



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜRKİYE'DEKİ CEVİZ AĞAÇLARINDA BULUNAN ELLAJİK
ASİT VE GALLİK ASİDİN HIZLANDIRILMIŞ SOLVENT
EKSTRAKSİYONU İLE İZOLASYONU VE MİKTAR TAYİNİ**

LEVENT ÖZGÜL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Güler YALÇIN

İSTANBUL-2011



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜRKİYE'DEKİ CEVİZ AĞAÇLARINDA BULUNAN ELLAJİK
ASİT VE GALLİK ASİDİN HIZLANDIRILMIŞ SOLVENT
EKSTRAKSİYONU İLE İZOLASYONU VE MİKTAR TAYİNİ**

LEVENT ÖZGÜL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Güler YALÇIN

İSTANBUL-2011

TEZ ONAYI**ÖRNEK**

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Programın seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ()

Anabilim Dalı : Analitik Kimya

Tez Sahibi : Levent Özgül

Tez Başlığı : Türkiye'deki Ceviz Ağaçlarında Bulunan Ellajik Asit ve Gallik Asidin Hızlandırılmış Solvent Ekstraksiyonu ve Miktar Tayini

Sınav Yeri : Analitik Kimya Anabilim Dalı

Sınav Tarihi : 16/08/2011

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

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof. Dr. Güler Yalçın

Kurumu

Marmara Üniversitesi

İmza

Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof. Dr. Sevim Rollas

Marmara Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Sevgi Karakuş

Marmara Üniversitesi

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü yönetim Kurulu'nun **25/08/2011** tarih ve **17** sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Gülten Z. OMURTAG

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.

04.07.2011

Levent ÖZGÜL

ÖNSÖZ

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

Huzurlu ve rahat bir çalışma ortamı sağladıkları için başta Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Ana Bilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Emre Dölen'e ve tüm öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışma ortamında bilgi ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Türkan Yurdun ve Öğretim Görevlisi Nuray Yüктаş' a teşekkürlerimi sunarım.

Isparta'dan ceviz ağacı örneklerimi sağlayan Müfit Mutluer'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda ve hayatımda aldığım tüm kararlarda beni yalnız bırakmayan annem Güler Özgöl, babam Orhan Kemal Özgöl, ve kardeşim Merve Özgöl'e tüm kalbimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

BEYAN	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÖZET	vi
SUMMARY	vii
SEMBOLLER	viii
KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
TABLO LİSTESİ	xiii
BÖLÜM I. GİRİŞ VE AMAÇ	1
I.1. GİRİŞ	1
I.2. AMAÇ	1
BÖLÜM II. GENEL BİLGİLER.....	2
II.1. CEVİZ (JUGLANS REGIA L.)	2
II.1.1. Ceviz Ağacının Genel Özellikleri	2
II.2. POLİFENOLLER	2
II.2.1. Ellajik Asit ve Özellikleri.....	3
II.2.2. Gallik Asit ve Özellikleri.....	5
II.2.3. Ellajik Asit ve Gallik Asidin Farmakolojik Özellikleri	6
II.2.4. Ellajik Asit ve Gallik Asit ile Yapılan Diğer Çalışmalar ...	6
II.3. HIZLANDIRILMIŞ SOLVENT EKSTRAKSİYONU (ASE).....	8
II.4. KROMATOĞRAFI.....	15
II.4.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	16
II.4.1.1. Çözücü Dağıtma Sistemi	18
II.4.1.2. Kolonlar	20
II.4.1.2. Dedektörler.....	21
II.5. KULLANILAN İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER.....	24

II.5.1. Aritmetik Ortalama	24
II.5.2. Standart Sapma	24
II.5.3. % Bağıl Standart Sapma	24
II.5.4. Geri Kazanım.....	24
BÖLÜM III. TEZ ÇALIŞMALARI	25
III.1. GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
III.1.1. Kimyasal Maddeler.....	25
III.1.2. Cihaz ve Analitik Koşullar	25
III.1.3. Çözeltiler.....	27
III.1.4. Ekstraksiyon İşlemleri.....	28
III.1.5. Kromatografik Koşullar.....	28
III.2.BULGULAR.....	29
III.2.1. Ön Denemeler.....	29
III.2.1.1. Ellajik Asit Standardın Kromatogramı	29
III.2.1.2. İki Tür Ceviz Filizi ile	
Yapılan Çalışmalar	31
III.2.1.3. Dereceli Elüsyon Sisteminde	
Yapılan Değişiklikler	34
III.2.1.4. Ceviz Ağacı Gövdesi Atığı (Rende) ile	
Yapılan Çalışmalar	36
III.2.1.5. Yaklaşık 70 Yıllık Ceviz Ağacı Kabuğu	
(K-70) Çalışmaları	39
III.2.1.6. Yaklaşık 100 Yıllık Ceviz Ağacı Kabuğu	
(K-100) Çalışmaları	41
III.2.1.7. Ön Denemelerin Değerlendirilmesi.....	42
III.2.2. Yeni Dereceli Elüsyon sistemi Oluşturulması	43
III.2.3. Ölçü Eğrisi Oluşturulması	43
III.2.4. Rende Örnekleri ile Yapılan Çalışmalar	45
III.2.5. Gallik Asit ile Yapılan Çalışmalar	47
III.2.6. Geri Kazanım Değeri.....	49
III.2.7. Rendede Bulunan Ellajik Asit Miktarı	49
BÖLÜM IV. TARTIŞMA VE SONUÇ	50

KAYNAKLAR.....	53
ÖZGEÇMİŞ.....	59

ÖZET

Bu çalışmada Türkiye'deki ceviz ağaçlarından örnekler alınarak hızlandırılmış solvent ekstraksiyonu (ASE) uygulanmış, örneklerin içerdikleri ellajik asit (EA) ve gallik asit (GA) miktarları ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile tayin edilmiştir. Ellajik Asit ve Gallik Asit polifenolik bileşiklerdir. İnsan sağlığı üzerinde birçok olumlu etkisi olan ellajik asidin en etkili özelliği kanser oluşumlarını engellemesidir. Özellikle akciğer, gırtlak, karaciğer, deri ve kolon kanserinde birçok araştırma yapılmıştır.

Çalışmada hareketli faz bileşenleri olarak A: 0,025M KH_2PO_4 / H_3PO_4 tampon çözeltisi (pH: 3,0) ve B: Asetonitril (ACN) kullanılmıştır. Bu iki çözücü ile farklı dereceli elüsyon uygulamaları yapılmıştır. En uygun dereceli elüsyon sistemi EA pik alıkonma zamanı ve en yakın piklerin ayrılmaları göz önüne alınarak belirlenmiştir. Yeni bir ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) dereceli elüsyon yöntemi geliştirilmiştir. RP-HPLC sistemi: Phenomenex Luna C18 (2) 4,6 mm x 250 mm, 5 μm kolon, bant genişliği 4 nm, $\lambda=255$ nm dalga boyu ve diod dizi dedektör (DAD) kullanılmıştır.

Beş farklı örnekle çalışılmıştır. 1. Ceviz ağacı gövdesi atığı (Rende), 2. Yaklaşık 70 yıllık ceviz ağacı kabuğu (K-70), 3. Yaklaşık 100 yıllık ceviz ağacı kabuğu (K-100), 4. Şebın türü ceviz ağacı filizi 5. Pedro türü ceviz ağacı filizi. Bu örneklerin ekstraksiyonunda Hızlandırılmış Solvent Ekstraksiyonu cihazı (ASE100) kullanılmıştır. Ekstraksiyon koşulları çözücü metanol-su (90:10); sıcaklık 100°C , statik zaman 1 dakika, temizleme hacmi % 50, yıkama zamanı 60 saniye, statik devir 3 olarak ayarlanmıştır. Kalibrasyon eğrisi $y=189,904x + 1,101$ $r^2: 0,9968$. Geri kazanım % 35-43 olarak ceviz ağacı gövdesi atığı (rende) içinde hesaplanan EA miktarı % 21,65 bağıl standart sapma değeri ile 39,3 mg/ 100g olarak bulunmuştur. Tayin ve gözleme sınırları sırasıyla 13 ng mL^{-1} (sinyal/ gürültü: 10/1) ve 60 ng mL^{-1} (sinyal/ gürültü: 3/1) olarak belirlendi.

Anahtar kelimeler: Ellajik Asit, Gallik Asit, hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu, miktar tayini, yüksek performanslı sıvı kromatografisi.

SUMMARY

THE ISOLATION AND THE DETERMINATION OF ELLAGIC ACID AND GALLIC IN TURKEY'S WALNUT TREE BY ACCELERATED SOLVENT EXTRACTION

In this study, the samples were collected from Turkey's walnut trees, extracted by accelerated solvent extractor and determined the Ellagic acid (EA) and the Gallic Acid (GA) amounts by applying reverse phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC). Ellagic Acid ve Gallic Acid are polyphenolic compounds. Ellagic Acid plays significant role in human health by preventing the improvement of cancer. A number of studies have been reported on lung, throat, skin and colorectal cancer about the healing of EA. Accelerated Solvent Extractor (ASE100) was used for the extraction of the samples. Conditions for the extraction were set as: methanol-water 90-10; temperature 100°C; static time 1 min; cleaning volume 50 %; cleaning time 60 sec; static cycle 3 cycles. The mobile phase components were A: 0,025M KH_2PO_4 / H_3PO_4 buffer solution (pH: 3,0) and B: Acetonitril (ACN). Various gradient elution systems were tried and the proper system was chosen considering the retention times and the resolution by using the A and B. The RP-HPLC system consisted of Phenomenex Luna C18 (2) 4,6 mm x 250 mm, 5 μm column and diode detector (DAD). The band width was 4 nm and the wavelength $\lambda=255$ nm. The five samples were studied: Walnut tree's trunks; approximately 70 year-old walnuts tree's bark (K-70); approximately 100 year-old walnut tree's bark (K-100); buds of Şebin and Pedro walnuts. The constructed calibration curve was $y=189,904x + 1,101$ $r^2: 0,9968$. The recovery was founded 35-43 %. The calculated amounts of EA the in the walnut tree's trunks was founded 39,3 mg/ 100g with the RSD of % 21,65. The limit of quantification (LOQ) and limit of detection (LOD) values were detected respectively as 13 ng.mL^{-1} (signal/ noise: 10/1) and 60 ng mL^{-1} (signal/ noise: 3/1).

Key words: Accelerated solvent extraction, determination, Ellagic Acid, Gallic Acid, high performance liquid chromatography.

SEMBOLLER

°C	: Santigrad derece
L	: Litre
mL	: Mililitre
µL	: Mikrolitre
mm	: Milimetre
µm	: Mikrometre
nm	: Nanometre
psi	: Basınç birimi
bar	: Basınç birimi
mg	: Miligram
g	: Gram
%	: Yüzde
% RSD	: % Bağlı standart sapma
R_t	: Alıkonma zamanı
mol.L⁻¹	: Konsantrasyon
dak	: Dakika
s	: Saniye
g.mol⁻¹	: Mol kütlesi

KISALTMALAR

HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
DAD	: Diod Dizi Dedektör
ASE	: Hızlandırılmış Çözücü Ekstraksiyonu
RP-HPLC	: Ters Fazlı Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
EA	: Ellajik Asit
GA	: Gallik asit
ACN	: Asetonitril
HCl	: Hidroklorik asit
UV	: Ultraviyole
UV-VIS	: Ultraviyole görünür bölge
FT-IR	: Fourier transform infrared spektrometresi
DMSO	: Dimetil sülfoksit
NMP	: 2-metil-1-pirolidin
ppb	: milyarda bir birim

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Ellajik Asidin açık formülü.....	3
Şekil 2.2. Ellajitanenlerin hidrolizi ile Ellajik Asit oluşumu	4
Şekil 2.3. Sebest haldeki Ellajik Asit, heksahidroksidifenikasit formunda şeker bağlı olarak bulunan Ellajik Asit, Ellajik Asit glikoziti.....	5
Şekil 2.4. Gallik Asidin açık formülü	5
Şekil 2.5. Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu cihazı şematik gösterimi.....	10
Şekil 2.6. Ekstraksiyon hücresi	11
Şekil 2.7. Toplama kabı	12
Şekil 2.8. ASE Cihazı.....	13
Şekil 2.9. HPLC cihazının şematik gösterimi	18
Şekil 3.1. Standart Ellajik Asit çözeltisinin kromatogramı.....	30
Şekil 3.2. Standart Ellajik Asit çözeltisinin HPLC-DAD dedektörle alınan UV spektrumu.....	30
Şekil 3.3. Şebin örneğinin kromatogramı	32
Şekil 3.4. Pedro örneğinin kromatogramı	33
Şekil 3.5. Pedro örneği ile Ellajik Asit standardının HPLC-DAD dedektörle alınan UV spektrumlarının karşılaştırılması.....	33

Şekil 3.6. Dereceli elüsyon I'in kullanıldığı Ellajik Asit

standardının kromatogramı..... 34

Şekil 3.7. Dereceli elüsyon II'in kullanıldığı Ellajik Asit

standardının kromatogramı..... 35

Şekil 3.8. Dereceli elüsyon III'ün kullanıldığı Ellajik Asit

standardının kromatogramı..... 36

Şekil 3.9. Standart Ellajik Asit çözeltisi kromatogramı..... 37

Şekil 3.10. Ceviz örneği rendesi (RS-II) örneği kromatogramı 38

Şekil 3.11. Ceviz örneği rendesi (RS-II) örneği ile

Ellajik Asit standartının HPLC-DAD dedektörle

UV spektrumlarının karşılaştırılması.....38

Şekil 3.12. Yaklaşık 70 yıllık ceviz kabuğu (K-70) örneği kromatogramı..... 39

Şekil 3.13. EA standardının kromatogramı..... 40

Şekil 3.14. Yaklaşık 70 yıllık ceviz kabuğu (K-70) örneği ile

Ellajik Asit standardının HPLC-DAD dedektörle

UV spektrumlarının karşılaştırılması..... 40

Şekil 3.15. Yaklaşık 100 yıllık ceviz kabuğu (K-100) örneği kromatogramı..... 41

Şekil 3.16. Yaklaşık 100 yıllık ceviz kabuğu (K-100) örneği ile

Ellajik Asit standardının HPLC-DAD dedektörle

UV spektrumlarının karşılaştırılması.....42

Şekil 3.17. Dereceli elüsyon IV sisteminde

Ellajik Asit standardının kromatogramı43

Şekil 3.18. Gallik Asit standardının kromatogramı47

Şekil 3.19. Ceviz ağacı atığı (rende) örneğinin kromatogramı48

Şekil 3.17. Dereceli elüsyon IV sisteminde

Ellajik Asit standardının kromatogramı48

Şekil 3.20. 3.19'daki ceviz ağacı rende örneği ile Şekil 3. 17'deki EA standardının

HPLC-DAD dedektörle alınan UV spektrumlarının karşılaştırılması.....48

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1. Ellajik asitin organik çözücülerde kalitatif olarak çözünmesi	4
Tablo 2.1. Ekstraksiyon tekniklerinin kıyaslanması	9
Tablo 2.2. Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonunda kullanılan genel çözücü hacimleri	13
Tablo 2.3. Diyoksin ve Furan ekstraksiyon koşulları (Çevresel örnekler)	14
Tablo 2.4. Diyoksin ve Furan ekstraksiyon koşulları (Çevresel örnekler)	17
Tablo 3.1. Dereceli elüsyon sistemi	30
Tablo 3.2. Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu koşulları 1.....	31
Tablo 3.3. Dereceli Elüsyon I	34
Tablo 3.4. Dereceli Elüsyon II	35
Tablo 3.5. Dereceli Elüsyon III.....	35
Tablo 3.6. Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu koşulları 2.....	37
Tablo 3.7. Dereceli Elüsyon IV.....	43
Tablo 3.8. Ölçü eğrisinde elde edilen pik alanı değerleri	44
Tablo 3.9. Ölçü eğrisinde elde edilen doğruların eğim, kayım ve korelasyon katsayısının karesi değerleri	45
Tablo 3.10. Üç paralel rende örneğinin analiz sonuçları	46

BÖLÜM I.

