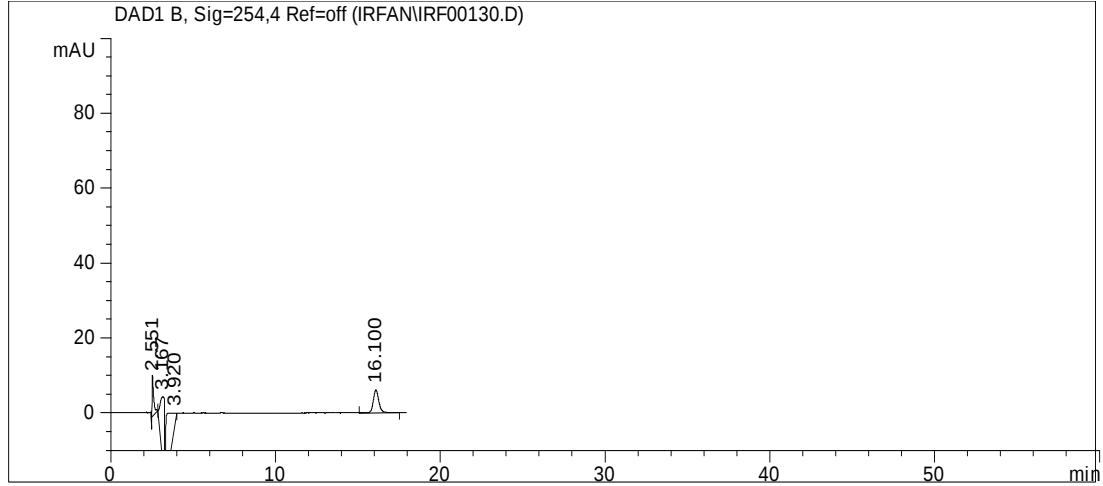
Şekil 3.12. Standart EA çözeltisinin ve KMK çözeltisinin HPLC-DAD dedektörle alınan çakışık UV spektrumu. Şekil. III. 10’de verilen kromatografik koşullar uygulanmıştır.

Modifiye edilerek çalışılan bu izokrotik elüsyon sisteminde EA pikinin alıkonma zamanı öngörüldüğü gibi 3.10 dak daha uzatılmıştır. Standart EA piki simetriktir. KMK örneğindeki EA piki, kendinden önce gelen piklerden ayrılmıştır.(Şekil 3.12). EA pikinden önce gelen piklerde, önceki yöntemlerde var olan genişleme ortadan kalkmış ve birbirinden etkin bir şekilde ayrılmış iki pik gözlenmiştir. Dolayısıyla sıcaklık parametresinin değiştirilmesi ile modifiye edilen bu kromatografik sistemin, çalışmamız için uygun bir yöntem olduğuna karar verilmiştir.

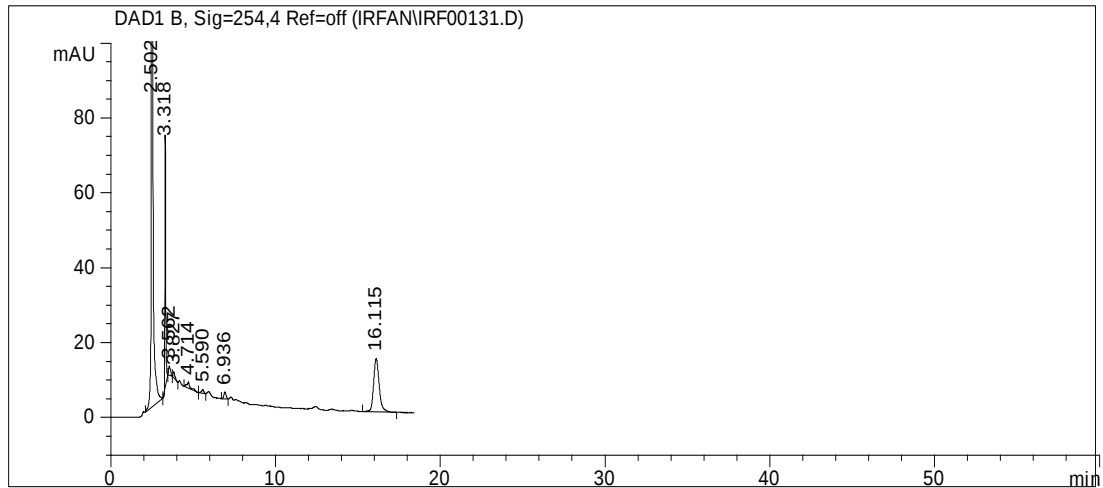
Şekil 3.11’ de elde edilen kromatogramdaki ilk iki pik yeterince birbirinden ayrılmasına rağmen alıkonma zamanlarını değiştirip, birbirinden daha fazla ayrılmasını sağlamak adına mofil faz % oranlarında, ACN miktarını azaltıcı değişiklikler yapıldı.

HPLC Yöntem 5-a

HPLC Yöntem 5'in mobil faz oranını 0,05 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{ACN}$ (84/16)(v/v) şeklinde değiştirerek, Standart EA çözeltisinin (Şekil 3.13) ve Kestane meyve kabuğu çözeltisinin (Şekil 3.14) kromatogramları alındı.



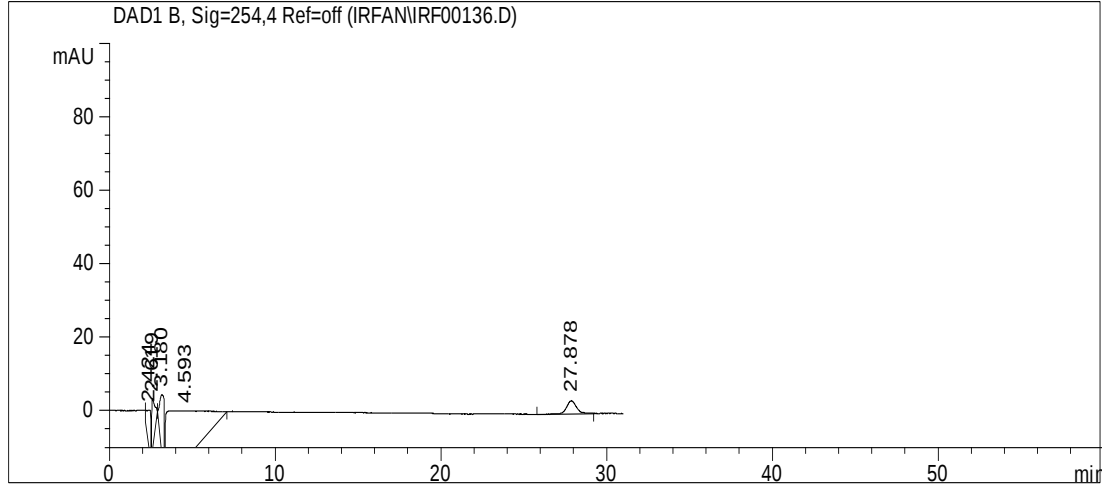
Şekil 3.13. Standart EA çözeltisinin kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5 μm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH_2PO_4 (0,005 M pH=2.5); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; $\lambda=254$ nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 μL ; Rt: 16,100 dak



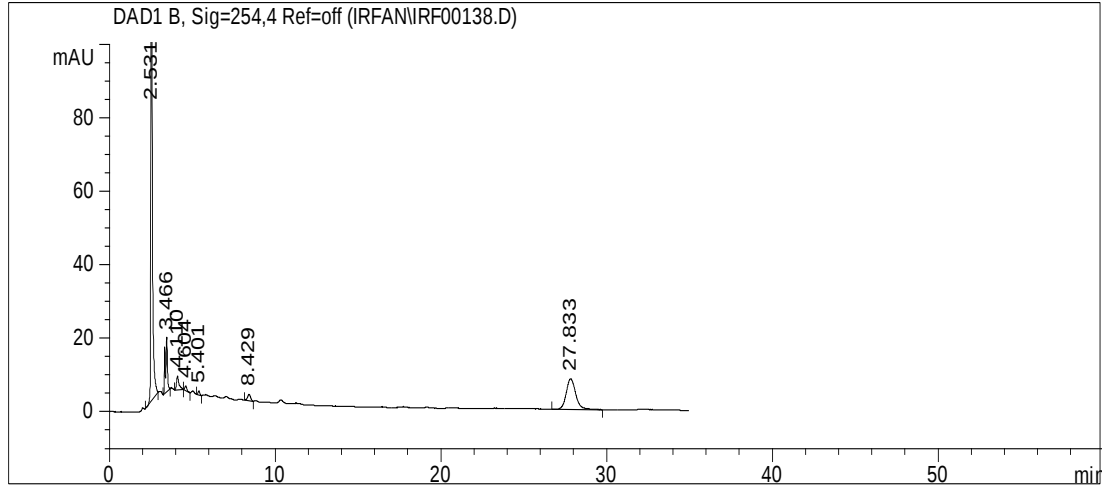
Şekil 3.14. Kestane meyve kabuğu çözeltisinin kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5 μm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH_2PO_4 (0,005 M pH=2.5); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; $\lambda=254$ nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 μL ; Rt: 16,115 dak.

HPLC Yöntem 5-b

HPLC Yöntem 5'in mobil faz oranını 0,05 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{ACN}$ (84/16)(v/v) şeklinde değiştirerek, Standart EA çözeltisinin (Şekil 3.15) ve Kestane meyve kabuğu çözeltisinin (Şekil 3.16) kromatogramları alındı.



Şekil 3.15. Standart EA çözeltisinin kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5 μm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH_2PO_4 (0,005 M pH=2.5); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; $\lambda=254$ nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 μL ; Rt: 27,878 dak



Şekil 3.16. Kestane meyve kabuğu çözeltisinin kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5 μm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH_2PO_4 (0,005 M pH=2.5); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; $\lambda=254$ nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 μL ; Rt: 27,833 dak.

Amakura Y. ve ark. geliştirdikleri izokrotik elüsyon sistemini modifiye ederek oluşturulan HPLC Yöntem 5'in, mobil faz bileşenleri oranlarında değişiklik yapılarak elde edilen KMK örneği kromatogramlarında, (şekil 3.15 ve şekil 3.16) ilk iki pikin alıkonma zamanlarında herhangi bir değişiklik olmamıştır. Analiz süresinin uzaması, EA pikinin genişlemesi ve daha etkin bir ayırım sağlanamadığı için mobil faz sisteminin HPLC Yöntem 5' in kullanılmasına karar verildi.

Çalışmamıza uygun bir HPLC yöntemi geliştirmek için yapılan ön denemeler sonucunda, Amakura Y. ve ark. geliştirdikleri izokrotik elüsyon sisteminin sıcaklık parametresi değiştirilerek oluşturulan HPLC yöntem 5 ile çalışılmasına karar verilmiştir.

