

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ELAZIĞ'DA YETİŞEN ÇEDENE (*Pistacia terebinthus*)
BİTKİSİNDE FENOLİK BİLEŞİKLERİN VE BAZI ESER
ELEMENTLERİN TAYİNİ

Hilal DİNÇ

Yüksek Lisans Tezi
Anabilim Dalı: Kimya
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ali ÖLÇÜCÜ
2012

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ELAZIĞ'DA YETİŞEN ÇEDENE (*Pistacia terebinthus*)
BİTKİSİNDE FENOLİK BİLEŞİKLERİN VE BAZI ESER ELEMENTLERİN TAYİNİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hilal DİNÇ

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 14.05.2012

Tezin Savunulduğu Tarih: 20.06.2012

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Ali ÖLÇÜCÜ

Diğer Jüri Üyeleri:

Prof.Dr. Ökkeş YILMAZ

Prof.Dr. Habibe ÖZMEN

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezi olarak sunulan bu çalışmada, çedene (*Pistacia terebinthus*) bitkisinde bulunan bazı fenolik asitlerin, flavonoidlerin ve metallerin tayini yapıldı. Çalışmada fenolik asitlerin tayini için Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Diode Array Dedektörü (DAD) ve C₁₈ kolonu ile birlikte kullanıldı. Metal tayinleri için Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresi (AAS) kullanıldı. Ayrıca metallerin tayini için kapalı ortamda mikrodalga ile çözünürleştirme ve kuru külleme ile çözünürleştirme metotları uygulandı.

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetimi (FÜBAP) tarafından, FF. 11. 25. numaralı proje olarak desteklenmiştir.

Bu çalışmada beni yönlendiren, çalışmalarım süresince yardımını esirgemeyen Sayın Hocam Prof. Dr. Ali ÖLÇÜCÜ' ye teşekkürlerimi sunarım.

Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Nurhan ŞAHİN ve Prof. Dr. Kazım ŞAHİN'e, AAS aşamasında tezime sağladıkları destek için teşekkürlerimi sunarım.

Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Ökkeş YILMAZ'a HPLC çalışmalarım boyunca yoğun çalışma programına rağmen verdiği destekten ve yardımlarından dolayı şükranlarımı sunarım.

Çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Mehmet YAMAN'a, doktora öğrencileri Şükran AKKUŞ'a ve Nagihan M. KARAASLAN'a, yüksek lisans öğrencisi canım dostum Ayşe ŞAP'a teşekkürlerimi sunarım.

HİLAL DİNÇ

ELAZIĞ-2012

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET	VII
SUMMARY	VIII
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	IX
TABLolar LİSTESİ	XI
KISALTMALAR	XII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Fenolik Bileşikler	2
2.2. Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması.....	3
2.2.1 Fenolik Asitler	5
2.2.1.1. Vanilik Asit.....	6
2.2.1.2. Kafeik Asit	6
2.2.1.3. Rosmarinik Asit	7
2.2.1.4. Ferulik Asit	8
2.2.2. Flavonoidler.....	8
2.2.2.1. Kuersetin.....	10
2.2.2.2. Resveratrol.....	11
2.3. Ekstraksiyon Yöntemleri	12
2.3.1. Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu	12
2.3.2. Sürekli Ekstraksiyon	12
2.4. Eser Elementler ve Canlılardaki Rolü.....	13
2.4.1. Kromun (Cr) Canlılardaki Rolü	14
2.4.2. Nikelin (Ni) Canlılardaki Rolü	14
2.4.3. Demirin (Fe) Canlılardaki Rolü	14
2.4.4. Kobaltın (Co) Canlılardaki Rolü.....	15
2.4.5. Çinkonun (Zn) Canlılardaki Rolü	16

2.4.6.	Bakırın (Cu) Canlılardaki Rolü.....	16
2.4.7.	Manganın (Mn) Canlılardaki Rolü.....	17
2.4.8.	Kurşunun (Pb) Canlılardaki Rolü	17
2.5.	Eser Analiz Yöntemleri.....	17
2.5.1.	Örnek Çözünürleştirme Yöntemleri.....	17
2.5.1.1.	Yaş Çözme	18
2.5.1.2.	Kuru Çözme	18
2.6.	Çedene (<i>Pistacia terebinthus</i>) Hakkında Bilgiler	19
2.7.	Literatür Çalışmaları	21
3.	ANALİZ YÖNTEMLERİ.....	24
3.1.	Kromatografi.....	24
3.2.	Kromatografi Metotları	25
3.2.1.	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	26
3.2.1.1.	HPLC Cihazı	27
3.2.1.2.	Çözücü Haznesi ve Çözücü	27
3.2.1.3.	Yüksek Basınç Pompası	28
3.2.1.4.	Numune Enjeksiyon Sistemleri	29
3.2.1.5.	Kolonlar	29
3.2.1.5.1.	Koruyucu Kolonlar	30
3.2.1.5.2.	Kolon Termostatları.....	30
3.2.1.5.3.	Kolon Dolgu Maddesi Tipleri	31
3.2.1.6.	Dedektörler	31
3.2.1.6.1.	Filtreli Ultraviyole Absorbans Dedektörleri	31
3.2.1.6.2.	Floresans Dedektörler	32
3.2.1.6.3.	Kırma İndisi Dedektörleri	32
3.2.1.6.4.	Elektro Kimyasal Dedektörler	33
3.2.1.6.5.	Kütle Spektrometrik Dedektörler.....	33
3.2.1.6.6.	Fotodiyod Array Dedektörü (DAD)	33
3.3.	Atomik Absorpsiyon Spektroskopisi	34
3.3.1.	Işık Kaynakları.....	35
3.3.2.	Monokromatör (Dalgaboyu Seçici)	36

3.3.3.	Dedektör.....	36
3.3.4.	Atomlaştırıcılar	36
3.3.4.1.	Alevli Atomlaştırıcılar	36
3.3.4.2.	Elektrotermal Atomlaştırıcılar	39
3.3.5.	Atomik Absorpsiyon Spektrometrisinde Görülen Girişimler ve Önlenmesi	39
3.3.5.1.	Kimyasal Girişimler.....	39
3.3.5.2.	Spektral Girişimler.....	40
3.3.5.3.	Zemin Girişimi.....	41
4.	MATERYAL- METOD.....	42
4.1.	Kullanılan Cihazlar ve Cam Malzemeler.....	42
4.2.	Kullanılan Standart Çözelti ve Reaktiflerin Hazırlanması.....	43
4.2.1.	AAS İçin Standart Çözelti Hazırlanması	43
4.2.1.1.	Kapalı Ortamda Mikrodalga Parçalama Yöntemi İçin Standart Çözelti Hazırlanması	43
4.2.1.2.	Kuru Külleme Yöntemi İçin Standart Çözelti Hazırlanması	44
4.2.2.	HPLC İçin Standart Çözelti ve Reaktiflerin Hazırlanması	44
4.3.	Örneklerin Temini ve Analize Hazırlanması	44
4.3.1.	Bitki Örneklerinin Fenolik Bileşik Tayini İçin Ekstraksiyonu	45
4.3.2.	Bitki Örneklerinin Metal Tayini İçin Çözünürleştirilmesi.....	45
4.3.2.1.	Kuru Külleme Yöntemi İçin Örnek Çözünürleştirilmesi.....	45
4.3.2.2.	Kapalı Ortamda Mikrodalga Parçalama Yöntemi İçin Örnek Çözünürleştirilmesi	45
4.4.	Kalibrasyon Grafikleri	46
4.4.1.	Kuru Külleme İle Metal Tayini İçin Elde Edilen Kalibrasyon Grafikleri	46
4.4.2.	Kapalı Ortamda Mikrodalga Parçalama ile Metal Tayini İçin Elde Edilen Kalibrasyon Grafikleri	48
4.4.3.	Fenolik Asitler için Standart Kromatogramı	52
4.4.4.	Flavonoidler için standart Kromatogramları.....	53
5.	BULGULAR.....	54
5.1.	HPLC Kromatogramları.....	54
5.1.1.	Çedene Bitkisi İçin Elde Edilen Kromatogramlar	54
5.1.2.	Çedene Kahvesi İçin Elde Edilen Kromatogramlar	56

5.2.	Atomik Absorbsiyon Spektrometrisi Bulguları	59
5.2.1.	Çedene Bitkisinde Kapalı Ortamda Mikrodalga Parçalama Yöntemi İle Metal Tay ini İçin Elde Edilen Bulgular	59
5.2.2.	Çedene Bitkisinde Kuru Külleme Yöntemi İle Metal Tayini İçin Elde Edilen Bulgular.....	59
6.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA	60
	KAYNAKLAR	62
	ÖZGEÇMİŞ.....	69

ÖZET

Bu çalışmada, Elazığ ve yöresinden temin edilen çedene (*Pistacia terebinthus*) ve çedene kahvesinde bulunan bazı fenolik asitler ve flavonoidler ile bazı metallerin konsantrasyonları incelendi. Fenolik madde tayininde HPLC-DAD, metal tayininde alevli AAS cihazları kullanıldı.

Fenolik bileşik tayininde çedene bitkisi için bulunan değerler şu şekildedir: vanilik asit: $219,167 \pm 26,135$ ppm, kafeik asit: $154,5 \pm 9,987$ ppm, ferulik asit: $9,667 \pm 1,04$ ppm, rosmarinik asit: ($<t.s$), kuersetin: $156,83 \pm 11,85$ ppm, resveratrol: $373,5 \pm 19,15$ ppm.

Çedene kahvesi için bulunan değerler şu şekildedir: vanilik asit $179,5 \pm 13,4$ ppm, kafeik asit $101,5 \pm 8,4$ ppm, ferulik asit $3,5 \pm 0,5$ ppm, resveratrol $295,41 \pm 20,05$ ppm, kuersetin $129,9 \pm 10,3$ ppm.

Mikrodalga parçalama yöntemiyle metal tayininde Cu, Co, Ni, Pb, Mn değerleri tayin sınırının altında bulunmuştur. Fe için en yüksek değer çedene kahvesinde $52,8 \pm 1,81$ ppm olarak bulunmuştur. Zn için en yüksek değer çedene bitkisinde $38,233 \pm 3,259$ ppm olarak bulunmuştur.

Kuru külleme yönteminde Cu için en yüksek değer çedene bitkisinde $8,05 \pm 0,65$ ppm bulunmuştur. Zn için en yüksek değer çedene bitkisinde $33,103 \pm 2,217$ ppm bulunmuştur. Fe için en yüksek değer çedene kahvesinde $44,2 \pm 5,6$ ppm bulunduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Fenolik asit, Flavonoid, Eser element, AAS, HPLC, HPLC-DAD, *Pistacia terebinthus*, Bakır, Nikel, Demir

SUMMARY

DETERMINATION OF PHENOLIC COMPOUNDS AND TRACE ELEMENTS IN TURPENTINE (*Pistacia terebinthus*) GROWN IN ELAZİĞ

In this study, the concentration of some phenolic acids, flavonoids and some metals examined in turpentine and turpentine coffee obtained from Elazığ and its surroundings. HPLC-DAD used in determination of phenolic matters, AAS with flame used in determination of metals.

These values obtained for turpentine plant in determination of phenolic compounds; vanilic acid: $219,167 \pm 26,135$ ppm, caffeic acid: $154,5 \pm 9,987$ ppm, ferulic acid: $9,667 \pm 1,04$ ppm, rosmarinic acid: ($< t.s$), quercetin: $156,83 \pm 11,85$ ppm, resveratrol: $373,5 \pm 19,15$ ppm.

These values obtained for turpentine coffee in determination of phenolic compounds; vanilic acid $179,5 \pm 13,4$ ppm, caffeic acid $101,5 \pm 8,4$ ppm, ferulic acid $3,5 \pm 0,5$ ppm, resveratrol $295,41 \pm 20,05$ ppm, quercetin $129,9 \pm 10,3$ ppm.

These values obtained in determination of metals with microwave digestion method: Cu ($< t.s$), Co ($< t.s$), Pb ($< t.s$), Ni ($< t.s$), Mn ($< t.s$). The highest of values Fe obtained in turpentine coffee: $52,8 \pm 1,81$ ppm. The highest of values Zn obtained in turpentine plant: $38,233 \pm 3,259$ ppm.

These values obtained in determination of metals with dry-ashing method: The highest of values Cu obtained in turpentine plant: $8,05 \pm 0,65$ ppm, The highest of values Fe obtained in turpentine coffee: $44,2 \pm 5,6$ ppm.

Key Words: Phenolic Acid, Flavonoid, Trace Elements, AAS, HPLC, HPLC-DAD, *Pistacia terebinthus*, Copper, Nickel, Iron.

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Fenolik bileşiklerin oluşum yolu.....	4
Şekil 2.2. Vanilik asit.	6
Şekil 2.3. Kafeik asit.	6
Şekil 2.4. Rosmarinik asit.	7
Şekil 2.5. Ferulik asit.....	8
Şekil 2.6. Flavonoidlerin genel yapısı	9
Şekil 2.7. Kuersetin.	10
Şekil 2.8. Resveratrol.	11
Şekil 3.1. HPLC cihazının şematik olarak görünüşü.	27
Şekil 3.2. Atomik Absorbsiyon Spektroskopisi Genel Şeması	34
Şekil 3.3. Alevde atomlaşma basamakları ve alevdeki diğer olaylar.	37
Şekil 4.1. AAS’ de kuru külleme ile Cu tayini için elde edilen kalibrasyon grafiği.	46
Şekil 4.2. AAS’ de kuru külleme ile Zn tayini için elde edilen kalibrasyon grafiği.	47
Şekil 4.3. AAS’ de kuru külleme ile Fe tayini için elde edilen kalibrasyon grafiği.	47
Şekil 4.4. AAS’ de, kapalı ortamda mikrodalga parçalama ile Co tayini için elde edilen kalibrasyon grafiği.	48
Şekil 4.5. AAS’ de kapalı ortamda mikrodalga parçalama ile Ni tayini için elde edilen kalibrasyon grafiği.	49
Şekil 4.6. AAS’ de kapalı ortamda mikrodalga parçalama ile Pb tayini için elde edilen kalibrasyon grafiği.	49
Şekil 4.7. AAS’ de kapalı ortamda mikrodalga parçalama ile Mn tayini için elde edilen kalibrasyon grafiği.	50
Şekil 4.8. AAS’ de kapalı ortamda mikrodalga parçalama ile Fe tayini için elde edilen kalibrasyon grafiği.	50
Şekil 4.9. AAS’ de kapalı ortamda mikrodalga parçalama ile Zn tayini için elde edilen kalibrasyon grafiği.	51

Şekil 4.10. AAS’ de kapalı ortamda mikrodalga parçalama ile Cu tayini için elde edilen kalibrasyon grafiği.	51
Şekil 4.11.1. HPLC-DAD ile kafeik asit, ferulik asit ve rosmarinik asit için standart kromatogramı.	52
Şekil 4.11.2. HPLC-DAD ile vanilik asit standart kromatogramı.	52
Şekil 4.12. HPLC-DAD ile resveratrol ve kuersetinin standart kromatogramı.	53
Şekil 5.1. HPLC-DAD ile çedene bitkisinin vanilik asit kromatogramı.	55
Şekil 5.2. HPLC-DAD ile çedene bitkisinin kafeik asit, ferulik asit, rosmarinik asit kromatogramı.	55
Şekil 5.3. HPLC-DAD ile çedene bitkisinin flavonoid kromatogramı.	55
Şekil 5.4. HPLC-DAD ile çedene kahvesinin kafeik asit, ferulik asit, rosmarinik asit kromatogramı.	56
Şekil 5.5. HPLC-DAD ile çedene kahvesinin vanilik asit kromatogramı.....	57
Şekil 5.6. HPLC-DAD ile çedene kahvesinin resveratrol kromatogramı	57
Şekil 5.7. HPLC-DAD ile çedene kahvesinin kuersetin kromatogramı	58

TABLÖLAR LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması.....	3
Tablo 2.2. Fenolik asitlerin genel yapısı: a) Benzoik asit türevleri b) Sinamik asit türevleri.....	5
Tablo 2.3. Kuersetinin genel özellikleri.....	11
Tablo 3.1. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması.....	25
Tablo 3.2. Yaygın olarak kullanılan alevin özellikleri	38
Tablo 4.1. HPLC çalışma parametreleri	42
Tablo 4.2. Mikrodalga ısıtıcı parametreleri	46
Tablo 5.1. HPLC-DAD ile çedene bitkisinde fenolik bileşik tayini için elde edilen bulgular (mg/kg) (n=3)	58
Tablo 5.2. AAS’de kapalı ortamda mikrodalga parçalama yöntemi ile çedene bitkisinde Cu, Co, Pb, Ni, Mn, Zn ve Fe’e ait bulgular (mg/L) (n=3).....	59
Tablo 5.3. AAS’de kuru külleme yöntemi ile çedene bitkisinde Cu, Fe ve Zn’ye ait bulgular (mg/L) (n=3)	59

KISALTMALAR

AAS	: Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresi
°C	: Santigrat derece
CO₂	: Karbondioksit
GC	: Gaz Kromatografisi
HPLC-DAD	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi- Fotodiyod Array Dedektörü
LC	: Sıvı Kromatografisi
µm	: Mikrometre
mL	: Mililitre
mM	: Mili molar
N	: Normal
nm	: Nanometre
OH	: Hidroksil
ppm	: mg/kg, mg/lt, µg/ml, µg/gr
UV	: Ultra Viyole

1. GİRİŞ

Bitkilerdeki fenolik bileşiklere ilgi bugün her zamankinden daha fazladır. Bunların doğada bulunuşları, dağılımları, biyosentezi, bitkilerdeki metabolizma ve fonksiyonlarına ait akademik çalışmaların ötesinde, fenolik bileşikler, uygulamalı bilimlerde artan bir öneme sahip olmaktadır (Harborne,1988). Fenolik maddeler doğal antioksidanların en önemli gruplarını oluştururlar. Bunlar bitkilerin tüm kısımlarında görülen polifenolik komponentlerdir (Tunalier ve ark., 2002). Bitkilerde fenolik bileşiklerin tayininde genelde HPLC, HPLC-MS, HPLC-DAD, GC ve GC-MS gibi modern tekniklerden yararlanılmaktadır.

Canlıların, eser elementlere az miktarlarda ihtiyaç duymaları bir rastlantı değildir. Aslında bu elementlerin çoğu zehirli madde sınıfına girer ve bir ortamda ancak çok az miktarlarda olurlarsa yaşamı desteklerler. Bir eser elementin, topraktaki ya da sudaki formu onun zehirlilik derecesini belirleyebilir. Bu amaçla en çok kullanılan metot alevli Atomik Absorpsiyon Spektrofotometrisidir. Bu çalışmada Elazığ ve yöresinden temin edilen ve çedene olarak bilinen menengiçte (*Pistacia terebinthus*) bulunan veya bulunması muhtemel bazı fenolik bileşiklerin (Rosmarinik asit, vanilik asit, kafeik asit, ferulik asit, resveratrol, kuersetin gibi) HPLC-DAD ile ve bazı metallerin (Cu, Pb, Co, Fe, Ni, Mn gibi) alevli AAS ile tayini amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Fenolik Bileşikler

Fenolik maddeler doğal antioksidanların en önemli gruplarını oluştururlar. Bunlar bitkilerin tüm kısımlarında görülen polifenolik komponentlerdir (Tunalıer ve ark., 2002).

Fenolik bileşikler şimdiye kadar 8000'i aşkın çeşidi bilinen bir grup kimyasaldır. Tüm bu bileşiklerin ortak yanı en az bir hidroksil grubuna bağlı en az bir aril halka varlığına sahip olmalarıdır. Aynı zamanda otçul hayvanlar için doğal bir antimikrobiyal ajan ve koruyucu olarak görev yaparlar. Fenolik bileşikler birçok bitki tarafından muhtemelen hasat öncesi tohum çimlenmesinde inhibitör rol oynayan ikincil metabolitler olarak üretilirler (Ersöz ve ark., 2009).

Bitkiler pek çok esansiyel besin bileşenlerinin yanında besleyici olmayan (non-nutrient) ancak biyolojik olarak aktif çok geniş bir grup olan fenolik bileşikleri de içerirler. Fenolik bileşikler bitkilerde aromatik aminoasit metabolizması sırasında sentezlenen yan bileşiklerden oluşan ikincil metabolitlerdir; fenolik asitler ve flavonoidlerden oluşurlar. Fenolik bileşikler meyve, sebze ve diyetle tüketilen diğer bitkisel gıdalarda bulunmaktadır.

Gıda bileşeni olarak fenolik bileşikler; insan sağlığı açısından işlevleri, tat ve koku oluşumundaki etkileri, renk oluşumu ve değişimine katılmaları, antimikrobiyal ve antioksidatif etki göstermeleri enzim inhibisyonuna neden olmaları gibi birçok açıdan önem taşırlar. Fenolik bileşiklerden flavonoidler başlıca; flavonoller, flavonlar, flavononlar, kateşinler, antosiyanidinler, proantosiyanidinler ve izoflavonoidler olarak sınıflandırılırlar (Ersöz ve ark., 2009).

Bitkilerdeki fenolik asitler ise benzoik asitin hidroksillenmiş türevleri (hidroksibenzoik asitler) ve sinamik asitin hidroksil türevleri (hidroksisinamik asitler) olarak ikiye ayrılır (Hakkinen ve ark., 2000).

En yaygın bitkisel fenolik antioksidanlar flavonoidler, sinamik asit türevleri, kumarinler, tokoferoller ve fenolik asitlerdir. Bunların besinlerde bulunan ve kolaylıkla oksitlenebilen maddeleri oksidasyondan korudukları bilinmektedir. Bu nedenle uzun yıllardır

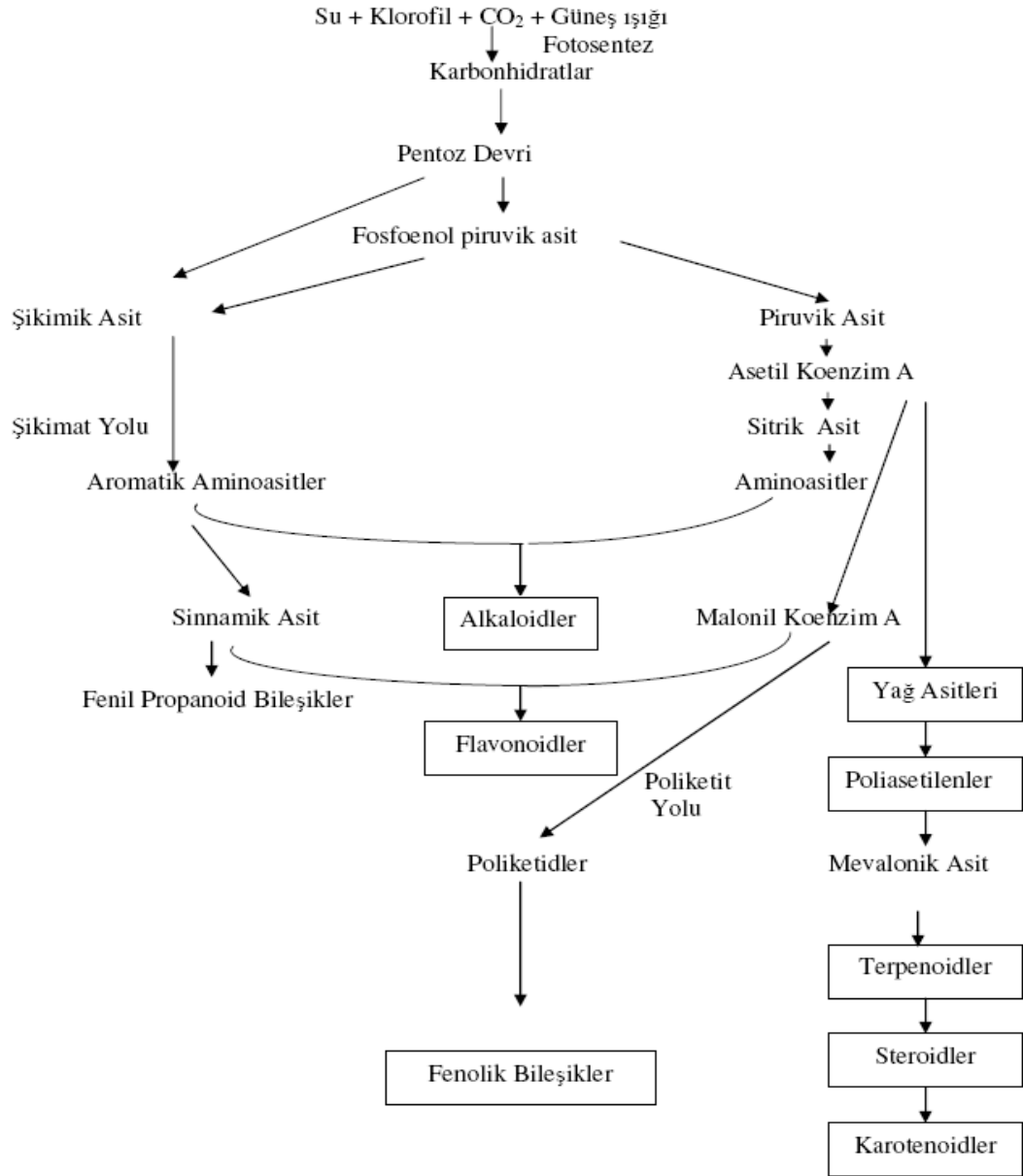
besinlerin koku ve tat gibi özelliklerini arttırmak için katkı olarak kullanılan baharat ve aromatik bitkiler giderek önem kazanmaktadır (Tunalıer ve ark., 2002).