GİRİŞ VE AMAÇ

I.1. GİRİŞ

Polifenoller yaygın olarak çay, kırmızı şarap, meyveler, içkiler ve çeşitli tıbbi bitkilerde bulunmaktadır (1, 2). Sert kabuklu ağaçlar polifenol türlerinden olan ellajik asit (EA), gallik asit (GA) içerir. Bitki tanninlerinde yaygın olarak bulunan bir fenolik asit olan EA, gallik asidin dimeridir (3, 4). Ayrıca EA sert ağaç örneklerinde yaygın olarak bulunur (3, 5).

EA başta ahududu, çilek, kızılcık, ananas, ıhlamur, limon, fındık, ceviz gibi kabuklu yemişler, pekan cevizi ve nar olmak üzere 40 çeşitten fazla meyvede rapor edilmiştir (6-9). Bitkilerde birçok türevi halinde bulunur ve bunların çözünürlükleri, reaktiviteleri, mobiliteleri farklıdır (10). EA glukozla esterleşmiş olarak bulunur. Ellagitanninler asitle hidrolizlenerek serbest EA oluşturdıklarından, EA'nın birincil kaynaklarıdır (11). Toplam EA'nın tayini için temel bir kimyasal işlem olan hidroliz adımı gerekir (12). Ellagitaninin asit hidrolizi ile ara ürün olarak heksahidroksidifenik asit (HHDP) ve glukoz oluşur. Daha sonra HHDP kendi içindeki bir tepkime sonucunda su çıkışıyla EA'ye dönüşür (6,13). Bu çalışmada hidroliz işlemi yapılmamış, buna karşın bozunmamış olan EA tayini yapılmıştır.

I.2. AMAÇ

Bu çalışmada Türkiye'de yetişen ceviz ağaçlarında bulunan EA'nın ve GA'nın miktar tayinlerinin yapılması amaçlanmıştır. Ceviz ağacındaki bu maddeler hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu (ASE) yöntemi kullanılarak izole edilerek, yüksek geri kazanımlı, ucuz, basit ve kolay bir ekstraksiyon yöntemi geliştirilmesi hedeflenmiştir.

BÖLÜM II.

GENEL BİLGİLER

II.1. CEVİZ (*JUGLANS REGIA L.*)

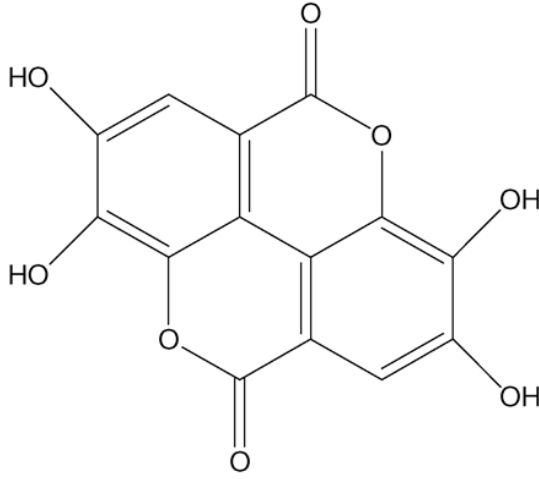
II.1.1. Ceviz Ağacının Genel Özellikleri

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

II.2. POLİFENOLLER

Şarap, çay, çilek, böğürtlen, elma, vişne, patates, soya gibi birçok gıdada çeşitli polifenoller görülmektedir. Antioksidan, kanser önleyici 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 (14).

II.2.1. Ellajik Asit ve Özellikleri



Şekil 2.1. Ellajik asidin açık formülü

EA IUPAC ismi : 2,3,7,8-tetrahidroksi[1]benzopirano

[5,4,3-cde][1]benzopiran-5,10-dion

Kapalı formülü : C₁₄H₆O₈

Molekül ağırlığı : 302,197 g/mol

Görünüşü : Açık sarı renkte, toz, katı

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), (6,15).



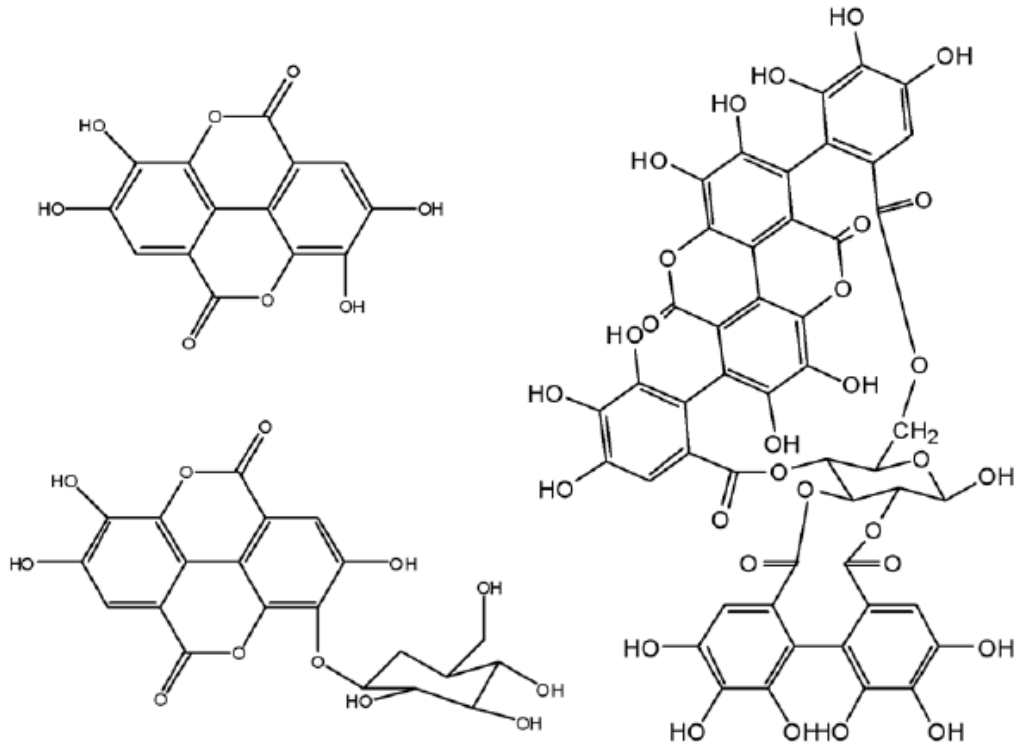
Şekil 2.2. Ellajitanenlerin hidrolizi ile Ellajik Asit oluşumu.

Tablo 1.1. Ellajik asidin organik çözücülerde kalitatif olarak çözünmesi (9).

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

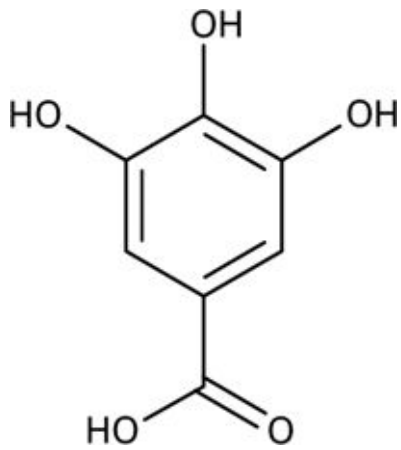
Ayrıca yaptığım çözücü denemeleri çalışmalarında 4,9 mg EA’in 28 mL metil alkolde, 5,2 mg EA’in 3,3 mL DMSO çözücüsünde, 5,5 mg EA’in 14 mL DMF çözücüsünde, 5 mg EA’in 3,4 mL THF çözücüsünde çözüldüğünü gözlemledim.

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



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

II.2.2. Gallik Asit ve Özellikleri



Şekil 2.4. Gallik asidin açık formülü

GA IUPAC ismi : 3,4,5-trihidroksibenzoik Asit

Kapalı formülü : $C_7H_6O_5$

Molekül ağırlığı : 170,12 g/mol

Erime noktası : 250 °C, 523 K, 482 °F

Görünüşü : Beyaz renkte, kristal, katı

Sudaki çözünürlüğü : Anhidrat standart için 100 ml suda 1.1 g (20 °C), monohidrat standart için 100 ml suda 1.5 g (20 °C).

II.2.3. Ellajik Asit ve Gallik Asidin Farmakolojik Özellikleri

Sert gövdeli ağaçlarla çalışma esnasında en çok korkulan etkilerden biri ağaç tozu kaynaklı mesleki sinonasal kanseridir (16). EA'in yapı taşı olan gallik asit esterleri DNA'ya direkt olarak toksik etki göstermiştir (17). Bu özelliklerinin yanı sıra kolon kanseri (18), akciğer ve yemek borusu kanserlerini (19) de önleyici etkisi olduğuna dair araştırmalar da bulunmaktadır. Hemostatik etkisi ve deriyi beyazlatıcı etkisi de bulunan EA'in kanser oluşumu önleyici etkisiyle ilgili yaklaşık on yıldır çalışmalar yayımlanmıştır (6, 7).

Bir ilaç adayı olan EA antioksidan işleviyle Japonya'da, izinli olarak, gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. (20, 21). Bu nedenle gerek önümüzdeki yıllarda ilaç preparatı olarak pazara sunulma olasılığı gerekse günümüzde yapılan araştırmalarda kullanılması açısından tayin metotları gıda hijyeni açısından olduğu gibi önem taşımaktadır (8).

II.2.4. Ellajik Asit ve Gallik Asit ile Yapılan Diğer Çalışmalar

İnce toz edilmiş meşe ve ceviz ağacı örneklerinde ekstraksiyon işlemi metanol kullanılmış ve sonikasyon uygulanmıştır (22). Taze meyvelerle yapılan bir çalışma metanolde homojenizasyon yapılmış ve homojenat reflüks edilerek süzölmüş; seyreltik. HCl çözeltisi ilave edilerek katı faz ekstraksiyonu uygulanmıştır

(8). Kestane kabuğundan ekstraksiyonda ise Bianco MA, Handaji A, Savolainen H'nin 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 (24).

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 (23);

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 (25);

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 (6);

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 (13);

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) kullanılmıştır (9).

II.3. HIZLANDIRILMIŞ ÇÖZÜCÜ EKSTRAKSİYONU (ASE)

Örnek ekstraksiyon teknikleri:

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

Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonun kullanılan diğer yaygın adları:

- 1) Basınçlı çözücü ekstraksiyonu,
- 2) Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu,
- 3) Basınçlı akışkan ekstraksiyonu,
- 4) Basınçlı sıcak çözücü ekstraksiyonu
- 5) Yüksek basınçlı çözücü ekstraksiyonu
- 6) Yüksek basınç yüksek sıcaklıkta çözücü ekstraksiyonu
- 7) Subkritik çözücü ekstraksiyonu (26)

Son yıllarda analitik ekstraksiyonlarda kullanılan tehlikeli organik çözücü miktarını azaltma ihtiyacı, yeni ekstraksiyon tekniklerinin geliştirilmesine katkı sağlamıştır (27). Son otomatikleştirilmiş ekstraksiyon teknikleri daha az çözücü kullanır ve gelişmiş analitik kararlılık verir (28). 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 2.5) (29, 30). ASE sokslet ve ultrasonik ekstraksiyon gibi tekniklerden daha kısa ekstraksiyon zamanı ve daha az çözücü tüketimine sahip bir ekstraksiyon tekniğidir (32) (Tablo 2.1). Sokslet ekstraksiyonu için kullanılan ekstraksiyon çözücüleri ASE içinde kullanılabilir. Bundan dolayı ASE klasik ekstraksiyon tekniklerinin yerine geçerek geliştirilmiştir (32).

Tablo 2.1. Sıvı ekstraksiyon tekniklerinin kıyaslanması.

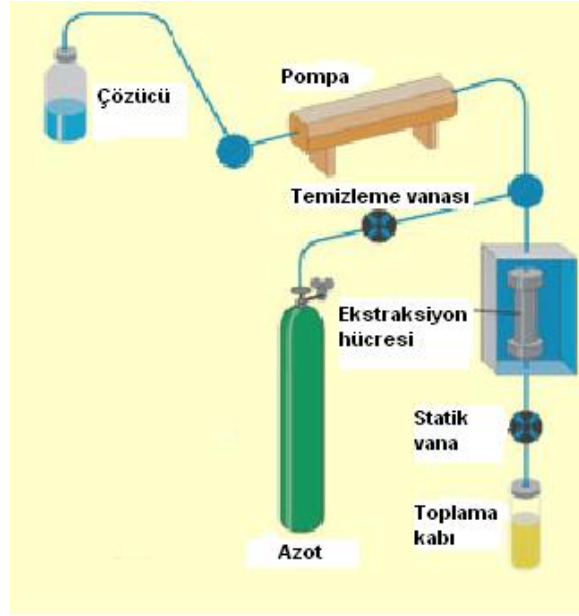
Teknik	Örnek Miktarı (g)	Çözücü Hacmi (mL)	Örnek/Çözücü (x10)
Sokslet	10-30	300-500	0,33-0,60
Sonikasyon	30	300-400	0,75-1,00
Mikrodalgalı ekstraksiyon	5	30	1,67
Çalkalama	50	300	1,67
Otomatik sokslet	10	50	2,00
ASE	10-100	15-120	6,67

Son yıllarda, ASE katı atıklar (33), toprak (34-36), yosun ve çam ağacı (37), hayvan yemi, yiyecek matrisleri (38) ve tortu (39) 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 etmiştir (28).

Genel olarak ASE' nin ekstraksiyon verimi, ASE' nin ekstraksiyon parametreleri olan ekstraksiyon basınç ve sıcaklığından etkilenir (40). Ek olarak örnek matriksi ekstraksiyon verimini etkiler (41). 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 (32).

Süper kritik akışkanlı ekstraksiyon tarım ilaç kalıntı analizleri için adapte edilmiş bir tekniktir. Tarım ilaçları mikrodalga etkili ekstraksiyondan sonrada analiz edilebilir (28).