3.2.2. Hidroliz reaksiyonu yöntemi için ön denemeler:

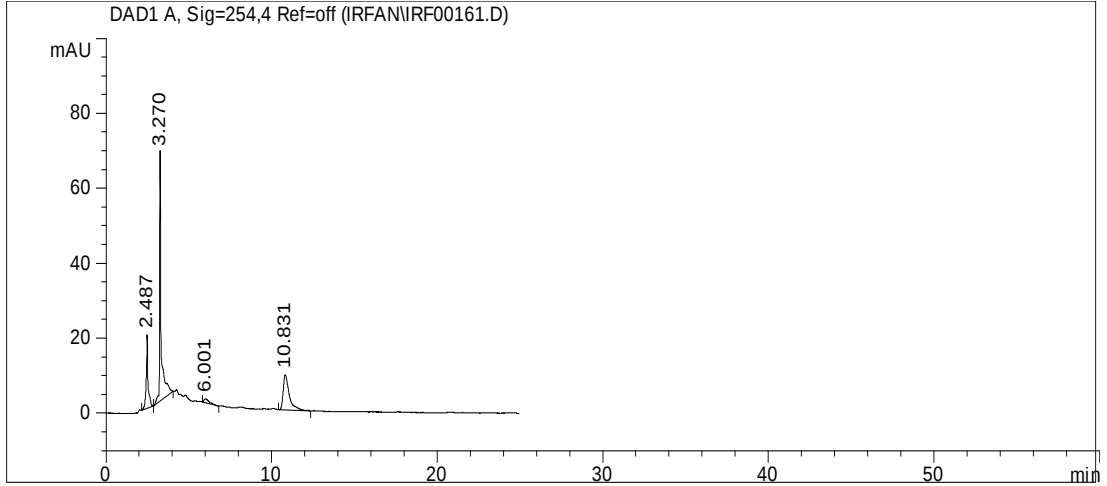
3.2.2.1. Hidroliz reaksiyonu yöntemi 1

Stok Kestane Meyve Kabuğu (KMK) Örneğinin Hazırlanması: KMK örneğinden aynı koşullarda 3 tartım alınarak paralel çalışma yapıldı. Bölüm 3. 1. 5 deki işlemler sonucunda elde edilen ekstraktlar, evaporatörde 60 °C de kuruluğa kadar uçuruldu. Kalıntılar 10 mL metanolde çözüldü. 0,45 µm membran filtreden süzüldü. 10 mL'lik balonjoje' ye aktarıldı.

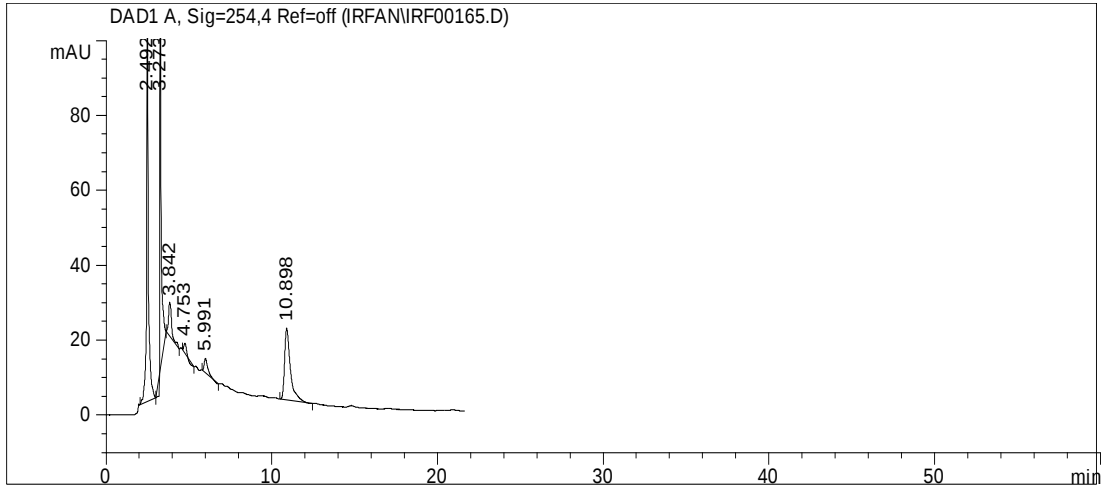
Hidroliz reaksiyonu işlemi: Hazırlanan stok KMK örneğinden 1,0 mL alınıp 10,0 mL'lik deney tüpüne konuldu. Üzerine 1 mL 4 N TFAA çözeltilisi ilave edildi. Deney tüpü ağzı açık bir şekilde, su banyosunda 95 °C sıcaklıkta 2 saat süreyle hidroliz edildi. Daha sonra 10 mL'lik balonjojeye aktarıldı ve 10 mL'ye MeOH - Mobil FazA (50/50, v/v) karışımı ile tamamlandı.

Karşılaştırma çözeltilisi: Artış miktarını belirlemek için bütün işlemlerin sabit tutulduğu sadece hidroliz olmayan KMK örneği hazırlandı.

Santrifüj işlemi: Her iki deney tüpünün ağzı kapatılıp, santrifüj cihazına karşıklı yerleştirildi. 24 °C de, 3000 devirle, 15 dak santrifüjlendi. Katı kısım sıvıdan ayrıldı. Sıvı kısımdan 20 µL enjekte edilip, HPLC yöntem 5 ile kromatogramları alındı. (şekil 3.17 ve şekil 3.18). Karşılaştırma yapıldı.



Şekil 3.17. KMK karşılaştırma çözeltisinin kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH_2PO_4 (0,005 M pH=2.5); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; $\lambda=254$ nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µL; Rt: 10,831 dak



Şekil 3.18. KMK çözeltisinin hidrolizi sonucunda alınan kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH_2PO_4 (0,005 M pH=2,5); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; $\lambda=254$ nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µL; Rt: 10,898 dak.

Hidroliz işlemi uygulanmadan elde edilen EA pikinin alanı 240,1 mAu iken, hidroliz işleminden sonra EA pikinin alanı 469,1 mAu olmuştur. Yapılan bu çalışmada EA'de 1,95 kat artış sağlandığı gözlemlendi. Daha yüksek sıcaklıkta hidroliz yapıldığındaki artış miktarını görmek için block ısıtıcıda hidroliz yapılmasına karar verildi.

3.2.2.2. Hidroliz reaksiyonu yöntemi 2

Stok Kestane Meyve Kabuğu (KMK) Örneğinin Hazırlanması: Stok kestane meyve kabuğu örneğinin hazırlanması işlemleri Hidroliz yöntem 1' de anlatıldığı gibi yapılmıştır.

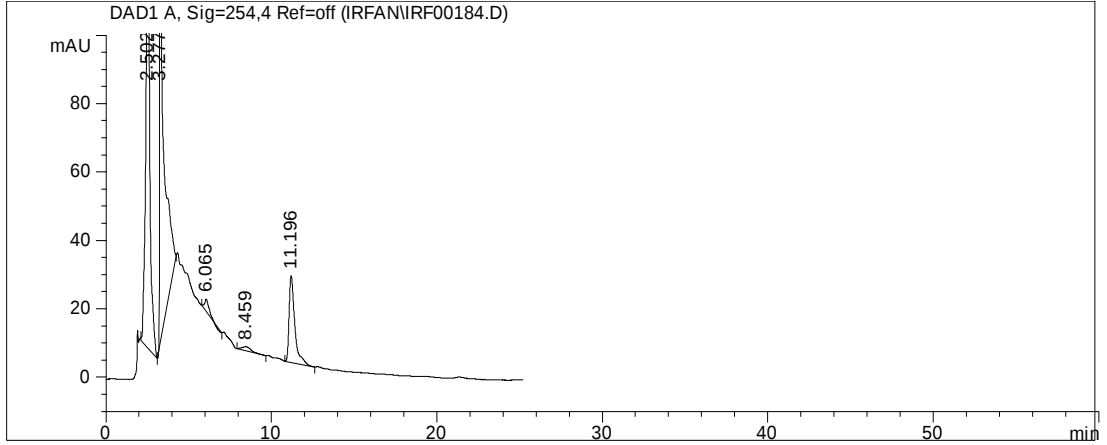
Hidroliz reaksiyonu işlemi: Hazırlanan stok KMK örneğinden 0,4 mL alınıp 3,0 ml'lik deney tüpüne konuldu. Metanolü azot gazı yardımıyla uçuruldu. Kalıntıya 0,40 mL Trifloraasetik asit (TFAA) ilave edildi. Ağız açık tüpte, 120 °C sıcaklıkta, 30 dak block ısıtıcı cihazında hidroliz edildi. Hidroliz sonrasında kalan asit çözeltisi, azot gazı yardımıyla uçuruldu. Kalıntı, 2 mL MeOH - Mobil FazA (50/50, v/v) karışımı ile çözüldü.



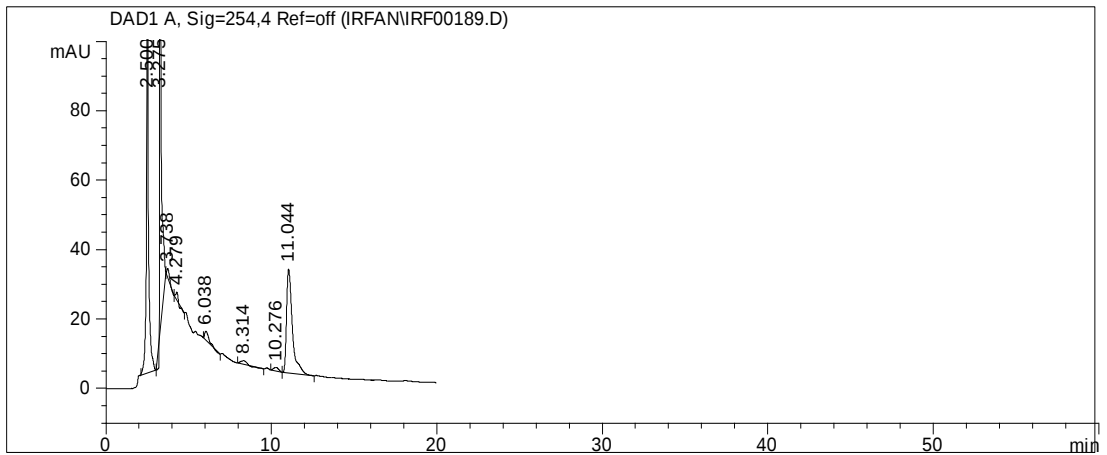
Resim 3. 3. Stuart Block ısıtıcı

Karşılaştırma çözeltisi: Hidroliz reaksiyonu sonucu artış miktarını gözlemek için, bir başka 3,0 ml'lik tüpe stok KMK örneğinden 0,40 mL alındı. Metanolü azot gazı ile uçuruldu. Kalıntı, 2 mL MeOH - Mobil FazA (50/50, v/v) karışımı ile çözüldü.

Santrifüj işlemi: Her iki deney tüpünün ağzı kapatılıp, santrifüj cihazına karşılıklı yerleştirildi. 24 °C de, 3000 devirle, 15 dak santrifüjlendi. Katı kısım sıvıdan ayrıldı. Sıvı kısımdan 20 µL enjekte edilip, HPLC yöntem 5 ile kromatogramları alındı. (Şekil 3.19 ve Şekil 3.20). Karşılaştırma yapıldı.



Şekil 3.19. KMK karşılaştırma çözeltisinin kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH_2PO_4 (0,005 M pH=2.5); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; $\lambda=254$ nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µL; Rt: 11,196 dak



Şekil 3.20. KMK çözeltisinin hidrolizi sonucunda alınan kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH_2PO_4 (0,005 M pH=2.5); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; $\lambda=254$ nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µL; Rt: 11,044 dak.

Hidroliz işlemi uygulanmadan elde edilen EA pikinin alanı 602,6 mAu iken, hidroliz işleminden sonra EA pikinin alanı 729,2 mAu olmuştur. Yapılan bu çalışmada EA'de önemli bir artışın sağlanmadığı gözlemlendi. Hidroliz süresinin kısa olduğu düşünülmüştür. Ayrıca kullanılan asit miktarının az olması ve önemli bir kısmının hidroliz işlemi sırasında buharlaşmasından dolayı Azot gazı ile uçurma işleminden vazgeçilmiştir.