2.2. Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması

Bitkilerdeki fenolik bileşiklere ait ilk modern sınıflandırma, basit fenoller, fenolik asitleri, fenil asetik asitleri, sinamik asitleri, kumarinleri, izokumarinleri, lignanları, 10 grup flavonoidi, ligninleri, taninleri, benzofenonları, ksantonları, stilbenleri, kinonları ve betasiyaninleri içermektedir (Harborne ve ark., 1964).

Tablo 2.1. Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması

Karbon Atomu Sayısı	Temel İskelet	Sınıf	Örnekler
6	C ₆	Basit Fenoller Benzokinonlar	Kateşol, hidrokinon, 2,6-dimetoksi benzokinon
7	C ₆ -C ₁	Fenolik asitler	p-hidroksi benzoik asit, Salisilik asit
8	C ₆ -C ₂	Asetofenonlar Fenilasetik asitler	3-Asetil-6-metoksi benzaldehit p-hidroksi fenilasetik asit
9	C ₆ -C ₃	Hidroksisinnamik asitler Fenil propenler Kumarinler İzokumarinler Kromonlar	Kafeik asid, ferulik asid, mirisetin, eugenol, umbelliferon, aesculetin, bergenin, eugenin.
10	C ₆ -C ₄	Naftakinonlar	Juglon, plumbagin
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Ksantonlar	Mangiferin
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbenler Antrakinonlar	Lunularik asit Emodin
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoidler İzoflavonoidler	Kersetin siyanidin Genistein
18	(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanlar Neolignanlar	Pinoresinol Eusiderin
30	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonoidler	Amentoflavon



Şekil 2.1. Fenolik bileşiklerin oluşum yolu (Dey ve ark., 1989)

Bitkisel materyallerde bulunan fenolik bileşikler, fenolik asitler ve flavonoidler olarak iki gruba ayrılırlar (Nizamlıoğlu ve ark., 2002).

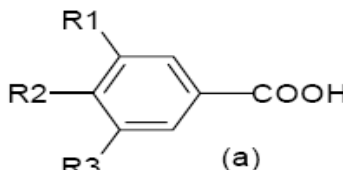
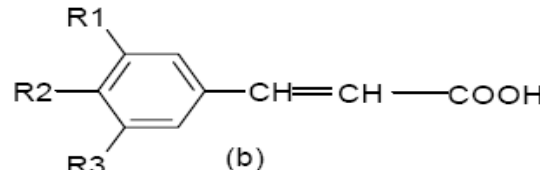
2.2.1 Fenolik Asitler

Hidroksi benzoik ve hidroksisinamik asitler olarak iki gruba ayrılırlar.

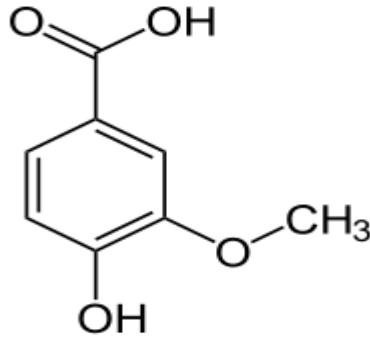
Hidroksibenzoik asitler C₆-C₁ fenilmetan yapısında olup, bitkisel gıdalarda genelde iz miktarda bulunurlar. Bunlar salisilik asit, m-hidroksibenzoik asit, gallik asit, vanilik asitler gibi asitlerdir. Hidroksisinamik asitler ise C₆-C₃ fenilpropan yapısındadırlar. Fenilpropan halkasına bağlanan OH grubunun konumu ve yapısına göre farklı özellik gösterirler. Çok yaygın bulunanları; kafeik asit, ferulik asit, p-kumarik asit ve o-kumarik asitlerdir. Bitkilerde büyük bir kısmı organik asitler ve şekerlerle esterleşmiş halde bulunan, fenolik asitlerin kimyasal yapıları Tablo 2.2.'de görülmektedir.

Hidroksisinnamik asitler doğadaki diğer pek çok polifenolden daha yaygın olarak bulunurlar. Örneğin kafeik asit, sikloheksan karboksilli asitlerle (kuinik asit gibi), şekerlerle (ramnoz gibi), organik asitlerle (malik asit gibi), aminlerle, lipidlerle ve diğer fenollerle birleşmiş halde bulunur (Harborne ve ark., 1988).

Tablo 2.2. Fenolik asitlerin genel yapısı: a) Benzoik asit türevleri b) Sinamik asit türevleri (Shahidi ve ark., 1995).

 (a)				 (b)			
Asit	R1	R2	R3	Asit	R1	R2	R3
<i>p</i> -Hidroksibenzoik	H	OH	H	<i>p</i> -Kumarik	H	OH	H
Pirokate şüik	H	OH	OH	Kafeik	H	OH	OH
Vanilik	CH ₃ O	OH	H	Ferulik	CH ₃ O	OH	H
Siringik	CH ₃ O	OH	CH ₃ O	Sinapik	CH ₃ O	OH	CH ₃ O
Gallik	OH	OH	OH				

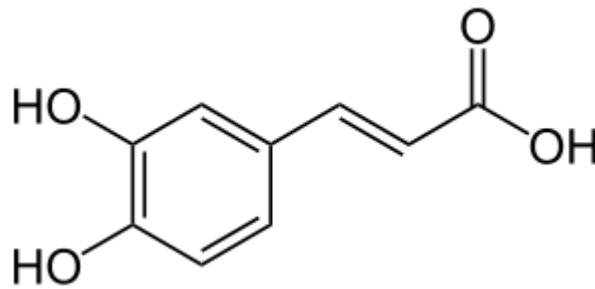
2.2.1.1. Vanilik Asit



Şekil 2.2. Vanilik asit

Molekül formülü (3-metoksi 4-hidroksi benzoik asit) $C_8H_8O_4$, molekül ağırlığı 168,14 g mol^{-1} 'dür. Alkoldeki çözünürlüğü çok iyidir. Erime noktası 210–230 °C 'dir. Beyaz renkli pudra şeklindedir. Şarap (Minussi ve ark., 2003), buğday kepeği (Yu ve ark., 2005) ve okaliptusta (Gonzalez ve ark., 2004) bulunmaktadır.

2.2.1.2. Kafeik Asit

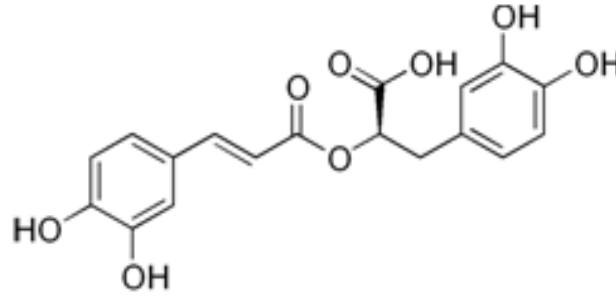


Şekil 2.3. Kafeik asit

Molekül formülü (3,4-dihidroksi sinnamik asit) $C_9H_8O_4$, molekül ağırlığı 180,16 g mol^{-1} 'dür. Sarı kristalize şeklinde bulunur. Erime noktası 223– 225 °C 'dir. Sıcak suda ve alkolde çözünürlüğü oldukça iyidir.

Elma, üzüm, erik, yulaf gibi çeşitli meyvelerde mevcuttur. Nitrite hızlı bir şekilde etki ederek nitrik oksite indirgemektedir (Huang ve ark., 1991).

2.2.1.3. Rosmarinik Asit



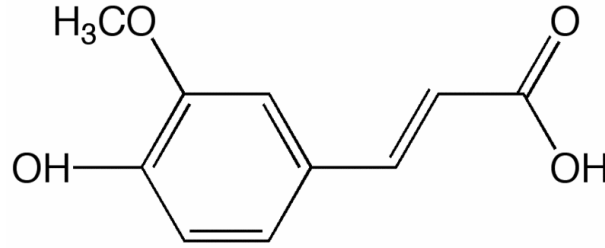
Şekil 2.4. Rosmarinik asit

Rosmarinik asit lamiasae bitki familyasında bulunan doğal polifenol bir bileşiktir (Baba ve ark., 2005). Rosmarinik asit genellikle Lamiaceae familyasının Nepetoideae alt familyası ile Boraginaceae familyası üyelerinde bulunur (Litvinenko ve ark., 1975). Rosmarinik aside ayrıca diğer bitki familyalarında da rastlanır. Örneğin; Blechnaceae familyasına ait eğreltiotlarında (Hausler ve ark., 1992), at kuyrukları gibi daha düşük yapılı bitkilerde (Takeda ve ark., 1990), Zosteraceae familyasına ait deniz çimi benzeri monokotiledonlarda (Rawn ve ark., 1994) ve Potamogetonaceae ve Cannaceae familyasına ait bitkilerde de Rosmarinik asit bulunduğu dair çalışmalar mevcuttur.

Rosmarinik asit'in biyolojik aktivitelerine dair literatürde çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Anti-inflamatuar, anti-mutajen, anti-bakteriyal, antioksidan, ve antiviral aktiviteler bunlar arasında sayılabilir (Parnham ve ark., 1985; Deans ve ark., 1989; Exarchou ve ark., 2002; Güllüce ve ark., 2003). Özellikle Rosmarinik asit içeren *Melisa officinalis* özütlerinden, Herpes simplex kaynaklı infeksiyonların tedavisinde yararlanıldığı rapor edilmektedir (Parnham ve ark., 1985). Anti-inflamatuar aktivitenin, lipooksigenaz ve siklo-

oksijenaz enzimlerinin inhibe edilmesi sonucunda ortaya çıktığı öne sürülmektedir (Parnham ve ark., 1985). Bu enzimler özellikle ekosenoiklerde ve lipit metabolizmasında etkin rol alır. Rosmarinik asit benzeri fenolik bileşiklerin kansere karşı koruyucu bir etki sergiledikleri de bilinmektedir. Ayrıca bu bileşik, kozmetik endüstrisinde kullanılan *Rosmarinus officinalis* ve *Sanicula europaea* gibi bitkilerin aktivitelerinde de önemli rol oynamaktadır (D'Amelio ve ark., 1999).

2.2.1.4. Ferulik Asit



Şekil 2.5. Ferulik asit

Ferulik asit kısaca $C_{10}H_{10}O_4$ formüllü bitki orijinli fenolik bir bileşiktir. Sistematik isimlendirmeye göre, ferulik asit 3-(4-hidroksi-3-metoksifenil) propenoik asit olarak adlandırılır (Jankovska ve ark. 2001). Farmakolojik çalışmalar, ferulik asitin trombositlerin kümeleşmesine engel olduğu, koroner kan akış hızını arttırdığı, düz kasların kasılıp gevşemesini sağladığı, anti-aritmik etkilere hükmettiği, oksit giderici, bağışıklığı teşvik edici, anti-inflamatuar vs. etkilerde bulunduğu göstermiştir (Lu ve ark., 2005).

2.2.2. Flavonoidler

Flavonoidler çeşitli besin ve tıbbi bitkilerde bulunan ikincil metabolitlerin en yaygın grupları arasında olan fenolik bileşiklerdir. Bu bileşikler renk, tat ve koku gibi organoleptik özelliklerden sorumlu oldukları için, analizlerini önemli derecede ilginç yapan bu tür ürünlerin kalitesiyle yakından ilgilidirler (Fabre ve ark., 2001; Borbalán ve ark., 2003).

Flavonoidlerin karbon iskeleti, iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşan ve 15 karbon atomu içeren, difenilpropan ($C_6-C_3-C_6$) yapısındadır. Flavonoidlerin yapısındaki OH grupları, reaktif özelliklerinden dolayı kolaylıkla glikozitlenir. Flavon türevleri olan flavonoidlerin genel yapısı Şekil 2.6.'de görülmektedir. Flavonoidler gıdalarda en yaygın bulunan polifenollerdir. Yaklaşık 6500 farklı flavonoid bilinmektedir. Yapısal olarak beş gruba ayrılırlar (Saldamlı ve ark., 2007);

1- Antosiyanidinler

2- Flavonlar ve flavonollar

3- Flavanonlar

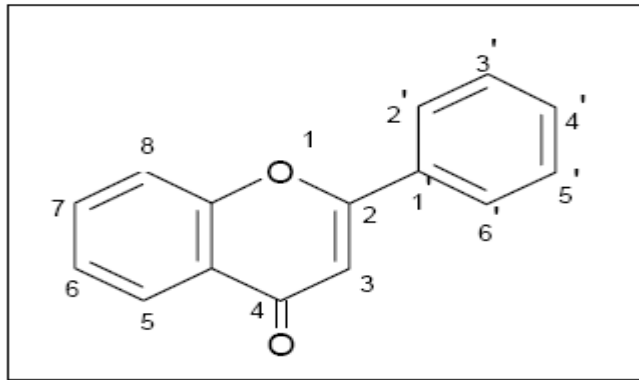
4- Kateşinler ve löykoantosiyanidinler

5- Proantosiyanidinler

Fenolik bileşiklerin en geniş sınıfı olan flavonoidler biyosentetik olarak bu iki yolun kombinasyonundan türerler.

1-Doğrudan hidroksisinnamik asit ve kumarinler gibi fenil propanoidleri veren şikimik asid yolu.

2-Pek çok kinonları ve basit fenolleri üretebilen poliketit yolu (Demirkıran ve ark., 2005).



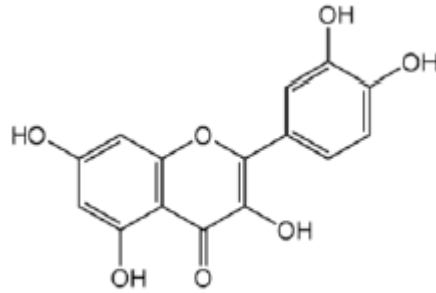
Şekil 2.6. Flavonoidlerin genel yapısı (Shahidi ve ark., 1995)

Flavonoidlerin antioksidan olarak davranma kapasiteleri onların molekül yapılarına bağlıdır. Hidroksil gruplarının pozisyonu, sayısı ve flavonoidlerin kimyasal yapılarındaki

diğer özellikler onların antioksidan ve serbest radikal temizleme aktiviteleri için önemlidir (Suschetet ve ark., 1998).

Flavonoidler, antialerjik, antienflamasyon, antiviral, antiproliferatif (çoğalmayı önleyici) aktiviteye sahip bileşikler olarak bilinmektedir (Harborne ve ark., 1994). Epidemiyolojik çalışmalarda flavonoid alımı ile koroner kalp rahatsızlıkları, felç, akciğer kanseri ve mide kanseri arasında zıt ilişkiler saptanmıştır (Hakkinen ve ark., 2000).

2.2.2.1. Kuersetin



Şekil 2.7. Kuersetin

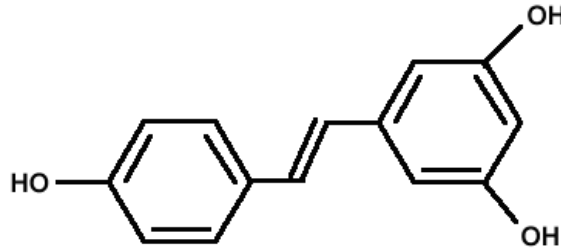
Kuersetin, diyetlerde en bol bulunan flavonol olup serbest radikal temizleme aktivitesi açısından tüm doğru yapısal özelliklere sahip olduğu için potansiyel bir antioksidandır (Pietta ve ark., 2000; Erkoç ve ark., 2003).

Serbest radikalleri yakalama özelliğinden dolayı güçlü bir antioksidandır. Bu özelliğiyle kardiyovasküler (kalp ve damarlarla ilgili) hastalıklardan koruduğu bilinmektedir (Bonaccorsi ve ark., 2008).

Tablo 2.3. Kuersetinin genel özellikleri

Molekül formülü	C ₁₅ H ₁₀ O ₇
Molekül ağırlığı	302 g/mol
Faz	Katı
Erime noktası	316 °C
Kaynama noktası	-
Yoğunluğu	1.799 g/cm ³
Diğer çözücülerde çözünürlükleri	Su: çok az çözünür Metanol, etanol, dietileter gibi organik çözücülerde iyi çözünür.
Görünüşü	Sarı renk
IUPAC adı	2-(3,4- dihydroxyphenyl)- 3,5,7- trihydroxy- 4 <i>H</i> - chromen- 4-one

2.2.2.2. Resveratrol



Şekil 2.8. Resveratrol

Resveratrol (3,5,4-trihidroksistilben) doğada yaklaşık 72 bitki türünde bulunan bir fitokimyasaldır. En önemli resveratrol kaynağı, Çin ve Japonya’da ilaç olarak kullanılan yabani bir bitki olan *Polygonum cuspidatum*’dur. Okaliptüs ve ladin gibi ağaçlar da resveratrol içermektedir. Yenebilir bitkilerde yaygın değildir. Üzüm, yer fıstığı, yerfıstığı ezmesi ve şarap resveratrol içeren gıdalardır. Üzümde UV radyasyona ve *Botrytis cinerea*’ya karşı yaprak dokuları tarafından üretilen resveratrol, kabuk kısmında bulunur. İklim ve varyeteye bağlı olarak miktarı değişen resveratrol kırmızı üzümde beyaz üzüme göre daha fazladır (Hao ve ark., 2004).

Resveratrol cis ve trans izomerleri veya glikolize olmuş formda bulunur. Bitkilerde çoğunlukla glikolizenmiş (3-o-D-glukozit) formdadır (Ather ve ark., 2007). Resveratrol, anti-inflamatuar ve anti-koagulant özelliğe sahip olup arterioskleroz (damar sertliği) ve kalp hastalıklarına karşı koruma sağlar. Bu hastalıklara karşı koruma, resveratrolun LDL (düşük yoğunluklu lipoprotein) oksidasyonu inhibe etmesinden ve trombosit kümeleşmesini (agregasyonunu) bloke etmesinden kaynaklanmaktadır (Gerogiannaki ve ark., 2006).

Resveratrol prostaglandin üretimini, siklogenaz-2 ve nükleer faktör-B aktivitesini inhibe ederek inflamasyonu azaltarak kalp hastalığı ve kansere karşı koruma sağlamaktadır (Sovak ve ark., 2001). Tümörün başlangıç, ilerleme ve yayılma safhalarını inhibe eder. Oksidatif stresten kaynaklanan hücre ölümlerini azaltır (Gerogiannaki ve ark., 2006).

2.3. Ekstraksiyon Yöntemleri

Ekstraksiyon, bir çözelti içerisindeki bileşenlerin yoğunluk farkından faydalanılarak birbirinden ayrılması işlemidir.

2.3.1. Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu

Kaynama noktası birbirine çok yakın olan, birbiri içerisinde karışmayan ve kaynama noktasında bozulan sıvıların ayrılmasında kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem için ayırma hunisi kullanılır. Sıvı-sıvı ekstraksiyonunda ayırma hunisi kullanılarak ve yoğunluk farkından yararlanarak yani dağılma oranlarının farkından ayırma yapılabilen sistemlerdir.

2.3.2. Sürekli Ekstraksiyon

Diğer ekstraksiyon yöntemleri ile ayrılması zor olan maddeleri bu yöntemle ayırmak mümkündür. Dağılma oranlarının küçük olduğu durumlarda çok sayıda sıvı-sıvı ekstraksiyonu uygulamak gerekir. Bu uzun zaman aldığı ve fazla çözücü gerektirdiğinde dolayı sürekli ekstraksiyon yöntemine başvurulur. Sürekli ekstraksiyon katılardan yapılacak olan çekme işlemi için de kullanılır. Bunun için en uygun yöntem soxhlet cihazıyla yapılacak olan ekstraksiyon işlemidir. Katı örnekler sürekli çözücüyle sirkülasyon halinde etkileştirilerek

çekme işlemi yapılır ve böylece işlem istenildiği kadar tekrarlanır (yani çözücü sürekli örneklerle etkileştirilir). Böylece istenilen bileşenler daha az çözücü kullanarak ve daha kısa sürede ayrılabilir.

2.4. Eser Elementler ve Canlılardaki Rolü

Eser elementler topraktaki ve litosferdeki dağılımı “binde bir” mertebesinde “milyonda bir” mertebesine kadar değişiklikler gösteren elementlerdir. Canlıların, eser elementlere az miktarlarda ihtiyaç duymaları bir rastlantı değildir. Aslında bu elementlerin çoğu zehirli madde sınıfına girer ve bir ortamda ancak çok az miktarlarda olurlarsa yaşamı desteklerler. Bir eser elementin, topraktaki ya da sudaki formu onun zehirlilik derecesini belirleyebilir. Buna en iyi örnek krom ve cıvadır. Cr^{+3} elementinin en zehirli bileşikler $+6$ değerlikte yaptıkları bileşiklerdir. Bakır, çinko gibi ağır metallerin, iyon hallerinin en zehirli durumları olması ise dikkat çekicidir. Diğer koşullarda bu elementlerin zehirliliklerini ortamdaki konsantrasyonları belirler (Ezer ve ark., 2005).

Yüksek organizasyonlu bitkiler için gerekli 16 esas element olduğu kabul edilir. Bitkinin ihtiyacı olan miktara göre yapılan sınıflandırmaya göre esas elementler mikro element ve makro element diye ikiye ayrılmıştır. Makro elementler bitki tarafından fazla miktarda (kuru ağırlıkta 1000 mg/kg) gereksinim duyulan ve bünyesinde fazla bulunan elementlerdir. Mikro elementler ise aksine bitkinin daha az ihtiyaç duyduğu (kuru ağırlıkta 100 mg/kg’den daha az) ve bünyesinde az miktarda bulunan elementlerdir. Makro elementler kükürt (S), fosfor (P), magnezyum (Mg), kalsiyum (Ca), potasyum (K), azot (N), oksijen (O), karbon (C) ve hidrojen (H)’dir. Mikro elementler ise molibden (Mo), bakır (Cu), çinko (Zn), mangan (Mn), bor (B), demir (Fe) ve klor (Cl) olarak bilinir (Taiz ve ark., 1991).

Mikro elementleri makro elementlerden ayıran en önemli özellik bitkilerin fizyolojik olarak bunlara daha az gereksinim duymalarıdır. Bitkide makro besin elementleri bitki vejetatif organında (yaprakta) ortalama % 0.1-0.5 arasında bulunurken, mikro besin elementleri ancak % 0.00002-0.02 arasında yer alır (Fırat ve ark., 1998).

2.4.1. Kromun (Cr) Canlılardaki Rolü

Krom, mavimsi gri renkli havada kolayca kararmayan sert bir metaldir. Kimyasal simgesi Cr, atom numarası 24, atom ağırlığı 51.996 olan kromun erime noktası da oldukça yüksektir (1875 °C) (Erdik ve ark., 1986).