Şekil 2.5. Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu cihazı şematik gösterimi

Hızlandırılmış Çözücü Ekstraksiyonu (ASE) Cihazının Özellikleri

ASE' de, çelik bir kap içerisine yerleştirilen (Şekil 2.6) katı yada yarı-katı örneğin çözücü ile bir fırın içerisinde 50-200 °C arasında değişen sıcaklıklarda ısıtılması ile başlar ve ısıtma sırasında fırına 500-3000 psi değerleri arasında basınç uygulanır (Şekil 2.8). Ekstraksiyonun 5-10. dakikalarında ortama yeni çözücü pompalanarak örneğin ve kabın yıkanması sağlanmaktadır. Sistem içerisindeki bütün çözücü genellikle nitrojen gazı kullanılarak bir şişe içerisinde (Şekil 2.7) toplanmaktadır (42).



Şekil 2.6.. 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.



Şekil 2.7. Toplama kabı

Yüksek basınç, çözücünün, deney materyalinin iç kısımlarına kadar nüfuz etmesine imkân sağlamaktadır.

ASE geleneksel sıvı ekstraksiyon yöntemlerinden daha hızlıdır.

ASE geleneksel ekstraksiyon yöntemlerinden daha az çözücü (Tablo 2.1) kullanır.

ASE matrikse bağıllık göstermez.

ASE geleneksel yöntemlerde halen kullanılan çözücülerini kullanır. Bundan dolayı metot geliştirmek basittir.



Şekil 2.8. Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu cihazı

Tablo 2.2. Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonunda kullanılan genel çözücü hacimleri.

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

ASE ve sokslet ekstraksiyonu arasındaki önemli fark ekstraksiyon sıcaklığıdır (Tablo 2.3). ASE’ de ekstraksiyon sıcaklığı çözücünün normal kaynama noktası üzerinde kullanılır. Aksine sokslet ekstraksiyonunda ekstraksiyon sıcaklığı kullanılan çözücünün kaynama noktası ile sınırlıdır. Yüksek sıcaklıklarda, polimer partiküllerinin içinden bileşenlerinin difüzyonu yüzeylerinde artırılmıştır. Ayrıca ekstraksiyon çözücüsü içinde partiküllerin yüzeyden transferi daha hızlı olacaktır. Buna ek olarak ekstraksiyon sıvısındaki bileşenlerin çözünürlüğü yüksek sıcaklıkta çalışıldığı zaman yükseltilebilecektir. Bundan dolayı yüksek sıcaklıktaki ekstraksiyon değeri anlamlı ölçüde yüksek olacaktır (43).

Tablo 2.3. Diyoksin ve Furan ekstraksiyon koşulları (Çevresel örnekler).

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

II.4. KROMATOĞRAFI

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

a) Ayrılma mekanizmalarına göre:

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

b) Uygulama biçimine göre

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

c) Faz tipine göre:

- 1) Sıvı kromatografisi**
 - Sıvı-Katı kromatografisi
 - Sıvı-Sıvı kromatografisi
- 2) Gaz kromatografisi**
 - Gaz-Katı kromatografisi

-Gaz-Sıvı kromatografisi

II.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 (44).

HPLC'nin avantajları:

- HPLC kolonu, rejenerasyon gerekmesizin pek çok kez kullanılabilir.
- HPLC tekniği kullanıcının becerisine daha az bağımlıdır ve tekrarlanabilirlik daha yüksektir.
- Nicel analiz kullanılabilir.
- Analiz süresi kısadır.
- Duyarlık 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 sistemi yer değiştirilerek geliştirilmiş bir sistemdir (Tablo 2.2.). Bu sistemde kolon apolar, mobil faz ise metanol, asetonitril ve su gibi polar çözücüler kullanılır. Geliştirilen bu teknikte örnek ve kolon hidrofobik bir etkileşim oluşturur. C₁₈, C₈, C₄, C₂, fenil gibi kolonlar ters faz sıvı kromatografisinde kullanılan kolon çeşitleridir.

Tablo 2.4. 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 sistem türleri:

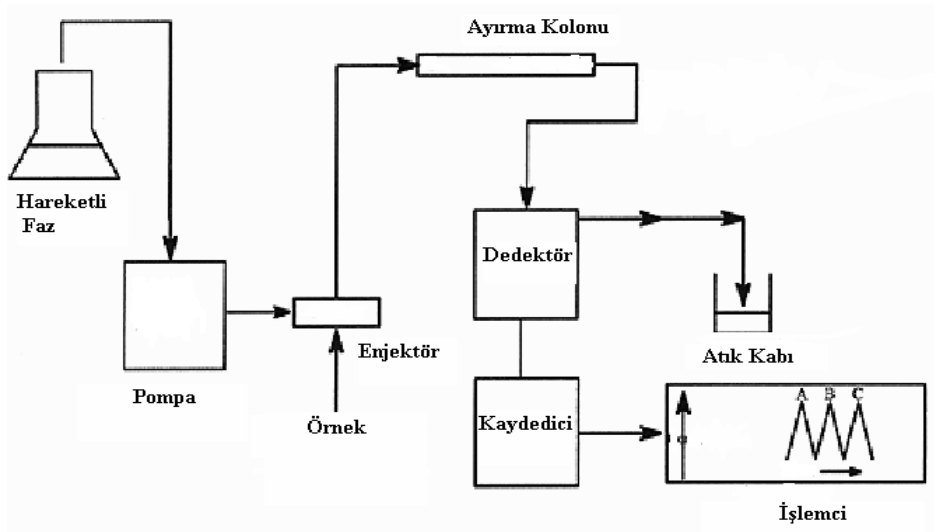
İzokratik sistem: Bu sistemde tek pompa ve tek çözücü kullanılır. Kullanılan çözücü bir karışım olabilir. Bu sistemdeki ayırım yetersizdir.

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 ya da üç pompa ve polariteleri önemli derecede birbirinden farklı iki yada üç hareketli faz vardır. Karışma pompadan sonra meydana gelir.

HPLC cihazı başlıca üç bölümden oluşur:

Çözücü dağıtma bölümü, ayırma kolonu, dedektör ve kaydedici sistem (Şekil 2.9)



Şekil 2.9. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazının şematik gösterimi

II.4.1.1. Çözücü Dağıtma Sistemi

Çözücü pompalama sistemi HPLC’de en önemli kısımlardan biridir. Kolon giriş ve çıkışı arasında oluşturulması gereken yüksek basınç farkı, kolon girişine bir pompa yoluyla uygulanan basınç ile sağlanır. Pompanın performansı, analitik

sonuçlardaki tekrarlanabilirliği, nicel değeri, gözlenebilme sınırı vb. değerleri büyük ölçüde etkiler.

Pompalama sistemlerinin farklı tipleri şunlardır:

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

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

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

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

Şırınga tipinde pompalarda, elektriksel olarak hareket eden kurşun vida, verilen çözücü hacmini yeterli basınçta tutan bir pistonu hareket ettirir. Bu

pompaların başlıca avantajı, yüksek basınçta (7500 psi'a kadar) serbest pulslu akış sağlama yetenekleridir ve akış hızı, çalışılan basınçtan bağımsızdır.

II.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.

Birçok uygulama için kolon sıcaklığının yakından kontrolü gerekli değildir ve kolonlar oda sıcaklığında kullanılırlar. Ancak, çoğu zaman, kolon sıcaklığı,

derecenin onda birkaçı hata ile sabit tutulduğu zaman daha iyi kromatogramlar elde edilmektedir. Birçok modern ticari cihaz, kolon sıcaklığını oda sıcaklığından, 100-150°C' ye kadar her sıcaklıkta onda birkaç derece hata ile sabit tutabilen kolon ısıtıcıları ile donatılmıştır (44).

II.4.1.3. Dedektörler

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

Bir dedektörde bulunması gereken önemli karakteristikler:

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

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

HPLC dedektörlerinin iki tipine rastlamak mümkündür.

1. Genel dedektörler
2. Seçici dedektörler

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

Dedektörün görevi örnek konsantrasyonu ile orantılı elektriksel bir cevap üretmektir.

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

UV-VIS dedektör, kolondan ayrılarak dedektöre ulaşan bileşenlerin ultraviyole bölgede yaptığı absorbansın ölçümüne dayanır. Tek bir dalga boyunda çalışan dedektörler 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 (cıva) lambası, çeşitli dalga boylarını ölçebilen dedektörlerde ise döteryum lambası kullanılır.

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

Eser miktardaki analizlerde (örnek derişimi 1 ppb den daha düşükse) floresans veya elektrokimyasal dedektörler kullanılmalıdır. Floresans özellikleri taşıyan bileşiklerin analizinde spektrofotometrik dedektörlere oranla duyarlılığı daha fazla olan floresans dedektörlerin kullanılması mümkündür. Bu dedektör ile 10^{-11} g.mL⁻¹ gibi çok düşük 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.

10^{-11} - 10^{-12} g.mL⁻¹ değerinde gözlenebilme sınırına 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 (44).

II.5. KULLANILAN İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER

II.5.1. Aritmetik Ortalama

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

II.5.2. Standart Sapma

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

II.5.3. % Bağlı Standart Sapma

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

II.5.4. Geri Kazanım

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

m_1 : Ekstrakte edilecek katı madde miktarı

m_2 : Ekstraksiyon sonucunda elde edilen katı madde miktarı

BÖLÜM III

TEZ ÇALIŞMALARI

III.1. GEREÇ VE YÖNTEM

III.1.1. Kimyasal Maddeler

Ceviz ağacı örneklerinden Şebin ve Pedro türleri Bandırma Ezer Fidancılık'tan diğer örnekler ise Isparta'dan temin edilmiştir.

<u>Kimyasalın adı:</u>	<u>Firma:</u>
Ellajik asit (≥ 95 saflıkta)	Sigma E2250
Gallik asit (≥ 99 saflıkta)	Sigma
Metanol (HPLC saflıkta)	Merck
Asetonitril (HPLC saflıkta)	Merck
KH_2PO_4 (136.086 g.mol ⁻¹)	Merck
H_3PO_4	Merck

III.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) Heidolph WB 2000 su banyosu
- 7) KNF LAB, Laboport vakum cihazı
- 8) Falc instruments manyetik karıştırıcı
- 9) Arzum Mulino /AR 151 kahve öğütücü
- 10) Nuaire -85° C Ultralow Freezer soğutucu

HPLC Donanımı:

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

HPLC koşulları:

Kolon: Luna 5µ C18(2) 250 mm * 4,6 mm

Hareketli Faz A: KH_2PO_4 (0,05 M; H_3PO_4 ile pH:3,0'e ayarlandı)

Hareketli Faz B: ACN

Dedektör: DAD UV λ : 254 nm

Akış Hızı: 1,000 ml/dak

Kolon sıcaklığı : 24° C

Enjeksiyon hacmi : 20 μ L

Dalga boyu : 254 nm (bant genişliği: 4 nm)

Kullanılan dereceli elüsyon sistemi: Hareketli faz B (ACN) oranı % 7 oranıyla başlayıp sekizinci dakika sonunda %40'a, on üçüncü dakika sonunda %50'ye çıkması sağlanmıştır. Daha sonra düzenli olarak azalarak on sekizinci dakika sonunda yine başlangıç oranı olan %7'ye düşürülmüştür.

Ayrıca pik tanımlanması için 190- 400 nm UV spektrumları kaydedildi. Bütün cam malzemeler deiyonize su ile kalibre edildi.

III.1.3. Çözeltiler

Stok Çözeltilerin Hazırlanması:

Stok Ellajik Asit Çözeltisi: 20 mg EA 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 GA tartılır. Metanol ile 50'ye tamamlanır. Stoğun konsantrasyonu $1,18 \times 10^{-3}$ mol. L⁻¹ ' dir.

HPLC Hareketli Faz Çözeltileri:

Hareketli Faz A: 0,025 M KH₂PO₄ (pH 3,0) tamponu.

Hareketli Faz A'nın Hazırlanışı: 3,4000g $\pm$ 0,0005 g KH₂PO₄ tartıldı. 900 ml ultra distile suda çözüldü. Fosforik asit ile pH:3,0'e ayarlandı.

Hareketli Faz B : %100 ACN

III.1.4. Ekstraksiyon İşlemleri

Ceviz ağacı atığı (rende) çalışmalarında aynı koşullar için 3 tartım alınarak paralel çalışma yapıldı. HPLC piklerine ait alan değerleri için hesaplanan % RSD değerleri 3 örnek (tartım) için hesaplandı.

ASE Koşulları: 1,5000 g $\pm$ 0,5 mg ceviz ağacı örneği ve 1,5000 g $\pm$ 0,5 mg diatom toprak tartılarak filtre kağıdıyla sarıldı, 10 mL' lik ekstraksiyon hücresine yerleştirildi.

Sıcaklık :100° C

Statik zaman : 10 dak.

Temizleme hacmi : % 60

Yıkama zamanı : 90 s.

Statik devir : 3

III.1.5. Kromatografik Koşullar

Ekstrakt çözücüler 60° C' de kuruluğa kadar uçuruldu. 10 mL hareketli faz A-B çözelti karışımında 50:50 (v/v) çözüldü. 0,45 μ m membran filtreden süzüldü. Tablo 3.1' de verilen HPLC sistemine 20 μ L enjekte edildi.

III.2. BULGULAR

III.2.1. Ön denemeler

Kestane kabuğundan elde edilmiş olan ticari standart ile aşağıda verilen ön denemeler yapıldı.

III.2.1.1. Ellajik Asit Standardının Kromatogramı

Örnek Hazırlanması: 10 mg ellajik asit standardı tartıldı. Saf metanol ile 50 mL'ye tamamlanarak ellajik asit stok standart çözeltisi hazırlandı. Stok standart çözeltisinden 0,25 mL alınıp saf metanol ile 10 mL'ye tamamlandı.