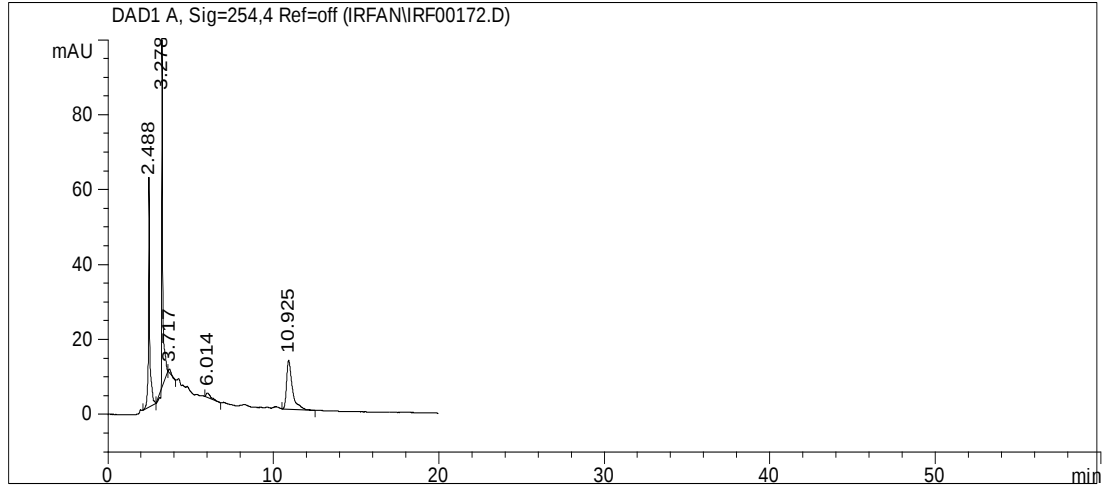
3.2.2.3. Hidroliz reaksiyonu yöntemi 3

Stok kestane meyve kabuğu örneğinin hazırlanması işlemleri Hidroliz yöntem 1' de anlatıldığı gibi yapılmıştır.

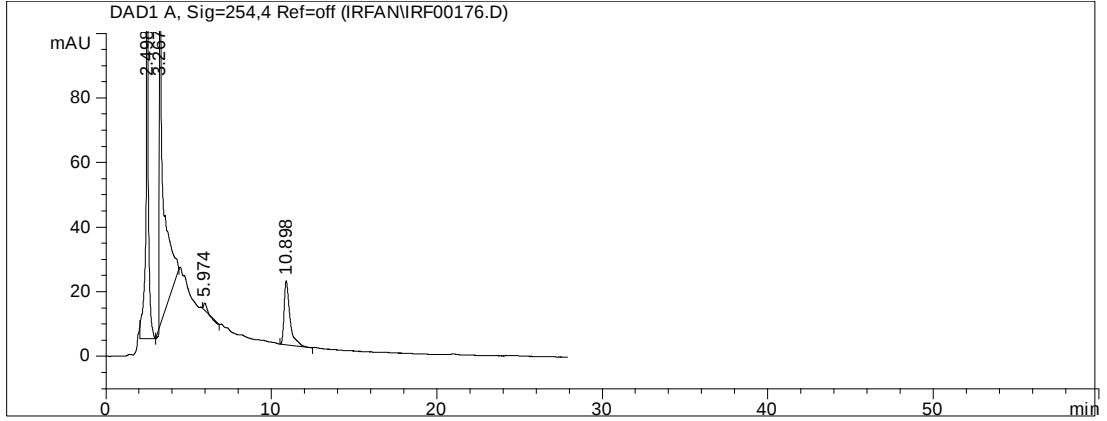
Hidroliz reaksiyonu işlemi: Hazırlanan stok KMK örneğinden 1,0 mL alınıp 3,0 mL'lik deney tüpüne konuldu. Üzerine 1 mL TFAA çözeltisi ilave edildi. Deney tüpü ağzı kapalı bir şekilde, block ısıtıcıda 120 °C sıcaklıkta 2 saat süreyle hidroliz edildi. Daha sonra 10 mL'lik balonjojeye aktarıldı ve 10 mL'ye MeOH - Mobil FazA (50/50, v/v) karışımı ile tamamlandı.

Karşılaştırma çözeltisi: Artış miktarını belirlemek için bütün işlemlerin sabit tutulduğu sadece hidroliz olmayan KMK örneği hazırlandı.

Santrifüj işlemi: Her iki deney tüpünün ağzı kapatılıp, santrifüj cihazına karşılıklı yerleştirildi. 24 °C de, 3000 devirle, 15 dak santrifüjlendi. Katı kısım sıvıdan ayrıldı. Sıvı kısımdan 20 µL enjekte edilip, HPLC yöntem 5 ile kromatogramları alındı. (Şekil 3.21 ve Şekil 3.22) Karşılaştırma yapıldı.



Şekil 3.21. KMK karşılaştırma çözeltisinin kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH₂PO₄ (0,005 M pH=2.5); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; λ=254 nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µL; Rt: 10,925 dak



Şekil 3.22. KMK çözeltisinin hidrolizi sonucunda alınan kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH₂PO₄ (0,005 M pH=2.5); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; λ=254 nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µL; Rt: 10,898 dak

Hidroliz işlemi uygulanmadan elde edilen EA pikinin alanı 317,8 mAu iken, hidroliz işleminden sonra EA pikinin alanı 484,1 mAu olmuştur. Yapılan bu çalışmada EA’de 1,52 kat artışın sağlandığı görülmüştür. Bundan sonraki çalışmada; Hidroliz yöntem 1’ de elde edilen Stok kestane meyve kabuğu örneğinin belli bir miktarının değil, tamamının hidroliz edilmesine karar verildi.

3.2.2.4. Hidroliz reaksiyonu yöntemi 4

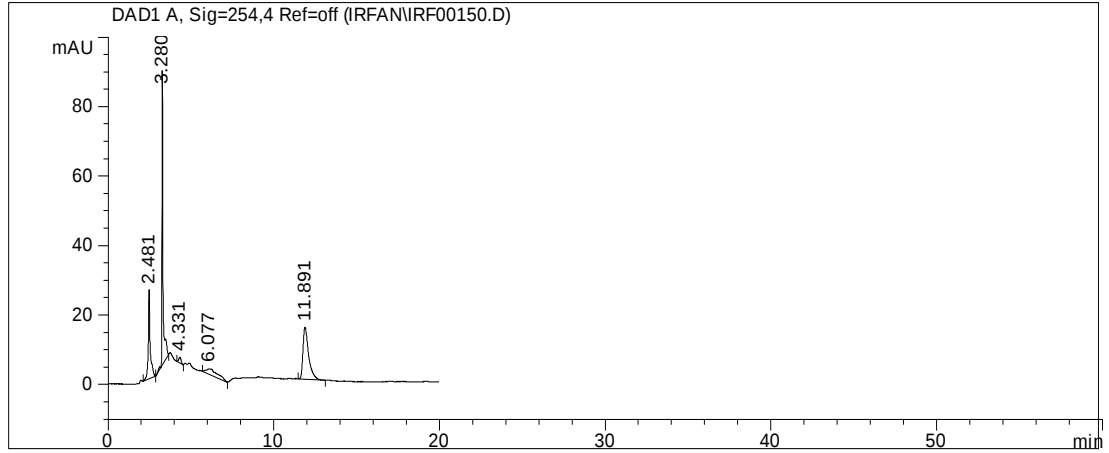
Stok kestane meyve kabuğu örneğinin hazırlanması işlemleri Hidroliz yöntem 1’ de anlatıldığı gibi yapılmıştır.

Hidroliz reaksiyonu işlemi: Hazırlanan 10 mL’lik stok KMK örneğinin metanolü, 65 °C de uçuruldu. Bu işlem 3 mL’lik tüple yapılabildiği için 2 şer mL’lik 5 ilave ile yapıldı. Bu şekilde stok KMK örneğinin tamamı konsantre hale getirildi. Elde edilen konsantre KMK örneğine, 2 ml TFAA (4 N) çözeltisi ilave edildi. Block ısıtıcıda 120 °C sıcaklıkta 2 saat hidroliz işlemi gerçekleştirildi.

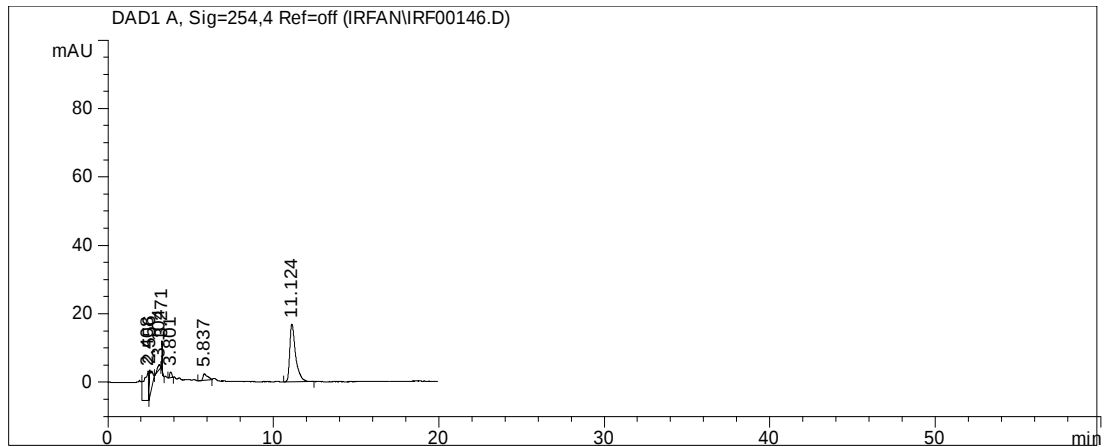
Karşılaştırma çözeltisi: Artış miktarını belirlemek için bütün işlemlerin sabit tutulduğu sadece hidroliz olmayan KMK örneği hazırlandı.

Santrifüj işlemi: Her iki deney tüpünün ağzı kapatılıp, santrifüj cihazına karşılıklı yerleştirildi. 24 °C de, 3000 devirle, 15 dak santrifüjlendi. Katı kısım sıvıdan ayrıldı.

Sıvı kısımdan 20 µL enjekte edilip, HPLC yöntem 5 ile kromatogramları alındı. (Şekil 3.23 ve Şekil 3.24) Karşılaştırma yapıldı.



Şekil 3.23. KMK karşılaştırma çözeltisinin kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH_2PO_4 (0,005 M pH=2.5); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; $\lambda=254$ nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µL; Rt: 11,891 dak



Şekil 3.24. KMK çözeltisinin hidrolizi sonucunda alınan kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH_2PO_4 (0,005 M pH=2.5); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; $\lambda=254$ nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µL; Rt: 11,124 dak

Hidroliz işlemi uygulanmadan elde edilen EA pikinin alanı 313,8 mAu iken, hidroliz işleminden sonra EA pikinin alanı 427,1 mAu olmuştur. Yapılan bu çalışmada EA'de 1,36 kat artışın sağlandığı görülmüştür. Bu çalışmadaki artış

miktarının az olması nedenin eklenen TFAA çözeltisinin yüksek sıcaklıkta çalışılmasından dolayı, reaksiyon ortamında kalmaması olarak düşünülmüştür. Ayrıca stok KMK' nın 2 şer 2 şer ilave edilmesinin nedeni; block ısıtıcının 10 mL'lik deney tüpünü alabilecek aparatının olmamasıdır. Ancak yapılan bu işlemde sistematik hatanın büyük olması kaçınılmazdır. Ayrıca bu şekil de konulduğunda madde kaybıda yaşanılmaktadır. Bütün bu nedenlerden dolayı block ısıtıcının 10 mL'lik tüp ile çalışılabilecek aparatı alınmıştır.