Atık sularda bulunan çeşitli krom türlerinin özelliği, çeşitli endüstriyel kaynakların atıklarındaki değişik fizikokimyasal şartlardan dolayı, doğal sularda bulunduğundan bileşiklerine, pH'a, materyal işlemlerinden gelen organik ve/veya inorganik atıklara ve üretim endüstrisindeki (kromat renkli pigmentler ve korozyon önleyici pigmentler) atık suyunda bulunur. Suda krom tayininde Cr(III), en çok beklenen krom türü olmasına rağmen, tortuda meydana gelen redoks reaksiyonları, Cr(V) derişimini artırabilir. Fakat materyal işleminden gelen yüksek miktardaki organik madde derişimi, çözünür Cr(III) komplekslerinin oluşmasında etkili olur (Elçi ve ark., 2002).

2.4.2. Nikelin (Ni) Canlılardaki Rolü

Demirin bazı niteliklerini taşıyan beyaz, parlak maden olan nikelin kimyasal simgesi Ni olup, atom numarası 28, atom ağırlığı 58,7 g/mol, kaynama noktası 2913 °C (3186 K), yoğunluğu 8.908 g/mL, elektron yerleşimi 2–8–16–2'dir ve periyodik tablonun VIII. grubunda yer alır (Erdik ve ark., 1986).

İçme sularında müsaade edilen maksimum Ni konsantrasyonu Avrupa Birliği ülkeleri için 50 ppb olup Dünya Sağlık Örgütü bunu 20 ppb olarak sınırlandırmıştır. Böyle çok düşük Ni konsantrasyonlarının tayini için en çok kullanılan metot grafit fırınlı AAS'dir. Ancak çoğu matrikste majör veya minör düzeyde bulunabilen Ca, K, Mg ve Na elementleri alevsiz AAS'de önemsenecek düzeyde girişim yaparlar (Work Environ 1990).

2.4.3. Demirin (Fe) Canlılardaki Rolü

Demir, insan ve diğer pek çok canlı türü için temel bir elementtir. Erişkin bir insan vücudunda 3–4 gram demir vardır ki, vücudun % 0,004'ünü oluşturur. Tüm vücut tartısının % 7 sini oluşturan kan demirinin % 70'ini içerir. Kanın % 15'ini teşkil eden hemoglobinde %

0,335 demir vardır. Demir dokuya oksijen taşınması ve dokudaki oksidasyon olaylarının sürdürülmesi için gereklidir. Vücutta ve besinler içerisinde büyük kısmı organik maddelerle birleşmiş durumda bulunmaktadır. Vücutta demir, öncelikle ince bağırsaklarda kontrol edilir.

İnce bağırsak demir için hem emilim hem de dışlama işlemini yapar. Erişkin bir insanın günlük demir ihtiyacı 10 mg olarak hesaplanmaktadır. Kadın ve çocukların erkeklere göre demir ihtiyacı daha fazladır (Ezer ve ark., 2005).

Demir ayrıca hemoglobin şeklinde, kanın oksijeni akciğerden dokulara taşımalarını sağlamaktadır ve elektron transferinde rol alır. Eksikliği küresel ölçüde yayılmış olan anemiye sebep olur. Aşırı tehlikelidir, hemokromatosis'e sebep olur. Bağırsak çeperinde absorbe edilen demir yalnız (II) değerlikli demirdir. Demir (III)'ün yalnız sindirim yoluyla indirgenen bölümünü emilir.

2.4.4. Kobaltın (Co) Canlılardaki Rolü

Kimyasal simgesi Co olan kobaltın atom numarası 27, atom ağırlığı 58.9, kaynama noktası 29270 °C (3200 K), özgül ağırlığı 8.9 (20°C'de) ve elektron yerleşimi 2-8-15-2 olup periyodik tablonun VIII. grubunda yer alır (Erdik ve ark., 1986).

Kobalt doğada yaygın bulunmakla birlikte yer kabuğunun yalnızca % 0,001'ini oluşturmaktadır. Yer ve gök taşı kökenli nikelli demirde, öbür elementlerle birleşmiş halde doğal sularda, toprakta, bitkilerde ve hayvanlarda az miktarda rastlanır. Çoğu demir, nikel bakır, gümüş, mangan, çinko ve arsenik gibi cevherlerde eser miktarda bulunan kobalt bu cevherlerden bir yan ürün olarak elde edilir. Kobalt, sığır ve koyun gibi geviş getiren hayvanların beslenmesinde, insandaki alyuvarların olgunlaşmasında gerekli olan B₁₂ vitamininde yer alır. Parlatılmış kobalt, maviye çalan gümüş beyazı rengindedir (Elçi ve ark., 2002).

İnsan ve geviş getiren hayvanların beslenmesinde kobaltın önemi onun doğal su, toprak, bitki, gübre gibi çeşitli örneklerdeki tayinine olan ilgiyi arttırmaktadır. Kobalt yaşayan canlı türlerinde B₁₂ vitamini için gerekli bir element olmakla birlikte büyük miktarları toksiktir (Narin ve ark., 2003).

2.4.5. Çinkonun (Zn) Canlılardaki Rolü

İnsan vücudunda toplam olarak 1–2,5 gram çinko bulunur. Kemiklerde, dişlerde, saçta, deride, kaslarda, testislerde ve karaciğerde depolanmış haldedir. Çinko birçok enzim ve hormonun yapısında bulunduğu gibi çoğu enzim ve hormonun da etkinlik kazanmasını sağlayan çok önemli bir biyokatalizördür. Besinlerle yeterli alınmaması halinde kasınma ve kasınma sonucu cilt bozukluğu, lekeli tırnakla kolayca anlaşılan çinko eksikliği görülür. Bu eksiklik özellikle çocuklarda büyüme ve gelişim bozukluğu, vücut zayıflığı, neşesiz ve durgunluk, tat alma bozukluğu gibi oldukça önemli, ama karmaşık bozukluklara neden olur. Çinko besinlerle alınır.

Bitkiler yüksek düzeyde çinko içerseler bile vücut, bitkisel çinkoyu değerlendirip kullanamaz, yine de eksikliği görülür. Tahıl ağırlıklı ve yalnız bitkisel beslenme rejiminde eksikliği yaygın olarak görülür. Hayvansal protein alınması ile bitkilerle alınan çinko da değerlendirilir. En azından ekmeği peynirle, mısır ve bakliyatı sütle veya etle yersek daha yararlı olur ve eksikliği görülmez. Özellikle hamile ve emzikli annelerin yeterli çinko alabilmek için hayvansal protein de yemeleri şarttır. Yine çinkonun da gerekenden fazla alınması organizma açısından sakıncalıdır. Günlük 50 mg alındığında kolesterolde düşüş gözlenmiştir.

2.4.6. Bakırın (Cu) Canlılardaki Rolü

Bakır tüm canlılar için "yaşamsal önemli" eser elementlerin en başında, demir ve çinko ile aynı düzeyde gerekli eser elementtir. Vücuttaki tüm oksidasyon olaylarında, enzimlerin kontrollü çalışması için bakır gereklidir. Normal bir erişkin insanda 100–150 mg kadar bakır bulunur. Bunun % 90 kadarı kas, kemik ve karaciğerde depolanmış haldedir. İleri derecede beslenme ve bağırsakta emilme bozukluğu olanlarda bakır eksikliği görülebilir. Bu durumda kansızlık, cilt ve kemik kusurları ve zekâ gelişme bozuklukları görülür.

Bakırın da fazlası zehirleyicidir. 15 mg'dan daha fazla elementel bakır yutulması halinde, bulantı, kusma, ishal, karın ağrısı, yaygın kas ağrıları gibi belirtiler ortaya çıkar. Zihinsel kusurlar ile koma ve ölüm de görülebilir.

2.4.7. Manganın (Mn) Canlılardaki Rolü

Mangan da çinko gibi hem bazı enzimlerin yapısında bulunur hem de bazı enzimleri aktifler. Ayrıca bağ dokusu yapımında, üre oluşumu, protein ve yağ asitleri sentezine katılır. Kemiklerin ve birçok enzimin yapısına giren mangan, kepekli tahıllarda, yeşil yapraklı sebzelerde, fındık, fıstık, ceviz ve çayda bol miktarda bulunur. Deney amacıyla manganezden arıtılmış bir beslenmeye giren kişide kilo kaybı, bulantı, kusma, deri tahrişi, saç uzamasında yavaşlama ve saç renginde beyazlaşma görülmüştür.

Manganez zehirlenmesi nadiren, manganez üretimde çalışan kişilerde ortaya çıkabilir ve Parkinson hastalığı benzeri sinir sistemi belirtileri ortaya çıkarır.

2.4.8. Kurşunun (Pb) Canlılardaki Rolü

Kurşun, kemiklerde birikir. Kolaylıkla kalsiyumun yerini alabilir. Ancak çoğu bileşiği suda çok az çözüldüğü için yıllarca zehir etkisi üzerinde fazla durulmamıştır.

Kurşundan kaynaklanan rahatsızlıklar meslek hastalıkları arasında ilk sırayı alır. Kurşun zehirlenmesi en çok görülen zehirlenmedir. Zehirlenmede uykusuzluk, yorgunluk, işitme ve görme bozukluğu ve kramp, ağırlık kaybı görülür (Vandecasteele ve ark., 1997; Mizuike ve ark., 1983).

2.5. Eser Analiz Yöntemleri

2.5.1. Örnek Çözünürleştirme Yöntemleri

Spektroskopik yöntemlerle örneklerin analizinde numunenin çözelti halinde olması gerekir. Bu sebepten analiz edilecek olan katı örnek çözelti haline getirilmelidir. Bu amaçla örneği analize hazırlamada örnek önce öğütülerek homojenleştirilir ve akabinde yakma veya parçalama metotları uygulanır. Gıdalar heterojen bir yapıya sahip olduklarından karışımdaki maddelerden her biri aynı miktarda eser element içermez. Bu yüzden eser elementlerin tayini için örneğin homojen olması zorunludur. Bir örneğin çözünürleştirilmesi için uygulanan metotlar genellikle yaş ve kuru metot şeklinde sınıflandırılır.

2.5.1.1. Yaş Çözme

Asitte yaş çözme tek bir asitle gerçekleştirilebileceği gibi birden fazla derişik asidin karışımı ile de gerçekleştirilebilir. Asitlerle çözünürleştirme, yükseltgen asitlerde çözünürleştirme (HNO_3 , HClO_4 , der H_2SO_4) ve yükseltgen olmayan asitlerde çözünürleştirme(HCl , HF , H_3PO_4 , HBr , sey H_2SO_4 , sey HClO_4 ,) şeklinde ayrılabilir.

Örneklerin tam çözünürleştirilmesinde asitlerin tek kullanılması genellikle iyi sonuç vermemektedir. Bu nedenle iki ya da daha fazla asit karışımı kullanılması tercih edilmektedir. Ancak, tüm elementlerin analizi yerine yalnız bir veya birkaç elementin analizi gerekiyorsa, elementin ve numunenin niteliğine göre tek bir yükseltgen asit ve hatta yükseltgen olmayan asitler kullanılabilir. Bu amaçla ya açık ya da kapalı sistem kullanılır. Kapalı sistemde teflon sistem veya basınç bombası altındaki cam-karbon kaplar kullanılır.

Yaş çözünürleştirme genellikle $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'nin altındaki sıcaklıklarda uygulandığında kuru yükseltgemeye tercih edilir. Çünkü buharlaştırma kayıpları As ve Se gibi bazı mineraller haricinde yoktur.

Ayrıca kuru küllenmeye göre daha büyük miktarda asitler kullanıldığından daha az buharlaşma ve daha az adsorbsiyon kayıpları olur. Bununla beraber yaş çözmede As, B, Cr, Ge, Hg, Os, Re, Ru, Sb, Se ve Sn gibi elementlerin buharlaşma ile kayıplarının tehlikesi vardır. Kuru çözmeye oranla daha çok çözücü gerektiğinden reaktiflerden gelen kirlenmeler, örnek sınırlaması ve daha büyük dikkat gösterilmesi gereği gibi dezavantajlar söz konusudur.

Çözme işlemi için kullanılan en yaygın çözücü reaktifler; Nitrik asit (HNO_3), Perklorik asit (HClO_4), Hidroflorik asit (HF), Hidroklorik asit (HCl), Sülfürik asit (H_2SO_4), Hidrojen peroksit (H_2O_2) ve kral suyudur. HClO_4 ve HF daha az ve özel amaçlı olarak kullanılmaktadır.

Derişik çözeltilerinde ve sıcakta iyi bir yükseltgen olan HClO_4 'in kullanıldığı çözünürleştirmelerde HClO_4 ' in patlayıcı özelliğinden dolayı örneğin kurummasına müsaade edilmemelidir.

2.5.1.2. Kuru Çözme

Bu yöntemde prensip olarak öncelikle örnekte bulunan su buharlaştırılır, sonra örnek kül edilir ($400\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $700\text{ }^{\circ}\text{C}$). Külleme tamamlandıncı kül seyreltik bir asit ile çözündürülür. Kül

etme işlemi normal basınçta sıcak fırınlarda hava ile yapıldığı gibi, yüksek basınçta bombalarda oksijen ile de yapılmaktadır.

Bu metot basit olması, örnek miktarında sınırlama probleminin olmaması ve daha az çözücü kullanılmasına bağlı olarak daha az kirlenme riski gibi avantajlara sahiptir. Bunun yanı sıra külleme süresince bazı metallerin (B, Cr, Cu, Ni, P, V, Zn gibi) metalik halde, klorürleri halinde veya organometalik bileşikleri halinde buharlaşması gibi dezavantajları vardır. Hg, Pb, Cd, As gibi elementler yüksek sıcaklıkta buharlaşabilmektedirler. Kayıplar çözünmeyen kalıntılardan ve kap yüzeyinde adsorpsiyondan da kaynaklanabilir. Kuru külleme uzun zaman gerektirdiğinden fazla miktar örnek ile çalışılamamaktadır. Kuru küllemede elde edilen kül tekrar çözündürülürken zorluk çıkabilmekte, kullanılan malzemelerin kirlenmesi ve aşınması da ayrı bir sorun yaratmaktadır.

2.6. Çedene (*Pistacia terebinthus*) Hakkında Bilgiler



Menengiçler (çedene) kışın yaprak döken 2–3 m boyunda çalı ya da ağaççık veya 8–10 metreye kadar boylanabilen kalın gövdeli ve yuvarlak tepeli ağaçlardır. Genellikle fazla boylanmaz ve yavaş büyürler. Gövde ve dal kabukları, sarımsı boz renkte ve küçük pullar halinde çatlaklıdır. Yumurta ya da mızrak şeklinde ve oblong (boyu eninden büyük) yaprakçıkların, boyları 4–8 cm arasında çok kısa saplı, kenarları düz ve keskin, üst yüzeyleri parlak koyu yeşil, alt yüzeyleri ise mat açık yeşil renktedir. Terminal yaprakçık lateral yaprakçıklardan daha dar olup reçine kokusuna sahiptir. Genç yaprakları tüylü, ergin yaprakları ise parlak yeşil ve tüysüzdür. Nisan-Mayıs aylarında açmaya başlayan ve bir önceki

yıla ait sürgünlerde gelişen üreme organları ayrı bireylerde çiçekler dik duran bileşik salkım kuruluşunda ve kırmızımsı mor renktedir. Meyveler ise yuvarlakça veya çarpık yumurta şeklinde olup, önceleri kırmızı renkte, Ağustos-Eylül aylarında olgunlaştıklarında ise koyu esmer yeşilimsi veya mavimsi renktedirler. Meyveler çekirdekli, kokulu ve yağlı olup yenilebilir niteliktedir (Davis ve ark., 1967; Baytop ve ark., 1984).

Pistacia terebinthus L. (*Anacardiaceae*), Güney Avrupa ve Ortadoğu'da geniş yetiştirme alanına sahip ve birçok biyolojik aktivitesi bulunan 20 *Pistacia* türünden biridir. *Pistacia* türleri antimikrobiyal, antiinflamatuvar ve sitotoksik aktivitelerinin yanı sıra antioksidan potansiyelleri ile araştırmacıların dikkatini çekmiştir (Yılmaz ve ark., 2010).

Pistacia cinsinin en yaygın türü *P. terebinthus*'tur. Sıcak iklime sahip alanlarda geniş yayılış göstermekte ve Akdeniz vejetasyonunun karakteristik üyesi ve baskın elementi olan *Quercus coccifera* L. gibi bitki türleri ile birlikte maki formasyonunda yoğun bir şekilde bulunmaktadır (Zohary ve ark., 1996; Atlı ve ark., 1999; Kafkas ve ark., 2002). Işık istekleri yüksek olup, güneşli bakıları tercih eden bu takson kuraklığa karşı dayanıklı fakat donlara karşı hassastır.

Türkiye'de *P. terebinthus* türleri özellikle deniz seviyesinden 1600 m yükseklikteki dağların güneyinde, çam ormanlarında ve kayalık yamaçlarında yetişmektedir. Bu türün meyveleri Türkiye'nin güney bölgelerinde atıştırmalık olarak, özel köy ekmeklerinin kabartılmasında ve kahve olarak kullanılır. Geleneksel tıpta bu meyveler mide ağrısı, astım, boğaz enfeksiyonları, diyare, egzama, öksürük, romatizma ve bağırsak tedavisinde kullanılır. Ayrıca, uyarıcı, diüretik, antitussif, kanamayı durdurucu, ateş düşürücü ve antibakteriyel etkilerinin olduğu bulunmuştur (Yılmaz ve ark., 2010).

2.7. Literatür Çalışmaları

Ökkeş Yılmaz ve çalışma arkadaşları, *Pistacia terebinthus*'un fenton reaktifinde radikal süpürücü etkisi ve doymamış yağ asitindeki koruyucu etkisini araştırmış ve *Pistacia Terebinthus* ekstraktlarının DPPH daki süpürücü etkisinin flavanoid konsantrasyonundaki artışa bağlı olduğu bulunmuştur. *Pistacia Terebinthus* ekstraktında yağ asiti miktarı fenton R grubtan daha yüksek çıkmıştır (Yılmaz ve ark., 2010).

Pistacia terebinthus'la yapılan başka bir çalışmada *Pistacia terebinthus*'un antioksidan potansiyeli, antimikrobiyal aktivitesi ve β -glukoronidaz inhibitörünün mümkünlüğü araştırılmıştır. Çalışma sonucunda *Pistacia terebinthus* ekstraktlarının biyoaktivitesinin kanser riskini azalttığı bulunmuştur (Kavak ve ark., 2010).

İftçi ve arkadaşları *Pistacia terebinthus* kahvesinde yağ asitleri, vitaminler ve eser elementlerin tayini yapmıştır. Bu çalışmada Cu, Ni, Fe, Zn, Co tayini yapılmıştır. Sonuçlar literatürdeki diğer çalışmalarla karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda bu kahve çeşidinin iyi bir eser element ve yağ asidi kaynağı olduğu bulunmuştur. Kahvedeki bazı eser elementlerin miktarı şöyle bulunmuştur: Cu 4.84, Ni 1.25, Zn 14,5, Fe 62,2 ve Co 0.42 $\mu\text{g/g}$ (Çiftçi ve ark., 2009).

G. Topcu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *Pistacia terebinthus* ekstraktında yeni bir antioksidan flavon eldesi yapılmıştır. Bu çalışmada 6'-hydroxyhypolaetin 3'-methyl ether flavonu bulunmuş ve bir grup bilinen flavonoid tayin edilmiştir (Topçu ve ark., 2007).

Oliveira ve arkadaşları farklı kültürlerdeki (Franguette, Mayette, Marbot, Mellenaise ve Parisienne) cevizlerin yeşil kabuklarında antimikrobiyal aktivite, antioksidan potansiyeli ve toplam fenolik bileşik miktarını tayin etmişlerdir. Toplam fenolik asit miktarı için kolorimetrik tayin kullanılmış ve en düşük değer Mellanaise kültüründe (32,61 mg/g), en yüksek değer Franguette kültüründe (74.08 mg/g) bulunmuştur (Oliveira ve ark., 2008).

Başka bir çalışmada 19 çeşit çilek türünde HPLC ile farklı kolonlar kullanarak antioksidan ve antikanserojen etki gösteren kamferol, kuersetin, miyrisetin, p-kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit, p-hidroksi-benzoik asit, gallik asit, ellagik asit gibi bileşiklerin analizini yapılmıştır (Häkkinen ve ark., 1999).

Başka bir çalışmada Solar ve çalışma arkadaşları Elit, Franguette, Hardley ve Sampion ceviz kültürlerinin filizlerindeki fenolik bileşikleri (kateşin, mirisetin, vanilik asit, şirincik asit,

ellagik asit, klorjenik asit, juglon, 1,4-naftokinon) HPLC ile mevsimlere göre tayin edilmiştir. Kateşin ve mirisetin Ağustos'tan Mayıs'a kadar azalmıştır. Vanilik, şirincik, ellagaik ve klorjenik asitlerin değeri baharda en yüksek yazın sonunda en düşüktür. Juglon ve 1,4-naftokinonda Mayısın sonunda ölçülen değer en düşüktür (Solar ve ark., 2006).

Badem kabuklarıyla yapılan başka bir çalışmada doğal badem kabuğunda, haşlanmış badem kabuğunda ve haşlama suyunda 21 farklı polifenol HPLC ile tayin edilmiştir. Toplam fenolik miktarı doğal badem kabuğunda haşlanmış badem kabuğu ve haşlama suyuna göre daha yüksektir (Mandalari ve ark., 2010).

Portekiz de yetiştirilen farklı kültürlerdeki (Lara, Franguette, Mayette, Marbot, Mellanaise ve Parisienne) ceviz yapraklarında fenolik bileşikler antimikrobiyal ve antioksidan özellikler HPLC ile tayin edilmiştir. 10 tane fenolik bileşik kalitatif ve kantitatif olarak tayin edilmiştir: 3-ve 5-kafeoilquinik asitler, 3-ve 4-parakumaroilquinik asitler, parakumarik asit, kuersetin 3-galaktosit, kuersetin 3-pentosit derivativ, kuersetin 3-arabinozit, kuersetin 3-ksilozit ve kuersten 3-ramnosit. (Pereira ve ark., 2007).

Francisco ve arkadaşları yer fıstığı ekstraktlarında fenolik bileşiklerin (gallik, protokateşik, epigallokateşin, kateşin, β -resorcylic, kafeik, prosiyanidin, epikateşin, epigallokateşin galat, p-kumarik, ferulik, piseit, epikateşin galat, kateşin galat, resveratrol ve kuersetin) eş zamanlı tayinini RP-HPLC ile yapmıştır (Francisco ve ark., 2009).

Üzümde yapılan bir çalışmada Lacopini ve arkadaşları HPLC-UV cihazı ile kateşin, epikateşin, kuersetin, rutin ve resveratrolü analiz etmişler ve antioksidan aktivitelerini incelemişlerdir (Lacopini ve ark., 2008).

Bakkali ve arkadaşlarının sebzelerdeki (domates, biber, soğan) eser elementlerin tayinini yaptıkları bir çalışmada eser elementler (Cd, Cr, Cu, Mn, Pb) basit ve hızlı bir metotla tayin edilmiştir. Eser elementler, kapalı kaplı mikrodalga parçalama sistemi kullanarak hidrojen peroksit ve nitrik asit ortamında ekstrakte edildikten sonra grafit fırınlı AAS de tayin edilmiştir. Domateste en yüksek değer Cu (78,8 $\mu\text{g/kg}$), en düşük değer Cd (14,2 $\mu\text{g/kg}$). Biberde en yüksek değer Cu (81,7 $\mu\text{g/kg}$), en düşük değer Cd (11,8 $\mu\text{g/kg}$), soğanda en yüksek değer Cu (80,9 $\mu\text{g/kg}$) en düşük değer Cd (10,7 $\mu\text{g/kg}$) bulunmuştur (Bakkali ve ark., 2009).