Vekiari SA, Gordon MH, Garcia-Macias P, Labrinea H'nin (24) uyguladıkları dereceli elüsyon sisteminde (Tablo 3.1.) kromatogramı alındı. Şekil 3.1.'de standart EA çözeltisinin kromatogramı verilmiştir. Bu çalışmanın kromatografik koşulları şunlardır:

Kolon: Luna 5 μ C18(2) 250 mm * 4,6 mm

Hareketli Faz A: KH₂PO₄ (0,05 M; pH:3,0)

Hareketli Faz B: ACN

Dedektör: DAD UV λ : 254 nm

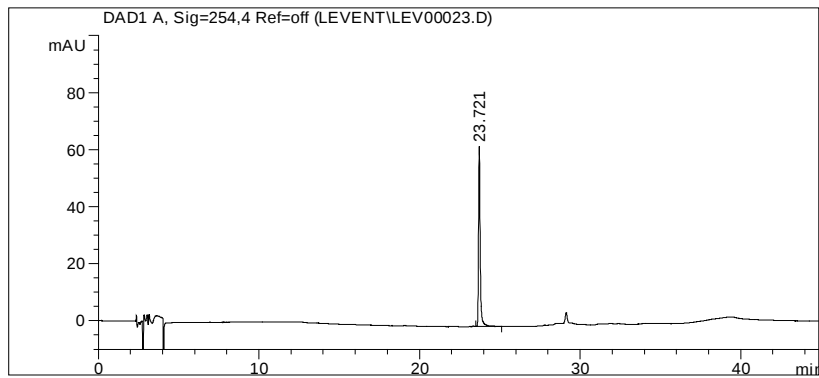
Akış Hızı: 1,000 ml/dak

Enjeksiyon Hacmi: 20 μ L

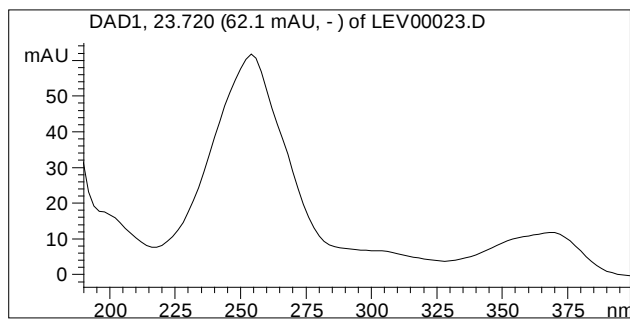
R_t: 23.721 dak

Tablo 3.1. Dereceli elüsyon sistemi (24)

Zaman (dakika)	%B
0,00	7,0
8,00	7,0
25,00	32,0
30,00	35,0
35,00	7,0



Şekil 3.1. Standart EA çözeltisinin kromatogramı. Kolon: Luna 5 μ C18(2) 250 mm * 4,6 mm; hareketli faz A: KH₂PO₄ (0,05 M; pH:3,0); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; UV λ : 254 nm; akış hızı: 1,000 ml/dak; enjeksiyon hacmi: 20 μ L; R_t: 23.721 dak.



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

III.2.1.2. İki Tür Ceviz Ağacı Filizi ile Yapılan Çalışmalar

Bu incelemede II.1.1.'de verilen kromatografik koşullarda ve Tablo 3.2.'de verilen dereceli elüsyon sisteminde çalışıldı.

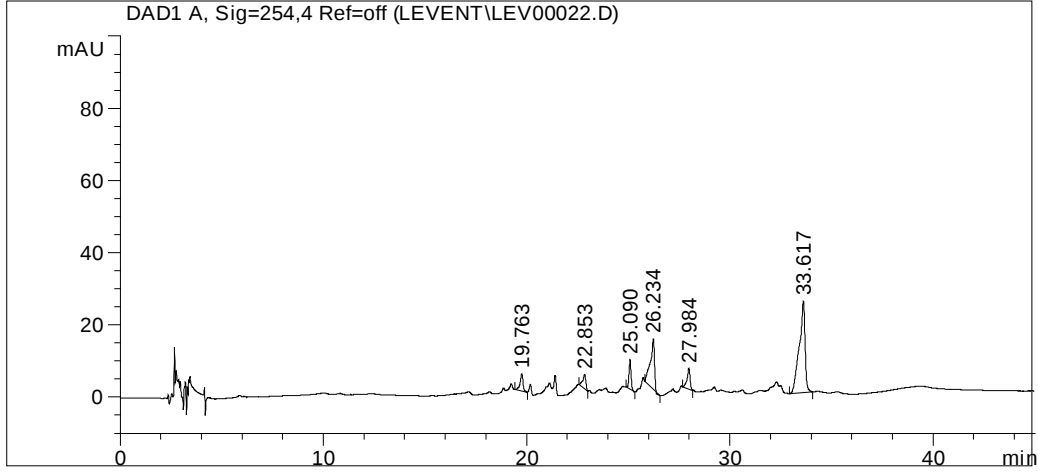
Örnek Hazırlanması: İnce filizler küçük parçalara ayrıldı. Etüvde 50 °C' de 2 saat kurutuldu. Arzum marka öğütücüde öğütülüp, havanda dövüldü. 50 °C' de sabit tartıma gelene kadar (3saat) kurutuldu. İncelenen türler aşağıda belirtilmiştir.

Tür-I; Şebin Örneği: 0,3000 g $\pm$ 0,0001 g örnek tartıldı. 0,3000 g $\pm$ 0,0001 g diatom toprak ilave edilerek siyah bantlı filtre kağıdına sarıldı. Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu (ASE) cihazına verildi. Cihazda uygulanan metot Tablo 3.2.'de verilmektedir.

Tablo3.2. Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu koşulları 1

Sıcaklık	100°C
Statik zaman	1 dakika
Temizleme hacmi	%50
Yıkama zamanı	60 s.
Statik devir	1
Çözücü	(%100) Metanol

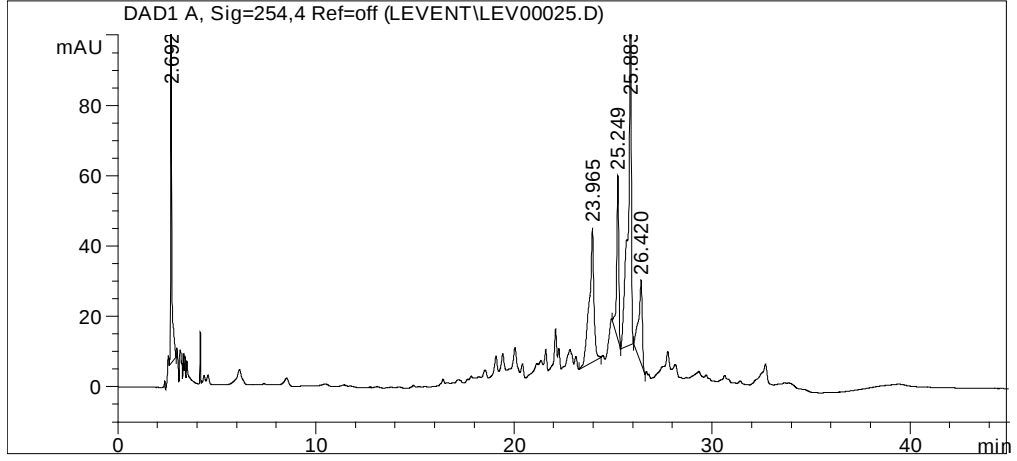
Evaporatörde 60°C'de 30 dak boyunca çözücüsü uçuruldu. Kalıntı 5 mL saf metanolde çözüldü. Örnek 0,45 µm membran filtreden süzüldü. Hiçbir seyreltme işlemi yapılmadan HPLC cihazına 50 µL enjekte edildi. Şekil 3.3.'de Şebin örneğinin kromatogramı verilmiştir.



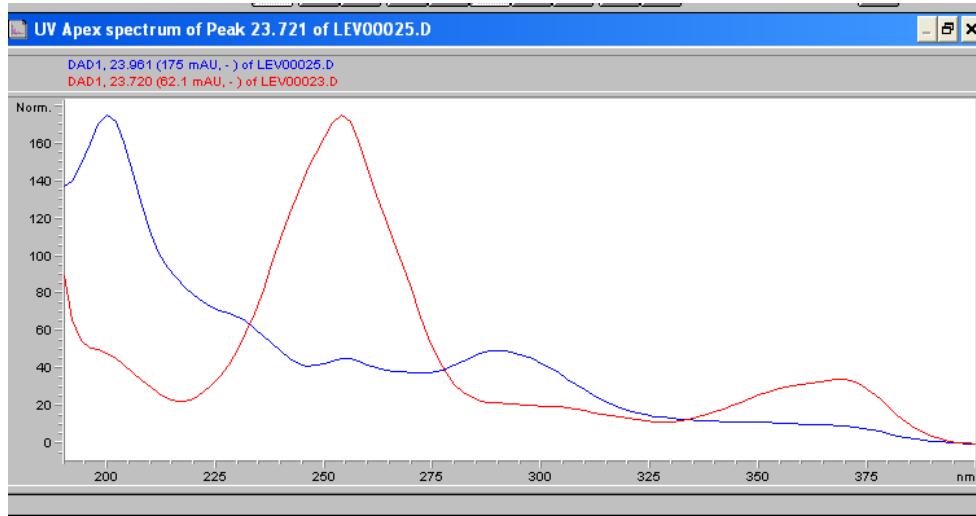
Şekil 3.3. Şebin örneğinin kromatogramı. Kolon: Luna 5µ C18(2) 250 mm * 4,6 mm; hareketli faz A: KH_2PO_4 (0,05 M; pH:3,0); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; UV λ : 254 nm; akış hızı: 1,000 ml/dak; enjeksiyon hacmi: 50 µL

Kromatogram incelendiğinde EA' e ait olan R_t : 23.721 dakikada herhangi bir pik gözlenmemiştir.

Tür-II; Pedro Örneği: 1,2000 g $\pm$ 0,0004 g örnek tartıldı. 1,2000 g $\pm$ 0,0004 g diatom toprak ilave edilerek filtre kağıdına sarıldı. Tablo 3.2.'deki koşullarda ASE cihazına verildi. Alınan ekstraktın çözücüsü evaporatörde 60°C'de 30 dak boyunca uçuruldu. Kalıntı alınıp, 5 mL saf metanolde çözüldü. Örnek 0,45 µm membran filtreden süzüldü. Hiçbir seyreltme işlemi yapılmadan HPLC cihazına 50 µL enjekte edildi. Şekil 3.4.'de Pedro örneğinin kromatogramı verilmiştir.



Şekil 3.4. Pedro örneğinin kromatogramı. Kolon: Luna 5 μ C18(2) 250 mm * 4,6 mm; hareketli faz A: KH₂PO₄ (0,05 M; pH:3,0); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; UV λ : 254 nm; akış hızı: 1,000 ml/dak; enjeksiyon hacmi: 50 μ L; R_tEA: 23.721 dak.



Şekil 3.5. Pedro örneği ile EA standardının HPLC-DAD dedektörle alınan UV spektrumlarının karşılaştırılması. Şekil 3.4.'de verilen kromatografik koşullar uygulanmıştır. Kırmızı renk ellajik asit standart spektrumu; mavi renk pedro örneği spektrumu.

Şekil 3.4.'deki kromatogram incelendiğinde R_t : 23.96 dakika ile önde belirgin, arkada belirgin olmayan kuyruklanmaya sahip bir pik gözlenmiştir. Bu pike ait HPLC-DAD dedektörle alınan UV spektrum, EA standart spektrumu ile karşılaştırıldığında spektrumların birebir çakışmadığı gözlenmiştir.

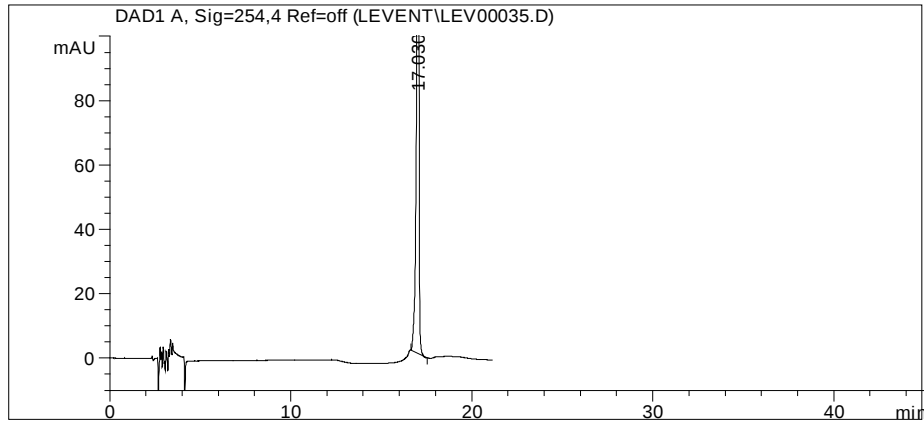
III.2.1.3. Dereceli Elüsyon Sisteminde Yapılan Değişiklikler

Vekiari SA ve ark. nın çalışmasında (24) analiz süresi uzun olduğu için; kısaltmak üzere çeşitli denemeler uygulandı. 3 farklı dereceli elüsyon sisteminde çalışıldı. Bunlara ilişkin dereceli elüsyon şemaları ve kromatogramları aşağıda verilmiştir.

Dereceli Elüsyon I: Kullanılan hareketli faz B oranı Tablo 3.3’ te belirtilmiştir. Şekil 3.6.’da EA çözeltisinin ($1,655 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) kromatogramı verilmiştir.

Tablo 3.3. Dereceli Elüsyon I

Zaman (dakika)	%B
0,00	7,0
8,00	7,0
15,00	40,0
20,00	7,0

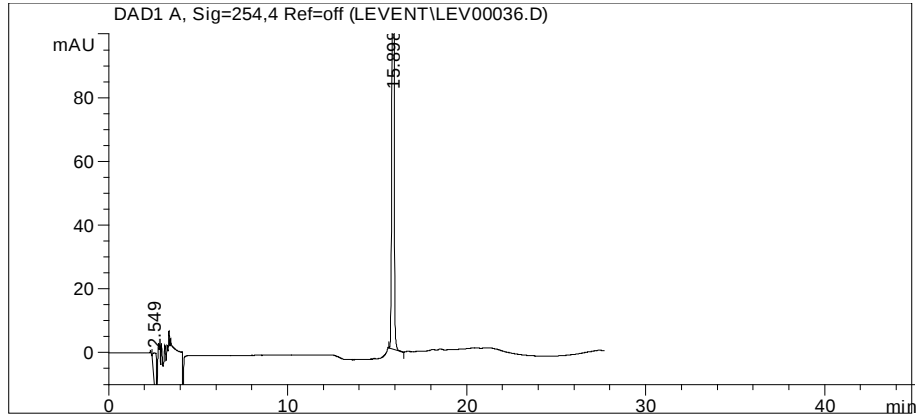


Şekil 3.6. Dereceli elüsyon I’in kullanıldığı EA standardının kromatogramı. Kolon: Luna 5µ C18(2) 250 mm * 4,6 mm; hareketli faz A: KH_2PO_4 (0,05 M; ph:3,0); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; UV λ : 254 nm; akış hızı: 1,000 ml/dak; enjeksiyon hacmi: 50 µL; R_t : 17.030 dak.

Dereceli Elüsyon II: Kullanılan hareketli faz B oranı Tablo 3.4’ de belirtilmiştir. Şekil 3.7’de EA çözeltisinin ($1,655 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) kromatogramı verilmiştir.