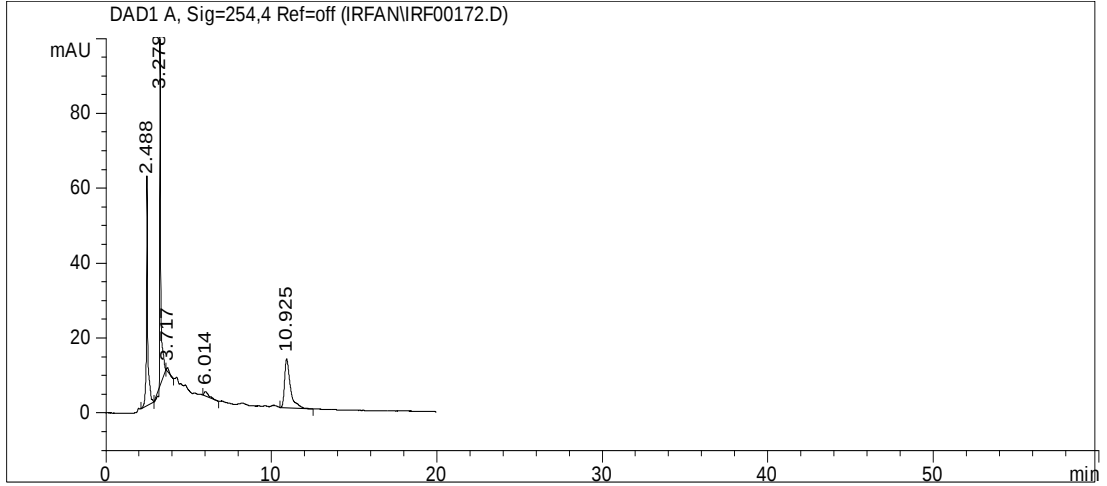
3.2.2.5. Hidroliz reaksiyonu yöntemi 5

Stok kestane meyve kabuğu örneğinin hazırlanması işlemleri Hidroliz yöntem 1' de anlatıldığı gibi yapılmıştır.

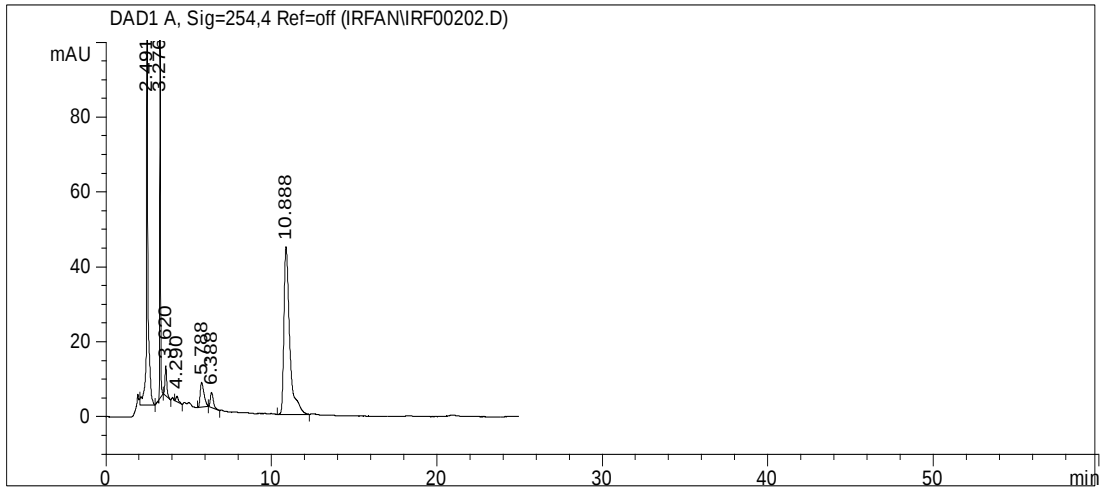
Hidroliz reaksiyonu işlemi: Hazırlanan 10,0 mL'lik stok KMK örneğininin tamamı deney tüpüne konularak su banyosunda, 65 °C sıcaklıkta metenolün büyük bir kısmı uçuruldu. Bu şekilde stok KMK örneğinin tamamı konsantre hale getirildi. Elde edilen konsantre KMK örneğine, 2 ml TFAA (4 N) çözeltisi ilave edildi. Block ısıtıcıda ağzı kapalı bir şekilde, 120 °C sıcaklıkta, 2 saat hidroliz işlemi gerçekleştirildi. Hidroliz işlemi bittikten sonra, deney tüpünde kalan TFAA ve MeOH çözeltilerini uçurmak için 130 °C sıcaklıkta 25 dak ısıtıldı. Kalıntı daha sonra 10 mL'lik balonjojeye aktarıldı ve 10 mL'ye MeOH - Mobil FazA (50/50, v/v) karışımı ile tamamlandı.

Karşılaştırma çözeltisi: Artış miktarını belirlemek için bütün işlemlerin sabit tutulduğu sadece hidroliz olmayan KMK örneği hazırlandı.

Santrifüj işlemi: Her iki deney tüpünün ağzı kapatılıp, santrifüj cihazına karşılıklı yerleştirildi. 24 °C de, 3000 devirle, 15 dak santrifüjlendi. Katı kısım sıvıdan ayrıldı. Sıvı kısımdan 20 µL enjekte edilip, HPLC yöntem 5 ile kromatogramları alındı. (Şekil 3.25 ve Şekil 3.26) Karşılaştırma yapıldı.



Şekil 3.25. KMK karşılaştırma çözeltisinin kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH_2PO_4 (0,005 M pH=2.5); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; $\lambda=254$ nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µL; Rt: 10,925 dak



Şekil 3.26. KMK çözeltisinin hidrolizi sonucunda alınan kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH_2PO_4 (0,005 M pH=2.5); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; $\lambda=254$ nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µL; Rt: 10,988 dak

Hidroliz işlemi uygulanmadan elde edilen EA pikinin alanı 313,1 mAu iken, hidroliz işleminden sonra EA pikinin alanı 1092,1 mAu olmuştur. Yapılan bu çalışmada EA'de 3,48 kat artışın sağlandığı görülmüştür. Bu hidrolizin ağzı kapalı yapılmasındaki amaç asit miktarını reaksiyon süresince korumaktır. Ancak sonrasında uçurmak için başka bir işlem yapıldığı için bundan vazgeçilmiştir.

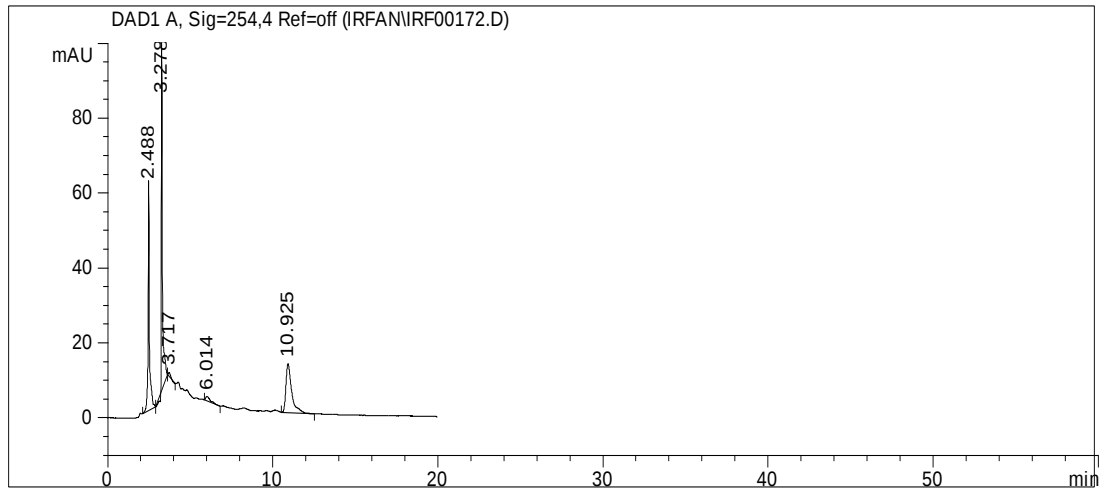
3.2.2.6. Hidroliz reaksiyonu yöntemi 6

Çalışılan bu yöntem de, Hidroliz reaksiyonu yöntemi 5' deki eksiklikleri ve zaman kayıplarını giderici modifikasyonlar yapıp, yöntem sistematikleştirilmiştir.

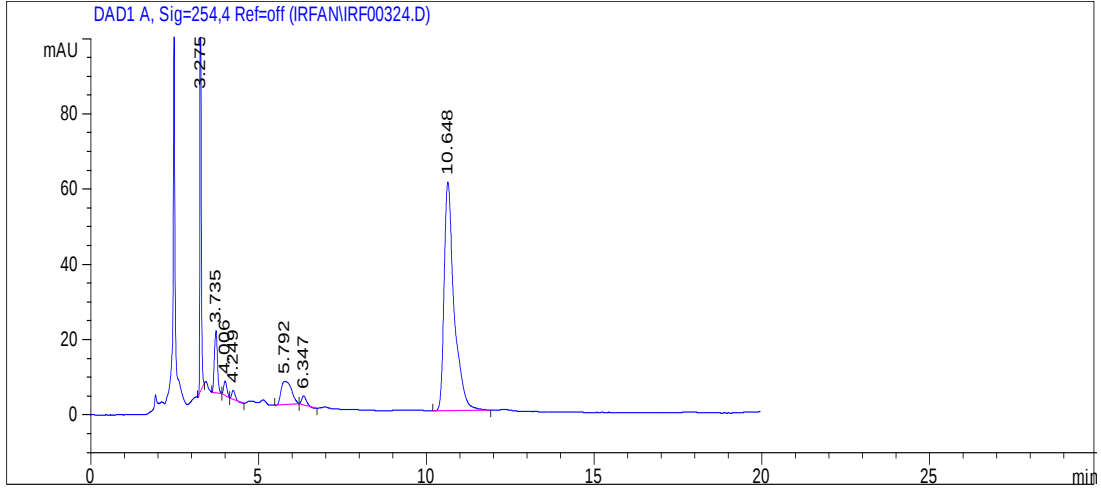
Stok kestane meyve kabuğu örneğinin hazırlanması işlemleri Hidroliz yöntem 1' de anlatıldığı gibi yapılmıştır.

Hidroliz reaksiyonu işlemi: Hazırlanan stok KMK örneğininin tamamı 10,0 mL'lik deney tüpüne konularak su banyosunda, 65 °C' sıcaklıkta metenolün tamamı uçuruldu. Kalıntı üzerine 2 mL TFAA (4 N) çözeltisi ilave edildi. Deney tüpü ağzı açık bir şekilde, block ısıtıcıda 120 °C sıcaklıkta 2 saat süreyle hidroliz edildi. Daha sonra 10 mL'lik balonjojeye aktarıldı ve 10 mL'ye MeOH - Mobil FazA (50/50, v/v) karışımı ile tamamlandı.

Santrifüj işlemi: Her iki deney tüpünün ağzı kapatılıp, santrifüj cihazına karşılıklı yerleştirildi. 24 °C de, 3000 devirle, 15 dak santrifüjlendi. Katı kısım sıvıdan ayrıldı. Sıvı kısımdan 20 µL enjekte edilip, HPLC yöntem 5 ile kromatogramları alındı. (Şekil 3.27 ve Şekil 3.28) Karşılaştırma yapıldı.