Baharatlarda, kuru meyvelerde ve kuru yemişlerde ağır metallerin (Pb, Cu, Zn, Fe, Mg) konsantrasyonu AAS ile tayin edilmiştir. Baharat karışımlarında eser elementler için en

yüksek ve en düşük değerlerler Pb (6,6–9,2 µg/g), Cd (0,65–1,34 µg/g), Fe (142,3–285,0 µg/g), Zn (64,2–65,8 µg/g). Kuru meyvelerdeki ağır metal miktarının kuru yemişlerden daha az olduğu bulunmuştur. Bademde Pb (1,02 µg/g) ve Cd (0,24 µg/g) miktarı diğer kuru yemiş ve kuru meyvelerden daha yüksek bulunmuştur (Sattar ve ark., 1989).

Soğukta muhafaza edilen soğandaki kuersetin glikozitleri ve fruktooligosakkaritlerin içeriğini Grzelak ve arkadaşları HPLC ile tayin etmişlerdir. Soğanın üç çeşidinde kuersetin glikosit içeriğini sırasıyla $1,381.6 \pm 123,1$ ve $1,479.4 \pm 125,5$ mg/100gr olduğunu kanıtlamışlar (Grzelak ve ark., 2009).

Ticari poşet çay ve kafein içeren içecekler üzerinde yapılan çalışmada bu içeceklerin fenolik madde miktarlarına göre karşılaştırılmasını amaçlanmıştır. Örneklerin toplam fenolik madde miktarlarını belirlemede Folin-Ciocalteu metodunu kullanılmıştır (Lakenbrink ve ark., 2000).

Kakaonun, çay ve kırmızı şaraba göre daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu ortaya koymaya çalışan Lee ve arkadaşları, antioksidan aktivitenin belirlenmesinde ABTS ve DPPH yöntemlerini kullanmış, ayrıca toplam fenolik madde (Folin- Ciocalteu metodu ile) ve toplam flavonoid miktarlarını da hesaplamışlardır. Yeşil çay için toplam fenolik madde miktarı 165 mg, flavonoid miktarı 47 mg olarak bulunurken, siyah çay için aynı sonuçlar sırasıyla 124 mg ve 34 mg olarak hesaplanmıştır (Lee ve ark., 2003).

3. ANALİZ YÖNTEMLERİ

3.1. Kromatografi

Kromatografi, bir karışımda bulunan bileşenleri birbirinden ayırmak için kullanılan yöntemlerin genel adıdır. Kromatografik yöntemlerde karışımdaki bileşenler, gaz veya sıvı haldeki hareketli fazın akışı ile sabit faz boyunca taşınırlar. Bileşenlerin ayrılması, bileşenlerin ilerleme hızlarındaki farklılığa, bir başka ifade ile sabit faza olan ilgilerine dayanır. Yani A bileşeninin sabit ve hareketli fazlardaki dağılımının,

$A_{\text{sabit}} = A_{\text{hareketli}}$ dengesi ile verildiği düşünülürse, bu dengenin denge sabiti, K, $K = C_s / C_M$ olur.

Burada C_s ve C_M sırası ile a bileşeninin sabit fazdaki ve hareketli fazdaki molar derişimidir. Bu denge sabiti değerine dağılma oranı veya dağılma katsayısı adı verilir ve ideal olarak bu oranın çok geniş bir derişim aralığında sabit olması istenir.

Kromatografik yöntemler, hareketli fazın sıvı veya gaz olmasına göre, sıvı ve gaz kromatografisi olarak sınıflandırılır. Tablo 3.1.'de çözünenin hareketli ve sabit fazlardaki dağılma dengesine bağlı olarak sıvı kromatografisi (LC) ve gaz kromatografisi (GS) türleri görölmektedir.

Tablo 3.1. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması

Genel sınıflandırma Türü	Yöntem Adı	Sabit Faz	Denge Türü
Sıvı kromatografisi (LC) (hareketli faz: sıvı)	Sıvı-sıvı veya dağılma Sıvı-katı veya adsorbsiyon İyon değiştirme	Katı üzerine adsorblanmış sıvı Katı iyon değiştirici reçine	İki sıvıda dağılma Adsorbsiyon İyon değiştirme
Gaz kromatografisi (GC) (hareketli faz: gaz)	Gaz-Sıvı Gaz-Katı	Katı üzerine adsorblanmış sıvı Katı	Gaz ve sıvıda dağılma Adsorbsiyon

3.2. Kromatografi Metotları

Kromatografi metotları fiziksel olarak, kolon düzlem (kâğıt ve ince tabaka) olmak üzere ikiye ayrılır. Kolon üzerine kurulan kromatografilerde hareketli faz, kolondaki sabit faz içinden geçerek kolonun altına iner.

Düzlem üzerine kurulan kromatografide hareketli faz (ortam), ya kapiler olaylarla veya yer çekimi (gravitasyon) kuvvetiyle hareket eder. Bu tür kromatografilerde sabit faz ya düz bir levha (cam, alüminyum gibi) üzerine muntazam olarak yayılmış özel bir madde (silika jel, alüminyum oksit gibi) veya kâğıt gibi lifli bir maddedir. Bu iki tür kromatografide kurulan dengeler ve teoriler aynıdır.

Daha fondamantal bir bakışla kromatografi dörde ayrılır. Bunlar:

- Sıvı kromatografisi,
- Gaz kromatografisi,
- Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC),
- Süperkritik akışkan kromatografisi

dir.

Böyle bir klasifikasyon hareketli ve sabit fazların cinsine ve bileşenlerin iki faz arasındaki dengesine dayanır. Adlarından da anlaşılacağı gibi birinci kromatografi türünde hareketli faz sıvı, ikincisinde gaz, üçüncüsündeyse bir süperkritik akışkandır. Kromatografi metotlarının büyük çoğunluğu ilk iki genel grupta toplanır.

Kromatografiler arasında sadece sıvı kromatografisi, hem kolonda, hem de düzlemde, gaz kromatografisi ve süperkritik akışkan kromatografisi sadece kolon ve tübüler boruda gerçekleşir.

3.2.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

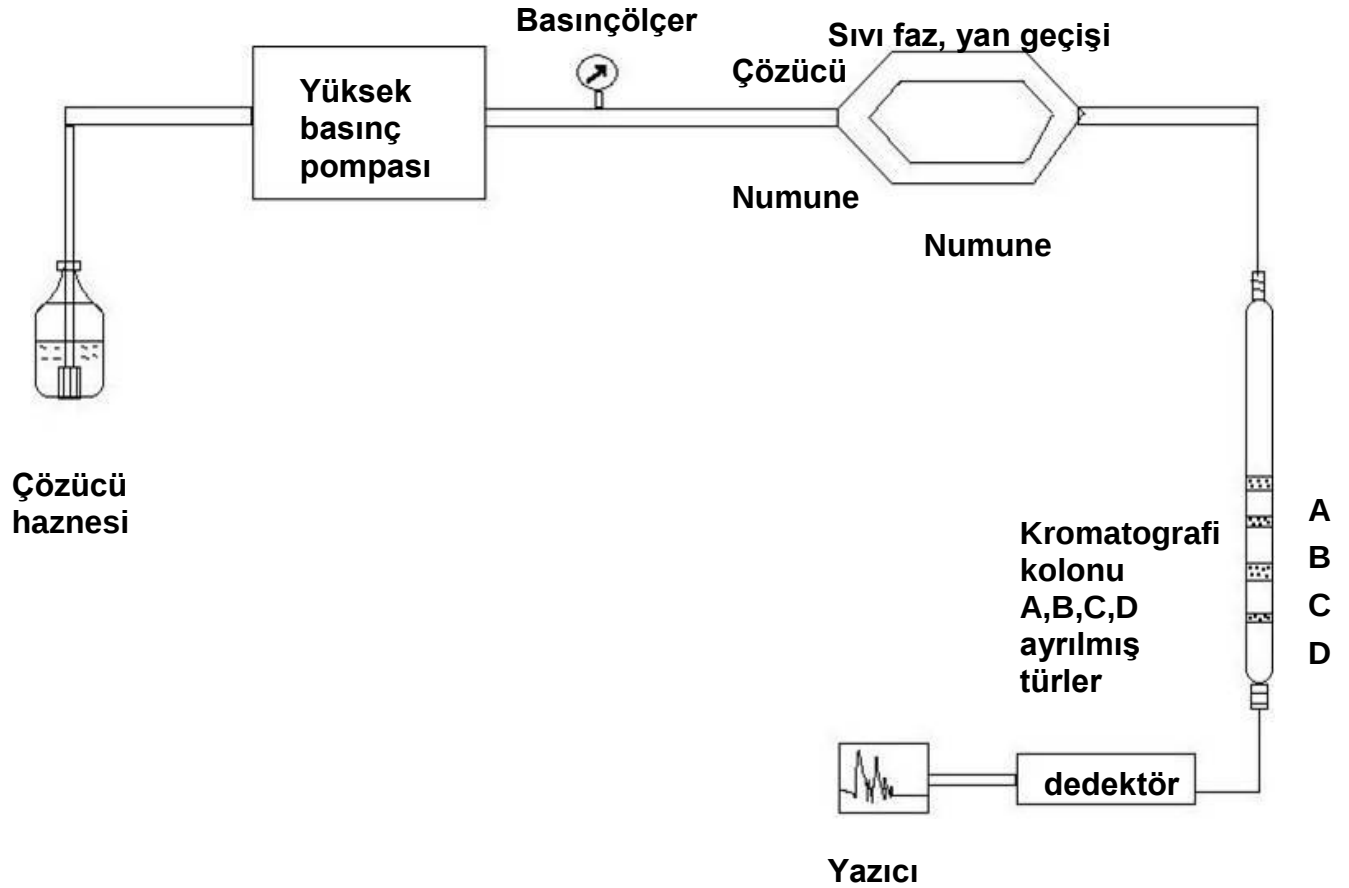
Yüksek performans sıvı kromatografisi, bütün analitik ayırma metotları arasında en çok kullanılanıdır (Gündüz, 1997). Bunun nedeni, bu metodun: hassas olması, sıcaklığa hassas olan maddelere bile uygulanabilmesi, doğruluk dereceleri ve kesinlikleri yüksek sonuçlar vermesidir.

Metodun uygulanabildiği başlıca alanlar şöyledir:

- Nükleik asitler,
- Terpenoitler,
- Pestisitler,
- Antibiyotikler,
- Steroitler,
- Proteinler,
- Aminoasitler,
- Hidrokarbonlar,
- Karbonhidratlar,
- Metal organik bileşikleri,
- Bazı inorganik maddelerdir

3.2.1.1. HPLC Cihazı

HPLC cihazı ana hatlarıyla aşağıdaki şekilde verilmiştir.



Şekil 3.1. HPLC cihazının şematik olarak görünüşü

3.2.1.2. Çözücü Haznesi ve Çözücü

Her cihazda en az bir tane 500 mL lik bir çözücü haznesi bulunur. Bu hazne camdan veya paslanmaz çelikten dir. Cihazda çözücüde çözünmüş halde bulunan oksijen, azot gibi gazları uzaklaştırmak için de bir sistem bulunur. Bu sistemle çözücüde çözünen gazlar dışarı atılır. Aksi halde bu gazlar dedektörü olumsuz yönde etkiler. Gaz uzaklaştırıcı olarak;

- Vakum pompası,
- Destilasyon cihazı,
- Isıtma sistemi,
- Çözücüyü karıştıran bir sistem,
- Çözücüden inert gaz geçiren bir sistem kullanılır.

Bir numunenin bileşenlerine ayrılması sadece bir çözücü kullanılarak yapılırsa buna isokratik elüsyon, farklı polaritede iki veya daha fazla çözücü kullanılarak yapılırsa buna dereceli elüsyon denir.

3.2.1.3. Yüksek Basınç Pompası

Yüksek basınç pompasının vuruntu yapmaması gerekir. Vuruntu anormal piklerin meydana gelmesine neden olur. Bu amaçla ileri geri hareket eden pistonlu pompalar kullanılır. Böyle pompalarda pistonun geri hareketinde sıvı pistona emilir, ileri hareketinde basılır.

Daha iyi sonuç almak için farklı fazda iki pompa da kullanılabilir. Bu metotta pompa sistemi çok önemlidir. Bunun nedenleri başlıca şöyledir:

- Yaklaşık 300 atmosferde çalışılması,
- 0,1–10 mL/dk arasında değişen bir akış hızına ihtiyaç duyulması,
- Akış hızı kontrolünün ve tekrarlanabilirliğin gerekmesi,
- Pulsuz çıkışların istenmesidir.

Bu kromatografi dalında basıncın yüksek olması, büyük bir engel değildir. Çünkü sıvıların sıkışma kabiliyeti çok düşüktür. Böyle bir çalışma yaparken bir arıza olması halinde patlama meydana gelmez.

Sistemde meydana gelebilecek bir kırılma sadece sıvı akmasına neden olur. Ancak, akan sıvının yangına sebep olabileceğini unutmamak gerekir.

HPLC’de kullanılan pompalar genel olarak üçe ayrılır. Bunlar:

- Silindir yollu pompalar,
- Yer değiştirme veya şırıngaya benzer pompalar,

- Pnömatik pompalardır.

Bunlardan en çok kullanılanı da silindir yollu pompalardır.

3.2.1.4. Numune Enjeksiyon Sistemleri

Çoğu zaman, sıvı kromatografik ölçmelerin kesinleyici belirli faktörü, numunenin kolon dolgu maddesine sevkini tekrarlanabilirliğidir. Aşırı numune yüklenmiş kolonlarda görülen bant genişlemesi de keskinliği etkiler. Bu yüzden kullanılan hacim, mikrolitrenin birkaç ondalığından belki 500 μL 'ye kadar oldukça küçük olmalıdır.

İlk ve en basit numune verme düzeneği, kendi kendine sızdırmazlık sağlayan elastomerik septumlardan şırınga ile enjeksiyon sistemi idi. Bu amaçla 100 atmosfer basınca kadar dayanıklı mikro şırıngalar kullanılır. Akış durdurma enjeksiyonunda, çözücü akışı bir an için durdurulur, kolonun başındaki bağlantı çıkarılır ve numune doğrudan kolon dolgu maddesine enjekte edilir. Bağlantı tekrar kurulduktan sonra ise sisteme tekrar basınç uygulanır. Bu tekniğin avantajı basitliğidir. Ne yazık ki, şırınga ile enjeksiyonun tekrarlanabilirliği nadiren % 2-% 3 'den daha iyidir ve çoğu zaman önemli ölçüde kötüdür.

Sıvı kromatografide numune vermek için en yaygın kullanılan yöntem numune giriş sarımlarının kullanım esasına dayanmaktadır. Birçok sıvı kromatografi cihazının ayrılmaz bir parçası olan bu sarımlar, değiştirilebilir nitelikte olup 5 μL 'den 500 μL 'ye kadar değişen hacimlerde numune hacmi seçimine olanak tanımaktadır. Bu tipteki numune alma hakları, numunenin 7000 psi basınca kadar, binde birkaç bağıl hata vererek kesinlikle numunenin kolona uygulanabilmesini sağlamaktadır. Hacmi 0,5–5 μL arasında olan halkaları bulunan mikro numune enjeksiyon muslukları da mevcuttur.

3.2.1.5. Kolonlar

Kolon çapları ve uzunlukları yapılacak işlerin cinsine göre değişir. Ancak, tipik bir HPLC kolonunun çapı 3–4 mm, uzunluğu 10–40 cm'dir. Kolon paslanmaz çelikten yapılır. Bazı özel durumlarda kolon boyu 80–100 cm kadar olabilir. Böyle durumlarda da daha iri dolgu maddesi kullanılır. Kolonun iç yüzünün camla veya teflonla kaplanması daha iyi sonuç verir. Dolgu maddesi olarak kullanılan silika jel boncukların büyüklüğü genelde 5–10 μm 'dir.

HPLC’ de bazen et kalınlığı daha büyük olan cam kolonlarda kullanılabilir. Böyle durumlarda iç basınç çok daha düşük olmalıdır. Halen en çok kullanılan kolonlar 4,6 mm çapında ve 25 cm boyunda olanlardır. Bunlar yaklaşık 5 µm’lik dolgu maddesiyle doldurulur. Böyle bir kolonda tabaka sayısı metre başına 40000–50000 arasında değişir.

Son zamanlarda çapları 1–4,6 mm, dolgu maddeleri çapları 3–5 µm, boyları 5–7,7 cm olan kolonlarda yapılmaktadır. Böyle kolonlarda tabaka sayısı 100000’e çıkmaktadır. Bunlarda hem az çözücü kullanılmakta, hem de işler daha kısa sürede tamamlanmaktadır. Az çözücü kullanılması son derece önemlidir. Çünkü kromatografide kullanılan çözücüler çok saf ve pahalıdır.

3.2.1.5.1. Koruyucu Kolonlar

Analitik kolonlar, çok değerli cihazlar olduklarından, hareketli faz bunlara gelmeden önce bir kolondan geçirilir. Bu kolonda çözücüde olması muhtemel partiküller ve kirler bertaraf edilir. Böyle kolonlara koruyucu kolonlar denir. Bunlar analitik kolonlara göre çok daha ucuzdur. Koruyucu kolonun bir başka faydası, analitik kolondaki sabit faz sıvısını korumasıdır.

Koruyucu kolondan geçen hareketli faz sıvısı, sabit faz sıvısıyla doymuş hale gelir ve analitik kolondaki sıvı azalmamış olur. Koruyucu kolonun yapımı, dolgu maddesini büyüklüğü hariç analitik kolonla aynı olmalıdır. Parçacıklar büyüdükçe kolondaki karşı basınç azalır.

3.2.1.5.2. Kolon Termostatları

Kolonlar genel olarak oda sıcaklığında çalıştırılır. Ancak, çok özel durumlarda ve daha iyi kromatogramlar elde etmek için kolonlar bazen bir termostat içine alınır. Böyle termostatlar oda sıcaklığından 150 °C ‘a kadar sıcaklıklarda kolon sıcaklığını derecenin onda birleri mertebesinde sabit tutabilir. Kolonlar sabit sıcaklıktaki suyla da kontrol edilebilirler.

3.2.1.5.3. Kolon Dolgu Maddesi Tipleri

Kolon dolgu maddesi olarak genelde boncuk şeklinde iki tip madde kullanılır. Birinci tip maddeler gözenekli olmayan cam veya bir polimerden yapılır. Çapları genel olarak 30–40 µm'dir. Yüzeylerine gözenekli yapıda silika, alümina veya iyon değiştirme reçinesi kaplanır. Bu uygulamalarda, bu şekilde kaplanmış olan boncukların üstüne bir kaplama daha yapılır. Bu daha önce yapılan kaplamanın üstüne adsorbsiyonla kaplanmış veya yayılmış bir sıvıdır. Boncuk şeklindeki parçacıklar duruma göre doğrudan bir organik maddeyle de kaplanabilir. Bunlar halen sadece koruyucu kolonun dolgu maddesi olarak kullanılmaktadır (analitik kolonlarda kullanılmazlar).

Boncuk şeklinde olan ikinci tip maddeler gözeneklidir. Bunlar çapları 3–10 µm olan mikro parçacıklardır. Bunlar da silika, alümina ve iyon değiştirme reçinelerinden yapılır. Ancak, en çok silikadan yapılanlar kullanılır. Gözenekli madde neden yapılmış olursa olsun, yüzeyi film şeklinde organik bir madde ile kimyasal veya fiziksel olarak kaplanır.

3.2.1.6. Dedektörler

Sıvı kromatografi dedektörleri temel olarak iki tiptir. Yığın özelliği dedektörleri, hareketli fazın kırma indisi, dielektrik sabiti veya yoğunluğu gibi, analit tarafından değiştirilen yığın özelliğine cevap veren dedektörlerdir. Bunun tersine, analitik özelliği dedektörleri analitin UV absorbansı floresans şiddeti veya difüzyon akımı gibi hareketli fazın sahip olmadığı bazı özelliklerine cevap veren dedektörleridir.

3.2.1.6.1. Filtreli Ultraviyole Absorbans Dedektörleri

En basit UV absorbsiyon dedektörleri, ışın kaynağı olarak bir cıva lambası kullanan filtreli fotometrelerdir. Bunlardan en yaygın kullanılanı da 254 nm dalga boyundaki şiddetli ışın, filtrelerle izole edilmiştir. Bazı cihazlarda, 250, 313, 334 ve 365 nm dalga boyundaki ışınlar, filtre değiştirmek suretiyle kullanılabilir. Tabi ki bu tip dedektörlerin kullanımı, bu dalga boyundaki ışınlardan birini absorblayan analitlerle sınırlıdır.

Giriş filtresi bulunan döteryum veya tungsten teli ışın kaynakları da bir kolondan elue edilen absorblayıcı türlerin teşhisi için kolaylıkla değiştirilebilen ve numunenin kalitatif bileşiminin bilindiği durumlardaki filtrelerin uygun sırada seçilmesi yoluyla tekrarlanabilir kantitatif analizler için özellikle kullanışlıdır. Çoğu zaman, filtrelerin değiştirilmesi bilgisayar kontrollüdür.

3.2.1.6.2. Floresans Dedektörler

HPLC için floresans dedektörler florometre ve spektroflorometrelere benzer şekilde tasarlanmışlardır. Bunların çoğunda floresans uyarıcı ışına 90 derecede yerleştirilmiş bir fotoelektrik dedektör yardımıyla gözlenmektedir. En basit dedektörlerde uyarıcı ışın kaynağı olarak cıva lambası veya yayılan ışınların belli bir bandını izole etmek için bir veya birkaç filtre kullanılır. Daha gelişmiş cihazlarda, kaynak olarak ksenon lambası floresans ışımasını izole etmek için ise optik ağ monokromatör kullanılır. Floresans dedektörlerinde gelecekteki gelişmeler, duyarlılık ve seçiciliği arttırmak amacıyla muhtemelen ayarlanabilen lazer ışın kaynağının kullanılması yönündedir.

Floresans yöntemlerinin özelliğinden kaynaklanan üstünlükleri, birçok absorbans işlemindekinin 10 katından daha büyük olabilen duyarlıklardır. Bu üstünlük, floresans özelliği bulunan numunelerdeki birleşmelerin ayrılması ve tayini için sıvı kromatografide kullanılmaktadır. Floresans özelliği olan bileşikler, ilaçlar, doğal ürünler, klinik numuneler ve petrol ürünleri gibi maddelerin analizinde sıklıkla kullanılmaktadır.

3.2.1.6.3. Kırma İndisi Dedektörleri

Kırma indisi dedektörlerinin hemen hemen bütün analitlere cevap vermek gibi önemli bir üstünlüğü vardır. Buna göre gaz kromatografisindeki alev veya termal iletkenlik dedektörlerine benzer tarzda bulunan genel dedektörlerdir. Ayrıca güvenilirler ve akış hızından etkilenmezler. Ancak bunlar sıcaklığa oldukça duyarlı olduklarından, sıcaklıkları derecenin binde birkaçından daha az değişecek şekilde tutulmaları gerekir. Ayrıca bu dedektörler diğer tip dedektörler kadar duyarlı değildir.

3.2.1.6.4. Elektro Kimyasal Dedektörler

Bu cihazlar amperometri, polarografi, kulometri ve kondüktometri esasına göre çalışmaktadır. Her ne kadar elektrokimyasal dedektörler henüz optik dedektörlerle yarışmasa da, duyarlılık, basitlik, kullanışlılık ve yaygın kullanım alanı gibi birçok yönden avantajlar sunmaktadır. Prensip olarak bu guruplardan herhangi birini içeren türler, amperometrik, polarografik ve kulometrik işlemlerle belirlenebilmektedir. Bu yüzden elektrokimyasal dedektörlerin, HPLC'nin uzun zamandır ihtiyacı olan duyarlı, genel dedektör görevini yerine getirme potansiyelinde olduğu söylenebilir.