Tablo 3.4. Dereceli Elüsyon II

Zaman (dakika)	%B
0,00	7,0
8,00	7,0
13,00	40,0
18,00	50,0
23,00	7,0

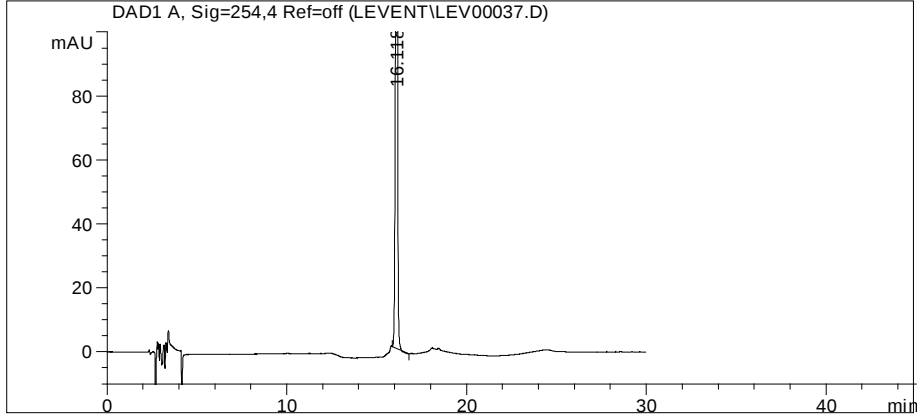


Şekil 3.7. Dereceli elüsyon II'in kullanıldığı EA standardının kromatogramı. Kolon: Luna 5µ C18(2) 250 mm * 4,6 mm; hareketli faz A: KH₂PO₄ (0,05 M; pH:3,0); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; UV λ: 254 nm; akış hızı: 1,000 ml/dak; enjeksiyon hacmi: 50 µL; R_t: 15.898 dak.

Dereceli Elüsyon III: Kullanılan hareketli faz B oranı Tablo 3.5' te belirtilmiştir. Şekil 3.8'de EA çözeltisinin ($1,655 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹) kromatogramı verilmiştir.

Tablo 3.5. Dereceli Elüsyon III

Zaman (dakika)	%B
0,00	7,0
8,00	7,0
15,00	50,0
20,00	7,0



Şekil 3.8. Dereceli elüsyon III'ün kullanıldığı EA standardının kromatogramı. Kolon: Luna 5 μ C18(2) 250 mm * 4,6 mm; hareketli faz A: KH₂PO₄ (0,05 M; pH:3,0); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; UV λ : 254 nm; akış hızı: 1,000 ml/dak; enjeksiyon hacmi: 50 μ L; R_t: 16.118 dak.

Yapılan denemeler sonucunda bundan sonraki çalışmalarda dereceli elüsyon II tablosunun kullanılmasına karar verilmiştir.

Kullanılan dereceli elüsyon II sisteminde hareketli faz B (ACN) % 7 oranıyla başlayıp ilk sekiz dakika oranlarda değişiklik olmamıştır. Sekiz ile on üçüncü dakikalar arası ACN oranı %7 den %40'a doğru düzenli olarak artmaktadır. On üç ile on sekizinci dakikalar arası ACN oranındaki artış %40'tan %50'ye çıkarılmıştır. On sekizinci dakikadan yirmi üçüncü dakikaya giderken ACN oranı, düzenli olarak azalarak, başlangıç pozisyonundaki %7'ye dönmüştür.

III.2.1.4. Ceviz Ağacı Gövdesi Atığı (Rende) ile Yapılan Çalışmalar

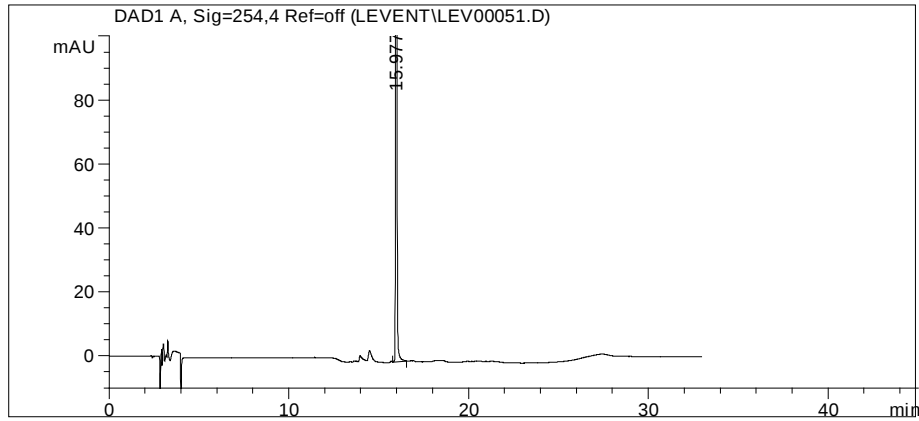
Örnek Hazırlama: Rende örneği etüvde 50°C'de 8 saat kurutuldu. Öğütücü ve havan kullanılarak küçük parçalara bölündü. 50°C'de etüvde sabit tartıma getirildi. 1,5000 g $\pm$ 0,0005 g rende örneği tartıldı. 1,5000 g $\pm$ 0,0005 g diatom toprak ilave edilerek filtre kağıdına sarıldı. ASE cihazına verildi.

ASE cihazının koşulları Tablo 3.6'da belirtilmiştir.

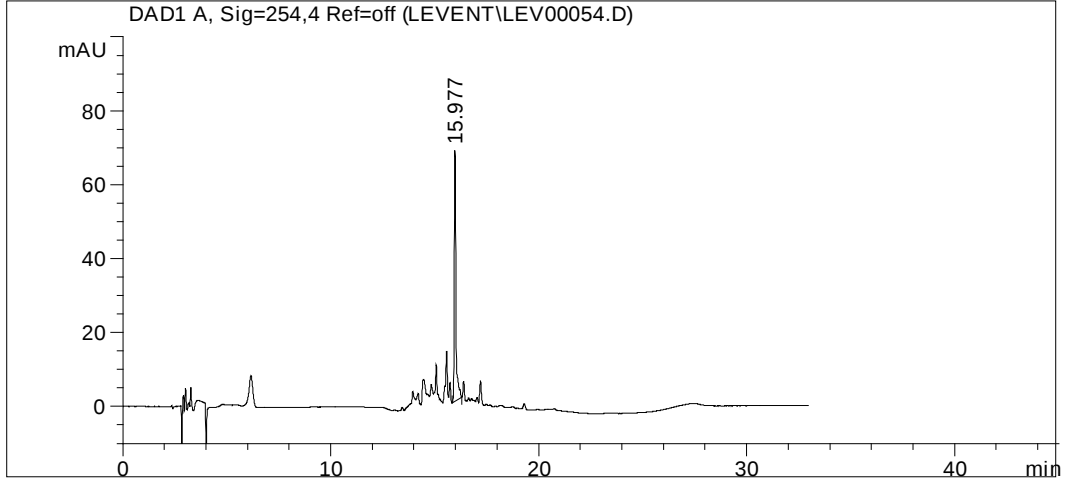
Tablo 3.6. Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu koşulları 2

Sıcaklık	100°C
Statik zaman	1 dakika
Temizleme hacmi	%50
Yıkama zamanı	60 s.
Statik devir	1
Çözücü	(%90) CH ₃ OH – (%10) H ₂ O

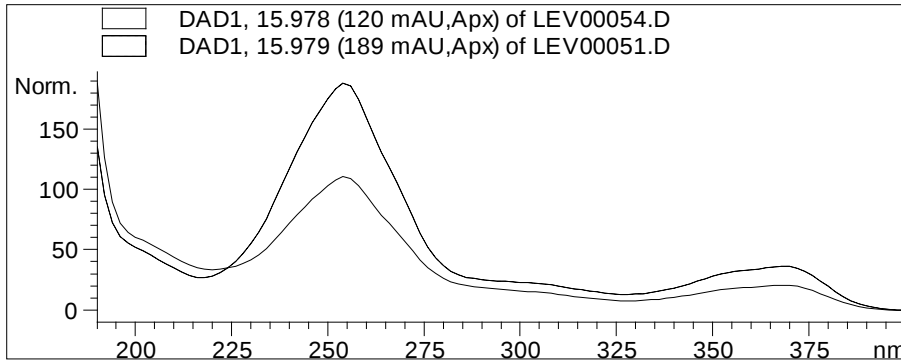
ASE cihazından alınan ekstraktın çözücüsü, evaporatörde 60°C’de 30 dak boyunca uçuruldu. Kalıntı 5 mL saf metanolde çözülüp; rende stok örneği hazırlandı. Örnek 0,45 µm membran filtreden süzüldü. Rengi koyu olduğundan seyreltmeler yapıldı. Rende stok çözeltisinden 1,000 mL alınıp saf metanol ile 10 mL’ye tamamlanarak rende seyreltme I (RS-I) örneği hazırlandı. RS-I örneğinden 1,000 mL alınıp saf metanol ile 10 mL’ye tamamlanarak rende seyreltme II (RS-II) örneği hazırlandı. RS-II HPLC cihazına 20 µL enjekte edildi. HPLC sisteminde Tablo 3.4’ de belirtilen dereceli elüsyon II sistemi kullanılmıştır. Şekil 3.9.’da standart EA çözeltisinin ($1,655 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) kromatogramı verilmiştir.



Şekil 3.9. Standart EA çözeltisinin kromatogramı. Kolon: Luna 5µ C18(2) 250 mm * 4,6 mm; hareketli faz A: KH₂PO₄ (0,05 M; pH:3,0); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; UV λ: 254 nm; akış hızı: 1,000 ml/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µL; R_t: 15.977 dak.



Şekil 3.10. Ceviz ağacı rendesi (RS-II) örneği kromatogramı. Kolon: Luna 5 μ C18(2) 250 mm * 4,6 mm; hareketli faz A: KH₂PO₄ (0,05 M; pH:3,0); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; UV λ : 254 nm; akış hızı: 1,000 ml/dak; enjeksiyon hacmi: 20 μ L, R_{tEA}: 15.977 dak.



Şekil 3.11. Ceviz ağacı rendesi (RS-II) örneği ile EA standardının HPLC-DAD dedektörle alınan UV spektrumlarının karşılaştırılması. Şekil 3.10.'da verilen kromatografik koşullar uygulanmıştır. Kesikli spektrum Ellajik Asit standardının UV spektrumu, düz spektrum ceviz ağacı rendesi (RS-II) örneğinin spektrumudur.

Şekil 3.10.'daki kromatogram incelendiğinde R_t : 15.977 dakikada EA standart kromatogramı ile aynı zamanda gelen bir pik gözlenmiştir. Bu pike ait HPLC-DAD dedektörle alınan UV spektrumu, EA standardının spektrumu ile karşılaştırıldığında birebir çakıştığı gözlenmiştir.

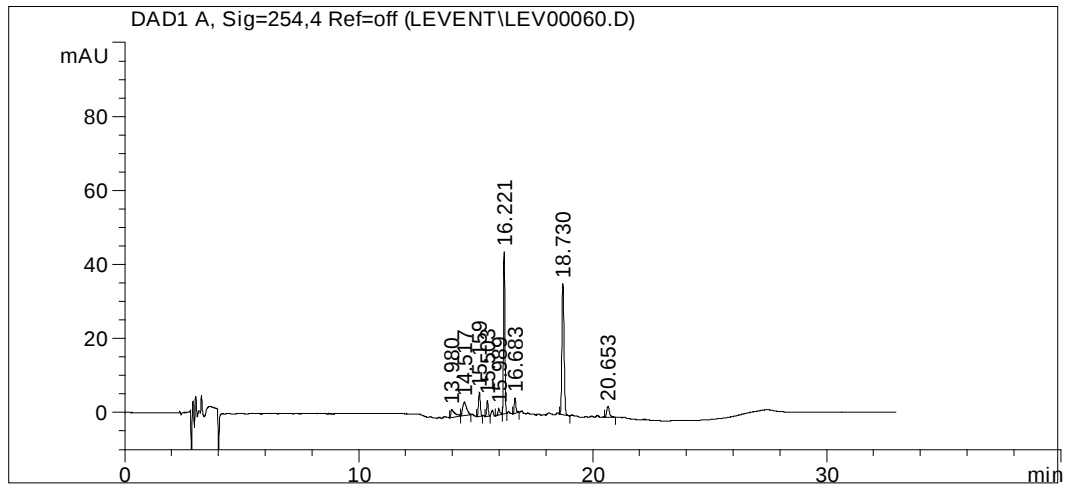
III.2.1.5. Yaklaşık 70 Yıllık Ceviz Ağacı Kabuğu (K-70) Çalışmaları

Örnek Hazırlama: K-70 örneği etüvde 50°C’de 8 saat kurutuldu. Öğütücü ve havan kullanılarak küçük parçalara bölündü. 50°C’de etüvde sabit tartıma getirildi. 1,5000 g $\pm$ 0,0005 g rende örneği tartıldı. 1,5000 g $\pm$ 0,0005 g diatom toprak ilave edilerek filtre kağıdına sarıldı.

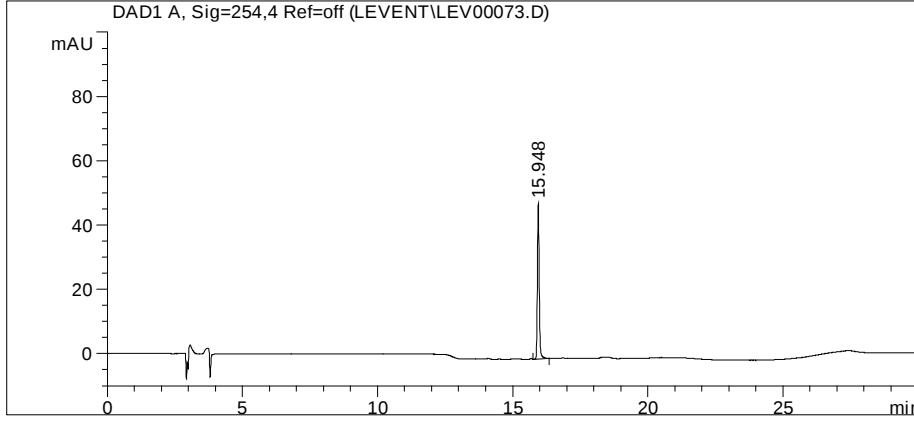
ASE cihazına verildi. ASE cihazının çözücüsü metanol:su (90:10) (v:v) karışımıdır. Statik zaman 1 dakika, temizleme hacmi %50, yıkama zamanı 60 saniye, statik devir 1 olarak ayarlanmıştır.

ASE cihazından alınan ekstraktın çözücüsü, evaporatörde 60°C’de 30 dak. boyunca uçuruldu. Kalıntı 5,000 mL saf metanolde çözülüp; rende stok örneği hazırlandı. Örnek 0,45 μ m membran filtreden süzüldü. Stok çözeltiden 1,000 mL alınıp saf metanol ile 10 mL’ye tamamlanarak seyreltik K-70 çözeltisi hazırlandı.