Şekil 3.27. KMK karşılaştırma çözeltisinin kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH₂PO₄ (0,005 M pH=2.5); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; λ=254 nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µL; Rt: 10,925 dak



Şekil 3.28. KMK çözeltisinin hidrolizi sonucunda alınan kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH₂PO₄ (0,005 M pH=2.5); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; λ=254 nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µL; Rt: 10,648 dak

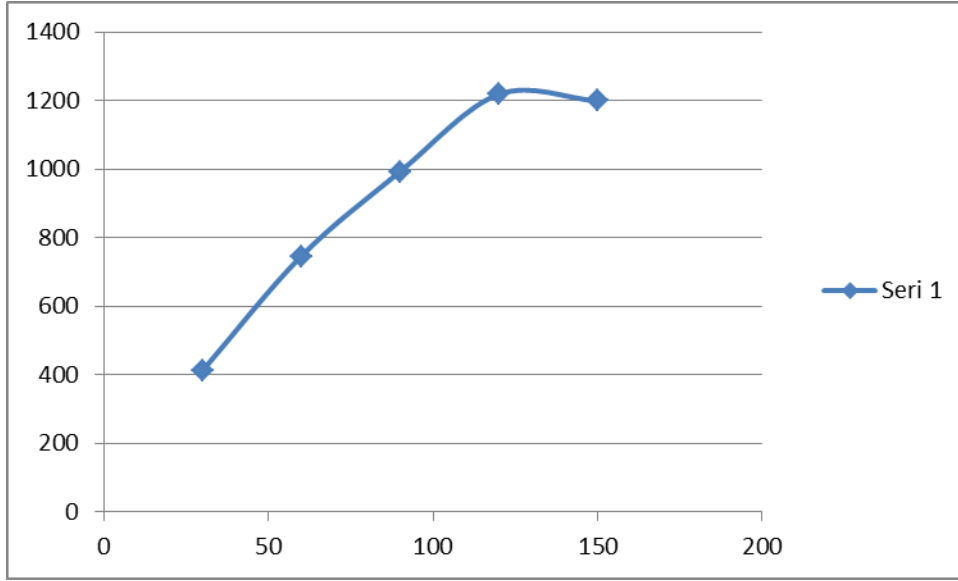
Hidroliz işlemi uygulanmadan elde edilen EA pikinin alanı 300,1 mAu iken, hidroliz işleminden sonra EA pikinin alanı 1220,9 mAu olmuştur. Yapılan bu çalışmada EA’de 4,07 kat artışın sağlandığı görülmüştür. Bu aşamadan sonra, hidroliz reaksiyonu yöntem 6’ nın sıcaklık ve zaman parametrelerini kontrollü değiştirerek en uygun şartlarının belirlenmesine karar verilmiştir.

Hidroliz Reaksiyonu Yöntemi 6’nın Zaman Değişimleri

En uygun reaksiyon süresini belirlemek için, 120 °C sıcaklıkta 5 farklı sürede hidroliz gerçekleştirilmiştir. Her bir nokta için 3 paralel çalışma yapılmıştır.

Tablo 3.6. Hidroliz Reaksiyonu Yöntemi 6’nın hidroliz koşulları

Eklenen Asit (mL)	Sıcaklık (°C)	Zaman (dak)	Pik Alanı (mAu)
2,00	120	30	412,59
2,00	120	60	746,55
2,00	120	90	992,86
2,00	120	120	1218,54
2,00	120	150	1198,80



Şekil 3.29. Hidroliz reaksiyonu 6'nın zamana karşı pik alanı değişimi

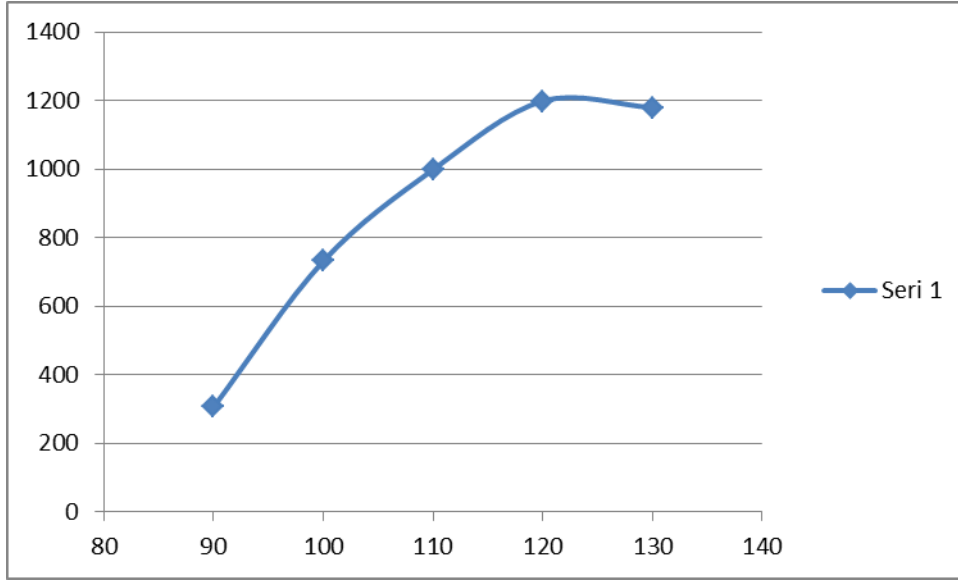
Yapılan çalışmada, 120 dakikadan sonra ellejik asit pik alanında, daha fazla artış gözlenmediği tespit edilmiştir. Hidroliz süresinin 120 dakika olmasına karar verilmiştir.

Hidroliz Reaksiyonu Yöntemi 6'nın Sıcaklık Değişimleri

En uygun reaksiyon sıcaklığını belirlemek için 120 dak. sabit süreyle 5 farklı sıcaklıkta hidroliz işlemi yapılmıştır. Her bir nokta için 3 paralel çalışma yapılmıştır.

Tablo 3.7. Hidroliz Reaksiyonu Yöntemi 6'nın hidroliz koşulları

Eklenen Asit (mL)	Sıcaklık (°C)	Zaman (dak)	Pik Alanı (mAu)
2,00	90	120	305,75
2,00	100	120	731,72
2,00	110	120	998,45
2,00	120	120	1198,54
2,00	130	120	1179,86



Şekil 3.30. Hidroliz reaksiyonu 6'nın sıcaklığa karşı pik alanı değişimi

Yapılan çalışmada 120 °C sıcaklıktan fazlası uygulandığı zaman, ellejik asit pik alanında daha fazla artış gözlenmediği tespit edilmiştir. Hidroliz reaksiyon sıcaklığının 120 °C olmasına karar verilmiştir.

3.3. Geliştirilen Tayin ve Hidroliz Yöntemi

Amakura Y. ve ark geliştirdikleri izokrotik elüsyon sistemi, sıcaklık parametresi ve polaritesi değiştirilerek, modifiye edilip en koşullar belirlendi (HPLC Yöntem 5). Belirlenen kromatografik sistemde, ellajik asit standartı yardımı ile kestane meyve kabuğu örneklerinde ve hidroliz reaksiyonu sonrasındaki kestane meyve kabuğu örneklerinde, bulunan ellajik asit miktarları belirlenmiştir. Hidroliz reaksiyonu sonucu ellajik asit oranındaki artış tespit edilmiştir.

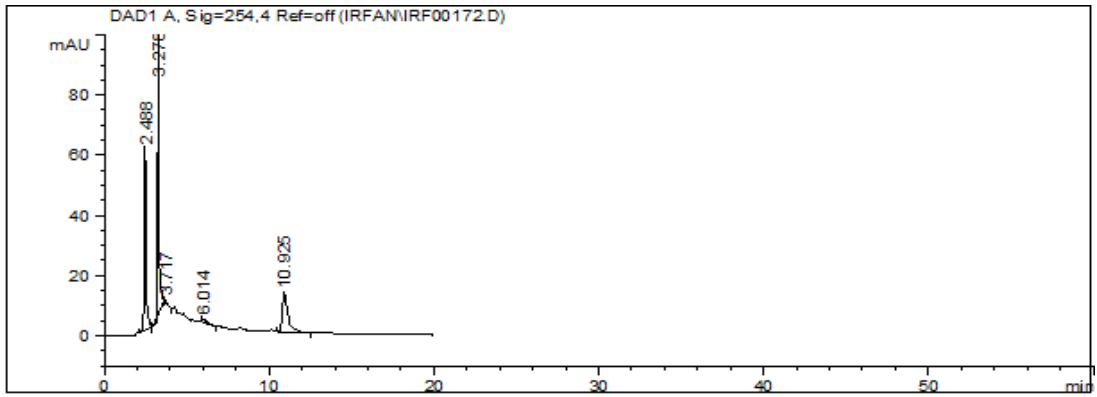
Hidroliz reaksiyonu için yapılan ön denemeler sonucunda, en fazla dönüşüm sağlayan hidroliz metodunun 'Hidroliz Reaksiyonu Yöntemi 6' olduğu belirlenmiştir. Sonrasında Hidroliz Reaksiyonu Yöntemi 6'nın sıcaklık ve zaman değerleri değiştirilerek en uygun sıcaklık ve zaman değerleri belirlenmiştir.

3.4. Geliştirilen Tayin Yönteminin Doğrulanması

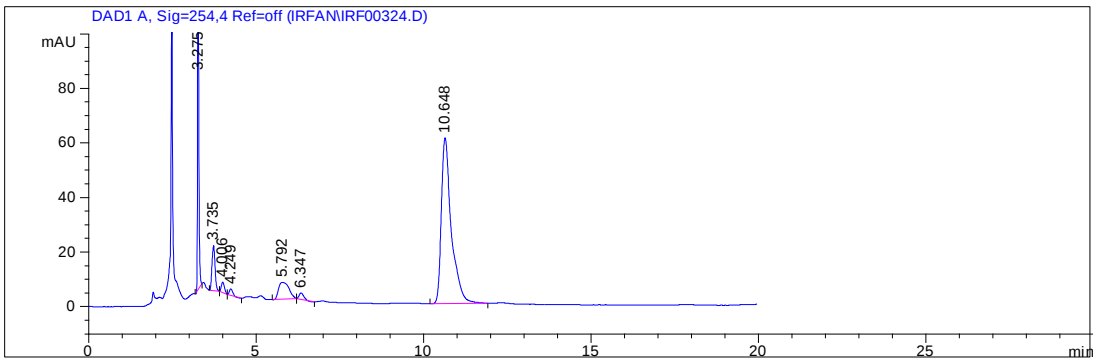
Analitik yöntem doğrulama parametrelerinin gerektirdiği doğruluk, özgünlük, doğrusallık, konsantrasyon aralığı, sağlamlık ve sistem uygunluk testleri uygulandı.

3.4.1. Yöntemin özgünlüğünün belirlenmesi

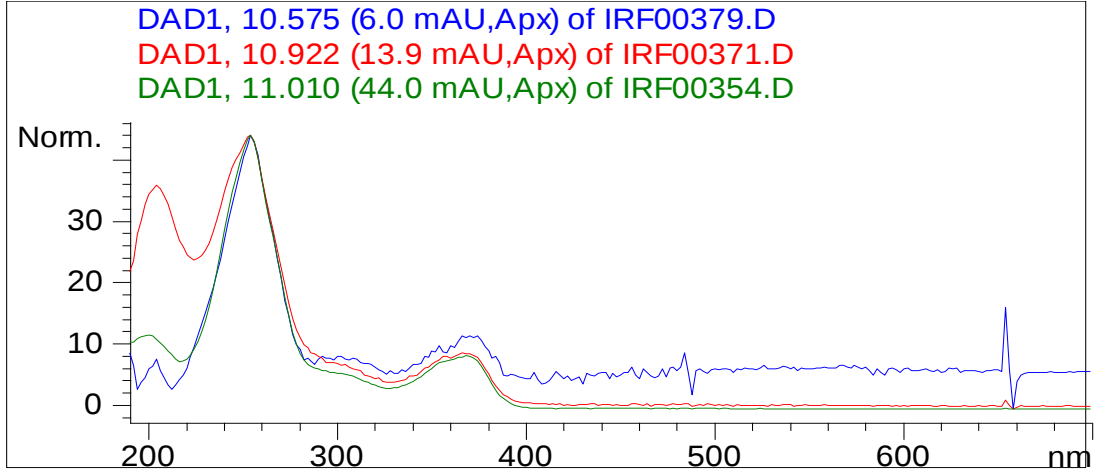
Geliştirilen yönteme göre kestane meyve kabuğunda bulunan Ellajik asitin örnekte yer alan diğer bileşiklerden kantitatif açıdan uygun olarak ayrıldığı Şekil 3.31, Şekil 3.32 ve Şekil 3.33 de gösterilmiştir.



