

**T.C.
BOZOK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI**

Yüksek Lisans Tezi

**KARAÇAM [*Pinus nigra* Arnold. subsp. *pallasiana* (Lamb)
Holmboe] VE KARAÇAM BİLEŞENLERİNDE BAZI
ORGANİK ASİTLERİN HPLC/DAD İLE EŞZAMANLI
TAYİNİ**

Kiraz GÜNGÖR

**Danışman
Yrd. Doç. Dr. Orhan HAZER**

Yozgat 2014

**T.C.
BOZOK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI**

Yüksek Lisans Tezi

**KARAÇAM [*Pinus nigra* Arnold. subsp. *pallasiana* (Lamb)
Holmboe] VE KARAÇAM BİLEŞENLERİNDE BAZI
ORGANİK ASİTLERİN HPLC/DAD İLE EŞZAMANLI
TAYİNİ**

Kiraz GÜNGÖR

**Danışman
Yrd. Doç. Dr. Orhan HAZER**

Yozgat 2014

T.C.
BOZOK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEZ ONAYI

Enstitümüzün Kimya Anabilim Dalı 70110112009 numaralı öğrencisi Kiraz GÜNGÖR'ün hazırladığı "**Karaçam [*Pinus nigra Arnold. subsp. pallasiana* (Lamb) Holmboe] ve karaçam bileşenlerinde bazı organik asitlerin HPLC/DAD ile eşzamanlı tayini**" başlıklı YÜKSEK LİSANS tezi ile ilgili TEZ SAVUNMA SINAVI, Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği uyarınca 19/06/2014 Perşembe günü saat 10:00'da yapılmış, tezin onayına OY BİRLİĞİYLE karar verilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. İsmail AKDENİZ



Üye : Yrd. Doç. Dr. Orhan HAZER (Danışman)



Üye : Yrd. Doç. Dr. İrfan KOCA



ONAY:

Bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../20..... tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../20.....

İÇİNDEKİLER

Sayfa

| | |
|---|------|
| ÖZET..... | iv |
| ABSTRACT..... | v |
| TEŞEKKÜR | vi |
| TABLolar LİSTESİ..... | vii |
| ŞEKİLLER LİSTESİ..... | viii |
| KISALTMALAR LİSTESİ..... | x |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 2. KARAÇAM (<i>Pinus nigra</i> Arnold. subsp. <i>pallasiana</i> (Lamb) Holmboe)..... | 3 |
| 2.1. Karaçamın (<i>Pinus Nigra</i> Arn.) Genel Özellikleri..... | 3 |
| 2.2. Karaçamın Kimyasal Özellikleri | 6 |
| 3.KROMATOGRAFİK YÖNTEMLER ve YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOGRAFİ (HPLC)..... | 7 |
| 3.1. Kromatografi Çeşitleri..... | 7 |
| 3.1.1. Sıvı Kromatografi Çeşitleri | 8 |
| 3.1.1.1. Adsorbsiyon (Katı-Sıvı) Kromatografisi | 8 |
| 3.1.1.2. Dağılma (Sıvı-Sıvı) Kromatografisi | 8 |
| 3.1.1.3. İyon Değişirme Kromatografisi | 9 |
| 3.1.1.4. Jel FiltrasyonKromatografisi | 9 |
| 3.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) | 9 |
| 3.2.1. Mobil Faz | 11 |
| 3.2.2. Degazör | 11 |
| 3.2.3. Pompa..... | 12 |
| 3.2.4. Örnekleyici (Autosampler)..... | 14 |
| 3.2.5. Kolon | 15 |
| 3.2.6. Dedektör | 18 |
| 3.2.7. Kaydedici..... | 21 |
| 3.3. Kromatografi Parametreleri..... | 21 |
| 3.3.1. Alıkonma Zamanı (t_R) | 22 |