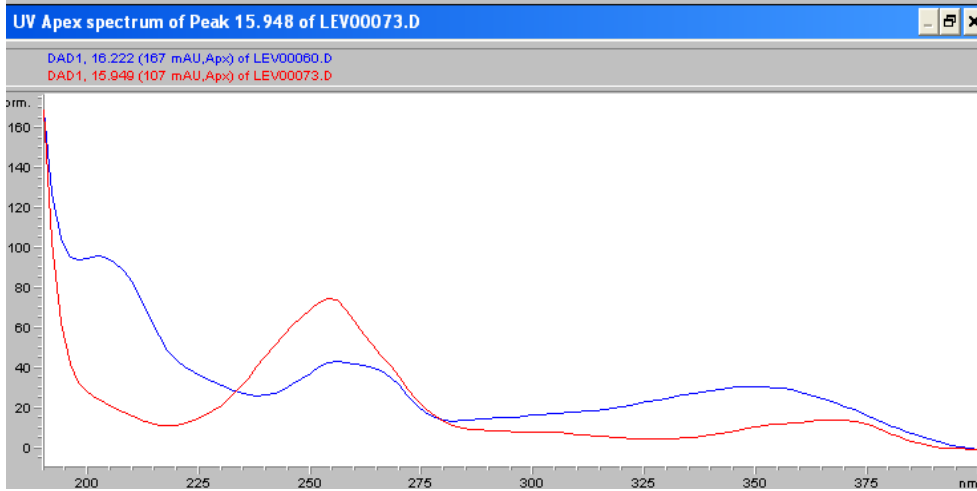
HPLC cihazına 20 μ L enjekte edildi. HPLC sisteminde kullanılan dereceli elüsyon II sistemi Tablo 3.4.’ de belirtilmiştir.



Şekil 3.12. Yaklaşık 70 yıllık ceviz ağacı kabuğu (K-70) örneği kromatogramı. Kolon: Luna 5 μ C18(2) 250 mm * 4,6 mm; hareketli faz A: KH₂PO₄ (0,05 M; pH:3,0); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; UV λ : 254 nm; akış hızı: 1,000 ml/dak; enjeksiyon hacmi: 20 μ L, R_t : 16.221 dak.



Şekil 3.13. EA standardının kromatogramı. Kolon: Luna 5 μ C18(2) 250 mm * 4,6 mm; hareketli faz A: KH₂PO₄ (0,05 M; pH:3,0); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; UV λ : 254 nm; akış hızı: 1,000 ml/dak; enjeksiyon hacmi: 5 μ L



Şekil 3.14. Yaklaşık 70 yıllık ceviz ağacı kabuğu (K-70) örneği ile EA standardının HPLC-DAD dedektörle alınan UV spektrumlarının karşılaştırılması. Şekil 3.12.'de verilen kromatografik koşullar uygulanmıştır. Kırmızı renk ellajik asit standart spektrumu; mavi renk yaklaşık 70 yıllık ceviz ağacı kabuğu (K-70) örneği spektrumu.

Şekil 3.12.'deki kromatogram incelendiğinde R_t : 16.221 dakikada gelen bir pik gözlenmiştir. Bu pike ait HPLC-DAD dedektörle alınan UV spektrumu, EA standardının spektrumu ile karşılaştırıldığında birebir çakışmadığı gözlenmiştir.

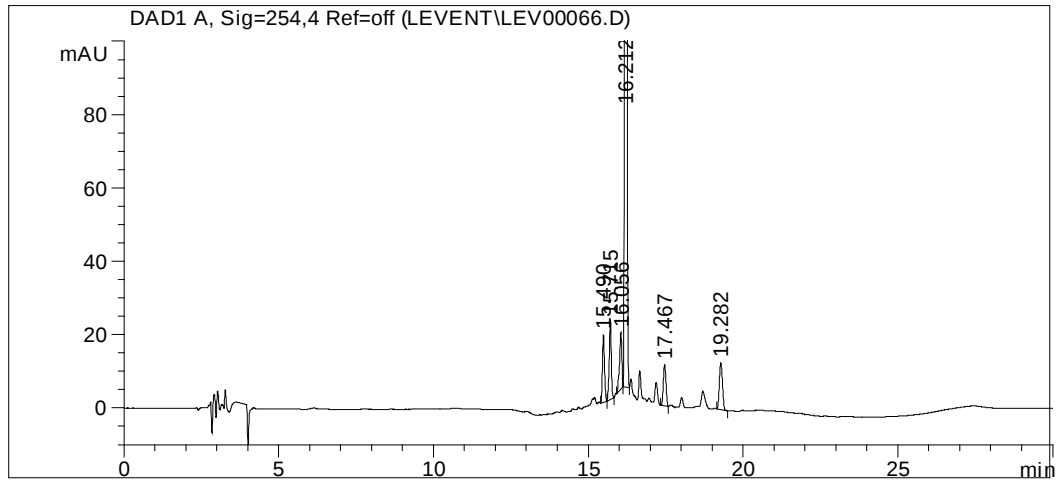
III.2.1.6. Yaklaşık 100 Yıllık Ceviz Ağacı Kabuğu (K-100) Çalışmaları

Örnek Hazırlama: K-100 örneği etüvde 50°C’de 8 saat kurutuldu. Öğütücü ve havan kullanılarak küçük parçalara bölündü. 50°C’de etüvde sabit tartıma getirildi. 1,5000 g $\pm$ 0,0005 g rende örneği tartıldı. 1,5000 g $\pm$ 0,0005 g diatom toprak ilave edilerek filtre kağıdına sarıldı.

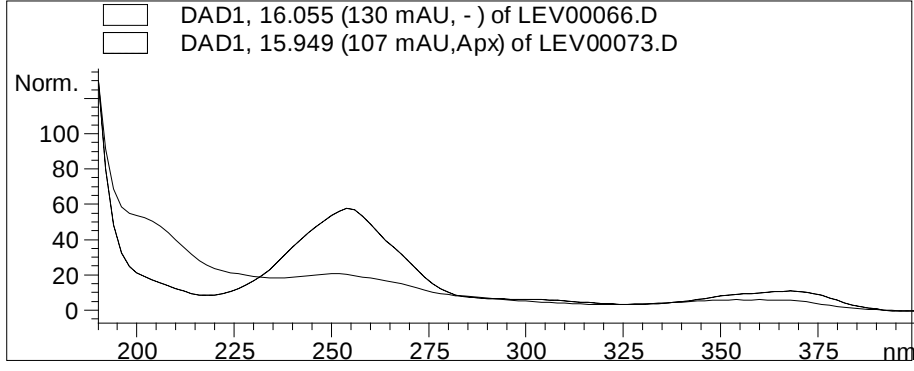
ASE cihazına verildi. ASE cihazının çözücüsü metanol:su (90:10) (v:v) karışımıdır. Statik zaman 1 dakika, temizleme hacmi %50, yıkama zamanı 60 saniye, statik devir 1 olarak ayarlanmıştır.

ASE cihazından alınan ekstraktın çözücüsü, evaporatörde 60°C’de 30 dak. boyunca uçuruldu. Kalıntı 5,000 mL saf metanolde çözülüp; rende stok örneği hazırlandı. Örnek 0,45 μ m membran filtreden süzüldü. Stok çözeltiden 1,000 mL alınıp saf metanol ile 10 mL’ye tamamlanarak seyreltik K-100 çözeltisi hazırlandı.

HPLC cihazına 20 μ L enjekte edildi. HPLC sisteminde kullanılan dereceli elüsyon II sistemi Tablo 3.4’ de belirtilmiştir.



Şekil 3.15. Yaklaşık 100 Yıllık Ceviz Ağacı Kabuğu (K-100) örneği kromatogramı. Kolon: Luna 5 μ C18(2) 250 mm * 4,6 mm; hareketli faz A: KH₂PO₄ (0,05 M; pH:3,0); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; UV λ : 254 nm; akış hızı: 1,000 ml/dak; enjeksiyon hacmi: 20 μ L, R_t : 16.056 dak.



Şekil 3.16. Yaklaşık 100 Yıllık Ceviz Ağacı Kabuğu (K-100) örneği ile EA standardının HPLC-DAD dedektörle alınan UV spektrumlarının karşılaştırılması. Şekil 3.15.'de verilen kromatografik koşullar uygulanmıştır. Kesikli spektrum Ellajik Asit standardının UV spektrumu, düz spektrum yaklaşık 100 yıllık ceviz ağacı kabuğu (K-100) örneğinin spektrumudur.

Şekil 3.15.'deki kromatogram incelendiğinde R_t : 16.056 dakikada EA standart kromatogramı ile aynı zamanda ($R_{t\text{ EA}}$: 15.949) gelen bir pik gözlenmiştir. Bu pike ait HPLC-DAD dedektörle alınan UV spektrumu, EA standardının spektrumu ile karşılaştırıldığında birebir çakışmadığı gözlenmiştir.

III.2.1.7. Ön Denemelerin Değerlendirilmesi

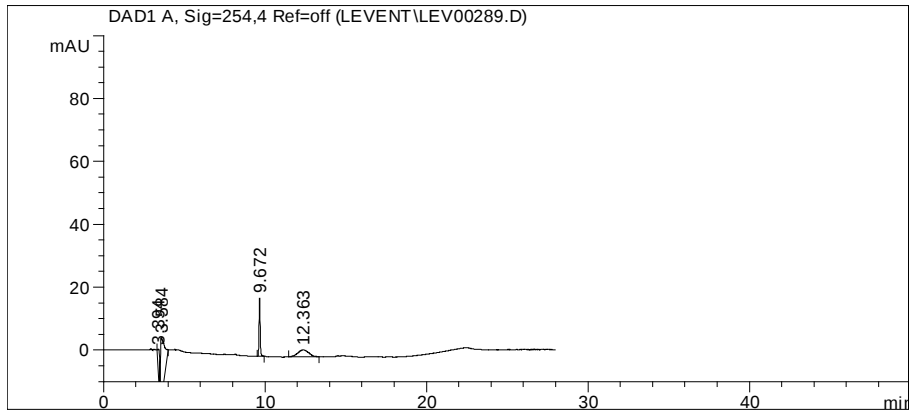
- Tablo 3.4.'de verilen dereceli elüsyon II sistemi'nin analiz süresinin uzun olduğu gözlemlendi.
- Rende örneğinde EA varlığı saptanmış ve ayrılmış olmakla birlikte; diğer örneklerde aynı alıkonma zamanında gelen pikin saf EA'e ait olmadığı gözlenmiştir.
- Sonuç olarak dereceli elüsyon II' nin değiştirilip analiz süresinin kısaltılmasına ve bundan sonraki çalışmalarda örnek olarak ceviz ağacı gövdesi atığının (rendenin) kullanılmasına karar verildi.

III.2.2. Yeni Dereceli Elüsyon Sistemi Oluşturulması

Tablo 3.7’de HPLC sisteminde kullanılan yeni dereceli elüsyon sistemi verilmiştir. Ölçü eğrisi ve ceviz ağacı gövdesi atığında (rende) yapılan analizlerde dereceli elüsyon IV sistemi kullanılmıştır. Şekil 3.17’de standart ellajik asit kromatogramı verilmiştir.

Tablo 3.7. Dereceli Elüsyon IV

Zaman (dakika)	%B
0,00	7,0
8,00	40,0
13,00	50,0
18,00	7,0



Şekil 3.17. Dereceli elüsyon IV sisteminde EA standardının kromatogramı. Kolon: Luna 5 μ C18(2) 250 mm * 4,6 mm; hareketli faz A: KH₂PO₄ (0,05 M; pH:3,0); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; UV λ : 254 nm; akış hızı: 1,000 ml/dak; enjeksiyon hacmi: 20 μ L, R_t : 9.672 dak.

III.2.3. Ölçü Eğrisi Oluşturulması

20 mg EA tartıldı, metanol ile 100 ml’ye tamamlanarak stok standart EA çözeltisi (stok EA) ($6,62 \times 10^{-4}$ mol. L⁻¹) hazırlandı. Stok EA çözeltisinden 250 μ L alınarak hareketli faz A-B (50-50) (v/v) karışımıyla 10 mL’ye seyreltilerek seyreltik

standart EA çözeltisi (SSEA) hazırlandı. SSEA çözeltisinden 18 µL alınarak hareketli faz A-B (50-50) (v/v) karışımıyla 100 mL'ye seyreltilerek hazırlandı. Stok EA çözeltisinden sırasıyla 14, 90, 180, 270, 360 µL alınarak hareketli faz A-B (50-50) (v/v) karışımıyla 50 mL'ye seyreltilerek hazırlandı. Ölçü eğrisi 6 nokta ile oluşturuldu. Her bir ölçü eğrisi için 3 farklı tartım alındı. 3 stok EA çözeltisi hazırlandı. ölçü eğrisindeki her bir nokta için üçer enjeksiyon yapıldı.

Kolon: Luna 5µ C18(2) 250 mm * 4,6 mm;

Hareketli faz A: KH₂PO₄ (0,05 M; pH:3,0)

Hareketli faz B: ACN

Dedektör: DAD, λ: 254 nm;

Akış hızı: 1,000 ml/dak

Enjeksiyon hacmi: 20 µL

Basınç: 141 bar

Sıcaklık: 24 °C

Tablo 3.8. Ölçü eğrisinde elde edilen pik alanı değerleri

Örnek No	C x 10 ⁶ (mol.L ⁻¹)	Alan Değerleri				SD	RSD
		A1	A2	A3	A ₀		
1	0,00298	8,5743	8,2280	7,9611	8,2545	0,307	3,719
2	0,185	12,6595	12,1387	11,9718	12,2567	0,359	2,929
3	1,19	70,3082	72,0437	66,4871	69,6130	2,843	4,084
4	2,38	135,9920	144,3127	137,8711	139,3919	4,364	3,131
5	3,58	218,9449	189,7193	189,8533	199,5058	16,835	8,438
6	4,77	263,3639	293,3419	279,0086	278,5715	14,994	5,382

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

Tablo 3.8’da belirtilen A1, A2, A3 ifadeleri alan değerleri olup A_0 ortalama alan değerini belirtir. SD standart sapma değeri olup, RSD ifadesi bağıl standart sapma değeridir.

Tablo 3.9. Ölçü eğrisinde elde edilen üç doğrunun eğim, kayım ve korelasyon katsayısının karesi değerleri

a (kayım)	3,14811	0,26747	-0,11281
m (eğim)	187,2157	194,5440	187,9522
r^2 (korelasyon katsayısının karesi)	0,99759	0,99501	0,99777

Çalışmalar sonucunda doğru denklemi $y = 189,904 x + 1,101$ olarak, korelasyon katsayısının karesi $r^2 = 0,99679$ olarak bulundu.

III.2.4. Rende Örnekleri ile Yapılan Çalışmalar

Örnek Hazırlama: Rende ceviz örneği ve diatom toprak hassas terazide 1,5000 g $\pm$ 0,0005 g tartıldı. Homojen şekilde karıştırıldı. Siyah bantlı filtre kağıdına sarılarak ekstraksiyon hücrelerine yerleştirildi. ASE cihazında yeni koşullar uygulanmıştır. ASE cihazının çözücüsü metanol: su (90:10) (v:v) karışımıdır. Sıcaklık 100 °C, statik zaman 10 dakika, temizleme hacmi %60, yıkama zamanı 90 saniye, statik devir 3 olarak ayarlanmıştır.

ASE cihazından alınan ekstrakt, evaporatörde 60°C’de 30 dakika boyunca uçuruldu. Kalıntı 10 mL saf metanolde çözülüp; rende stok örneği (RS) hazırlandı. Örnek 0,45 μ m membran filtreden süzüldü. RS’den 1,000 mL alınıp saf metanol ile 10 mL’ye tamamlanarak seyreltik rende çözeltisi 1 (RS-1) hazırlandı. RS 1’den 1,000 ml alınıp saf metanol ile 10 mL’ye tamamlanarak seyreltik rende çözeltisi 2 (RS-2) hazırlandı.