Şekil 3.31. KMK karşılaştırma çözeltisinin kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH_2PO_4 (0,005 M pH=2.5); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; $\lambda=254$ nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µL; Rt: 10,925 dak



Şekil 3.32. KMK çözeltisinin hidrolizi sonucunda alınan kromatogramı. Kolon: İnertsil ODS V3 5µm 250 mm . 4,6 mm; hareketli faz A: KH_2PO_4 (0,005 M pH=2.5); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; $\lambda=254$ nm; akış hızı: 1,000 mL/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µL; Rt: 10,648 dak



Şekil 3.33. Ellajik asit standartı spektrumu (379), Hidroliz öncesi KMK örneği spektrumu (371), Hidroliz sonrası KMK spektrumu (354)

3.4.2. Yöntemin doğrusallığının belirlenmesi

3.4.2.1. Ellajik asitin ölçü eğrisinin doğrusallığının belirlenmesi

Ölçü eğrisini belirlemek için standart ekleme metodu kullanıldı. Bölüm 3.2.1 de anlatıldığı gibi hazırlanan Stok KMK çözeltisinden, 1 ml alınıp 10 ml'lik balonjojeye aktarıldı. Bu şekilde 6 paralel örnek hazırlandı. Hazırlanan 6 paralel örneğin herbirinin üzerine, Bölüm 3.1.3'de anlatıldığı gibi hazırlanan Ellajik Asit stok çözeltisinden ($C = 6,62 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$), artan hacimlerde (50, 100, 300, 600, 750, 1000 μL) standart çözeltisi ilave edildi. Son olarak herbir balonjenin hacmi 10 ml ye Metanol+Mobil faz ile tamamlandı. Hazırlanan örnekler 3'er defa sisteme enjekte edildi. Her bir konsantrasyon değerine karşılık gelen Ellajik asit pik alan değerleri grafiğe geçirildi. Çalışma farklı günlerde 3 defa tekrarlandı.

İlk numune çözeltisine ilave yapılmaz. Numune çözeltisi hepsinde bulunduğu ortam yaklaşık olarak aynıdır

A_1 , A_2 , A_3 : Her bir konsantrasyon için yapılan 3 enjeksiyondan elde edilen pik alanı değerlerinin ortalaması.

A_0 : A değerlerinin ortalaması

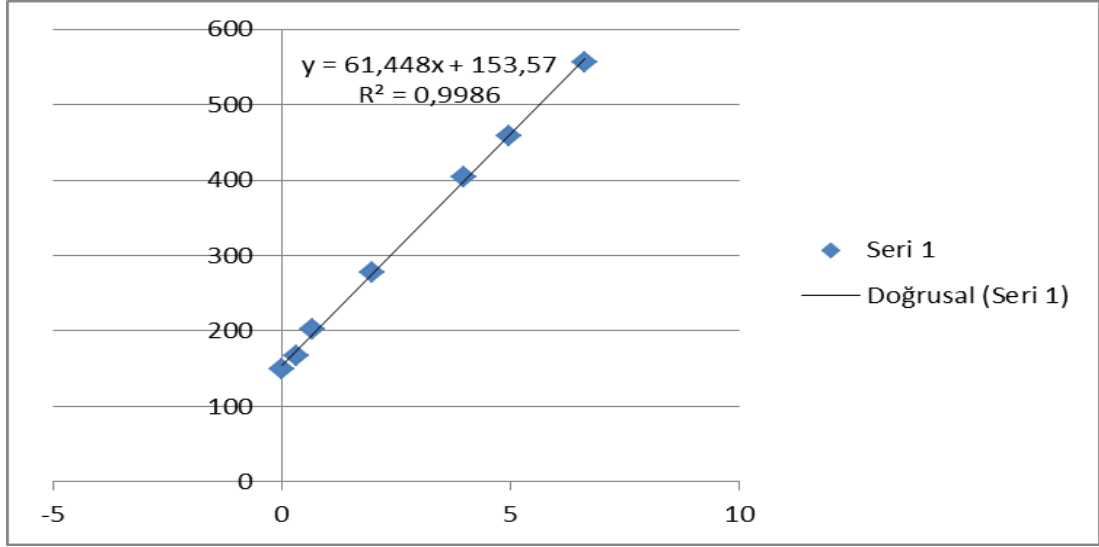
Tablo 3.8. Ellajik Asit'e ilişkin ölçü eğrisinde elde edilen pik alan değerleri

	C(mol/L)x10 ⁻⁵	A ₁	A ₂	A ₃	A ₀	SD	RSD
1	0	140,33	152,00	154,63	148,99	7,611	5,108
2	0,331	161,16	158,97	180,27	166,8	11,716	7,023
3	0,662	188,63	206,067	214,43	203,04	13,163	6,483
4	1,986	256,40	280,33	295,13	277,27	19,543	7,048
5	3,972	382,54	412,90	414,93	403,47	18,143	4,497
6	4,963	442,20	464,20	470,47	458,96	14,846	3,234
7	6,610	515,42	557,57	593,43	555,47	39,047	7,029

En küçük kareler yöntemiyle elde edilen doğruların regresyon analizi yapıldı. Doğru denklemi $y = bx + a$ (a: kayım b: eğim), korelasyon katsayısının karesi R^2 olarak ifade edildi.

Tablo 3.9. Ellajik asit için ölçü eğrisinden elde edilen doğruların eğim, kayım ve R^2 değerleri

	1	2	3	SD	RSD
a	145,21	161,84	161,70	9,561	6,119
	57,736	60,755	64,274	3,272	5,370
b	0,9971	0,9982	0,9979	0,0006	0,060



Şekil 3.34. EA'ye ilişkin dedektör sinyalinin konsantrasyona karşı grafiği

Konsantrasyona karşı ortalama alan değerleri grafiğe geçirildiğinde elde edilen doğru denklemi $y = 61,448x + 153,57$ korelasyon katsayısının karesi $R^2 = 0,9986$ olarak bulundu.

3.4.2.2. Yöntemin çalışma aralığının belirlenmesi

Ellagic asit için $0,3335 - 12,5815 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ konsantrasyon aralığında doğrusallık elde edilmiştir.

3.4.2.3. Dedeksiyon limiti (LOD) ve kantitatif tayin limiti (LOQ)

Ellagic asit için dedeksiyon limiti $8,338 \times 10^{-8} \text{ M}$, kantitatif tayin limiti $3,335 \times 10^{-7} \text{ M}$; olarak bulunmuştur.

3.4.2.4. Yöntemin doğruluğunun belirlenmesi

Bu test geri kazanım çalışmaları ile gerçekleştirilmiştir. Stok çözeltiden alınan 36 µl EA, 1gr KMK örneği türü üzerine eklenmiştir. Diatomize toprakla karıştırılan standart eklenmiş örnek ASE cihazının ekstraksiyon hücreğine yerleştirilir ve 60 °C'de 3 kez tekrarlanan % 100 metanol ekstraksiyonu gerçekleştirilir. Elde edilen ekstraktan rotary evaporatör yardımıyla metanol uçurulur. Kalan çökelti 10 ml methanol çözeltisinde çözündürüldükten sonra 0.45 µm'lik şırınga ucu naylon filtreden geçirilip HPLC 'ye enjekte edilmiştir. Enjeksiyon hacmi 20 µl'dir. Her enjeksiyon 3 defa tekrarlandı. 3 farklı tartım alınarak yapılan geri kazanım çalışmasına ait sonuçlar Tablo 21'de verilmiştir.

Tablo 3.10. EA içeren karışımdan geri kazanım testi sonuçları

N	1.Analiz EA içeren karışımdan geri kazanım % EA	2.Analiz EA içeren karışımdan geri kazanım % EA	3.Analiz EA içeren karışımdan geri kazanım % EA
1	91,02	89,09	87,50
EA için ; $X_{ort.}$: 89,203, SD:1,763 RSD: 1,976			

Sonuçlar incelendiğinde ortalama % geri kazanım değerleri Ellajik Asit için % 87,50-91.02 olarak bulunmuştur.

Geri kazanım testinin sonuçları % 95 güven sınırları içerisinde değerlendirildi.

$X_{ort.} + t_{n-1} \times s / \sqrt{n}$ formülünde $t_2 = 4,30$ alınarak güven sınırları hesaplandı.

Ellajik Asit'in üç farklı analizi için;

$$89,203 \pm 4.30 \times 1,763 / \sqrt{3} = 89,203 \pm 4,377$$

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada hidroliz sonucu miktar arttırımını sağladığımız, zayıf bir asit olan ellajik asit termodinamik bakımdan kararlı bir polifenoldur. Polifenoller acılık, renklilik gibi duysal özelliklere sahip olup, sağlık üzerine olası etkilerinden dolayı önemli kimyasal bileşiklerdir (Okuda ve ark., 1995).

Ellajik asidin 1960'lı yıllarda kan pıhtılaşması ve cilt beyazlatma etkileri, hemostatik aktivitesi üzerinde çalışılmıştır. İlerleyen yıllarda kanser oluşumu; daha sonraki yıllarda ise olası antimitojenik, antiviral ve anti kanserojenik etkileri nedeniyle ellajik aside olan ilgi artmıştır.

Sentetik antioksidanların kanserojen özelliklerinden dolayı kullanımlarına kısıtlamalar getirilirken, gıda ve ilaç endüstrisinde doğal bitkilere, antioksidan olarak kullanımlarına, kansere karşı koruyucu özelliklerine olan ilgi artmıştır (Häkkinen ve ark., 1999; Bala ve ark., 2006; Bianco ve ark., 1998; Vekari ve ark., 2008). Bu nedenle de ellajik asit gibi doğada bulunan ve başta antioksidan olmak üzere bir çok özelliğe sahip bileşiklerin elde edilmeleri saflaştırılmaları ve miktar arttırımının sağlanmaya çalışılması önem kazanmıştır.

Bu çalışmada, Kafkas Kestane Firmasından temin edilen kestane meyve kabuğu (KMK), öğütme, sabit tartıma getirme ve eleme ön işlemlerinden geçirildi. Bu işlemler sırasında tanecik büyüklüklerinin tekdüze olması hedeflendi. Ekstraksiyon için sokslet gibi geleneksel yöntemlerden üstün olan hızlandırılmış çözücü ekstraksiyon yöntemi (ASE cihazı) kullanıldı. ASE cihazı, yüksek sıcaklık ve basınç kullanımı ile çözücü tüketimini ve ekstraksiyon zamanını azaltmaktadır. Yüksek basınç çözücüyü kaynama noktasının altında tutarken, artmış sıcaklık ekstraksiyon kinetiğini hızlandırır, böylece bir örneği kısa bir zamanda (yaklaşık 30 dak) hızla ekstrakte etmek mümkündür. Anabilim dalında daha önce yapılan çalışmalarda kestane meyvesinde (İşyapan, 2011) ve ceviz ağacı kereste atıklarında (Özgül, 2011) ellajik asit için hızlandırılmış çözücü ekstraksiyon yöntemi geliştirilmiştir. Ekstraksiyon koşulları Tablo 3.1 de verilmiştir. Ekstraktlar, evaporatörde 60°C de

kuruluğa kadar uçuruldu. Kalıntılar EA'nın çözünürlüğünün yüksek olduğu metanolde çözüldü ve -20°C de saklandı (İşyapan, 2011; Özgül, 2011).