3.2.1.6.5. Kütle Spektrometrik Dedektörler

Sıvı kromatografi ile kütle spektrometreyi birbirine bağlamadaki temel problem, birincisinin bağıl olarak çok çözücü hacimleriyle çalışması ve ikincisinin de vakum gerektirmesidir. Bu problemi çözmek amacıyla çeşitli ara bağlantılar geliştirilmiştir. Bunlardan piyasada mevcut olan bir tanesinde, kolondan çıkan eluant iki kısma ayrılır ve çok az bir kısmı, doğrudan kütle spektrometrik dedektöre bağlanması mümkün olabilir. Ticari olarak da satılan ikinci tip bağlantı da, çözücü ve analiti buharlaştırma ile ayırmak için, çözelti, hareketli bir şerit veya hareketli bir tel üzerinde toplanır ve bir ısıtma odasına gönderilir. Çözücüsü buharlaştırıldıktan sonra, şerit veya tel üzerindeki analit desorbsiyon iyonlaşmanın meydana geldiği iyon kaynağı bölgesine gelir (Skoog-West).

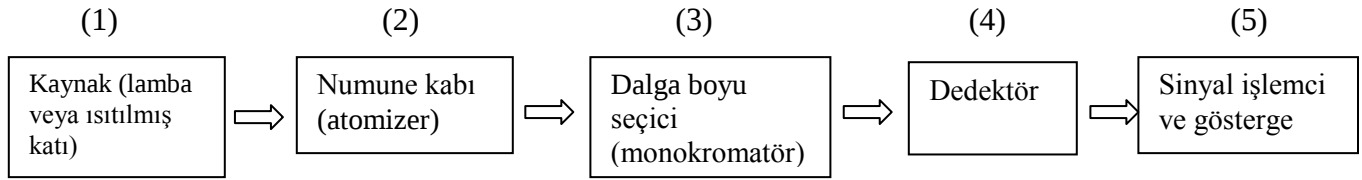
3.2.1.6.6. Fotodiyod Array Dedektörü (DAD)

UV/VIS dedektörden farkı, 512 elementten oluşan bir yüzeyde, her elementin ayrı bir dalga boyundaki absorpsiyon eş zamanlı olarak ölçülebilmesidir. Bu sayede 3 boyutlu kromatogramlar almak ve istenilen her pikin çok hızlı spektrum taramasını görebilmek olasıdır. Ayrıca istenilen dalga boyu aralığında çalışabilmesi bu dedektörün sağladığı bir diğer önemli avantajdır. Kullanılan ışık kaynağı döteryum veya tungsten lambadır (Dinçer ve ark., 2010).

3.3. Atomik Absorpsiyon Spektroskopisi

Atomik Absorpsiyon Spektrometrisi (AAS), temel düzeydeki element atomlarının kendilerine özgü dalga boylarında ışını absorblamalarına dayanır. Absorpsiyonun büyüklüğü, temel düzeydeki atomların derişimi ve analit derişimine bağlıdır. Absorbans ölçülmesiyle, analit derişimi bulunabilir. Dengede bulunan bu sistemde uyarılmış düzeydeki atom sayısının temel düzeydeki atom sayısına oranı Boltzmann eşitliği ile verilir.

Atomların ışını absorblamaları, ilk kez 1814 yılında gözlenmiştir. Atomik absorpsiyon spektroskopisinin temel prensipleri ise, 1860'da Kirchhoff tarafından kurulmuştur. Bununla birlikte, 1953'te Alan Walsh, AAS'nin Ni element analizinde kullanılabileceğini göstermiştir. Bugün, AAS, analitik kimyada en yaygın kullanılan metotlardan birisidir.



Şekil 3.2. Atomik Absorpsiyon Spektroskopisi Genel Şeması

AAS, örnekteki analite ait serbest atomların elde edilmesi ve oluşan bu atomların elektromanyetik ışını absorblamaları olmak üzere iki ana bölüme ayrılabilir. Örnekteki molekül veya iyonlardan temel haldeki element atomlarının oluşturması, atomlaştırıcıda gerçekleştirilir. Temel düzeyde bulunan atomların elektromanyetik ışını absorblamalarıyla atomlar, uyarılmış elektronik düzeye geçerler. Temel düzeyle ilk uyarılmış düzey arasındaki geçiş “rezonans geçişi” olarak bilinir. Rezonans hat, en şiddetli absorpsiyona sahip olan hattır. Temel enerji düzeyiyle, uyarılmış enerji düzeyleri arasındaki enerji farkı gittikçe azalır. Dolayısıyla elementin absorpsiyon şiddeti de azalır.

Duyarlılığı yüksek analizler için, analitin rezonans hattı kullanılır. Bütün metallerin ilk rezonans hattının dalga boyu 220 nm'den daha büyüktür. Pek çok non-metaller için rezonans hattın dalga boyu UV (ultraviyole) bölgededir. Bu nedenle, AAS ölçümleri, yaygın olarak metallerin analizinde kullanılır. Absorpsiyon olayı, Beer tarafından açıklanmıştır ve Beer

Kanunu olarak bilinir. Buna göre, serbest gaz atomlarının yaydıkları elektromanyetik ışın monokromatiktir ve $P = P_0 e^{-abc}$ formülüyle verilir. P_0 , gelen ışın şiddeti, P ; yayılan ışının gücü veya şiddeti, a ; analit absorpsiyon katsayısı, b ; ışın yolu, c ; analit derişimidir.

Bu eşitliğin geçerli olabilmesi için, örnek üzerine gelen ışının emisyon hat genişliği analit atomlarının absorpsiyon hat genişliğinden daha dar olması gerekir. Primer ışın kaynağının absorpsiyon hat genişliği çok dardır (<0.001 nm). Bu temele dayanarak ticari atomik absorpsiyon spektrometreleri üretilmiştir.

3.3.1. Işık Kaynakları

AAS'de en yaygın olarak kullanılan primer ışık kaynağı, oyuk katot lambasıdır. Oyuk katot lambasının katodu, iç çapı 2–5 mm olacak şekilde analiz edilecek elementin çok saf metalinden veya o elementi içeren alışımdan yapılır. Katot ve anot, cam silindir içine yerleştirilmiştir. Yüksek voltaj ve 30 mA'e kadar akım, oyuk katotta tamamen boşalım sağlamak için kullanılır. Dolu gazı olarak 1–5 torr basınçla, Ar veya Ne gazı kullanılır. Ne gazı, yüksek iyonlaşma potansiyelinden dolayı tercih edilmektedir.

Elektrotlar arasına yeterli gerilim uygulanarak inert gazın anotta iyonlaşması sağlanır.

Bu iyonlar, iki elektrot arasında bulunan elektriksel potansiyel ile katot yüzeyine doğru hızlandırılır. Pozitif yüklü iyonlar, negatif yüklü katot yüzeyine şiddetle çarpınca, hareket eden gaz iyonları ile çarpışarak enerji absorblarlar. Böylece, uyarılmış elektronik enerji düzeyine çıkarlar. Tekrar temel enerji düzeyine dönerken, katot elementinin karakteristik spektrumunu yayarlar.

Primer ışın kaynağının yaydığı ışının şiddeti, AAS tayinlerinde önemli bir parametredir. Belirli bir optimum değerin ötesinde lamba akımını arttırmak, pek çok elementin duyarlılığını azaltır. Yüksek akımda, self-absorpsiyon ve hat genişlemesi artar. Doppler genişlemesi, ışın yayan atomların termal hareketi nedeniyle oluşur. Hat genişlemesini önleyecek ve iyi bir lamba kararlılığı verebilecek optimum bir çalışma akımı seçilmelidir.

AAS'nin en önemli dezavantajı, analiz edilebilecek her bir element için farklı oyuk katot lambasının kullanılmasıdır. Bu nedenle, çok elementi oyuk katot lambalarının yapılması düşünülmüştür. Multi element içeren lambalar, birkaç elementin kombinasyonu şeklinde kullanılır. Katot, alaşımlardan, metaller arası bileşiklerden veya toz haline getirilmiş metal

karışımlarından yapılabilir. Diğer bir sorun da, üç veya daha fazla element bir lambada birleştirildiğinde, her bir elementin emisyon şiddetinin tek elementli lambaya göre zayıflamasıdır. Bunun sonucunda, sinyal/gürültü oranının azalması ile kesinlik ve gözlenebilme sınırı etkilenebilir.

3.3.2. Monokromatör (Dalgaboyu Seçici)

Atomik absorpsiyonda, iki hattın birbirinden ayrılması, sadece oyuk katot lambasının emisyon hatlarının yarı genişliği ile absorpsiyon hatlarının yarı genişliğine bağlıdır AAS’inde monokromatör, analitin rezonans hattını, alevden veya dağınık ışıktan ayırmak amacıyla kullanılır. Yapılan çalışmalar 0,2 nm’lik bant genişliğinin pratik olarak bütün elementler için yeterli olduğunu göstermiştir.

3.3.3. Dedektör

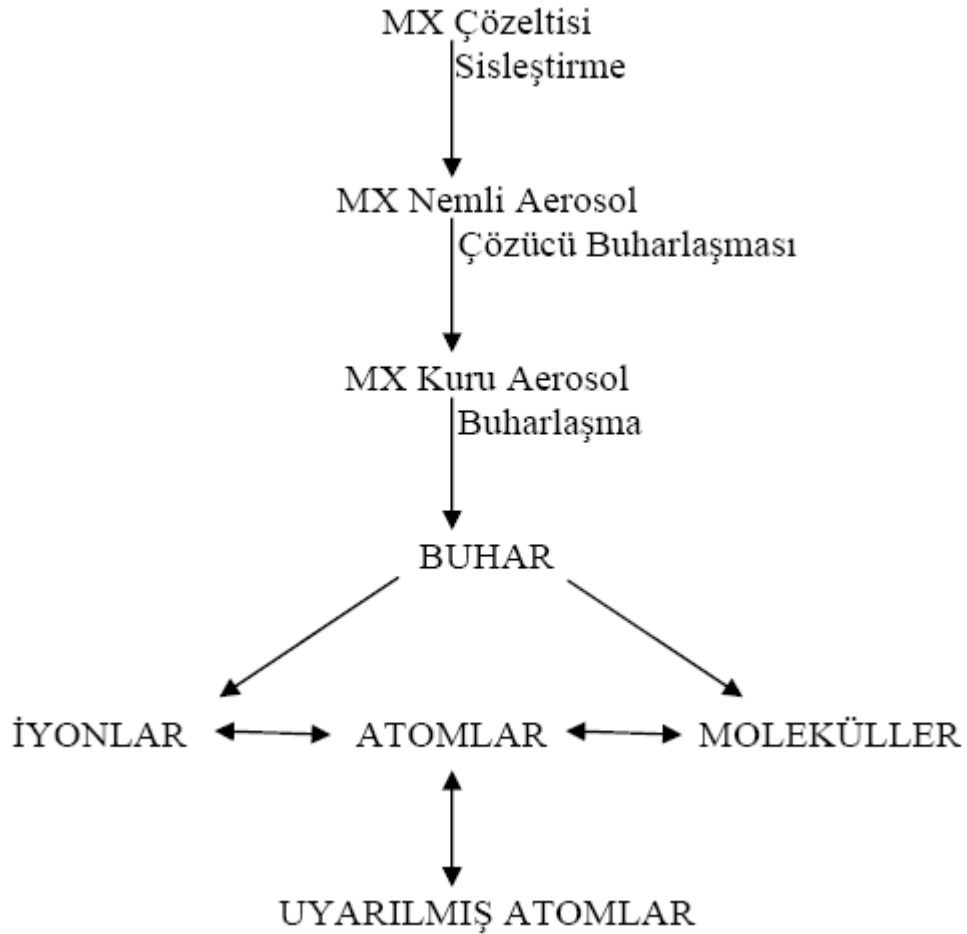
Atomik absorpsiyon spektroskopisinde, ışık sinyalinin elektrik sinyaline dönüştürülmesinde fotoçoğaltıcılar kullanılır. Fotoçoğaltıcının kullanacağı spektral aralık, katot üzerindeki ışığa duyarlı tabakaya ve tüpün pencere malzemesine bağlıdır. Fotoçoğaltıcılarda, çoğunlukla UV ve görünür bölgenin kısa dalga boylarında Cs-Sb, görünür bölge için ise selenyum katot kullanılır. Foto alıcılar yardımıyla elde edilen elektrik sinyalleri dijital, analog ya da bir yazıcıdan absorbans olarak kaydedilir. Gerekirse, bilgisayar bağlantısı ile doğrudan derişim olarak okunabilir.

3.3.4. Atomlaştırıcılar

Atomlaştırıcının görevi, örnekteki molekül veya iyonlardan temel haldeki element atomlarını oluşturmaktır. Analizin başarılı olup olmaması, atomlaşmanın etkinliğine bağlıdır. Tayinin duyarlılığı ise, incelenen elementin atomlaşma derecesi ile doğrudan orantılıdır.

3.3.4.1. Alevli Atomlaştırıcılar

Alevde, örneğin atomlaştırılmasında ilk işlem örnek çözeltisinin aleve püskürülmesidir. Aerosol halinde aleve örnek girdikten sonra, çözücü buharlaştırılır. Kuruyan küçük parçacıklar ayrılır. Katı madde kalır. Katı madde buharlaştırılır. Bu moleküllerin bir kısmı, nötr atomlar vermek üzere ayrılır. Bu atomlar, AAS’de absorpsiyon yapan türlerdir.



Şekil 3.3. Alevde atomlaşma basamakları ve alevdeki diğer olaylar

Şekil 3.4’ de görüldüğü gibi, sisteme verildiğinde, çeşitli kimyasal olaylarla, serbest atom oluşum verimi artar. Bu kimyasal olaylar:

1. Uyarılma ve gaz moleküllerinin elektromanyetik ışın yayması

2. Yüksek sıcaklıklarla molekül ve iyonları oluşturmak için alev bileşenleri ile gaz atomlarının reaksiyonu

3. Uyarılmış atomların oluşumunu içerir.

Alev, elektrotermal atomlaşmada gelişmelere rağmen, atomik spektroskopi için atomlaştırıcı olarak oldukça faydalıdır. Alevde atomlaşma verimi, uygulanan yanıcı ve yakıcı gaz oranına dolayısıyla sıcaklığa bağlıdır. Alevin maksimum çalışma sıcaklığı, absorpsiyon veya emisyon hattı ile karışmamalıdır.

Alevli AAS'de hava/yakıt oranı ve alev yüksekliği, temel düzeyde serbest atomların sayısını maksimum yapacak, emisyon, iyonlaşma veya bileşik oluşumunda kaynaklanacak bozucu etkileri minimuma indireyecek şekilde seçilir. Tablo 3.2.'de maksimum alev sıcaklıkları ve yanıcı-yakıcı gaz türleri verilmiştir. AAS' de en iyi bilinen ve kullanılan alev hava/asetilen alevidir.

Birçok element için uygun bir ortam ve atomlaşma için yeterli sıcaklık sağlar. Bu alev, geniş bir spektral aralıkta geçirendir 230 nm'ye kadar self absorpsiyonu yoktur. Ayrıca, emisyonu çok düşüktür. Alüminyum, berilyum, silisyum, vanadyum ve nadir toprak elementleri gibi çok kararlı oksitler oluşturan elementlerin atomlaşması için ise sadece yüksek sıcaklık veren oksijen asetilen veya nitroz oksit-asetilen alevleri kullanılır.

Tablo 3.2. Yaygın olarak kullanılan alevin özellikleri

Yanıcı Gaz	Yakıcı Gaz	Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)
Asetilen	Hava	2400
Asetilen	Azot oksit	2800
Asetilen	Oksijen	3140
Hidrojen	Hava	2045
Hidrojen	Azot oksit	2690
Hidrojen	Oksijen	2660
Hidrojen	Hava	1925

3.3.4.2. Elektrotermal Atomlaştırıcılar

Alevli atomlaştırıcılara alternatif olarak elektrotermal atomlaştırıcılar geliştirilmiştir. Grafit fırın ve karbon çubuk gibi elektriksel ısıtmalı cihazlar AAS’ de alevsiz atomlaştırıcı olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Çünkü bu maddeler, yüksek elektriksel iletkenliğe, yüksek iç dirence ve uzun süre dayanıklılığa sahiptirler.

3.3.5. Atomik Absorpsiyon Spektrometrisinde Görülen Girişimler ve Önlenmesi

Atomik absorpsiyon spektroskopisinde nicel tayinler referans madde ile karşılaştırma şeklinde yapıldığından, örneğin referans maddesine göre herhangi bir farklı davranışı girişimlere yol açmaktadır. Girişim kelimesi ile analizde hataya neden olan etmenlerin tümü kastedilmektedir. Girişimler nedenlerine bağlı olarak kimyasal, fiziksel, iyonlaşma, spektral ve zemin olarak sınıflandırılabilir. Kimyasal girişimler, birim hacimde oluşan atom sayısını etkilediği halde, zemin ve spektral girişimler sinyal ölçüme dayanır.

3.3.5.1. Kimyasal Girişimler

Kimyasal girişimlerin ortaya çıkmasının başlıca iki nedeni vardır: Bunlardan birisi, zor eriyen veya buharlaşan tuz oluşur ve oluşan moleküller tam olarak ayrışmaz. Diğer bir neden, serbest atomlar, ortamda bulunan öteki atom veya radikallerle tepkimeye girerek absorpsiyon için uygunluklarını kaybederler. Alevde karşılaşılan kimyasal girişimlerden başlıcası, serbest atomların ortamda bulunan başka atom veya radikallerle kendiliğinden tepkimesidir. Serbest metal atomları ile alevin yanma ürünlerinin birleşmesi sonucu oksitler, hidroksitler, karbürler veya nitrürler oluşur. Bu tür girişimin sonucu olarak, otuz kadar metalik element hava/asetilen alevinde kararlı oksitler, hatta zor eriyen karbür ve nitrürler oluştururlar.

Örnek matriksinin neden olduğu kimyasal girişimler de söz konusudur. Eğer, bir örnekte standarda göre daha az ayrışan moleküller oluşuyorsa, incelenen metalin derişimi

hatalı olarak düşük bulunacaktır. Buna karşılık, standarda göre daha kolay ayrışan moleküller oluşuyorsa, sinyal artar ve pozitif bir hata söz konusudur.

Birçok kimyasal girişim, alev sıcaklığının yükseltilmesi veya kimyasal çevrenin değiştirilmesi ile uzaklaştırılır. Bu pratik değilse, kimyasal girişimler, kimyasal olarak giderilebilir. Bunun için en çok kullanılan yöntemler şunlardır:

1. Girişim yapan iyon, standart çözeltiye eklenir veya daha genel olarak, örnek matriksi ve standart çözeltiler birbirine benzetilir.
2. Girişim yapan anyon, örnek çözeltisine aşırı eklenen başka bir katyonla bağlanır.
3. Tayin edilecek katyon kompleks içinde tutulur.
4. Alevisiz atomlaştırıcılarda, kimyasal olarak inert ve indirgen bir ortam olduğundan alevin özelliklerinin neden olduğu çeşitli girişimlerle karşılaşmaz.

Elektrotermal atomlaştırıcılarda, kimyasal girişimler, başlıca, uçucu bir bileşik oluşumu veya kararlı bir bileşik oluşumundan kaynaklanır. Analit, iki nedenden dolayı ortamdan uzaklaşabilir. Bunlardan birisi, incelenen element örnekte, kullanılan kül etme böyle bir bileşiğe dönüştürülebilir. Bir örnekte incelenen her element için, belli bir atomlaşma sıcaklığına karşı bozunma sıcaklıkları taranarak, uygun bir bozunma sıcaklığı saptanmalıdır. İncelenen elementin yüksek ayrışma sıcaklıklarına dayanıklı, fakat atomlaşma sıcaklığında hızla ve nicel olarak ayrışan bir bileşik oluşturması, girişimleri büyük ölçüde giderir.

3.3.5.2. Spektral Girişimler

Spektral girişim, tayini istenen elementin rezonans çizgisinin ışık kaynağında veya alevde oluşan çizgilerle etkilenmesi sonucu ortaya çıkar. Emisyon ve absorpsiyon çizgilerinin karşılıklı durumu dikkate alınırsa, bu tür girişimi meydana getirebilecek sebepler şöyle sıralanabilir:

1. Analitin rezonans çizgisinin ışık kaynağındaki diğer emisyon çizgileri ile çakışması, Tek element içeren oyuk katot lambaları için, girişime neden olabilecek emisyon çizgilerinin kaynağı, katot safsızlıkları veya dolgu gazıdır. Çok element içeren oyuk katot lambaları için, komşu elementlerden safsızlık gelebilir.

2. Analitin rezonans çizgisinin alevde oluşan absorpsiyon çizgileri ile çakışması. Çakışma şiddeti üzerinde, absorpsiyon ve emisyon profillerinin maksimumlarının yakınlığı ve profil şekilleri etkin olan faktörlerdir.

3.3.5.3. Zemin Girişimi

Bir atomik buhar kuvvetli manyetik alana tutulduğu zaman, atomların elektronik enerji seviyelerinde her bir elektronik geçişte birçok absorpsiyon çizgisinin oluşumuna yol açan bir yarıma gözlenir. Oluşan yeni çizgilerin absorpsiyonları toplamı, onların oluştuğu orijinal çizginin absorpsiyonuna tam olarak eşit olmak üzere, bu çizgiler biri diğerinden 0,01 mm. kadar ayrılır. Bu durum genel olarak bütün atomik spektrumlarda Zeeman etkisi olarak tanımlanır (Spektroskopi Yaz Okulu, KTÜ., 1988).

1975’li yıllardan sonra Zeeman etkisinden yararlanmada gelişme olmuş ve ilk defa ticari aletlere uygulanmıştır. Günümüzde çoğu ticari aletlerde bu sistemler bulunmaktadır.

Zeeman etkisinin ana ilkesi şöyledir. Magnetik alan etkisine konulan bir atomun kuantum hallerinde değişim olur ve spektral hatlar üç veya daha fazla hatta ayrılır. Bunlardan orta alanı Π bileşeni, bunun iki yanında simetrik σ^- σ^+ ve bileşenleri olarak bilinir. Lamba ile atomlaştırıcı arasına bir polarizör konur ve belirli frekansta lambadan bir Π bileşeni (toplam absorpsiyonun ölçer) ve birde σ bileşeni (zemin absorpsiyonunu ölçer) Π ve σ bileşenleri ile ölçülen absorpsiyonlar farkı düzeltilmiş atomik absorpsiyon değeridir.

Zeeman etkili cihazlar, zemin için daha önce belirtilen yöntemlerden daha doğru düzeltme oluşturur. Bu cihazlar özellikle elektrotermal atomlaştırıcı türü için yararlı olup, idrar ve kan numunelerindeki elementlerin doğrudan tayinlerine izin verir.

4. MATERYAL- METOD

4.1. Kullanılan Cihazlar ve Cam Malzemeler

Çalışmada fenolik asitlerin tayini için HPLC (Shimadzu) ve DAD(Shimadzu SPD-M10A VP) dedektörü birlikte kullanılmıştır. Çalışma şartları Tablo 4.1. de verilmiştir.

Metal tayini için kapalı ortamda mikrodalga çözünürleştirme ve kuru külleme metotları kullanıldı. Kapalı ortamda mikrodalga parçalama için AAS (Peklin Elmer AA800 Analyst) ve mikrodalga ısıtıcı (Berghof MWS–2) kullanıldı. Kuru külleme için ise Kül fırını (Lenton Furnaces) ve AAS (Unicam 929 AA Spectrometer) cihazları kullanıldı.

Tablo 4.1. HPLC çalışma parametreleri

Standart	Alıkonma zamanı (dk)	Enjeksiyon hacmi (µL)	Sıcaklık (°C)	Dalga boyu(nm)
Gallik asit	1,886	2	32	280
Kafeik asit	2,818	2	32	330
Vanilik asit	3,059	2	32	254
Resveratrol	3,173	2	32	306
Ferulik asit	4,593	2	32	330
Rosmarinik asit	5,652	2	32	330
Kuersetin	5,894	2	32	254

Kullanılan diğer yardımcı malzemeler şunlardır:

1. Ultrasafsu cihazı
2. Etüv
3. Elektronik terazi
4. Santrifüj (Hettich Zentrifugen Universal 320 R)
5. Kolon [Macherey Nagel (MN) EC 150/4,6 Nücleodur 100-5 C18 ec]

6. Isıtcılı karıştırıcı
7. Vial tüp
8. Homojenizatör (Micra)
9. Otomatik pipet
10. Süzgeç kâğıdı (125 mm)
11. Teflon kap
12. Değişik büyüklükte pipet, beher, balon joje, mezür vb. cam malzemeler kullanıldı.