Bu örnek hazırlama yolu kullanılarak toplam üç rende ceviz örneği hazırlandı. Aşağıda belirtilen kromatografik koşullarda HPLC'ye enjekte edildi. Her bir RS-2 örneği beş kez enjekte edildi. Şekil 3.18.'de ceviz ağacı atığı (rende) örneğinin kromatogramı verilmiştir.

Kromatografik koşullar: Luna 5µ C18(2) 250 mm * 4,6 mm kolonla çalışıldı. Hareketli faz A olarak KH₂PO₄ (0,05 M; pH:3,0) tamponu, hareketli faz B olarak ACN kullanıldı. DAD dedektörde dalga boyu 254 nm'ye ayarlandı. Akış hızı: 1,000 ml/dak olarak, 141 bar basınç ve 24 °C kolon sıcaklığında örneklerin 20 µL hacminde enjeksiyonları yapıldı.

Kullanılan dereceli elüsyon sisteminde hareketli faz B'nin (ACN) ilk sekiz dakikada % 7'den %40'a artması sağlanmıştır. Sekiz ile on üçüncü dakikalar arası %40'tan %50'ye varan hareketli faz B artışının devamı uygulanmıştır. On sekizinci dakikada hareketli faz B'nin tekrar başlangıç oranı olan %7'ye düşmesi sağlanmıştır. Her iki enjeksiyon arasında on dakika bekleme süresi vardır.

. Stok EA çözeltisinden ($6,62 \times 10^{-4}$ mol. L⁻¹) 125 µL alınarak hareketli faz A-B (50-50) (v/v) karışımıyla 10 mL'ye seyreltilerek seyreltik standart EA çözeltisi hazırlandı. Rende örneklerinde uygulanan kromatografik koşullarda enjeksiyonu yapıldı. Tablo 3.10'da belirtilen A_O, HPLC'de yapılan beş paralel enjeksiyonun ortalama alan değeridir. SD standart sapma, RSD bağıl standart sapma değerleridir.

Tablo 3.10. Üç paralel rende örneğinin analiz sonuçları

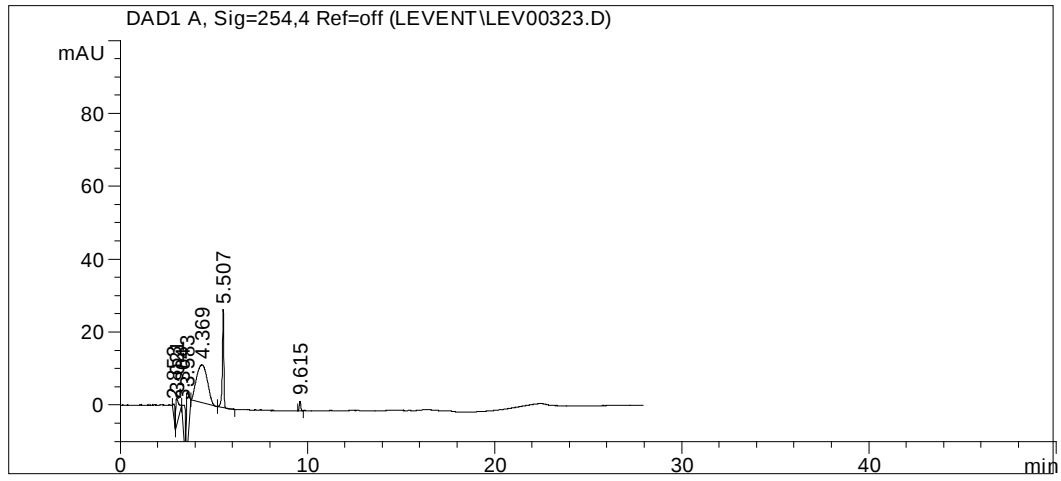
Örnek No	Alan Değeri	SD	RSD
Ceviz rende örneği-1	86,2361	0,191	0,221
Ceviz rende örneği-2	106,2080	0,975	0,918
Ceviz rende örneği-3	133,0541	4,757	3,575

Farklı numaralandırılan üç ceviz örneklerinin alan değerlerinin standart sapması % 23,49 bağıl standart sapması %21,65 olarak hesaplanmıştır.

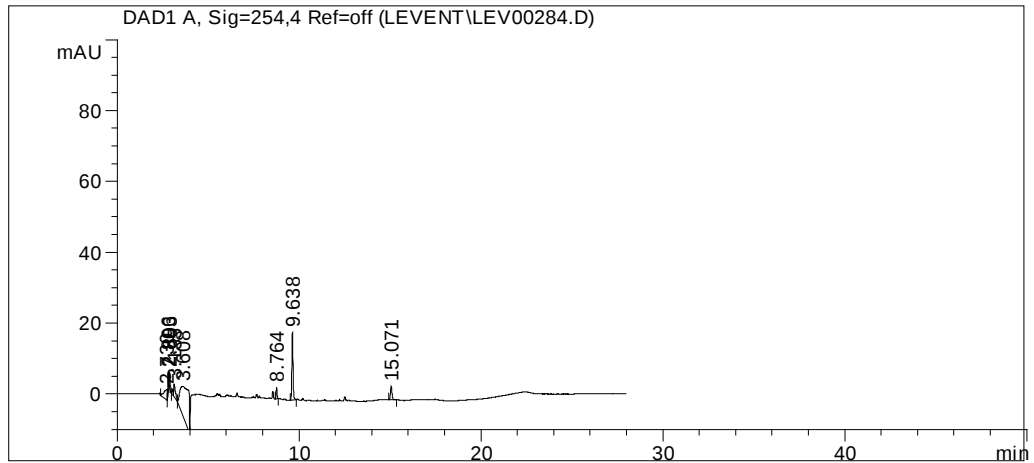
III.2.5. Gallik Asit ile Yapılan Çalışmalar

Gallik Asit (GA) Standardının Hazırlanması: 10 mg gallik asit standardı tartılır. Metanol ile 50'ye tamamlanır. Stok konsantrasyonu $1,18 \times 10^{-3}$ mol. L⁻¹ 'dir.

GA stok standart çözeltisinden 1,000 ml alınıp hareketli faz A-B (50-50) (v/v) karışımıyla 10 mL'ye seyreltilerek seyreltik standart GA çözeltisi hazırlanır. Tablo 3,7'de verilen dereceli elüsyon IV sisteminde ve III.2.4'te verilen kromatografik koşullarda çalışıldı.

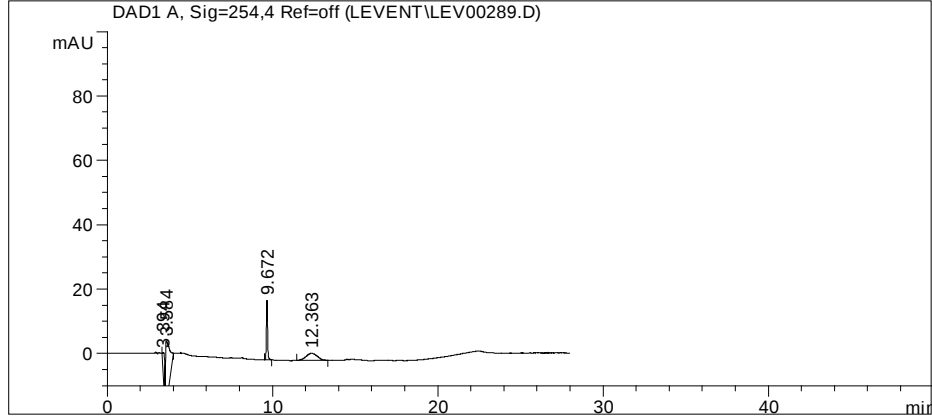


Şekil 3.18. Gallik Asit standardının kromatogramı. Kolon: Luna 5 μ C18(2) 250 mm * 4,6 mm; hareketli faz A: KH₂PO₄ (0,05 M; pH:3,0); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; UV λ : 254 nm; akış hızı: 1,000 ml/dak; enjeksiyon hacmi: 20 μ L, R_t : 5.507 dak.

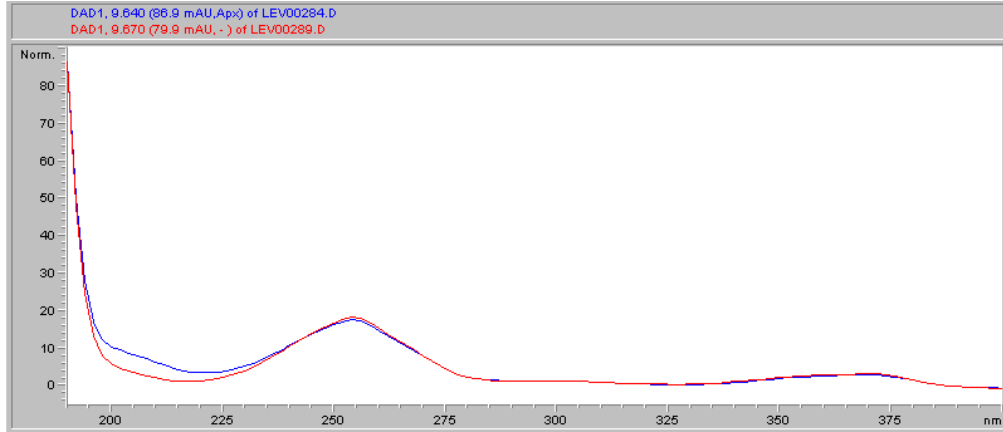


Şekil 3.19. Ceviz ağacı atığı (rende) örneğinin kromatogramı. Kolon: Luna 5 μ C18(2) 250 mm * 4,6 mm; hareketli faz A: KH₂PO₄ (0,05 M; pH:3,0); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; UV λ : 254 nm; akış hızı: 1,000 ml/dak; enjeksiyon hacmi: 20 μ L, R_t : 9.638 dak.

Şekil 3.17’de dereceli elüsyon IV sistemi uygulanarak HPLC analizi uygulanan EA standart çözeltisinin kromatogramı verilmiştir.



Şekil 3.17. EA standardının kromatogramı. Kolon: Luna 5µ C18(2) 250 mm * 4,6 mm; hareketli faz A: KH_2PO_4 (0,05 M; pH:3,0); hareketli faz B: ACN; dedektör: DAD; UV λ : 254 nm; akış hızı: 1,000 ml/dak; enjeksiyon hacmi: 20 µL, R_t : 9.672 dak.



Şekil 3.20. Şekil 3.19’deki ceviz ağacı rende örneği ile Şekil 3. 17’deki EA standardının HPLC-DAD dedektörle alınan UV spektrumlarının karşılaştırılması. III.2.4’deki kromatografik koşullar uygulanmıştır.

Şekil 3.17, Şekil 3.18 ve Şekil 3.19’deki kromatogramlar incelendiğinde ceviz ağacı atığı (rende) örneğinde, standart GA pikiyle ($R_{t\text{ GA}}$: 5.507 dak.) aynı zamanda gelen bir pik gözlenmemiştir. Buna karşın EA standart kromatogramı ($R_{t\text{ EA}}$: 9.672 dak.) ile aynı zamanda gelen bir pik (R_t : 9.638 dak.) gözlenmiştir.

II.2.6. Geri Kazanım Değeri

1,5000 g $\pm$ 0,0005 g rende rneği ve 1,5000 g $\pm$ 0,0005 g diatom toprak tartıldı. Siyah bantlı filtre kağına sarılarak ekstraksiyon hücresine yerleştirildi. ASE cihazına verilen ilk örneğe hiçbir standart ilavesi yapılmadı. Seyreltik standart EA zeltisi (5 μ g/mL) hazırlandı. Bu standart çözeltisinden sırasıyla 50 μ L, 100 μ L ve 200 μ L miktarlarından alınıp ekstraksiyon hücresine, ASE cihazına verilmeden hemen önce, enjekte edildi. Enjekte edilen her bir miktar standart çözelti için üç paralel örnek hazırlandı.

ASE cihazının çözücüsü metanol: su (90:10) (v:v) karışımıdır. Sıcaklık 100 $^{\circ}$ C, statik zaman 10 dakika, temizleme hacmi %60, yıkama zamanı 90 saniye, statik devir 3 olarak ayarlanmıştır. Alınan ekstrakt evaporatörde 60 $^{\circ}$ C'de kuruluğa kadar uçuruldu. Kalıntıya 10 mL saf MeOH ilave edildi. Hazırlanan zeltiden 1,000 ml alınarak MeOH ile 10 mL'ye tamamlandı. Ara seyreltmeden sonra oluşan çözeltiden tekrar 1,000 mL alınarak 10 mL'ye MeOH ile tamamlanarak seyreltildi.

Yapılan işlemler sonunda geri kazanım değeri %35-43 aralığında hesaplanmıştır. Geri kazanım değerleri çok düşük çıkmıştır. EA miktarı geri kazanım miktarları dikkate alınmadan verilmiştir.

II.2.7. Rendede Bulunan Ellajik Asit Miktarı

l eğrisi kullanılarak rende örneklerinin alan değerlerinden içerdikleri EA miktarları hesaplanmıştır. Yapılan matematiksel işlemler sonunda rendede bulunan EA miktarı 39,3 mg/ 100 g olarak belirlenmiştir.

BÖLÜM IV.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada Türkiye’de yetişen ceviz ağaçlarından (*Juglans Regia L.*) alınan dört farklı örnekle çalışılmış ve örneklerin ekstraksiyonu için hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu kullanılmış, Ellajik asit miktar tayini ile ters fazlı-yüksek performanslı kromatografi (RP-HPLC) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Kullanılan örnekler: Şebin ve Pedro türleri ceviz ağacı filizleri, yaklaşık 70 yıllık ve 100 yıllık ceviz ağacı kabukları, ceviz ağacı atığıdır (rende).

Geleneksel ekstraksiyon yöntemleri ile çok zaman alabilecek ekstraksiyonlar, hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu ASE100 ile her bir örnek için yarım saat gibi çok kısa bir sürede tamamlanmıştır. ASE100 ekstraksiyon hücresinde örnek miktarına eşit miktarda diatom toprak kullanılmış bu şekilde basınç uygulanan hücrede maddenin sıkışması önlenmiştir. ASE100 için daha önce bölümümüzde yapılan bir tez çalışmasında optimize edilmiş olan koşullar (45) seçilmiştir (Bölüm III.1.4).

Daha önce literatürde kayıtlı bulunan RP-HPLC dereceli elüsyon sistemlerine göre analiz süresi çok daha kısa ve pik ayrılmaları yüksek bir dereceli elüsyon sistemi (Elüsyon Sistemi IV) geliştirilmiştir (Bölüm III.2.2). Diyot dizi dedektör kullanılarak farklı örneklerin ekstraksiyon kromatogramları ile Ellajik Asit (EA) standart kromatogramları karşılaştırılmış ve sadece ceviz ağacı atığı (rende) örneği ile standardın alıkonma zamanı ve spektrumlarının bire bir çakışmıştır (Bölüm III.2.1.4 de Şekil 3.9, Şekil 3.10, Şekil 3.11). Gallik asit (GA) için Elüsyon Sistemi IV ile rende örneği kullanılarak çalışmalara devam edilmiş, fakat bu örnekte GA piki gözlenmemiştir.