Elde edilen ekstraktlardaki, ellajik asit ve diğer olası ellajitanenlerin etkin bir şekilde ayrılması ve miktarının belirlenmesi amaçla ile yeni bir RP-HPLC-DAD tayin yöntemi geliştirilmiştir ve kullanılan yöntem valide edilmiştir.

Çalışmada öncelikli olarak, fenolik bileşiklerin analizlerinin kimyasal yapılarının benzer olması nedeniyle son derece zor olması ve çeşitli çalışmalarda fenolik madde içeriklerinin tespitine yönelik analizlerde HPLC yönteminin yaygın olarak kullanılmasından dolayı en uygun HPLC yönteminin belirlenmesi için çalışmalar yapılmıştır.

HPLC sistemine yönelik çalışmalarda başlangıç olarak, Vekiari ve ark., uyguladıkları dereceli elüsyon sisteminde değişiklikler yapılarak (Tablo 3.3) kromatogramlar alındı. Bu koşullar altında yapılan ön denemeler sonucu çalışılan maddenin standartına ait piklerde ön kuyruklanma görülmüştür. Ayrıca var olduğu düşünülen daha apolar özellikteki ellejitanenlerin pikleri gözlenememiştir (Şekil 3.1). Ayrıca arda arda yapılan enjeksiyonlarda dahi tekrarlanabilir sonuçlar elde edilememiştir. Bu nedenle yapılan çalışma terk edilerek HPLC yöntem 1'de kullanılan Vekiari SA ve ark. geliştirdikleri Özgül L. tarafından modifiye edilen dereceli elüsyon sistemi kullanılarak (Tablo 3.4) kromatogramlar alındı. Çalışılan bu HPLC yönteminde, standart EA çözeltisinin enjeksiyonu ile elde edilen kromatogramdan, EA pikinin simetrik olduğu gözlemlendi. HPLC Yöntem 1' deki gibi hazırlanan KMK örneği enjekte edildi. Yapılan karşılaştırma sonucunda EA piklerinin alıkonma zamanlarının eşit olduğu belirlendi. Ancak KMK örneğinde EA piki, kendinden bir önceki pikten iyi ayrılmadığı ve analiz süresi uzun olduğu için yeni yöntem denenmesine karar verilmiştir.

Piklerin ayırımında ve pik şekillerin düzelmesinde düşük pH değerinde hazırlanan bir tampon çözeltinin (5mM KH₂PO₄ tamponu (pH: 2.5 o-fosforik asit)) etkili olacağı düşünüldüğü Amakura Y. ve ark izokritik HPLC çalışması temel alınıp kromatoğrafik koşullar değiştirilmiştir. Olası ellajitanen piklerini görebilmek ve alıkonma zamanını arttırmak için ilk olarak sıcaklık düşürülmüştür. Sonrasında

mobil faz oranında değişiklikler yapılarak polaritenin değişimine ellajik asit ve ellajitanen piklerinin cevabı gözlenmiştir. Amakura Y. ve ark. geliştirdikleri, kromatografik koşulları modifiye edilerek çalışılan metot ile, ellajik asit ve ellajitanen piklerinin ayrımı etkin bir şekilde sağlanılmıştır. Bu şekilde çalışılacak RP-HPLC-DAD (HPLC Yöntem 5) metoduna karar verilmiştir.

Polifenolik bileşiklerden olan ellajitanenler, bir veya daha fazla sayıdaki heksahidroksidifenol grubu taşıyan bir molekül ile şeker molekülünün (genellikle glukoz) esterleşmesiyle oluşan ve hidrolize olabilen bileşiklerdir (Lee, 2004). Ellajitanenler, asit veya bazlarla hidrolize uğradığında ester bağları hidrolize olarak heksahidroksidifenik asit ve glukoz ara ürünlerini verir, ve heksahidroksidifenik asit kendiliğinden laktonize olarak suda az çözünen ellajik aside dönüşür (Häkkinen ve ark., 2000; Clifford ve ark., 2000; Mullen ve ark., 2002). Ellajik asit, doğada birçok bitkide (çilek, ahududu, böğürtlen, nar, yaban mersini, ananas gibi meyvelerde ve ceviz, kestane, gibi sert kabuklu yiyeceklerde) serbest halde bulunabildiği gibi, glikozitleri halinde, ya da heksahidroksidifenik asit olarak da bulunur (Okuda ve ark., 1995; Daniel ve ark., 1989; Pinto ve ark., 2008; Bianco ve ark., 1998).

Belirtilen bu özelliklerinden ve ilaç adayı bir molekül olmasından ve en önemlisi sentetik olarak üretilmemesinden dolayı, ellajik asitin bitkilerden ekstrakte edilmesi kaçınılmazdır. Diğer yandan ülkemizde kestane, sanayi ölçeğinde işlenerek çeşitli ürünler elde edilmektedir. Yapılan bu üretimler sonrasında tonlarca kestane kabuğu atığı oluşmaktadır.

Atık olan kestane meyve kabuğu ektresinden önceki çalışmalarda (Clifford ve ark., 2000; Mukhtar ve ark., 1986; İşyapan, 2011) İTK ile saflaştırma yöntemleri geliştirilmiştir. Fakat bu güne kadar ülkemizde kestane kabuğu ektresindeki ellajitanenlerin hidrolizi yoluyla ellajik asit miktarının arttırılması ile ilgili bir çalışma yapılmamıştır. Dünyada ise sayılı hidroliz çalışmalarının hiçbirinde atık olan kestane kabuğu hedef olarak alınmamıştır.

Bu çalışmada kestane kabuğu ektresinde bulunan, ellajik asit miktarı geliştirilen hidroliz reaksiyonu yoluyla 4,07 katına çıkarılmıştır. Geliştirilen hidroliz yöntemi koşulları optimize edilmiş, geliştirilen RP-HPLC-DAD (HPLC Yöntem 5) ile miktar

tayini yapılmıştır. Miktar tayini metodu olarak standart katma yöntemi seçilmiştir. Çalışılan kromatografik yöntem valide edilmiş, LOD ($8,338 \times 10^{-8}$ M); LOQ ($3,35 \times 10^{-7}$ M) değerleri önceki çalışmalardan daha düşük bulunmuştur. Geri kazanım değeri (%89.20) ise analitik açıdan oldukça yüksektir.

Sonuç olarak; kestane meyve kabuğunun metanollü ektresindeki ellajik asit miktarını, 4,07 katına çıkaran bir hidroliz metodu ve duyarlı bir RP-HPLC-DAD metodu geliştirilerek hidroliz olmamış 1 kg KMK atığından 75,53 mg EA, hidroliz edilmiş 1 kg KMK atığından 307,41 mg EA elde edilmiştir.

5. KAYNAKLAR

Aguilera-Carbo A., Augur, C., Prado-Barragan, L.A., Faveal-Torres, E., Aguilar, C.N., (2007), Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins, *Applied Microbiology Biotechnology*, 1-11.

Akagi K., Hirose M., Hoshiya T., Mizoguchi Y., Ito N. & Shirani T. (1995). Modulating effects of ellagic acid, vanillin and quercetin in a rat medium term multiorgan carcinogenesis model, *Cancer letters*, 94, 113-121.

Amakura Y. , Okada M. , Tsuji, S. & Tonogai, Y. (2000). High performance liquid chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits. *Journal of Chromatography*, 896, 87-93.

Bala, I., Bhardwaj, V., Hariharan, S., Kumar, M.N.V.R., (2006), Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 40, 206-210.

Barros Ana I.R.N.A. , Nunes Fernando M. , Gonçalves Berta , Richard N. Bennett , Ana Paula Silva (2011) Effect of cooking on total vitamin C contents and antioxidant activity of sweet chestnuts (*Castanea sativa* Mill.) *Food Chemistry*.

Berta Gonçalves , Olga Borges , Helena Soares Costa , Richard Bennett , Mariana Santos , Ana Paula Silva (2010), Metabolite composition of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) upon cooking: Proximate analysis, fibre, organic acids and phenolics. *Food Chemistry*, 122 p.154–160.

Bhargava U.C., Westfall B. A.,(1968) Antitumor activity of *juglans nigra* (black walnut)*J. Pharm. Sci.* 57 ,1674-1677.

Bianco M.A., Handaji A., Savolainen H.,(1998) Quantative analysis of ellagic acid in hardwood samples, *The Science of the Total Enviroment* 222 , 123-126.

Boukharta M., Jalbert G., Castonguay A., (1992). Biodistribution of ellagic acid and dose-related inhibition of lung tumorigenesis in A/J mice. *Nutrition and Cancer* 18, 181-189.

Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56, 317-333.

Chang, Y. S., Lin, M. S., Jiang, R. L., Huang, S. C., & Ho, L. K. (1996). 20-epibryonolic acid, phytosterols and ellagic acid from *coriaria intermedia*. *Phytochemistry*, 42, 559-560.

Charrier B., Haluk J.P., Marques M.,(1992) HPLC analysis of gallic and ellagic acids in European oakwood (*Q. Robur L.*) and *Eucalyptus (E. globulus)*, *Holzforschung* 46 (1) 87–89.

Chung KT, Wei CI, Johnson MG. (1998). Are tanens a double-edged sword in biology and health? *Trends in Food Sci and Tech.* 9: 168-175.

Claudine Manach, Augustin Scalbert, Christine Morand, Christian Rémésy, and Liliana Jimé'nez Polyphenols: food sources and bioavailability (2004), *The American Journal of Clinical Nutrification* 79 727-47.

Clifford M. N. , & Scalbert A. (2000), Ellagitannins- nature, occurence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1118-1125.

Connor, W.E., (1997). The beneficial effects of omega - 3 fatty acids: cardiovascular disease and neuro–development. *Current opinion in Lipidology* 8: 1-3

Corthout, J., Peiters L.A., Claeys M., Vanden Berghe D.A. , Vleitnick A.J., (1991), Antiviral ellagitannins from *Spondia mombin*. *Phytochemistry* 30, 1129-1130.

Cuartero M., Ortuño J.A., Truchado P., García M.S., Tomás-Barberán F.A., Albero M.I. (2011) Voltammetric behaviour and square-wave voltammetric determination of the potent antioxidant and anticarcinogenic agent ellagic acid in foodstuffs. *Food Chemistry*.

Daniel E.M. , Krupnick A.S., Heur Y.H., Blinzler J.A., Nims R.W., Stoner G.D.(1989), Extraction, stability, and quantitation of ellagic acid in various fruits and nuts *J. Food Comps. Anal.* 2, 338-349.

G. Va'zquez, E. Fontenla, J. Santos, M.S. Freire, J. Gonza'lez-A'lvarez, G. Antorrena (2008) Antioxidant activity and phenolic content of chestnut (*Castanea sativa*) shell and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark extracts industrial crops and products 28, 279–285.

García del Moral, P., Arín, M.J., Resines, J.A., & Díez, M.T. (2007). Determination of ellagic acid in oak leaves and in sheep ruminal fluid by ion-pair RP-HPLC. *Journal of Chromatography B*, 855, 276-279.

Gómez-341 Caravaca, A. M., Verardo, V., Segura-Carretero, A., Caboni, M. F., (2008). Development of a rapid method to determine phenolic and other polar compounds in walnut by capillary electrophoresis–electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatogr A*, 1209, 238-245.