4.2. Kullanılan Standart Çözelti ve Reaktiflerin Hazırlanması

4.2.1. AAS İçin Standart Çözelti Hazırlanması

4.2.1.1. Kapalı Ortamda Mikrodalga Parçalama Yöntemi İçin Standart Çözelti Hazırlanması

Co stok çözeltisi: 1000 ppm'lik Co'nın standart stok çözeltisinden (Merck) 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1 ppm'lik çözeltiler hazırlandı.

Ni stok çözeltisi: 1000 ppm'lik Ni'nin standart stok çözeltisinden (Merck) 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1 ppm'lik çözeltiler hazırlandı.

Pb stok çözeltisi: 1000 ppm'lik Pb'un standart stok çözeltisinden (Merck) 1, 2, 3, 5 ppm'lik çözeltiler hazırlandı.

Mn stok çözeltisi: 1000 ppm'lik Mn'nin standart stok çözeltisinden (Merck) 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1 ppm'lik çözeltiler hazırlandı.

Fe stok çözeltisi: 1000 ppm'lik Fe'nin standart stok çözeltisinden (Merck) 1, 2, 3, 4 ppm'lik çözeltiler hazırlandı.

Zn stok çözeltisi: 1000 ppm'lik Zn'nun standart stok çözeltisinden (Merck) 1, 2, 3, 4 ppm'lik çözeltiler hazırlandı.

4.2.1.2. Kuru Külleme Yöntemi İçin Standart   zelti Hazırlanması

Cu stok çözeltisi: 1000 ppm'lik Cu'nın standart stok çözeltisinden (Merck) 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1, 2, 3 ppm'lik çözeltiler hazırlandı.

Zn stok çözeltisi: 1000 ppm'lik Zn'nun standart stok çözeltisinden (Merck) 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1, 2, 3, 4, 5 ppm'lik çözeltiler hazırlandı.

Fe stok çözeltisi: 1000 ppm'lik Fe'in standart stok çözeltisinden (Merck) 0,3, 0,6, 1,2, 2,4, 3, 6, 9 ppm'lik çözeltiler hazırlandı.

4.2.2. HPLC İçin Standart   zelti ve Reaktiflerin Hazırlanması

Standart   zelti olarak kullanılan flavonoidlerin (Kuersetin, Resveratrol), fenolik asitlerin [Vanilik asit (Fluka), rosmarinik asit (Aldrich), kafeik asit (Sigma), ferulik asit (Fluka), gallik asit (Sigma)] HPLC saflıkta 500 ppm'lik stok çözeltileri hazırlandı.

Mobil Faz: 10mM H₃PO₄ (A)   zeltisinin % 75 i ile metanolün (B) % 25 i alınarak mobil faz oluşturuldu. Mobil faz oluşturulurken 1 mL/dk olarak belirlendi.

4.3. Örneklerin Temini ve Analize Hazırlanması

Elazığ ve yöresinden temin edilen  edene  rnekleri ve ayrıca piyasada satılan  edene kahvesi oda sıcaklığında muhafaza edildi. İşlenmemiş  edene  rnekleri saf su ile yıkanıp etüvde 75  C de 24 saat kurutuldu. Örnekler homojenize edilip, aşağıdaki yöntemler uygulanarak analiz için hazırlandı.

4.3.1. Bitki Örneklerinin Fenolik Bileşik Tayini İçin Ekstraksiyonu

Homojenize edilmiş olan bitki örneklerinin her birinden 2 g tartıldı. 10 mL metanol ilave edilip homojenizatör ile karıştırıldı. 1 gün soğutucuda bekletildikten sonra santrifüj edildi (9000 devir, 15 dk).

Santrifüj edilen ekstraktlar soğutucuda analiz için bekletildi. Örnekler daha sonra HPLC'ye enjekte edildi.

4.3.2. Bitki Örneklerinin Metal Tayini İçin Çözünürleştirilmesi

4.3.2.1. Kuru Kütleme Yöntemi İçin Örnek Çözünürleştirilmesi

Kurutulmuş örneklerden 1 g tartıldı. Kül fırınında 100, 200, 300, 350, 400 ve 450°C de gaz çıkışları bitinceye kadar bekletildikten sonra 480 °C de beyaz kül haline gelene kadar bekletildi. Kül örneklerine 2 mL saf nitrik asit eklenerek kuruluğa kadar ısıtıldı. 2 mL'lik saf nitrik asit tekrar eklenerek kurutma işlemi tekrarlandı. Kalıntıya 10 mL 0,1 N nitrik asit çözeltisi eklendi ve süzgeç kâğıdı yardımıyla süzüldü. Süzme işleminden sonra elde edilen berrak çözeltiler Atomik Absorbsiyon Spektrometresi cihazı ile analiz edildi.

4.3.2.2. Kapalı Ortamda Mikrodalga Parçalama Yöntemi İçin Örnek Çözünürleştirilmesi:

Kurutulmuş örneklerden 100 mg tartıldı. Örnekler teflon kap içerisine alınıp üzerine 5 mL nitrik asit, 2 mL hidrojen peroksit eklenip 30 dk bekletildi. Örnekler mikrodalga cihazına alındı (mikrodalga ısıtıcı parametreleri Tablo 4.2. de gösterildiği gibidir.). Son olarak örnekler 10 mL ye tamamlandı.

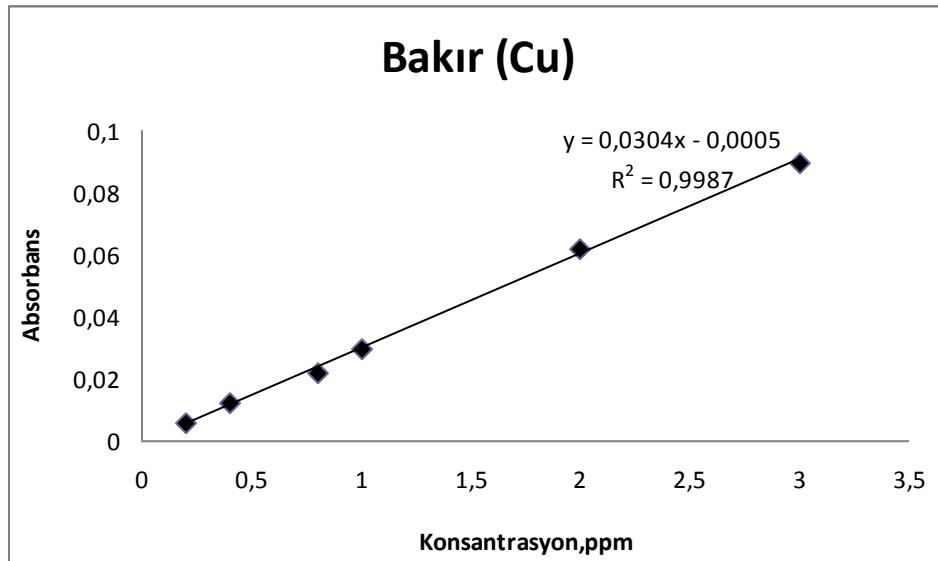
Tablo 4.2. Mikrodalga ısıtıcı parametreleri

Step	1	2	3	4
T°C	145	170	100	100
Power %	80	80	80	80
Time min.	5	10	10	10

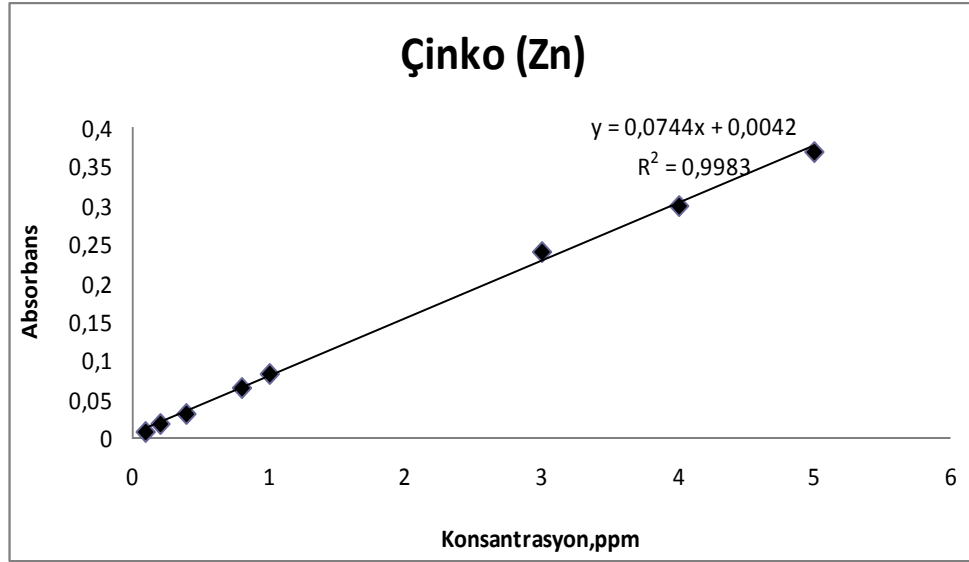
4.4. Kalibrasyon Grafikleri

4.4.1. Kuru Külleme İle Metal Tayini İçin Elde Edilen Kalibrasyon Grafikleri

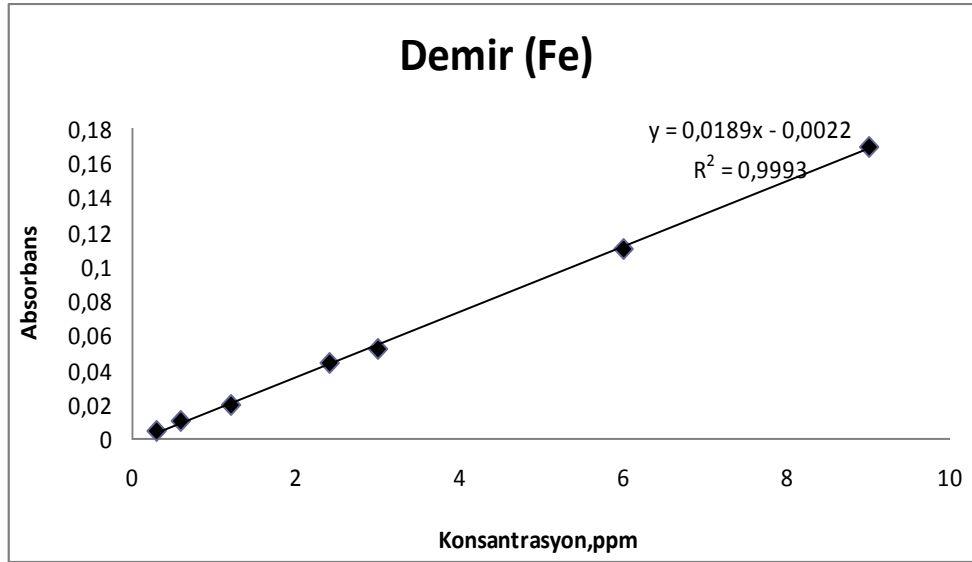
Kuru külleme yöntemi ile Cu, Zn, Fe için elde edilen kalibrasyon grafikleri sırasıyla Şekil 4.1., Şekil 4.2.ve Şekil 4.3. te verilmiştir.



Şekil 4.1. AAS' de kuru külleme ile Cu tayini için elde edilen kalibrasyon grafiği



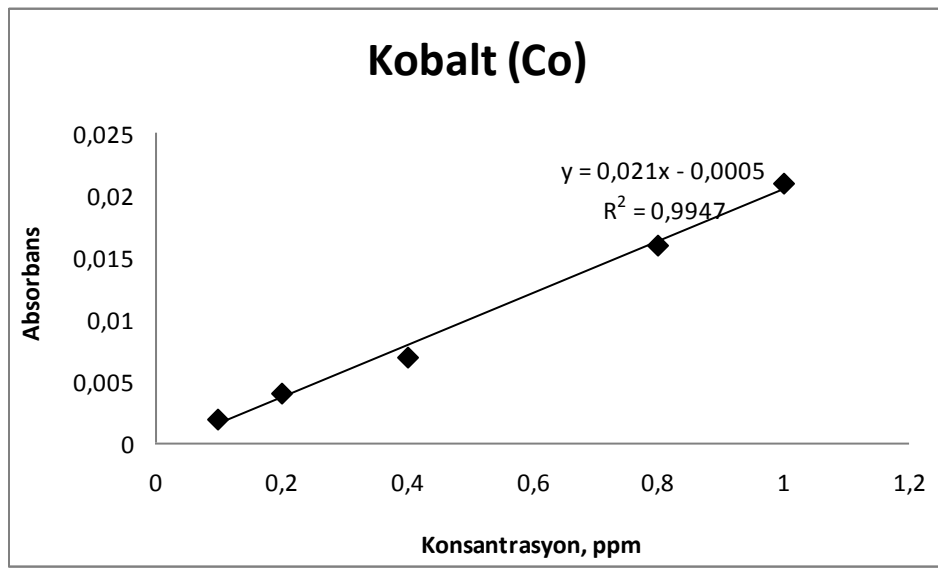
Şekil 4.2. AAS’ de kuru kütleme ile Zn tayini için elde edilen kalibrasyon grafiği



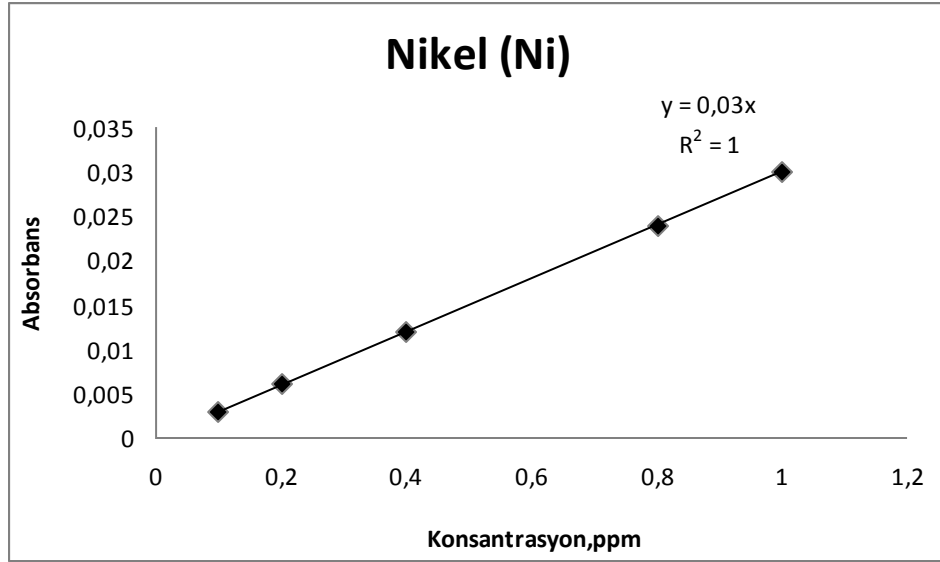
Şekil 4.3. AAS’ de kuru kütleme ile Fe tayini için elde edilen kalibrasyon grafiği

4.4.2. Kapalı Ortamda Mikrodalga Parçalama ile Metal Tayini İçin Elde Edilen Kalibrasyon Grafikleri

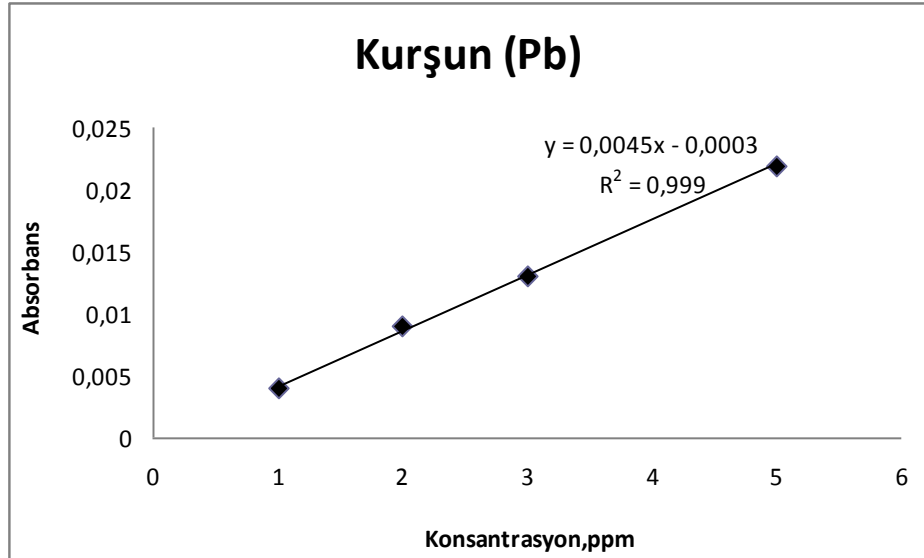
Yaş çözme yöntemi ile Co, Ni, Pb, Mn, Fe, Zn, Cu için elde edilen kalibrasyon grafikleri sırasıyla Şekil 4.4., Şekil 4.5., Şekil 4.6., Şekil 4.7., Şekil 4.8., Şekil 4.9.ve Şekil 4.10'da verilmiştir.



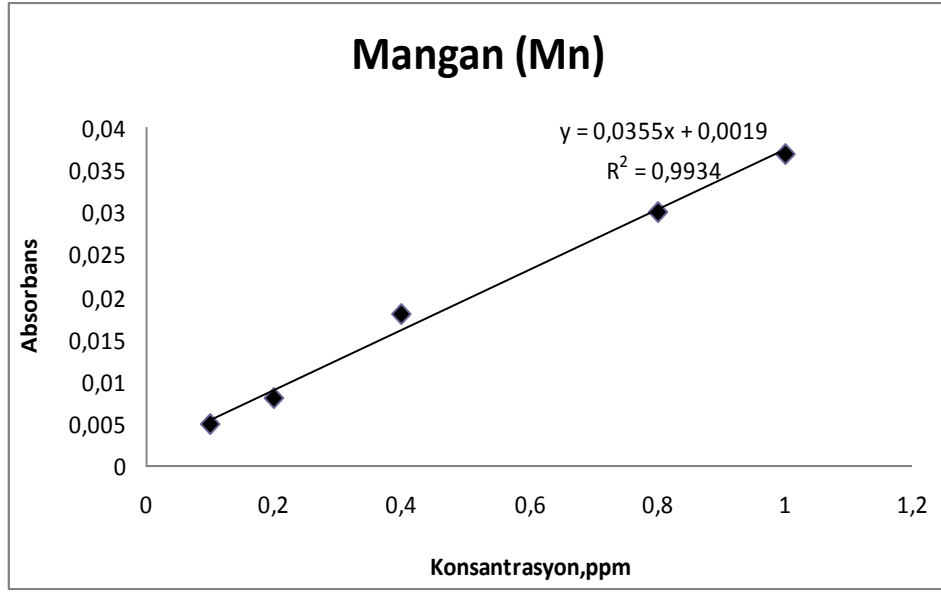
Şekil 4.4. AAS' de, kapalı ortamda mikrodalga parçalama ile Co tayini için elde edilen kalibrasyon grafiği



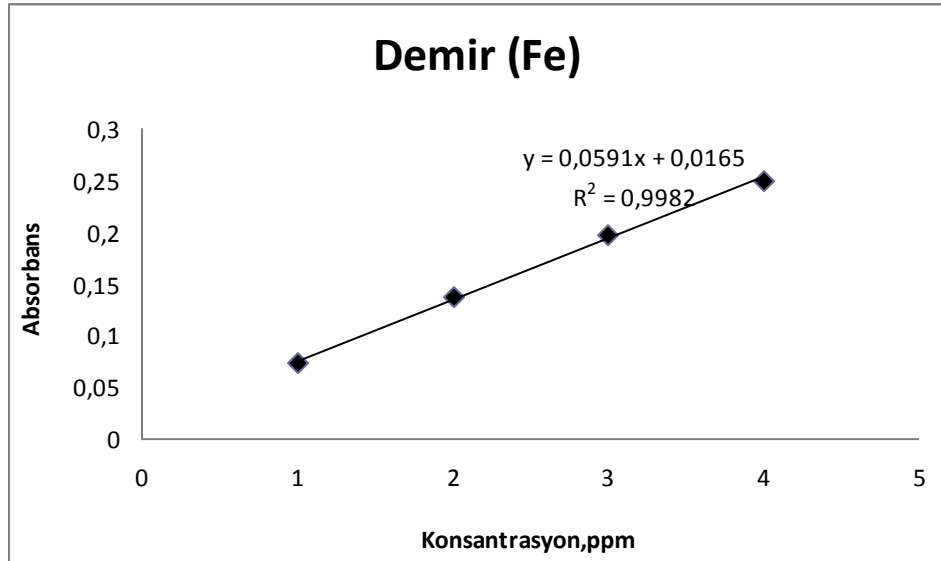
Şekil 4.5. AAS’ de kapalı ortamda mikrodalga parçalama ile Ni tayini için elde edilen kalibrasyon grafiği



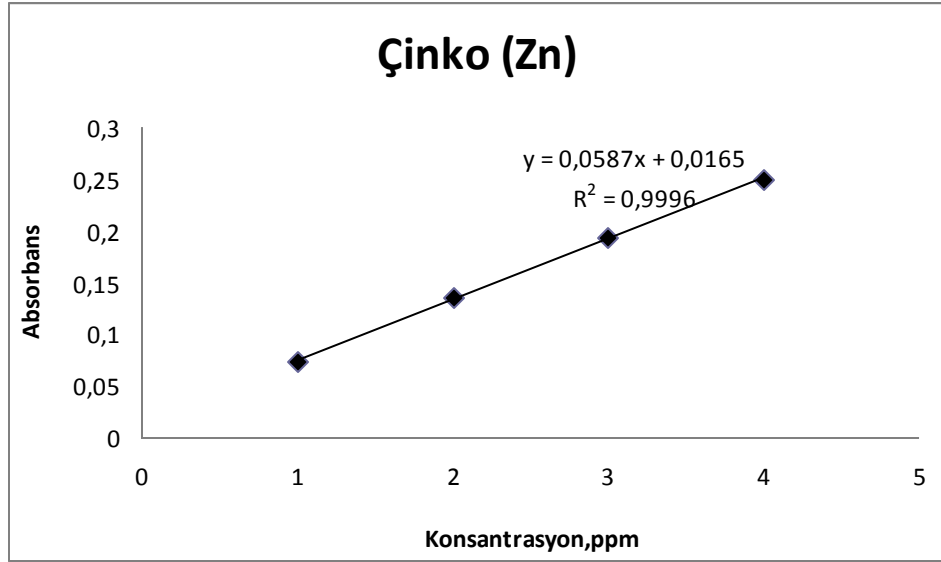
Şekil 4.6. AAS’ de kapalı ortamda mikrodalga parçalama ile Pb tayini için elde edilen kalibrasyon grafiği



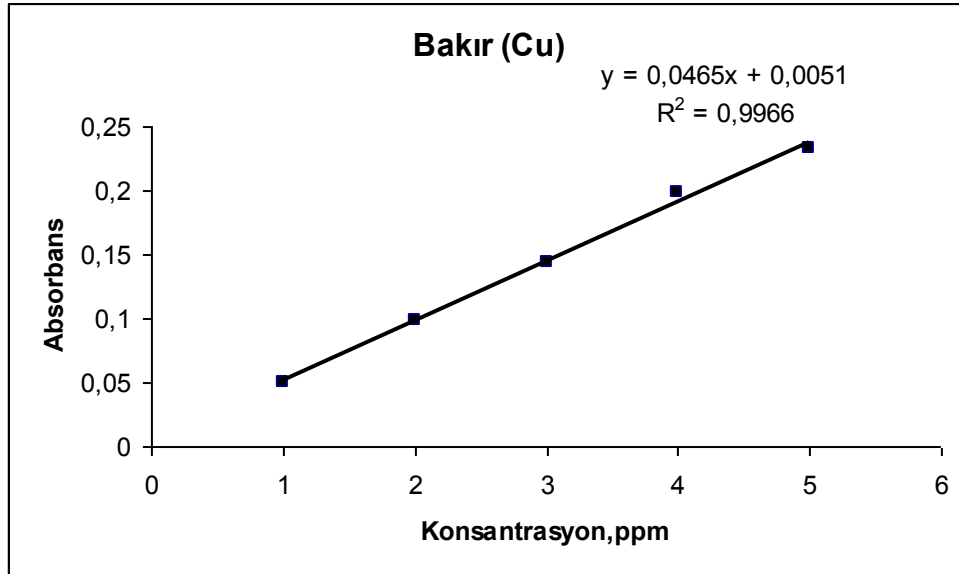
Şekil 4.7. AAS’ de kapalı ortamda mikrodalga parçalama ile Mn tayini için elde edilen kalibrasyon grafiği