| | |
|---|-----------|
| 3.3.2. Kapasite Faktörü (k') | 23 |
| 3.3.3. Seçicilik Faktörü | 23 |
| 3.3.4. Kolon Ayırma Gücü | 24 |
| 3.3.5. Kolon Verimliliği | 25 |
| 3.4. Yöntem Validasyon Parametreleri | 25 |
| 3.4.1. Doğruluk | 25 |
| 3.4.1.1. Referans bir yöntemle karşılaştırmak | 25 |
| 3.4.1.2. Kör (matriks) ortamına analizi yapılan maddeyi ilave etmek | 26 |
| 3.4.1.3. Standart ekleme yöntemi ile saf madde ilavesi | 26 |
| 3.4.2. Kesinlik | 26 |
| 3.4.3. Seçicilik | 27 |
| 3.4.4. Teşhis Sınırı (LOD) | 27 |
| 3.4.5. Tayin Alt Sınırı (LOQ) | 27 |
| 3.4.6. Doğrusallık | 28 |
| 3.4.6.1. Kalibrasyon Grafiği | 28 |
| 3.4.6.2. Duyarlık | 28 |
| 3.4.6.3. Çalışma Aralığı | 29 |
| 3.4.6.4. Sağlamlık | 29 |
| 3.4.6.5. Tutarlılık | 29 |
| 4. ORGANİK ASİTLER | 30 |
| 4.1. Bazı Organik Asitler Ve Genel Özellikleri | 30 |
| 4.1.1. Oksalik Asit | 30 |
| 4.1.2. Tartarik Asit | 31 |
| 4.1.3. Sitrik Asit | 33 |
| 4.1.4. Formik Asit | 35 |
| 4.1.5. Asetik Asit | 36 |
| 4.1.6. Laktik Asit | 36 |
| 5. MATERYAL VE METOT | 38 |
| 5.1. Kullanılan Bazı Kimyasallar Ve Özellikleri | 38 |
| 5.2. Kullanılan Cihazlar | 38 |
| 5.2.1. Yüksel Performanslı Sıvı Kromatografisi | 38 |
| 5.2.2. Ultrasonik Banyo | 39 |
| 5.2.3. Teraziler | 40 |

| | |
|--|-----------|
| 5.2.4. UV-VIS Spektrofotometresi | 40 |
| 5.2.5. Ultra Saf Su Cihazı | 41 |
| 5.2.6. Filtrasyon Düzeneği | 41 |
| 5.2.7. Öğütücü Cihazı | 42 |
| 6. DENEYSSEL | 43 |
| 6.1. Organik Asitler İçin Optimum Koşulların Tayini | 43 |
| 6.1.1. Organik Asitler İçin Optimum Mobil Faz Seçimi | 44 |
| 6.1.2. Organik Asitler İçin Optimum Akış Hızının Belirlenmesi..... | 48 |
| 6.1.3. Organik Asitler İçin Optimum Kolon Sıcaklığının Belirlenmesi..... | 50 |
| 6.1.4. Organik Asitler İçin Optimum H ₂ SO ₄ 'in Konsantrasyonunun Belirlenmesi | 51 |
| 6.2. Örneklerin Analize Hazırlanması | 53 |
| 6.3. Optimum Şartlarda Elde Edilen Kromatogramlar | 55 |
| 6.4. Kalibrasyon Grafiklerinin Çizilmesi | 57 |
| 6.4.1. Oksalik Asidin Kalibrasyon Grafiği | 57 |
| 6.4.2. Tartarik Asidin Kalibrasyonu | 58 |
| 6.4.3. Formik Asidin Kalibrasyon Grafiği | 59 |
| 6.4.4. Laktik Asidin Kalibrasyon Grafiği | 60 |
| 6.4.5. Asetik Asidin Kalibrasyon Grafiği | 61 |
| 6.4.6. Sitrik Asidin Kalibrasyonu | 62 |
| 6.5. Karaçamın Odun, İğne ve Kozalak Kısımlarının Ekstraksiyonlarına Standart Çözelti Eklenmesi | 64 |
| 7. SONUÇ..... | 67 |
| KAYNAKLAR | 69 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 73 |

**KARAÇAM [*Pinus nigra* Arnold. subsp. *pallasiana* (Lamb)
Holmboe] VE KARAÇAM BİLEŞENLERİNDE BAZI ORGANİK
ASİTLERİN HPLC/DAD İLE EŞ ZAMANLI TAYİNİ**

Kiraz GÜNGÖR

**Bozok Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi,**

2014; Sayfa: 73

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Orhan HAZER

ÖZET

Bu çalışmada oksalik, tartarik, formik, laktik, asetik ve sitrik asitlerin eş zamanlı tayinleri için diode array detection (DAD) dedektörü kullanılarak bir HPLC yöntemi geliştirildi. Duyarlılığı arttırmak için sistemin tüm parametreleri optimize edildi. Optimum koşullar: akış hızı; 1mL.dk⁻¹, kolon sıcaklığı; 60°C, dalga boyu; 210 nm ve mobil faz H₂SO₄ (pH: 2.5) / asetonitril belirlendi. Geliştirilen yöntem karaçam (*pinus nigra*) ve bileşenlerine (odun, iğne ve kozalak) uygulandı.