Häkkinen S., Heinonen M., Kärenlampi S., Mykkänen H., Ruuskanen J., Törrönen R.,(1999) Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries, *Food Res. Int.* 32 , 345-353.

Häkkinen S.H., Kärenlampi S.O., Mykkänen H. M., Heinonen I. M., Törrönen A.R.,(2000), Ellagic acid content in berries: influence of domestic processing and storage, *European Food Research and Technology*, 212, 75-80.

Häkkinen S.H., Kärenlampi S.O., Heinonen I.M., Mykkänen H.M., Törrönen A.R.,(1998) HPLC method for screening of flavonoids and phenolic acids in berries *J. Sci. Food Agric.* 77 , 543-551.

Häkkinen S.H., Törrönen A.R., (2000), Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: Influence of cultivar, cultivation site and technique, *Food Research International*, 33, 517-524.

Harttig U., Hendricks J.D., Stoner G.D., Bailey G.S. (1996) Organ specific, protocol dependent modulation of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene carcinogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by dietary ellagic acid, *Carcinogenesis* 17 : 11, 2403-2409.

Hayatsu H., Arimoto S., Negishi T., (1988) Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis . Mutat Res 202: 429-446.

Işık, N., 2003. Kestane ve Beslenmeye Katkıları, Bursa.

İşyapan B, (2011), Ellajik Asidin İnce Tabaka Kromatografisi İle Saflaştırılması, MÜ Yüksek Lisans tezi, İstanbul (Danışman: Prof. Dr. Güler Yalçın).

Jeganathan N.S., Kannan K., (2008), HPTLC Method for estimation of ellagic acid and gallic acid in Triphala Churanam formulations, Journal of Phytochemistry 2(1), 1-9.

Kalt, W., Forney, C. F., Martin, A., & Prior, R. L. (1999). Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, 4638-4644.

Kawamoto H, Nakatsubo F.(1997) Effects of environmental factors on two-stage tannin-protein co-precipitation. Phytochemistry 46:479-483.

Khallouki F., Haubner R., Hull W.E., Erben G., Spiegelhalter B., Bartsch H., Owen R.W.,(2007), Isolation, purification and identification of ellagic acid derivatives, catechins, and procyanidins from the root bark of Anisophyllea dichostyla R.Br., Food and Chemical Toxicology 45, 472-485.

Khandurja K.L., Gandhi R.K., Pathania V., Shal N.,(1999) Prevention of Nnitrosodiethylamine-induced lung tumorigenesis by ellagic acid and quercetin in mice. Food Chem. Toxicol. 37, 313-318.

Lee J., (2004), Hydrolytic and antioxidant properties of ellagic acid and its precursors present in muscadine grape, Doctor of Philosophy Thesis, University of Florida. Florida, 104s.

Lee KH. (1992). 'Plant phenolics compounds as cytotoxic antitumour agents' in phenolic compounds in food and their Effects on health, II. Antioxidants and Cancer Prevention, pp. 367-379 ACS Symposium Series 506, American Chemical Society.

Mahdavi D.L., Salukhe D.K., (1995). Toxicological aspects of food antioxidants. In: Mahdavi, D.L., Deshpande, S.S., Salukhe, D.K. (Eds.), Food Antioxidants. Dekker, New York.

Mandal S., Stoner G.D., (1990) Inhibition of N-nitrosobenzylmethylamine-induced esophageal tumorigenesis in rats by ellagic, Carcinogenesis 11 , 55-61.

Maria do Carmo B.M. de Vasconcelos, Richard N. Bennett, Rémi Jacquet, Eduardo A.S. Rosa, Jorge V. Ferreira-Cardoso (2010), Evaluating the potential of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) fruit pericarp and integument as a source of tocopherols, pigments and polyphenols. Industrial Crops and Products, 31, p.301–311.

Mukhtar H., Das M., Del Tito B.J. Jr., Bickers D.R., (1984) Protection against 3-methylcholanthrene induced skin tumorigenesis in BALB/c mice by ellagic acid, Biochem Biophys Res Commun 119:751-757.

Mukhtar H.A., Das M., Bickers D.R., (1986). Inhibition of 3methyl-cholanthrene induced skin tumorigenicity in BALB/c mice by chronic oral feeding of trace amounts of ellagic acid in drinking water. Cancer Research 46, 2262-2265.

Mullen W., McGinn J. , Lean M. E.J. , MacLean M.R. , Gardner P. , Duthie G.G. , Crozier A. , (2002). Ellagitannins, flavonoids and other phenolics in red raspberries and their contribution to antioxidant capacity and vasorelaxation properties. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50, 5191-5196.

Mullen, W., Yokota, T., Lean, M. E. J., & Crozier, A. (2003). Analysis of ellagitannins and conjugates of ellagic acid and quercetin in raspberry fruits by LC–MS, Phytochemistry, 64, 617-624.

Namiki M., Yamashita K., Osawa T., in: Yagi K. (Ed.) (1993), Active Oxygen Lipid Peroxides and Antioxidants, Japan Sci. Soc. Press, Tokyo, p. 319.

Nara O., (1997), Effective purification of ellagic acid by successive automatic recrystallization and absolute determination of purity by absorptivity ratio, Analytica Chimica Acta, 338, 247-253.

Narayanan, B.A., Geoffroy, O., Willingham, M.C. , Re, G.G. , Nixon, D.W. , (1999). p53/p21 (WAF1/CIP1) Expression and its possible role in G1 arrest and apoptosis in ellagic acid treated cancer cells. *Cancer Letters* 136, 215-221.

Okuda T., Yoshida T., Hatano T., in: Huang M.T., Ho C.T., Lee C.Y. (Eds.) (1992) Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health II, ACS Symposium Series, Vol. 507, American Chemical Society, Washington, DC, p. 87.

Okuda T., Yoshida T., Hatano T., in: Yagi K. (Ed.)(1993) Antioxidant Phenolics in Oriental Medicine, Japan Sci. Soc. Pres, Tokyo, p.333.

Okuda T., Zasshi Y. (1995) Tannins, a new family of bio-active natural organic compounds (questions and answers). *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* 115(2), 81-100.

Okuda, T. (2005). Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry*, 66, 2012-2031.

Özgül L, (2011), Türkiye’deki Ceviz Ağaçlarında Bulunan Ellajik Asit Ve Gallik Asit Miktarlarının Hızlandırılmış Solvent Ekstraksiyonu İle İzolasyonu ve Miktar Tayini, MÜ Yüksek Lisans tezi, İstanbul (Danışman: Prof. Dr. Güler Yalçın).

Özkarakaş İ. , Kestane Tarımı, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü İzmir.

Pinto M.S., Lajolo F.M., Genovese M.I.,(2008) Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.)*Food Chemistry* 107 , 1629-1635.

Rao C.V., Tokumo K., Rigoty J., Zang E., Kelloff G., Reddy B.S., (1991). Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary administration of piroxicam, difluoromethlornithine, 16 β -fluor-5-androsten-17-one and ellagic acid individually and in combination, *Cancer Research* 51, 4528-4534.

Rommel A., Wrolstad R.E.(1993), Influence of acid and base hydrolysis on the phenolic composition of red raspberry juice. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 41,1237-1241.

Sellapan, S., & Akoh, C. C. (2002). Flavonoids and antioxidant capacity of Georgia grown *Vidalia* onions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5338-5342.

Shahrzad S., Bitsch I, (1996) Determination of some pharmacologically active phenolic acids in juices by high-performance liquid chromatography *J. Chromatogr. A* 741, 223-231.

Sharma S., Stutzman J.D., Kellof G.J., Steele V.E. (1994) Screening of potential chemopreventive agents using biochemical markers of carcinogenesis. *Cancer Research* 54 : 5848-5855.

Sigman C. C., Helmes C. T., Fay J. R., Lundquist P. L. & Perry L. R. (1984). A study of chemicals in the wood and associated industries for the selection of candidates for carcinogen bioassay, 1. Naturally-occurring wood chemicals. *Journal of Environmental Science and Health*, A19(5), 533-577.

Stoner, G.D., & Morse, M.A. (1997). Isothiocyanates and plant polyphenols as inhibitors of lung and esophageal cancer. *Cancer Letters*, 114, 113-119.

Strube M., Dragsted L.O., Larsen J.C. (1993) Naturally occurring antitumorigens. I Plant phenols. *Nordiske Seminar- og Arbejdsrapporter* 605, Nordic Council of Ministers, Copenhagen, Denmark.

Subaşı B.,(2004). Kestane Sektör Profili. İstanbul Ticaret Odası Etüt ve Araştırma Şubesi.

Tanaka T., Kojima T., Kawamori T., Wang A., Suzui M., Okamoto K., Mori H., (1993). Inhibition of 4-nitroquinoline-1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis by the naturally occurring plant phenolics caffeic, ellagic, chlorogenic and ferulic acids. *Carcinogenesis* 14, 1321-1325.

Tanaka T.,(1999) Structure, property and function of plant polyphenols, *Foods Food Ingrid. J. Jpn.* 180, p. 64.

Thakur, K., & Pitre, K. S. (2008). Polarographic (DCP & DPP) Determination of Ellagic Acid in Strawberries & Pharmaceutical Formulations. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 55, 143-146.

Uzuner S. (2008), Nar Suyunda Farklı Üretim ve Depolama Koşullarında Ellajik asit ve Toplam Antioksidan Aktivitelerindeki Değişimler, H.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara (Danışman: prof. Dr. Jale Acar).

Vekiari S.A., Gordon M.H., Garcia- Macias P., Labrinea H.,(2008) Extraction and determination of ellagic acid content in chestnut bark and fruit, Food Chemistry 110, 1007-1011.

Venkat Ratnam, D., Bhardwaj, V., & Ravi Kumar, M. N. V. (2006). Simultaneous analysis of ellagic acid and coenzyme Q10 by derivative spectroscopy and HPLC. Talanta, 70, 387-391.

Versari A., Biesenbruch S., Barbanti D. , Farnell P.J., Galassi S., (1997) Effects of pectolytic enzymes on selected phenolic compounds in strawberry and raspberry juices Food Res. Int. 30 , 811-817.

Wilson T.C., Hagerman A.E., (1990) Quantitative determination of ellagic acid, Journal of Agricultural Food Chemistry 38 : 1678-1683.

Wood A.W., Huang M.T., Chang R. L., Newmark H. L., Lehr R.E., Yagi H., Sayer J. M., Jerina D. M., Cornney A.H., (1982) Inhibition of the mutagenicity of bayregiondiol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by naturally occurring plant phenols: Exceptional activity of ellagic acid, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 , 5513.

Zhou, B., Wu, Z., Li, W., Zhang, J., & Hu, X. (2008). Analysis of ellagic acid in pomegranate rinds by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. Phytochemical Analysis, 19, 86-89.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	İrfan	Soyadı	BAHŞİ
Doğum Yeri	Baskil / Elazığ	Doğum Tarihi	28.12.1984
Uyruğu	T.C.	TC Kimlik No	31420463700
E-mail	irfanbahsi@gmail.com	Tel	05019119118

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Lisans	İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Malatya	2010
Lise	Malatya Fen Lisesi	2003

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
Ar_Ge Analitik Üzman Yrd.	Onko Koçsel İlaçları	2013 / 16 Ay

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	İyi	Orta	İyi

* Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Yabancı Dil Sınav Notu #								
KPDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	60							

Başarılmış birden fazla sınav varsa, tüm sonuçlar yazılmalıdır

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office Word, Excel, Powerpoint	Çok iyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Uluslararası ve Ulusal Yayınları/Bildirileri/Sertifikaları/Ödülleri/Diğer