Şekil 4.8. AAS’ de kapalı ortamda mikrodalga parçalama ile Fe tayini için elde edilen kalibrasyon grafiği



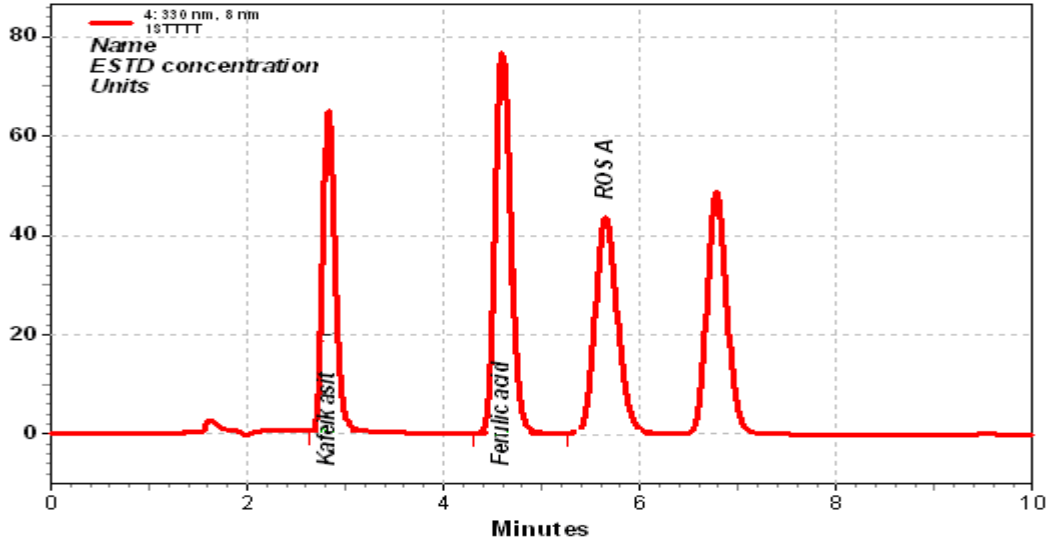
Şekil 4.9. AAS’ de kapalı ortamda mikrodalga parçalama ile Zn tayini için elde edilen kalibrasyon grafiği



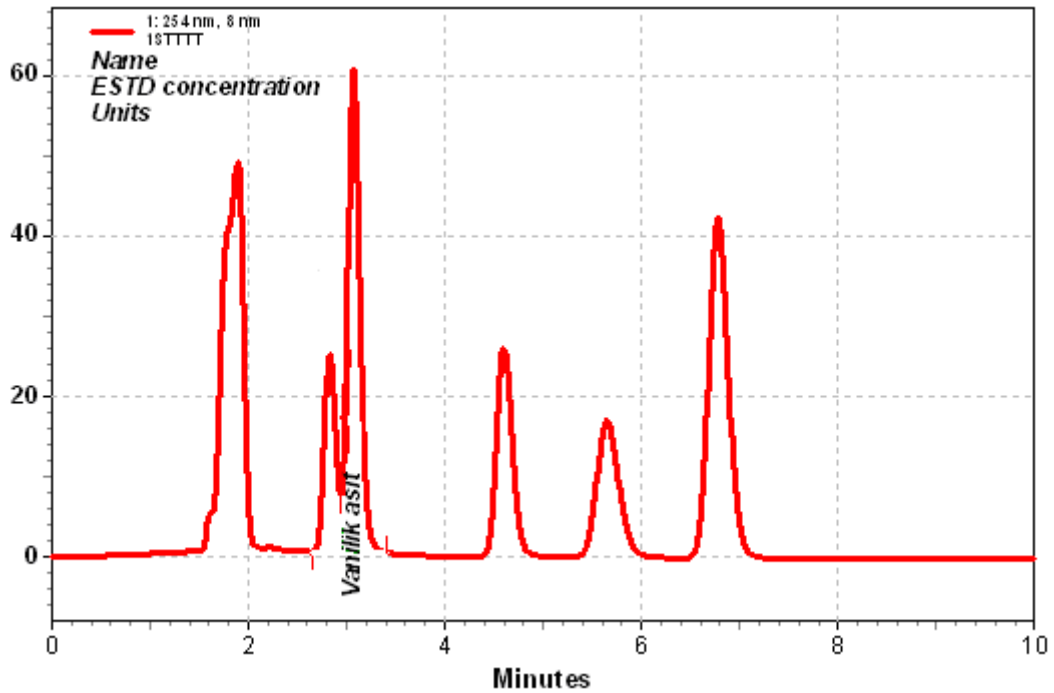
Şekil 4.10. AAS’ de kapalı ortamda mikrodalga parçalama ile Cu tayini için elde edilen kalibrasyon grafiği

4.3. Fenolik Asitleri için Standart Kromatogramı

Fenolik asitlerin standartlarının kromatogramı Şekil 4.11.1 ve Şekil 4.11.2’de verilmiştir.



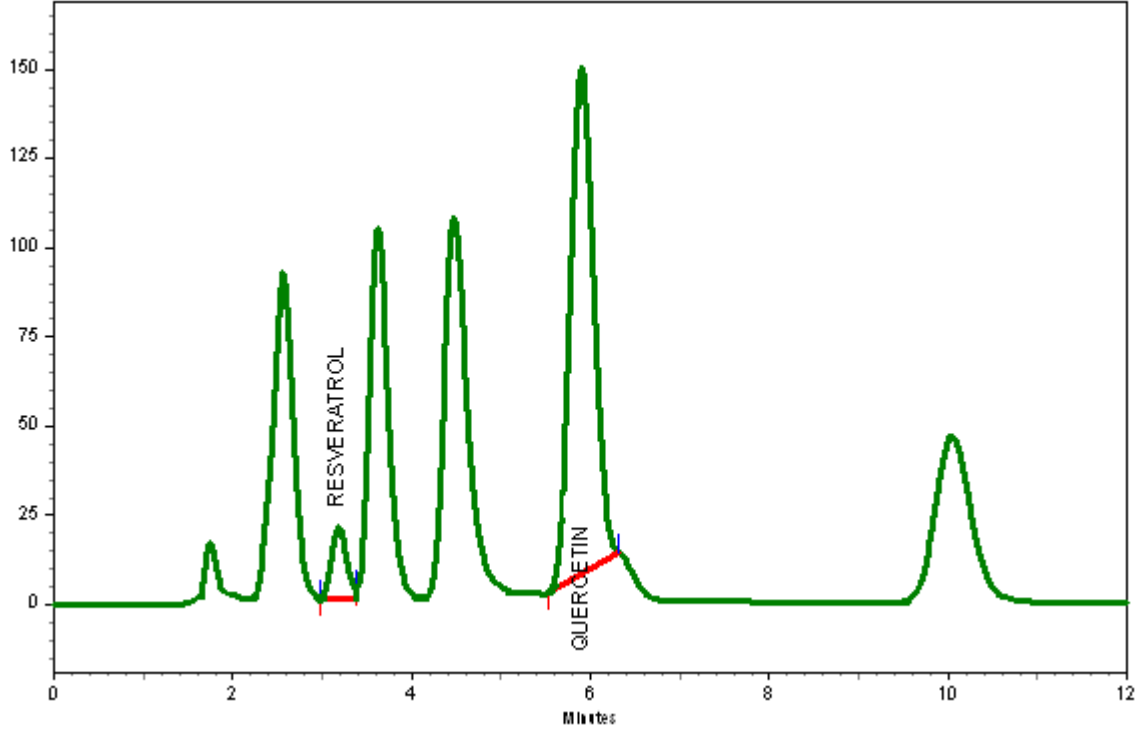
Şekil 4.11.1. HPLC-DAD ile kafeik asit, ferulik asit ve rosmarinik asit için standart kromatogramı



Şekil 4.11.2. HPLC-DAD ile vanilik asit standart kromatogramı

4.4. Flavonoidler için standart Kromatogramları

Kuersetin ve resveratrolun standart kromatogramı Şekil 4.12’de verilmiştir.



Şekil 4.12. HPLC-DAD ile resveratrol ve kuersetinin standart kromatogramı

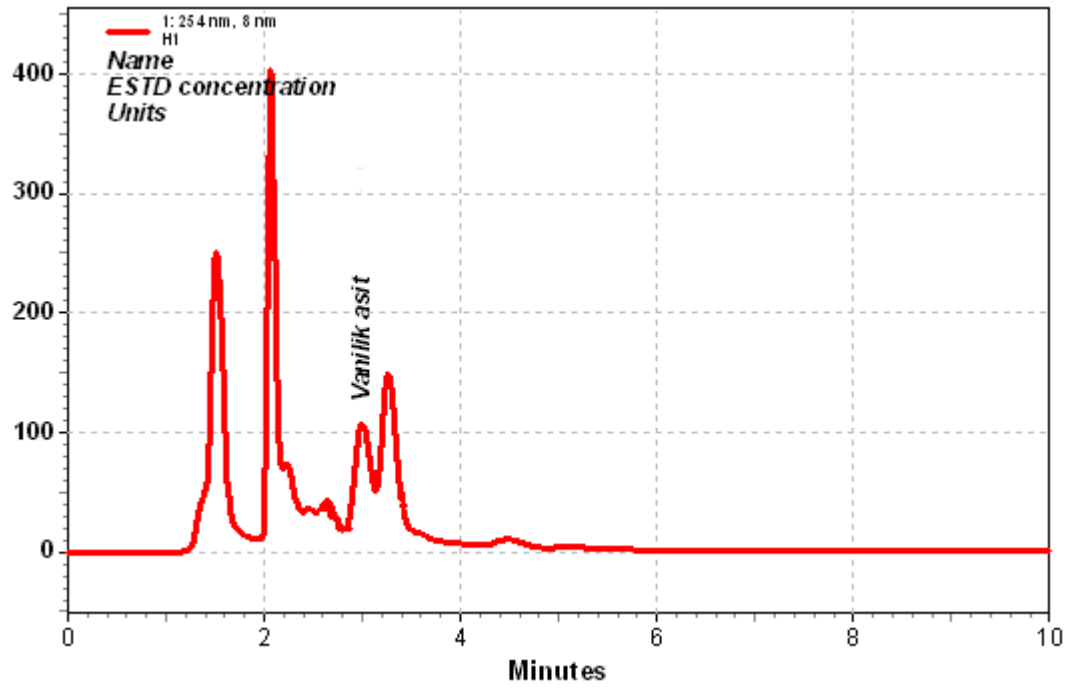
5. BULGULAR

5.1. HPLC Kromatogramları

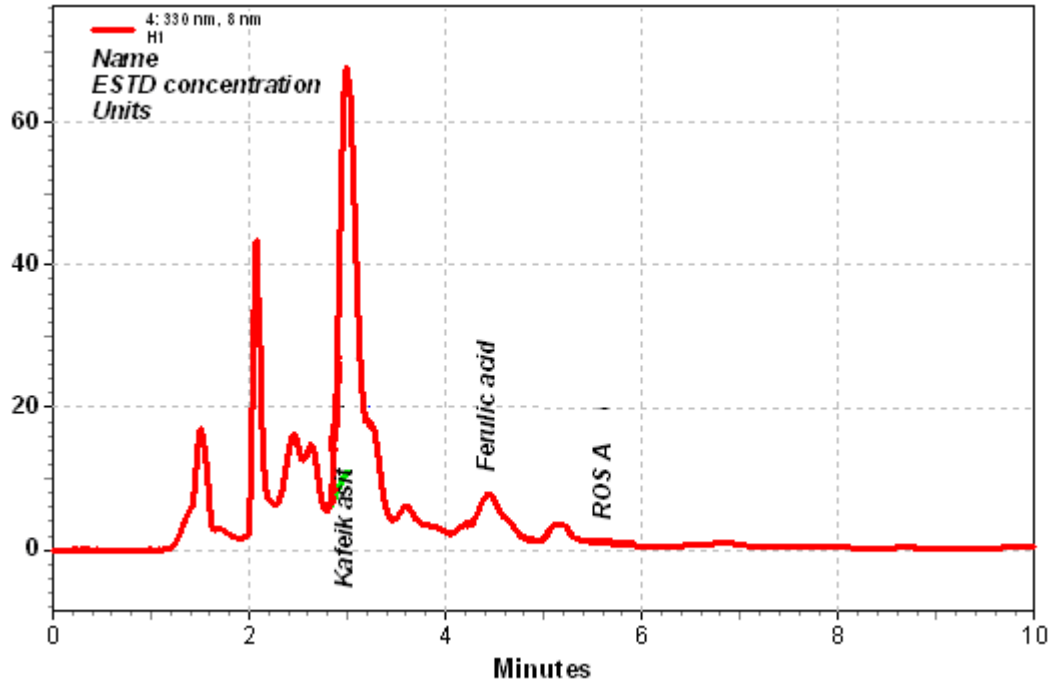
HPLC-DAD cihazında Class-VP HPLC programına (Shimadzu, Kyoto, Japan) göre veriler hesaplanmıştır.

5.1.1. Çedene Bitkisi İçin Elde Edilen Kromatogramlar

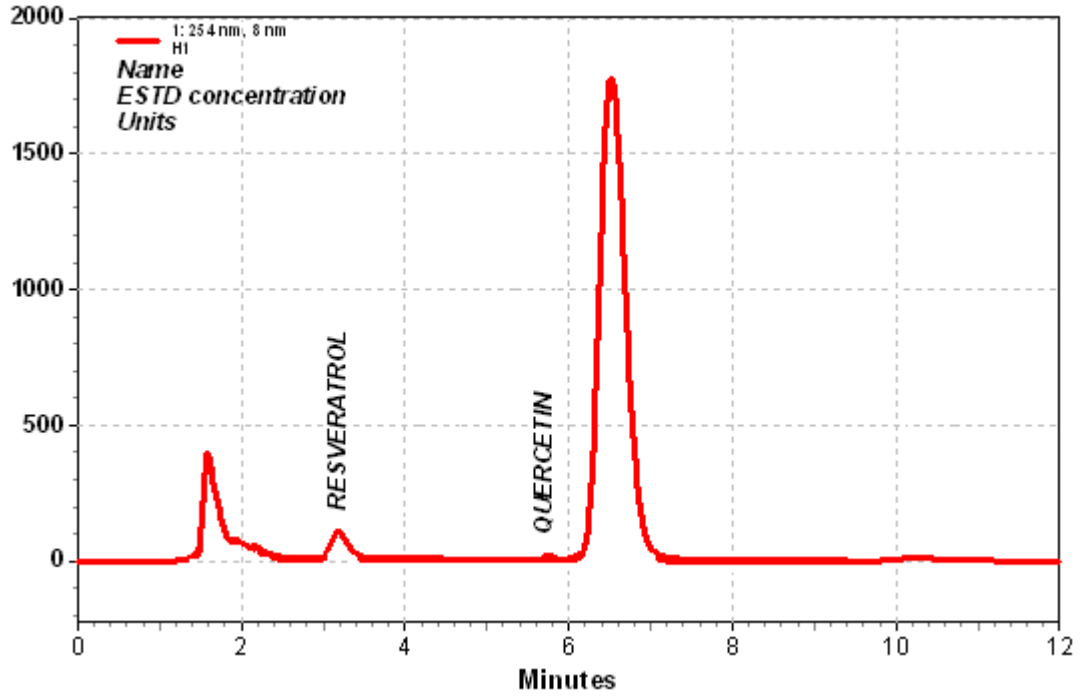
Çedene bitkisinde bulunan fenolik asitlerin kromatogramı Şekil 5.1. ve Şekil 5.2’de, flavonoidlerin kromatogramı Şekil 5.3’de verilmiştir.



Şekil 5.1. HPLC-DAD ile çedene bitkisinin vanilik asit kromatogramı



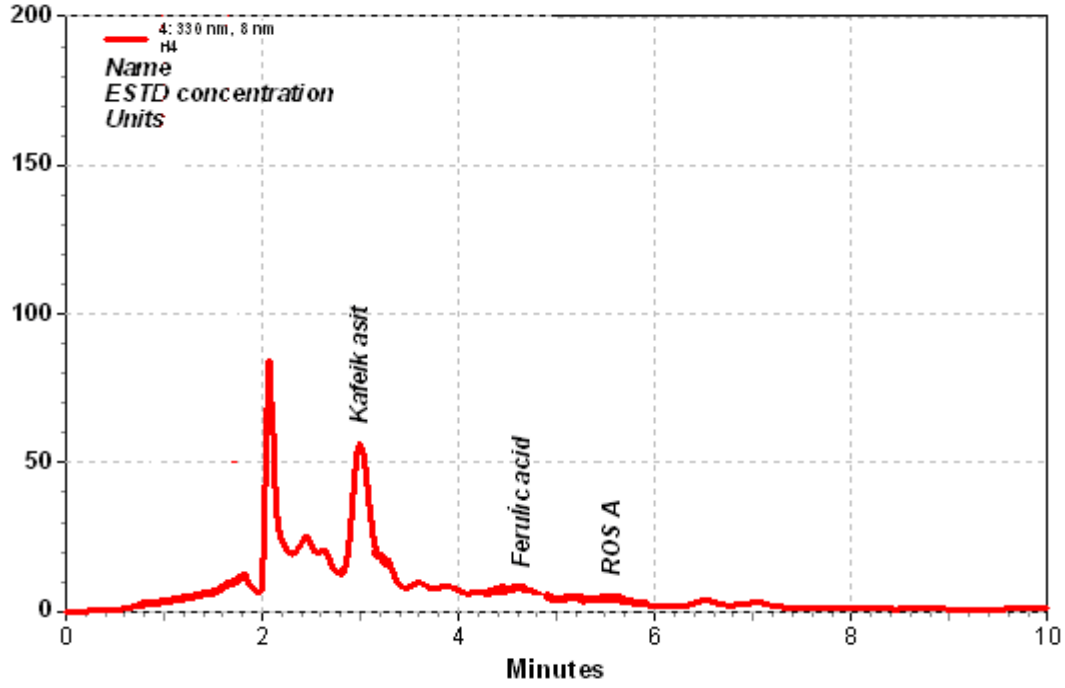
Şekil 5.2. HPLC-DAD ile çedene bitkisinin kafeik asit, ferulik asit, rosmarinik asit kromatogramı



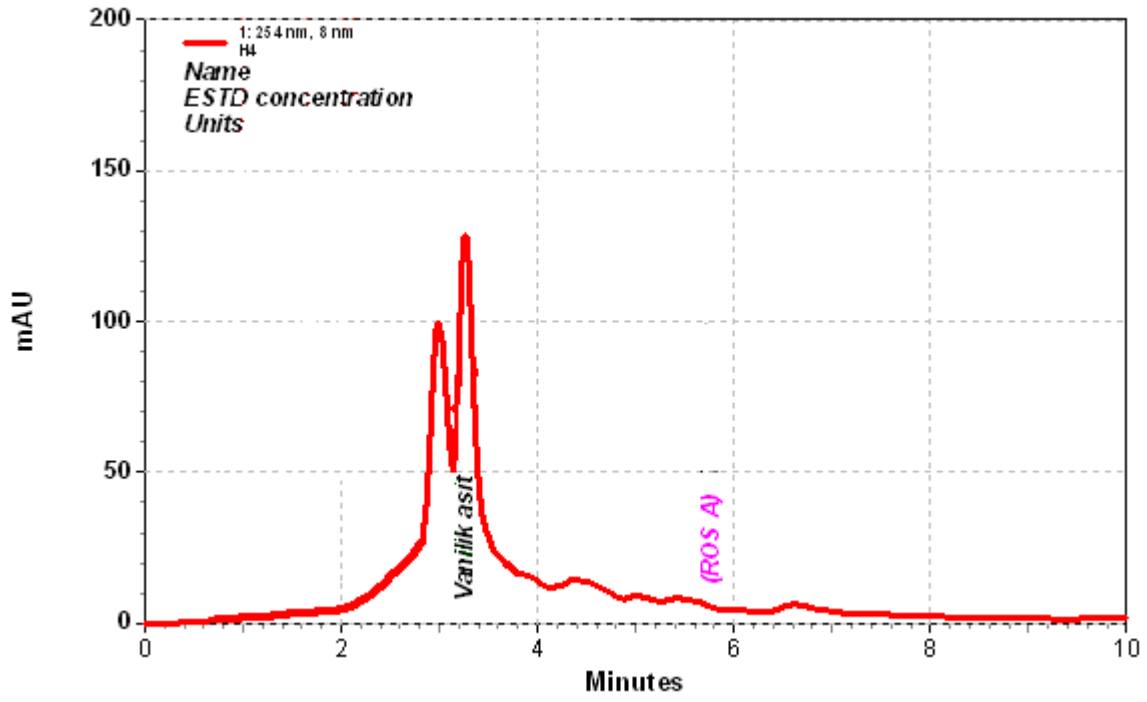
Şekil 5.3. HPLC-DAD ile çedene bitkisinin flavonoid kromatogramı

5.1.2. Çedene Kahvesi İçin Elde Edilen Kromatogramlar

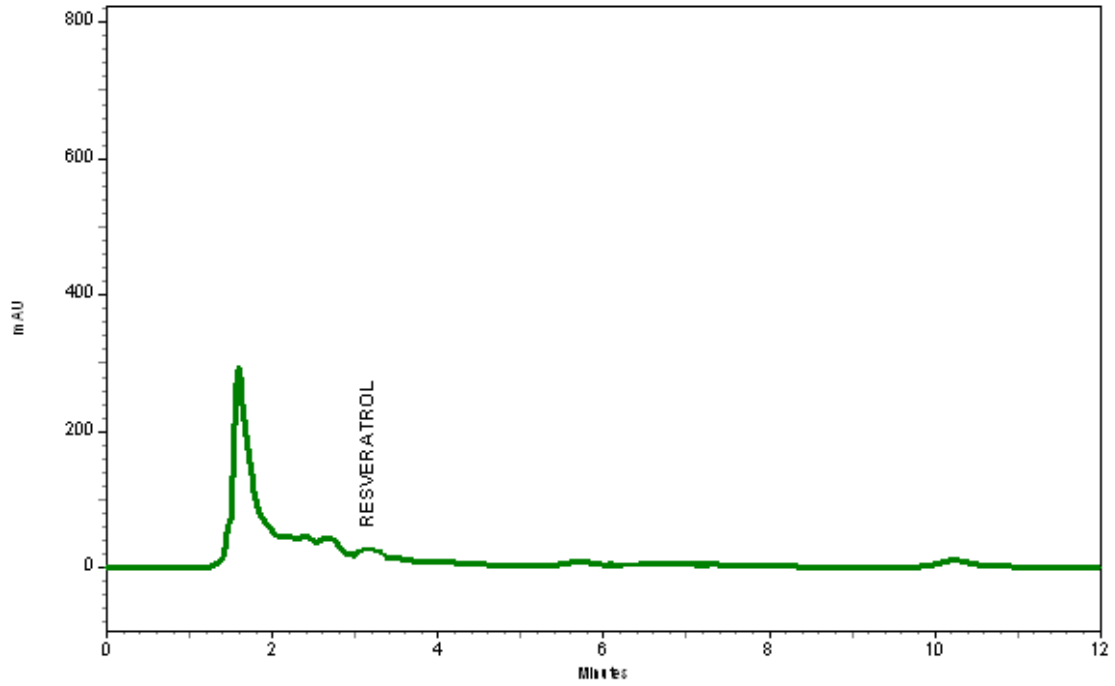
Piyasada satılan çedene kahvesinde bulunan fenolik asitlerin kromatogramı Şekil 5.3’te, flavonoidlerin kromatogramı şekil 5.4’de verilmiştir.