Kromatografik koşulların oluşturulması için Vekiari ve ark., (24) çalışması temel alınmış (Bölüm III.2.1.1 ve Tablo 3.1) ilk basamakta üç aşamalı (Bölüm III.2.1.3) ikinci basamakta son bir değişiklik daha yapılmıştır (Bölüm III.2.2, Tablo 3.7). Bu şekilde Vekiari ve ark (24) çalışmasında alıkonma zamanı R_t : 23,72 dak iken; üç

aşamada 17,03 dak, 15,89 dak, 16,12 dak olarak belirlenen alıkonma zamanı 9,67 dakikaya indirilerek analiz süresi yaklaşık 2,5 katı azaltılmıştır. Bu şekilde harcanan organik çözücü miktarı da azalmıştır.

Tablo 3.1. Dereceli Elüsyon Sistemi (24)

Zaman (dakika)	% B
0,00	7,0
8,00	7,0
25,00	32,0
30,00	35,0
35,00	7,0

Tablo 3.7. Dereceli Elüsyon IV

Zaman (dakika)	%B
0,00	7,0
8,00	40,0
13,00	50,0
18,00	7,0

Kestane kabuğundan elde edilmiş olan % 95 saflıktaki ticari Standart EA ile yapılan çalışmalarda tekrarlanabilir sonuç alınmasında güçlükler ortaya çıkmış, buna karşın maddenin agat havanda karıştırılarak homojenize hale getirilmesi ile sorun çözülmüştür. Doğrusal tayin aralığı geniş olup, (3×10^{-9} - $4,8 \times 10^{-6}$ Mol.L⁻¹) bu şekilde miktar tayininde hatanın azaltılması sağlanmıştır. Ayrıca tayin limiti ve dedeksiyon limiti değerleri sırasıyla 13 ng.mL⁻¹ ve 60 ng mL⁻¹ olarak belirlenmiştir. Bu düşük tayin limiti, bugün Japonya’da gıda katkı maddesi olarak kullanılan ve bir ilaç adayı olan EA’nın miktar tayininde ve ayrıca günümüzde yapılan hayvan ve insan denemelerinde önem taşımaktadır.

Literatürde ceviz örneğinde EA miktar tayini ile ilgili sadece iki çalışmaya rastlanmıştır. Araştırmacılardan Daniel, E. M. ve ark EA miktarını $59 \pm 0,1$ g / 100 g

olarak (12); buna karşın Bianco ve ark 2800 mg / 100 g olarak bildirmiştir (23). Bu konuda yapılan çalışmaların çok az olması nedeniyle bir karşılaştırma veya genelleme yapmak olanaksızdır. Önceki EA miktar tayinlerinin çoğu, çok çeşitli çilek-kiraz (berry) türleri, kuşburnu, meşe ve kestanenin çeşitli kısımlarında yapılmıştır. Son zamanlarda bu konuyla ilgili ayrıntılı bir inceleme yayınlanmıştır. EA'nın en yüksek miktarda çilek türleri olan raspberry ve yellow raspberry ile kestanede bulunduğu anlaşılmaktadır (46, 24, 23).

Bu çalışmada Isparta'da bir marangozhaneden sağlanan ceviz ağacı atığında (rende) bulunan EA miktarı 39,3 mg/ 100 g olarak belirlenmiştir. Çilek-kiraz türlerinin meyva olarak yendiği düşünülürse ticari açıdan EA eldesi için uygun bir kaynak olmadığı söylenebilir. Buna karşın kestaneden elde edilen EA % 95 lik saflıkta ticari olarak pazarda bulunmaktadır. Bu standardın 1 gramının günümüz itibarıyla 160 TL olduğu düşünülürse, 1000 gram ceviz ağacı atığından elde edilecek olan EA miktarı yaklaşık 393 mg olacaktır. Bu tür atıkların yakılarak tüketildiği düşünülürse bu çalışmanın daha büyük ölçekte preperatif olarak yapılması ile EA saf olarak elde edilebilecek ve ülke ekonomisine bir katkı verilebilecektir.

Çalışmamızda sorun olarak saptanan tek husus 3 paralel örnekle çalışma sonucunda bağıl standart sapmanın % 21, 65 ile yüksek bir değerde bulunması ve geri kazanım değerlerinin % 35 ve % 43 ile çok düşük olmasıdır. Üç paralel örnekten üçüncüsünün geri kazanımı daha da düşük bulunmuş olup burada verilmemiştir. Bu nedenle hesaplanan miktarlarda geri kazanım değerleri göz önüne alınamamıştır. Örneklerin tekrarlanabilirliğinin düşük olmasının yöntemden değil, fakat bitkide bulunan miktarın homojenite göstermemesinden kaynaklanması muhtemeldir. Geri kazanım değerleri ilgili denemelerin tekrarlanması gerekmektedir. Ayrıca, örneğe uygulanan öğütme, eleme ve sabit tartıma getirilme işlemlerinin tekrarlanabilir sonuç alınması için yeterli olmadığı anlaşılmıştır. Bu nedenle liyofilizasyon işlemine başvurulması gerekmektedir.

Bu çalışmanın geliştirilmesi için ince tabaka ve/veya sütun kromatografisi ile EA elde edilip saflaştırılması; elementel analiz, NMR, kütle spektroskopisi ve IR teknikleri ile tanımlanması planlanabilir.

KAYNAKLAR

1. Okuda T., Yoshida T., Hatano T., in: Huang MT., Ho CT., Lee CY.(Eds.). (1992) Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health II, ACS Symposium Series. *American Chemical Society*, Washington, DC. 507; 87.
2. Okuda T., Yoshida T., Hatano T., in: Yagi K. (Ed.). (1993) Antioxidant Phenolics in Oriental Medicine. *Japan Science Society Press*, Tokyo, 333.
3. Bianco MA, Savolainen H. (1997) Phenolic acids as indicators of wood tannins. *Science Total Environment* 203; 79–82.
4. Kawamoto H., Nakatsubo F. (1997) Effects of environmental factors on two-stage tanin protein co-precipitation. *Phytochemistry*, 46; 479–483.
5. Tanaka T., Ueda N., Shinohara H., Nonaka G., Kouno I. (1997) Four new C-glycosidic ellagitannins, castacrenins D-G, from Japanese chestnut wood *Castanea creanata* Sieb. et Zucc. *Chemical Pharmacology Bull*, 45; 1751–1755.
6. Hakkinen SH., Karenlampi SO., Mykkanen HM., Heinonen IM., & Torronen AR. (2000) Ellagic acid content in berries: Influence of domestic processing and storage. *European Food Research Technology*, 212; 75–80.
7. Rommel A., & Wrolstad R. (1993) Influence of acid and base hydrolysis on the phenolic composition of red raspberry juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41; 1237–1241.
8. 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.
9. Bala I., Bhardwaj V., Hariharan S., Ravi Kumar MN. V. (2006) Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 40; 206–210.

10. Clifford M. N. , & Scalbert A. (2000) Ellagitannins- nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80; 1118-1125.
11. Zafrilla P., Federico F., Tomas-Barberan FA. (2001) Effect of processing and storage on the antioxidant ellagic acid derivatives and flavonoids of red raspberry (*Rubus idaeus*) jams. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49; 3651–3655.
12. Daniel EM., Krupnick AS., Heur YH., Blinzler JA., Nims RW., & Stoner GD. (1989) Extraction, stability and quantitation of ellagic acid in various fruits and nuts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2; 338–349.
13. Marcia da Silva Pinto, Franco Maria Lajolo, Maria Ines Genovese. (2008) Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Food Chemistry*, 107; 1629–1635.
14. Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* 79; 727-47.
15. Mullen W., McGinn J., Lean M. EJ. , MacLean M.R., Gardner P., Duthie G.G., Crozier A. (2002b) 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.
16. Leclerc A., Luce D., Demers PA., (1997) Sinonasal cancer and occupation, Results from reanalysis of twelve case-control studies. *American Journal of Industrial Medicine* 31; 153–165.
17. Nakagawa Y., Moldeus P., Moore G. (1997) Propyl gallate-induced DNA fragmentation in isolated rat hepatocytes. *Archives of Toxicology*, 72; 33–37.
18. Akagi K., Hirose M., Hoshiya T., Mizoguchi Y., Ito N., & Shirai T. (1995) Modulating effects of ellagic acid, vanillin and quercetin in a rat medium term multi-organ carcinogenesis model. *Cancer letters*, 94; 113–121.

18. Rao CV., Tokumo K., Rigoty J., Zang E., Kelloff G., Reddy BS. (1991) Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary administration of piroxicam, difluoromethylornithine, 16 β -fluor-5-androsten- 17-one and ellagic acid individually and in combination. *Cancer Research*, 51; 4528–4534.
19. Stoner GD., Morse MA. (1997) Isocyanates and plant polyphenols as inhibitors of lung and esophageal cancer. *Cancer Letters*, 114; 113–119.
20. Corthout J., Peiters LA., Claeys M., Vanden Berghe DA., Vleitinck AJ. (1991) Antiviral ellagitannins from *Spondia mombin*. *Phytochemistry*, 30; 1129–1130
21. Kalt W., Forney CF., Martin A., Prior RL. (1999) Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after storage of small fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47; 4638–4644.
22. 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 A*, 896; 87–93.
23. Bianco MA., Handaji A., Savolainen H. (1998) Quantitative analysis of ellagic acid in hardwood samples. *The Science of the Total Environment*, 222; 123–126.
24. 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.
25. Bronze MR., Boas LF. V., Belchior AP. (1997) Analysis of old brandy and oak extracts by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 768; 143–152.
26. Çam M., Hışıl Y. (2006) Basınçlı Solvent Ekstraksiyonu Ve Uygulamaları. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 3; 79-86.
27. Ken L., Landriault M., Fingas M., Llompart M. (2003) Accelerated solvent extraction (ASE) of environmental organic compounds in soils using a modified supercritical fluid extractor. *Journal of Hazardous Materials*. 102; 93-104.

28. Obana H., Kikuchi K., Okihashi M., Hori S. (1997) Determination of Organophosphorus Pesticides in Foods Using an Accelerated Solvent Extraction System, *Analyst*, 122; 217–220.
29. Richter B. E., Ezzell J. L., Felix D., Roberts K. A., Later D. W. (1995) An accelerated solvent extraction system for the rapid preparation of environmental organic compounds in soil. *Am. Lab.* 27; 24-28.
30. Richter B. E. (2000) Extraction of Hydrocarbon Contamination from Soils Using Accelerated Solvent Extraction. *Journal of Chromatography A*, 874; 217-224.
31. Drăgan D., Cucu-man S., Mocuna R., Covaci A. (2007) Accelerated solvent extraction method for the determination of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in soil. *Revue Roumaine de Chimie*, 52(6); 597–601.
32. Yarita T. (2001) Extraction Behavior of Accelerated Solvent Extraction of DDT Metabolite from Fish Matrix. *Analytical Sciences*, 17; 913-915.
33. Popp P., Keil P., Moder M., Paschke A., Thuss U. (1997) Application of accelerated solvent extraction followed by gas chromatography, high-performance liquid chromatography and gas chromatography–mass spectrometry for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons, chlorinated pesticides and polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in solid wastes, *Journal of Chromatography A*, 774; 203-211.
34. Hubert A., Wenzel K.D., Manz M., Weissflog L., Engewald W., Schüürmann G. (2000) High extraction efficiency for POPs in real contaminated soil samples using accelerated solvent extraction. *Analytical Chemistry*. 72; 1294-1300.
35. Concha-Graña E., Turnes-Carou M. I., Muniategui-Lorezo S., Lopez-Mahia P., Fernández- Fernández E., Prada-Rodriguez D. (2004) Development of pressurized liquid extraction and cleanup procedures for determination of organochlorine pesticides in soils. *Journal of Chromatography A*, 1047; 147-155.

36. Sporring S., Bøwadt S., Svensmark B., Björklund E. (2005) Comprehensive comparison of classic Soxhlet extraction with Soxtec extraction, ultrasonication extraction, supercritical fluid extraction, microwave assisted extraction and accelerated solvent extraction for the determination of polychlorinated biphenyls in soil. *Journal of Chromatography A*, 1090; 1–9.
37. Wenzel K.D., Hubert A., Manz M., Weissflog L., Engewald W., Schüürmann G., (1998) Accelerated solvent extraction of semivolatile organic compounds from biomonitoring samples of pine needles and mosses. *Analytical Chemistry*, 70; 4827-4835.
38. Müller A., Björklund E., Holst CV. (2001) On-line clean-up of pressurized liquid extracts for the determination of polychlorinated biphenyls in feedingstuffs and food matrices using gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 925; 197-205.
39. De La Cal A., Eljarrat E., Barceló D., (2003) Determination of 39 polybrominated diphenyl ether congeners in sediment samples using fast selective pressurized liquid extraction and purification. *Journal of Chromatography A*, 1021; 165-173.
40. Schantz MM., Nichols JJ., Wise SA. (1997) Evaluation of Pressurized Fluid Extraction for the Extraction of Environmental Matrix Reference Materials. *Analytical Chemistry*, 69; 4210-4219.
41. Kenny DV., Olesik SV. (1998) Extraction of Lignite Coal Fly Ash for Polynuclear Aromatic Hydrocarbons: Modified and Unmodified Supercritical Fluid Extraction, Enhanced-Fluidity Solvents, and Accelerated Solvent Extraction, *The Journal of Chromatographic Science*, 36; 59-65.
42. Kaufmann B., Christen P. (2002) Recent Extraction Techniques For Natural Products: Microwave-Assisted Extraction And Pressurised Solvent Extraction. *Phytochemical Analysis*, 13; 105-113.

43. Lou X., Janssen HG., Cramers CA. (1997) Parameters affecting the accelerated solvent extraction of polymeric samples. *Analytical Chemistry*, 69; 1598-1603.
44. Skoog, DA., Holler, FJ., Nieman, TA. (1998) *Enstrümantal Analiz*, Bilim Yayıncılık, Edt. Kılıç, E., Köseoğlu, F., Yılmaz, H., Ankara, Türkiye, 725-768
45. Sarayoğlu E. (2010) Soya Etken Maddesi Genistein' in Hızlandırılmış Çözücü Ekstraksiyonu Yardımıyla İzolasyonu. M. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, (Danışman: Prof. Dr. G Yalçın).
46. Landete JM. (2011) Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. *Food Research International*, 44,1150-1160,

ÖZGEÇMİŞ

7 Aralık 1984 tarihinde İstanbul’da doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi İstanbul’da tamamladım. 2003 yılında Trakya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya bölümünde lisans eğitimime başladım. 2008 yılında lisans eğitimimi bitirip, aynı yıl Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim dalında yüksek lisans eğitimime başladım.