Karaçam ve bileşenlerinde yapılan analizler sonucunda karaçamın odun kısmında oksalik, laktik ve sitrik asit miktarı sırasıyla; 289.26, 40.10 ve 162.14 mg.kg⁻¹ olarak belirlendi. Diğer üç asit (tartarik, formik ve asetik asit) tayin limitinin altında olduğu için belirlenemedi.

Karaçamın iğne kısmında oksalik, tartarik, laktik ve sitrik asit miktarları sırasıyla; 667.04, 75.12, 54.82 ve 223.63 mg.kg⁻¹ olarak belirlendi. Diğer iki asit (formik ve asetik asit) tayin limitinin altında olduğu için belirlenemedi.

Karaçamın kozalak kısmında ise oksalik, tartarik, laktik, asetik ve sitrik asit miktarları sırasıyla; 568.18, 60.13, 90.14, 68.43 ve 105.38 mg.kg⁻¹ olarak belirlendi. Formik asit ise tayin limitinin altında olduğu için belirlenemedi.

Anahtar Kelimeler: HPLC-DAD, organik asit, eş zamanlı tayin, karaçam (*pinus nigra*).

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF SOME ORGANIC ACIDS IN BLACK PINE [*Pinus nigra* Arnold. subsp. *pallasiana* (Lamb) Holmboe] AND BLACK PINE COMPONENTS BY HPLC/DAD

Kiraz GÜNGÖR

**Bozok University
Graduate School of Natural
And Applied Sciences
Department of Chemistry
Master of Science Thesis**

2014; Page: 73

Seminar Supervisor: Assist. Prof. Orhan HAZER

ABSTRACT

In this study, a HPLC-DAD (Diode Array Detector) method was developed for simultaneous determination of six organic acids (oxalic, tartaric, formic, lactic, acetic and citric acid). All parameters were optimized for increase the sensitivity of this developed method. Optimum conditions were: flow rate; 1 mL.min⁻¹, column temperature; 60°C, wavelength; 210 nm and mobile phase H₂SO₄ (pH:2.5) / acetonitrile determined. The developed method was applied to different parts (branch, leave and cone) of Black Pine (*pinus nigra*).

The branch side of black pine oxalic, lactic and citric acid contents were founded 289.26, 40.10 and 162.14 mg.kg⁻¹, respectively. Other three acids (tartaric, formic and acetic acid) were not detected because of below detection limits.

The leave side of black pine oxalic, tartaric, lactic and citric acid contents were 667.04, 75.12, 54.82 and 223.63 mg.kg⁻¹, respectively. Other two acids (formic and acetic acid) were not detected because of below detection limits.

The cone side of black pine oxalic, tartaric, lactic, acetic and citric acid contents were 568.18, 60.13, 90.14, 68.43 and 105.38 mg.kg⁻¹, respectively. Formic acid was not detected because of below detection limit.

Keywords: HPLC-DAD, organic acid, simultaneous determination, Black pine (*pinus nigra*).

TEŞEKKÜR

Tez alıőmamn yűrűtűlmesinde bilgi ve yardımlarını esirgemeyen deęerli hocam Yrd. Do. Dr. Orhan HAZER'e sonsuz saygı ve Őukranlarımı sunarım.

Laboratuar çalıőmalarım sırasında yardım ve desteklerinden dolayı Uzman Mohammed AKKBIYIK, Dilara DEMİR, Yasemin TURHAN ve arkadaőım Merve PELTEK'e sonsuz teőekkűrlerimi sunarım.

Öğrenim hayatım boyunca maddi manevi desteklerini hiç esirgemeyen Sevgili aileme sonsuz saygı ve Őukranlarımı sunarım.