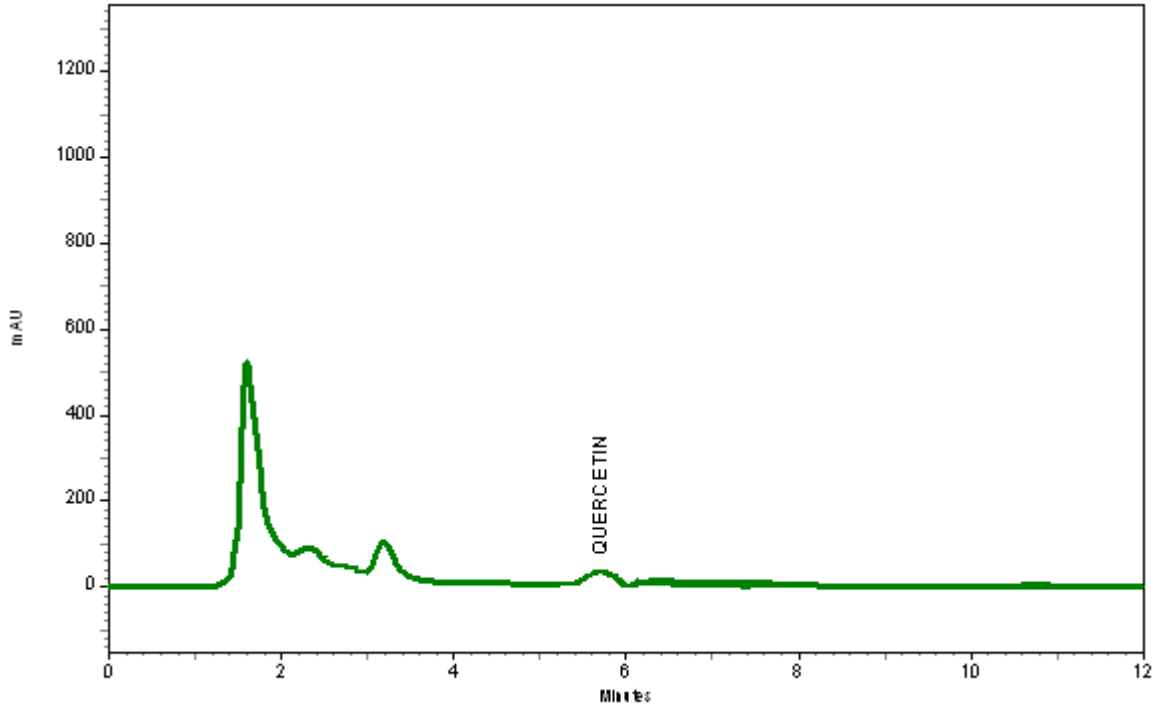
Şekil 5.4. HPLC-DAD ile çedene kahvesinin kafeik asit, ferulik asit, rosmarinik asit kromatogramı



Şekil 5.5. HPLC-DAD ile çedene kahvesinin vanilik asit kromatogramı



Şekil 5.6. HPLC-DAD ile çedene kahvesinin resveratrol kromatogramı



Şekil 5.7. HPLC-DAD ile çedene kahvesinin kuersetin kromatogramı

Tablo 5.1. HPLC-DAD ile çedene bitkisinde fenolik bileşik tayini için elde edilen bulgular (mg/kg) (n=3)

Fenolik bileşik	Çedene	Çedene Kahvesi
Vanilik Asit	219,167 ± 26,135	179,5 ± 13,4
Kafeik Asit	154,5 ± 9,987	101,5 ± 8,4
Ferulik Asit	9,667 ± 1.04	3.5 ± 0,5
Rosmarinik Asit	< t.s	< t.s
Kuersetin	156,83 ± 11,85	129,9 ± 10,3
Resveratrol	373,5 ± 19,15	295,41 ± 20,05

5.2. Atomik Absorbsiyon Spektrometrisi Bulguları

5.2.1. Çedene Bitkisinde Kapalı Ortamda Mikrodalga Parçalama Yöntemi İle Metal Tayini İçin Elde Edilen Bulgular

Tablo 5.2. AAS’de kapalı ortamda mikrodalga parçalama yöntemi ile çedene bitkisinde Cu, Co, Pb, Ni, Mn, Zn ve Fe’e ait bulgular (mg/L)

Metal	Çedene	Çedene kahvesi
Cu	< ts	< ts
Co	< ts	< ts
Pb	< ts	< ts
Ni	< ts	< ts
Mn	< ts	< ts
Fe	47,23±8,26	52,8 ± 1,81
Zn	38,233±3,259	33,7 ± 0,4

5.2.2. Çedene Bitkisinde Kuru Külleme Yöntemi İle Metal Tayini İçin Elde Edilen Bulgular

Tablo 5.3. AAS’de kuru külleme yöntemi ile çedene bitkisinde Cu, Fe ve Zn’ye ait bulgular (mg/L) (n=3)

Metal	Çedene	Çedene kahvesi
Cu	8,05±0,65	7,4 ± 2,3
Zn	33,103 ± 2,217	32,9 ± 1,9
Fe	40,33 ± 2,203	44,2 ± 5,6

6. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Fenolik bileşiklerle ilgili yapılan çalışmalar bu bileşiklerin sağlık açısından azımsanmayacak kadar önemli olduklarını ortaya koymuştur. Özellikle antialerjik, antienflamasyon, antiviral, antiproliferatif özelliklere sahip oldukları ve koroner kalp rahatsızlıkları, felç, akciğer kanseri ve mide kanseri gibi hastalıkları azaltıcı etkilerinin olduğu saptanmıştır (Harborne, 1994, Hakkinen, 2000).

Bu çalışmada adı geçen resveratrol, kuersetin, rosmarinik asit, vanilik asit, kafeik asit, ferulik asit bileşiklerinin çedene (menengiç) bitkisinin meyvelerinde ve Elazığ'da çedene kahvesi olarak bilinen kahvedeki konsantrasyonlarının tayini amaçlandı. Ayrıca bu örneklerde bazı metallerin de (Cu, Co, Pb, Ni, Mn, Fe, Zn gibi) konsantrasyonlarının tayini amaçlandı.

Fenolik bileşiklerin analizi için HPLC-DAD kullanıldı. İyi bir ayırım yapabilmek amacıyla mobil faz olarak H_3PO_4 -metanol (%85, %15) karışımı kullanıldı. Fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için metanol kullanıldı. Fenolik bileşiklerin standart kromatogramları Şekil 4.11.1, Şekil 4.11.2 ve Şekil. 4.12'de verildiği gibidir.

Çedene örneklerinde bulunan fenolik bileşik miktarları Tablo 5.1'de verilmiştir. Tablo 5.1'e göre tüm örneklerde en yüksek fenolik asit değerinin vanilik asite, en düşük değer ise rosmarinik asite ait olduğu görülür. Resveratrolün değeri ise kuersteinden yüksektir.

Çedene bitki örneklerinde metal tayini için AAS kullanıldı. Bunun için hem kuru külleme hem de kapalı ortamda mikrodalga parçalama yöntemleri ile çözme işlemi yapıldı. Mikrodalga parçalama için çalışma parametreleri Tablo 4.2'de verilmiştir.

Mikrodalga parçalama yöntemi ile elde edilen sonuçlar Tablo 5.2'de verilmiştir. Buna göre Cu, Co, Pb, Ni ve Mn değerleri tayin sınırının altında bulunmuştur. Fe değeri çedene bitkisinde kahveye göre daha düşük iken Zn değeri çedene bitkisinde kahveye göre daha yüksektir.

Kuru külleme yöntemi ile elde edilen sonuçlar Tablo 5.3'te verilmiştir. Cu ve Zn değerleri kahveye göre çedene bitkisinde daha yüksek bulunurken, Fe değeri daha düşük bulunmuştur.

Bu veriler göz önüne alındığında Cu mikrodalga ile tayin sınırının altında bulunmasına rağmen, kuru kütleme yönteminde madde miktarı arttırıldığı için tayin edilebilmiştir.

KAYNAKLAR

- Akyüz, E., 2007,** Polygonum bistorta ssp. carneum Bitki Ekstraktlarının Kromatografik Yöntemlerle Kimyasal bileşiminin Belirlenmesi ve Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktiviteleri, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, *Yüksek Lisans Tezi*.
- Ather M, Back JH, Tang X, Kim KH, Kopelovich L, Bickers DR, Kim AL. 2007.** Resveratrol: A review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicol Appl Pharmacol*, **224**: 274-283.
- Atlı, H. S., Arpacı, S., Ayanoglu, H., Ak, B.E., 1999.** Comparison of seedling characteristics of some Pistacia species. XI GREMPA seminar on pistachios and almonds, (Ak, B.E., -Ed.) *Cahiers Options Mediterraneennes*, **56**, 1022-1379, (France).
- Baba S, Osakabe N, Natsume M, Yasuda A, Muto Y, Hiyoshi K, Takano H, Yoshikawa T, Terao J., 2005,** Absorption, metabolism, degradation and urinary excretion of rosmarinic acid after intake of Perilla frutescens extract in humans, *Europe Journal Nutrient*. **44**:1-9.
- Bakkali, K., Martos, N.R., Souhail, B., Ballesteros, E., 2009.** Characterization of trace metals in vegetables by graphite furnace atomic absorption spectrometry after closed vessel microwave digestion, *Food Chemistry*, **116**, 590–594.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, Samir., 2006.** Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, **99**: 191– 203.
- Baytop, T., 1984.** Türkiye’de Bitkilerle Tedavi (Geçmişte ve Bugün). İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Yayın No: 3255/40, 520 s. İstanbul.
- Bonaccorsi P., 2008,** Flavonol glucosides in Allium species: A comparative study by means of HPLC–DAD–ESI–MS–MS, *Food Chemistry*, 1668–1673.

- Borbalán Á.M.A., Zorro L., Guillén D.A. ve Barroso C.G., 2003,** Study of Polyphenol Content of Red and White Grape Varieties by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and Its Relationship To Antioxidant Power, *J. Chromatogr. A*, **1012**,31–38.
- Çam,M.,2005,**Kayseri Bölgesi'nde Tüketilen Gilaburu(*Viburnum Opulus*) Meyve Suyunun Organik Asit ve Fenolik Bileşiklerinin Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Belirlenmesi.
- Çiftçi, H., Özkaya, A., Kariptaş, E., 2009.** Determination of fatty acids, vitamins and trace elements in pistacia terebinthus coffee. *Journal of Food*, **7**, 72-74.
- D'Amelio, F.S. 1999.** Botanicals, A Phytocosmetic Desk Reference. CRC Press, London, pp. 361.
- Davis, P.H., 1967.** Flora of Turkey and the East Aegean Islands.. *Edinburgh University Press.*, **2**, 546-547, Edinburgh.
- Deans, S.G., Svoboda, K.P. 1989.** Antibacterial activity of summer savory (*Satureja hortensis* L.) essential oil and its constituents, *Journal of Horticultural Science*, **64**: 205-210.
- Demirkıran,Ö.,2005,***Hypericum Montbrett*II Spach. Bitkisindeki Fenolik Bileşiklerin İzolasyonu ve Tanımlanması, *Doktora Tezi*, Kimya Ana Bilim Dalı, Edirne.
- Dey, P.M., Harborne, J. B., 1989,** Methods in Plant Biochemistry, Vol.1, *Academic Press*, London.
- Dinçer,S., Kızılbey,K., 2010,** Makromoleküllerin Kromatografik Yöntemle Analizi,Yıldız Teknik Üniversitesi,Biyomühendislik Bölümü,İstanbul.
- Elçi, L., Divrikli, Ü. 2002.** Seryum Hidroksit Birlikte Çöktürme Yöntemiyle Eser Elementlerin Zenginleştirilmesi ve Türlemesi, Kayseri.
- Erdik, E.,Sarıkaya,Y.,1986.** Temel Üniversite Kimyası.
- Erkoç Ş., Erkoç F. ve Keskin N., 2003,** Theoretical Investigation of Quercetin and Its Radical Isomers, *J. Mol. Struct. (Theochem)*, **631**, 141–146.
- Ersöz,E.,2009,**Koyun Sütlerinden Üretilen Torba Yoğurtlarının Özellikleri Üzerine Fenolik Bileşiklerin Etkisi, Yüksek Lisans Tezi,Süt Teknolojisi Bölümü.
- Exarchou, V., Nenadis, N., Tsimidou, M., Gerothanassis, I.P., Troganis, A., Boskou, D. 2002.** Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from Greek oregano, Greek sage, and summer savory. *J. Agric, Food. Chem.*, **50**: 5294-5299.

- Ezer, M., Laçin A. 2005.** K. Maraş Bölgesindeki Keçi Sütünde Eser Element Analizi, K.Maraş.
- Fabre N., Rustan I. ve Hoffmann D.E., Quetin-Leclercq J., 2001,** Determination of Flavone, Flavonol, and Flavanone Aglycones by Negative Ion Liquid Chromatography Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **12**, 707-715.
- Firat, B.: 1998** “Bitki Nasıl Beslenir” *Atlas Kitabevi*, Konya, 21,23,67,239.
- Francisco, M.L., Resurreccion, A.V.A., 2009.** Development of a reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) procedure for the simultaneous determination of phenolic compounds in peanut skin ekstraktı. *Food chemistry*, **117**, 356–363.
- Gerogiannaki-Christopoulou M, Athanaspoulos P, Kyriakidis N, Gerogiannaki IA, Spanos M. 2006.** trans-resveratrol in wines from the major Greek red and white grape varieties. *Food Chem*, **17**: 700-706. **Gonzalez J., Cruz J. M., Dominguez H., Parajo J. C. 2004,** Production of antioxidants from Eucalyptus globulus wood by solvent extraction of hemicellulose hydrolysates, *Food Chemistry*, **84**, 243–251.
- Grzelak K., 2009,** Content of quercetin glycosides and fructooligosaccharides in onion stored in a cold room, *European Food Research and Technology*, **228**, 1001-1007.
- Gündüz,T., 1997.**İnstrümental Analiz, *Bilge Yayıncılık*,Ankara.
- Güllüce, M., Sokmen, M., Daferera, D., Agar, G., Özkan, H., Kartal, N., Polissiou, M., Sokmen, A., Şahin, F. 2003.** In vitro antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L. *J. Agric. Food Chem.*, **51**: 3958-3965.
- Häkkinen S., 1999,** Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries, *Food Research International*, 345-353.
- Hakinen,S.,2000,**Flavonols and Phenolic Acids in Berries and Berry Products, Doctoral Thesis,Kuopio University Publications D. Medical Sciences,90P.
- Hao HD, He LR. 2004.** Mechanisms of cardiovascular protection by resveratrol. *J Med Food*, **7**: 290–298.

- Harborne, J.B., 1994**, The Flavonoids: Advances in Research Since 1986, *London, Academic Pres.*
- Harborne, J. B., 1964**, Biochemistry of Phenolic Compounds, *Academic Press.*, London.
- Harborne, J. B., 1988**, The Flavonoids: Advances in Research Since 1980, , Chapman and Hall, London.
- Hausler, E., Petersen, M., Alfermann, A.W. 1992.** Rosmarinsäure in Blechnum-Spezies. In: Haschke, H.P., Schnarrenberger, C. (Eds.), Botanikertagung. Berlin. Akademie Verlag, Berlin, p. 507.
- Huang M., Ferraro T. 1991**, Phenolic compounds in food cancer prevention, *American Chemical Society Symposium Series* **507**, 8-35.
- Jankovska, P., Copikava, J. and Sinitsya, A., (2001)**, Determination of ferulic acid in Sugar Beet Pulp, *Institute of chemical technology*, Vol. **19**, No. 4: 143–147.
- Kafkas, S., Perl-Treves, R., 2002.** Interspecific relationships in Pistacia based on RADP fingerprinting, *Hortscience*, **37**, 168-171.
- Karaman, Ş., Tütem, E., Başkan K., Apak, R., 2010.** Comparison of total antioxidant capacity and phenolic composition of some apple juices with combined HPLC-CUPRAC assay. *Food Chemistry*, **120**, 1201–1209.
- Kavak, D.D., Altıok, E., Bayraktar, O., Ülkü, S., 2010.** Pistacia terebinthus extract: as a potential antioxidant, antimicrobial and possible β -glucuronidase inhibitor. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **64**, 167–171.
- Lacopini P., 2008**, Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions, *J. of Food Composition and Analysis*, **21**, 589–594.
- Lakenbrink, C., Lapczynski, S., Mailwald, B. and Engelhardt, U.H., 2000.** Flavonoids and other polyphenols in consumed brews of tea and other caffeinated beverages, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 2848-2852.
- Lee, K.W., Kim J.J, Lee, H.J. and Lee C.Y., 2003.** Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine, *Journal of Agriculture of Food Chemistry*, **51**, 7292–7292.
- Litvinenko, V.I., Popova, T.P., Simonjan, A.V., Zoz, I.G., Skolov, V.S. 1975.** "Gerbstoffe" und Oxymethylsäureabkömmlinge in Labiataen. *Planta Medica*, **27**: 372–380.

- Lu, G.H., Chan, K., Leung, K., Chan, C.L., Zhao, Z.Z., Jiang, Z.H., (2005).** Assay of free ferulic acid and total ferulic acid for quality assessment of *Angelica sinensis*, *Journal of chromatography*, **1068**, 209–219,
- Lu, Y., Foo L.Y. 1999.** Rosmarinic acid derivatives from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry*, **51**: 91–94.
- Mandalari, G., Tomaino, A., Arcoraci, T., Martorana, M., Lo Turco, V., Cacciola, F., Rich, G.T., Bisignano, C., Saija, A., Dugo, P., Cross, K.L., Parker, M.L., Waldron, K.W., Wickham, M.S.J., 2010.** Characterization of polyphenols, lipids and dietary fibre from almond skins (*Amygdalus Communis* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*, **23**, 166-174.
- Minussi R. C., Rossi M., Bologna L., Cordi L., Rotilio D., Pastore G. M., Duran N.2003,** Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines, *Food Chemistry*, **82**, 409-416.
- Mizuike, A., 1983.** Enrichment Techniques for Inorganic Trace Analysis, Springer Verlag, New York.
- Mulabagal, V., Tsay, H.S. 2004.** Plant cell cultures-An alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *International Journal of Applied Science and Engineering*, **2,1**: 29–48.
- Narin, İ., Soylak, M.,2003,** *Analytica Chimica Acta* **493**, 2005-212.
- Nizamhoğlu,N.M., Nas,S.,2002,** Meyve ve Sebzelerde Bulunan Fenolik Bileşikler; Yapıları ve Önemleri, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi* Cilt:5, No: 1, 2010 (20-35), *Electronic Journal of Food Technologies* Vol: 5, No: 1, 2010 (20-35).
- Oliveira, İ., Sousa, A., Ferreira, I.C.F.R., Bento, A., Estevinho, L., Pereira, J.a., 2008.** Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut(*juglans regia* L.) green husks. *Food And Chemical Toxicology*, **46**, 2326–2331.
- Parnham, M. J., Kesselring, K. 1985.** Rosmarinic acid. *Drugs of the Future*, **10**: 756 757.
- Pereira, J.a. Oliveira,İ., Sousa,A., Valentao,P. ,Andrade,P.B. ,Ferreira,İ.C.F.R. ,Ferrerres,F. ,Bento,A.,Seabra, R., Estevinho, L., 2007,** Walnut (*juglans regia* L.) leaves: phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. *Food And Chemical Toxicology*, **45**, 2287–2295.

- Pietta P.G., 2000**, Flavonoids as Antioxidants, *J. Nat. Prod.*, **63**, 1035-1042.
- Rawn, H., Pedersen, M.F., Andary, J., Borum, C., Anthoni, U., Cristophersen, C, Nielsen, P.H. 1994.** Seasonal variation and distribution of two phenolic compounds, rosmarinic acid and caffeic acid, in leaves and roots-rhizomes of eelgrass (*Zostera marina* L.). *Ophelia*, **40**: 51–61.
- Robbins R.J. 2003**, Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology, Food Composition Laboratory, *Beltsville Human Nutrition Research Center*, USA, **10**, 2866–2887.
- Saldamlı, İ., 2007.** Gıda Kimyası. Hacettepe Üniversitesi Yayınları. Ankara, 463–492.
- Sattar, A., Wahid, M., Durrani, S.K., 1989.** Concentration of selected heavy metals in spices, dry fruits and plant nuts. *Plant Foods for Human Nutrition*, **39**, 279–286.
- Shahidi, F., Naczek, M., 1995.** Food Phenolics. Technomic Publishing Company Book, Lanchester, USA, 199–225.
- Skoog-West-Holler, 1999.** Enstrümental Analiz İlkeleri, *Bilge Yayıncılık*, Ankara.
- Solar, A., Colaric, M., Usenik, V., Stampar, F., 2006.** Seasonal variations of selected flavonoids, phenolic acids and quinones in annual shoots of common walnut (*Juglans Regia* L.), *Plant Science*, **170**, 453-461.
- Sovak M. 2001.** Grape extract, resveratrol, and its analogs: A review. *J Med Food*, **4**: 93 _105.
- Spektroskopi Yaz Okulu, 1988**, KTÜ, Trabzon.
- Suschetet M., Siess M.-H. ve Le Bon A.-M., 1998**, Canivenc Lavier, M.-C., in : INRA (Ed.), Polyphenols 96, Les Colloques, Paris, 166–204.
- Takeda, R., Hasegawa, J., Sinozaki, M. 1990.** The first isolation of lignans, megaceratonic acid and anthoceratonic acid, from non-vascular plants, Anthocerotae (hornworts). *Tetrahedron Letters*, **31**: 4159–4162.
- Taiz, L.; Zeiger, E. 1991:** "Plant Physiology" *The Benjamin Cummings Publishing Company*, California, 116–121.
- Topcu, G., Ay, M., Bilici, A., Sarikurkcu, C., Ozturk, M., Ulubelen, A, 2007.** A new flavone from antioxidant extracts of pistacia terebinthus. *Food Chemistry*, **103**, 816–822.

- Tunaher, Z., Öztürk, N., KoGar,M., BaGer, K.H.C., Duman, H., Kırimer, N., 2002,** Bazı Sideitis Türlerinin Antioksidan Etki ve Fenolik Bileşikler Yönünden İncelenmesi, *14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı*, Bildiriler, 29-31 Mayıs 2002, Eskişehir, Eds. K.H.C.Başer ve N.Kırimer Web"de yayın tarihi: Haziran 2004.
- Vandecasteele, C. and Block, C.B., 1997.** Modern Methods for Trace Element Determination, p.1-7, John Wiley and Sons, Chichester.
- Yılmaz, Ö., Özşahin, A., Bircan, B., Erden, Y., Karaboğa, Z., 2010.** radical scavenging activitiy of the pistacia terebinthus in fenton reagent environment and its protective effects on the unsaturated fatty acids, *Asian Journal of Chemistry*, **22**, 7949-7958.
- Yu L., Zhou K.,2005,** Antioxidants properties of bran extracts from ‘Palte’ wheat grown at different locations, *Food Chemistry*, **90**, 311-316.
- Work Environ. Health, 1990, 16,** 1–82.
- Zohary, D., 1996.** Taxonomy the genus Pistacia L. Taxonomy, Distribution, Conservation and Uses of Pistacia Genetic Resources, *Report of Workshop (IPGRI)*, (Padulosii S., Caruso T. and Barone E. -eds) Palermo, Italy.

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Elazığ'da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Elazığ'da tamamladım. 2006 yılında Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünde lisans eğitime başladım ve 2010 yılında mezun oldum. Aynı yıl Fırat üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Analitikkimya Anabilim Dalında yüksek lisans eğitime başladım.