TABLULAR LİSTESİ

Sayfa

| | | |
|--------------------|---|----|
| Tablo 5.1: | Kullanılan Kimyasallar Ve Özellikleri | 38 |
| Tablo 6.1: | H ₂ SO ₄ – ACN mobil faz karışımı verileri..... | 44 |
| Tablo 6.2: | CaCl ₂ – MeOH mobil faz karışımı verileri..... | 45 |
| Tablo 6.3: | KH ₂ PO ₄ – ACN mobil faz karışımı | 47 |
| Tablo 6.4: | H ₂ SO ₄ – ACN karışımı oranları..... | 48 |
| Tablo 6.5: | Akış hızı taraması verileri..... | 49 |
| Tablo 6.6: | Akış hızı taraması analiz süresi verileri..... | 50 |
| Tablo 6.7: | Kolon sıcaklığı taramasının verileri..... | 50 |
| Tablo 6.8: | H ₂ SO ₄ 'in konsantrasyon etkisinin verileri | 52 |
| Tablo 6.9: | Oksalik asidin kalibrasyon verileri | 58 |
| Tablo 6.10: | Tartarik asidin kalibrasyon verileri..... | 59 |
| Tablo 6.11: | Formik asidin kalibrasyon verileri..... | 60 |
| Tablo 6.12: | Laktik asidin kalibrasyon verileri | 61 |
| Tablo 6.13: | Asetik asidin kalibrasyon verileri | 62 |
| Tablo 6.14: | Sitrik asidin kalibrasyon verileri..... | 63 |
| Tablo 6.16: | Odon, iğne ve kozalak kısımlarının geri kazanım sonuçları..... | 66 |
| Tablo 7.1: | Geliştirilen yöntem için optimum parametreler..... | 67 |

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

| | | |
|------------|--|----|
| Şekil 2.1: | <i>Pinus nigra</i> Arn. subsp. <i>pallasiana</i> (Lamb.) Holmboe' nın dünyadaki yayılışı.. | 4 |
| Şekil 2.2: | Yozgat Çamlığı Milli Parkında bulunan <i>Pinus nigra</i> Arn. subsp. <i>pallasiana</i> (Lamb.) Holmboe görüntüsü | 5 |
| Şekil 3.1: | HPLC cihazının diyagramı | 10 |
| Şekil 3.2: | Mobil faz | 11 |
| Şekil 3.3: | HPLC degazörünün diyagramı | 12 |
| Şekil 3.4: | HPLC' si pompası | 14 |
| Şekil 3.5: | HPLC' si örnekleyicisi | 15 |
| Şekil 3.6: | HPLC kolon fırını ve HPLC kolonu | 18 |
| Şekil 3.7: | Diode Array Detection (DAD) dedektörü | 21 |
| Şekil 3.8: | Kolon ayırım gücünün gösterildiği bir kromatogram | 24 |
| Şekil 4.1: | Oksalik asidin kimyasal yapısı | 31 |
| Şekil 4.2: | Tartarik asidin kimyasal yapısı | 33 |
| Şekil 4.3: | Sitrik asidin kimyasal yapısı | 34 |
| Şekil 4.4: | Formik asidin kimyasal yapısı..... | 35 |
| Şekil 4.5: | Asetik asidin kimyasal yapısı..... | 36 |
| Şekil 4.6: | Laktik asidin kimyasal yapısı..... | 37 |
| Şekil 5.1: | Shimadzu marka HPLC cihazı | 39 |
| Şekil 5.2: | Ultrasonik banyo | 40 |
| Şekil 5.3: | Shimadzu marka hassas terazi..... | 40 |
| Şekil 5.4: | UV-VIS Spektrofotometre cihazı..... | 41 |
| Şekil 5.5: | Ultra saf su cihazı..... | 41 |
| Şekil 5.6: | Filtrasyon Düzeneği | 42 |
| Şekil 5.7: | Pulverisette 9 marka öğütücü cihazı..... | 42 |
| Şekil 6.1: | Dalga boyu taraması..... | 43 |

| | | |
|--------------------|--|----|
| Şekil 6.2: | H ₂ SO ₄ – ACN mobil faz taraması | 45 |
| Şekil 6.3: | CaCl ₂ – MeOH mobil faz taraması | 46 |
| Şekil 6.4: | KH ₂ PO ₄ – ACN mobil faz karışımı..... | 48 |
| Şekil 6.5: | Akış hızı taraması..... | 49 |
| Şekil 6.6: | Kolon Sıcaklığı Taraması..... | 51 |
| Şekil 6.7: | Optimum sıcaklıkta elde edilen kromatogram | 51 |
| Şekil 6.8: | H ₂ SO ₄ 'in Konsantrasyonunun Etkisi..... | 52 |
| Şekil 6.9: | Yozgat Çamlığı Mili Parkı karaçam (<i>pinus nigra</i>) örnekleri | 53 |
| Şekil 6.10: | Karaçamın odunun kısmı numunesi..... | 53 |
| Şekil 6.11: | Karaçamın iğne kısmının hazırlanması ve numunesi..... | 54 |
| Şekil 6.12: | Karaçamın kozalak kısmının hazırlanması ve numunesi | 54 |
| Şekil 6.13: | 500 ppm'lik standart çözeltisine ait kromatogram | 55 |
| Şekil 6.14: | 0,01M NaOH'de karaçam odununa ait kromatogram | 56 |
| Şekil 6.15: | 0,01M NaOH' de karaçam iğnesine ait kromatogram | 56 |
| Şekil 6.16: | 0,01M NaOH'de karaçam kozalağına ait kromatogram..... | 57 |
| Şekil 6.17: | Oksalik asidin kalibrasyon grafiği..... | 58 |
| Şekil 6.18: | Tartarik asidin kalibrasyon grafiği | 59 |
| Şekil 6.19: | Formik asidin kalibrasyon grafiği | 60 |
| Şekil 6.20: | Laktik asit kalibrasyon grafiği..... | 61 |
| Şekil 6.21: | Asetik asidin kalibrasyon grafiği..... | 62 |
| Şekil 6.22: | Sitrik asidin kalibrasyon grafiği | 63 |
| Şekil 6.23: | Karaçamın odun kısmının ekstraksiyonu ve standart çözeltiye ait kromatogram | 64 |
| Şekil 6.24: | Karaçamın iğne kısmının ekstraksiyonu ve standart çözeltiye ait kromatogram | 65 |
| Şekil 6.25: | Karaçamın kozalak kısmının ekstraksiyonu ve standart çözeltiye ait kromatogram | 65 |

KISALTMALAR LİSTESİ

| | |
|---------------------------------|---|
| HPLC | : Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi |
| GC | : Gaz Kromatografi |
| μg | : Mikro gram |
| μL | : Mikro litre |
| μm | : Mikro metre |
| SS | : Standart Sapma |
| m | : Eğim |
| BSS | : Bağlı Standart Sapma |
| BH | : Bağlı Hata |
| $\mu\Omega$ | : Mikro ohm |
| N* | : Teorik Tabaka Sayısı |

1. GİRİŞ

Anadolu karaçamı, Türkiye’de 2.527.685 hektarlık bir alanda saf meşcereler halinde yayılış göstermektedir [1]. Yaşlı gövdesi derin çatlaklı, kalın ve esmer renkli kabukları vardır. 40 m kadar boy, 1 m den çok çap yapabilen silindir biçiminde düzgün gövdeye sahiptir. Büyümesi çabuktur. Anadolu karaçamı yarı ışık ağacı olup, gençlik çağında yavaş büyür [2].

Türkiye’nin ilk milli parkı ve Yozgat kültüründe önemli bir yere sahip olan Yozgat Çamlığı milli parkından alınan örneklerde bazı organik asitlerin miktarları belirlenmeye çalışıldı.

Organik asitler yapıları karbon iskeletine bağlı asitlerdir. Doğada saf olarak bitkisel ve hayvansal organizmada bulunabilirler ve ayrıca doğal yollardan elde edilebilirler. Hayvan vücudunda kullanılıp, metabolize olduktan sonra karbondioksit ve suya okside olurlar. Dolayısıyla canlı organizma için herhangi bir sağlık sorunu ya da bir risk oluşturabilecek hiçbir kalıntı bırakmazlar. Bu özellikleri nedeniyle organik asitler, gerek kaba ve yoğun yem üretiminin de, gerek bunların depolanmasında ve gerekse tüm çiftlik hayvanlarının performansları üzerindeki olumlu etkilerinden dolayı, hem koruyucu hem de verim artırıcı özellikleri nedeniyle hayvan beslemede çok önemli bir yere sahip olup kâr büyütme faktörlerinin hayvan beslemede kullanımının yasaklanmasından sonra antibiyotiklerin yerini alabilecek çok güçlü bir alternatif olması nedeniyle günümüzde büyük bir popülerite kazanmışlardır.

Günümüze kadar birçok farklı yöntemler kullanılarak organik asitlerin tayinleri yayınlanmıştır. Bu yöntemler genellikle Gaz Kromatografi (GC) veya Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) ile tayinlerine dayanmaktadır. Meyve ve meyve sularının GC esasına dayalı birçok analiz metotları vardır. Mükemmel ayırma ve duyarlılık olmasına rağmen, fazla zaman alması, türevlendirme basamakları, kullanılan toksik türev belirteçleri dezavantajlarıdır. Üstelik bu analizler için gerekli olan yüksek sıcaklık, örnek bozulmalarına yol açabilir. Diğer taraftan, HPLC metotlarının dezavantajı, düşük ayırma gücü ve yüksek tayin limitlerine dayanır. Yine de basitliği, eş zamanlı tayinleri ve daha uygun kromatografik şartları sayesinde

HPLC ayırmaları, organik asitlerin ayrılmalarında ve miktar tayinlerinde, etkili metotlardır [3].

Bu tez çalışması kapsamında altı farklı organik asidin eş zamanlı tayini için basit ve tekrarlanabilir bir HPLC metodu optimize edilerek karaçam (*pinus nigra*) bileşenlerine uygulandı.

2. KARAÇAM (*Pinus nigra* Arnold. subsp. *pallasiana* (Lamb) Holmboe)

2.1. Karaçamın (*Pinus nigra* Arn.) Genel Özellikleri

Dünya üzerinde çok geniş bir alanda, parçalı küçük alanlar halinde yer alan Karaçam, esas yayılışını Güney Avrupa, Balkanlar, Güney Karpatlar, Kırım, Kıbrıs, Suriye ve asıl olarak Türkiye’de yapmaktadır [4]. Karaçamın dünya üzerinde doğal yayılış gösteren 5 alt türü bulunmaktadır [5,6].

Bu alt türler ve yayılışları şunlardır;

Pinus nigra Arnold. Subsp. *nigra*: Avusturya karaçamı, (Syn: *Pinus nigra* Arnold var. *austriaca* (Hoess.) Badaux.), Avusturya’dan Orta İtalya’ya kadar uzanır; Yunanistan ve Yugoslavya’da doğal olarak yetişir.

Pinus nigra Arnold. Subsp. *larico* (Poiret) Maire: Korsika karaçamı, (Syn: *Pinus nigra* Arnold var. *corsicana* Suring), Güney İtalya, Korsika ve Sicilya’da yayılış yapar.

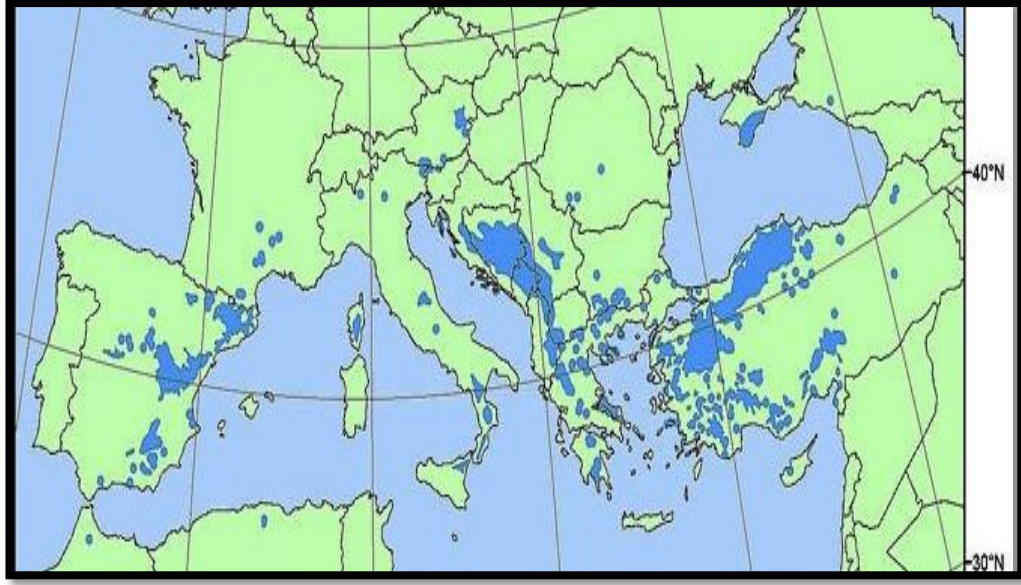
Pinus nigra Arnold. Subsp. *dalmatica* (Vis.) Franco: Dalmaçya karaçamı, Yugoslavya’nın kuzeybatı sahilleri ve adalarında yayılış yapar.

Pinus nigra Arnold. Subsp. *salzmannii* (Dunal) Franco: Pirene karaçamı, (Syn: *Pinus nigra* Arnold var. *cabennensis*), Orta ve güney İspanya ile Pirene dağlarında yayılış yapar.

Pinus nigra Arnold. Subsp. *pallasiana* (Lamb.) Holmboe: Anadolu karaçamı, (Syn: *Pinus nigra* Arnold var. *caramanica*, *Pinus nigra* Arnold var. *pallasiana* Schneid.), Balkanlar, Güney Karpatlar, Kırım, Türkiye, Kıbrıs ve Suriye’de yayılış yapar [7].

Anadolu Karaçamı’nın yaşlı gövdesi derin çatlaklı, kalın ve esmer kabukları vardır. 40 m kadar boy, 1 m’den çok çap yapabilen silindir biçiminde düzgün gövdeye sahiptir. Tomurcuk pullarının kenarları kirpiklidir. İğne yaprakları 4-8 cm uzunluğunda koyu yeşil ve serttir. Sürgün uçlarında bulunan yapraklar ise tomurcuğa doğru yönelmiş olduğundan çanak görünümünde bir boşluk oluştururlar. İğne

yaprakların kenarları ince dişli, uç kısımları sertleşmiştir ve iğne gibi batıcıdır [8]. Erkek ve dişi çiçekler soluk sarı renkli olmasına karşın, dişi kozalaklar parlak saman sarısı renktedir. Yumurtamsı-konik şeklindeki kozalakları simetrik ve çok denecek kadar kısa saplıdır. Kozalağın uç kısmındaki karpellerin çoğunun göbeğinde iğne gibi ufak bir dikenimsi çıkıntı bulunur. Kozalak boyu 3,5–10 cm arasında değişmektedir [9].



Şekil 2.1. *Pinus nigra* Arn. subsp. *pallasiana* (Lamb.) Holmboe' nin dünyadaki yayılışı

Anadolu Karaçamı ülkemizde 4.202.298 ha ile Kızılcım'dan sonra yayılışı en fazla olan ikinci ibrelili türümüzdür [10]. Anadolu'nun iç kesimlerinde Tokat çevresinden başlayarak Amasya, Çorum, Çankırı, Yozgat (Şekil 2.2), Çubuk ve Ankara dolaylarında Beynam, Bağlum gibi antropojen bozkır alanlarına doğru lokal yayılış gösterdiği; Beypazarı, Mudurnu ve Sündiken dağlarındaki Çatacık'tan güneyde İç Anadolu'ya doğru sokulduğu; Boyabat, Vezirköprü ve Kargı'dan itibaren batıya doğru geniş alanlarda görülmektedir [11].



Şekil 2.2. Yozgat Çamlığı Milli Parkında bulunan *Pinus nigra* Arn. subsp. *pallasiana* (Lamb.) Holmboe görüntüsü

Anadolu Karaçamı ülkemizde bozkıra en çok sokulan ağaç türümüzdür. Yayılış alanında daima denize bakan yamaçlardan kaçır, denize kapalı kısımları tercih eder. Bozkırda genellikle kar yağışlarının görülmesi ve yeterince suyun bulmasının yanında, karaçamanın kazık kök geliştirip bu rezerv suya ulaşabilme yeteneğinde oluşu, bunda etkilidir. Karaçam Trakya, Karadeniz' in doğusu hariç tüm Karadeniz, Ege, Marmara, İç ve Doğu Anadolu'da doğal olarak bulunur. Karadeniz'de Yeşilirmak'ın batısında görülür.

Anadolu Karaçamı, Batı ve Orta Karadeniz Bölümü'nde 400-1400 m'lerde saf meşcereler halinde, 1400-1700 m'lerde sarıçamla birlikte yayılış gösterir. Batı Karadeniz'de özellikle göknar ve meşe türleri ile meşcere kurar. İç Anadolu step sınırlarında 900 m'ye kadar meşçere halinde yaylalarda 1400 m'ye kadar münferit halde yer alır. Akdeniz Bölgesi'nde Toroslarda 1200-2100 m'ler arasında görülür. Ege ve Marmara Bölgeleri'nde genellikle 800-1000 m'den sonra saf olarak karşımıza çıkar [12,13].

Bunun dışında, ekonomik değeri bakımından da oldukça önemli bir tür olan Anadolu Karaçamı, ülkemizde Kuzey Anadolu'da Tokat ve Güney Anadolu'da Kahramanmaraş illeri arasında çekilebilecek bir sınırın batısında saf ve karışık meşcereler halinde bulunmaktadır [14].

Karadeniz Bölgesi'nde Kızılırmak'ın doğusunda sarıçam ve Doğu Karadeniz göknarı ile; Kızılırmak'ın batısında Uludağ göknarı, Doğu kayını, Kazdağı göknarı, meşe türleri ve kızılçamla karışık meşcereleri vardır. Marmara ve Ege Bölgeleri'nde kızılçam ve meşe türleri ile karışık meşcereler kuran Anadolu karaçamı, Akdeniz Bölgesi'nde Toros sediri, kızılçam, Toros göknarı ve ardıç türleriyle; İç Anadolu Bölgesi'nde ise, ardıç ve meşe türleri ile birlikte görülür [15].

2.2. Karaçamın Kimyasal Özellikleri

Karaçam odunu, yapısında % 72.15 holoselüloz, % 57.91 selüloz, % 28.94 lignin ve % 13.27 pentozan bulundurmaktadır. Bunun dışında alkol-benzende % 6.07, sıcak suda % 4.71 ve % 1'lik NaOH'de % 12.16 oranında çözünmektedir [16].

Karaçamın selüloz oranını öz odunda % 55,7, diri odunda % 57.9, α -selüloz oranını öz odunda % 46.8, diri odunda % 47.6 ve lignin oranını öz odunda % 27.9, diri odunda % 28.2 olarak bulmuşlardır. Ayrıca soğuk su, sıcak su, alkol-benzen ve % 1'lik NaOH çözünürlüğü değerlerini sırasıyla öz odun ve diri odun için % 3–2, % 4.7–3.2, % 6.1–4.9 ve % 12.2–10.8 olarak tespit etmişlerdir [17].

3. KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLER ve YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİ (HPLC)

Kromatografi, bir karışımdaki kimyasal bileşenlerin bir sabit faz ve bir hareketli faz yardımıyla ayrılması, tanınması ve tayini ile kalitatif ve kantitatif analizlerin yapıldığı yöntemlerin genel adıdır ve analitik bir metottür.

Karışımda bulunan maddelerin hareketli faz yardımıyla sabit faz üzerinde değişik hızlarla hareket etmeleri veya sürüklenmeleri esasına dayanmaktadır. Hareketli faz gaz veya sıvı; sabit faz da sıvı veya katı olabilmektedir [18].

1930'lu yıllardan itibaren kromatografi teknikleri gelişmeye başlamıştır. İnce Tabaka Kromatografisinin temelleri 1938'de İzmanov ve Schraiber tarafından atılmıştır. Stahl da 1958'de bu yöntemi geliştirmiştir. 1941'de Martin ve Synge'nin çalışması sıvı kromatografisinde köklü değişiklikler yapmıştır [19].

Sıvı kromatografisi, başlarda geniş çaplı cam kolonlarda ve ortam şartlarında yapılmıştır. Analiz süreleri uzun ve prosedürleri ise yorucudur. 1960'lı yılların sonlarından itibaren sıvı kromatografisi geliştirilerek gaz kromatografisini tamamlayıcı bir teknik haline almıştır. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)'de bu ilerlemelerin bir sonucu olarak geliştirilmiştir [19,20].

3.1. Kromatografi Çeşitleri

Kromatografi hareketli faz tiplerine göre gaz kromatografisi ve sıvı kromatografisi şeklinde ikiye ayrılmaktadır. Sıvı kromatografisi de kendi içerisinde adsorbsiyon kromatografisi, dağılma kromatografisi, iyon değişimi kromatografisi, dışlama (jel filtrasyon) kromatografisi olarak 4 gruba ayrılmaktadır [19,21]. Gaz kromatografisinde kendi içerisinde gaz-katı kromatografisi ve gaz-sıvı kromatografisi olmak üzere ikiye ayrılır.

3.1.1. Sıvı Kromatografi Çeşitleri

3.1.1.1. Adsorbsiyon (Kati-Sıvı) Kromatografisi

Katı-sıvı kromatografisi, çözünen maddelerin silika jel ve alümina gibi polar adsorbanlara tutunması esasına dayanan bir tekniktir. İnce Tabaka Kromatografisi de katı-sıvı kromatografisinin bir türüdür. Bu teknik organik çözücülerde çözünen ve iyonize olmayan bileşenler için uygundur [19].

3.1.1.2. Dağılıma (Sıvı-Sıvı) Kromatografisi

Dağılıma kromatografisi, çözünen maddelerin birbirine karışmayan iki çözücü arasındaki dağılımı esasına dayanan bir tekniktir. Bu çözücülerden biri sabit diğeri ise mobil fazdır.

Dağılıma kromatografisi eğer sabit faz mobil fazdan daha polar ise *normal faz* olarak adlandırılır. Eğer mobil faz sabit fazdan daha polar ise de *ters faz* olarak adlandırılmaktadır [21].

Sıvı-sıvı dağılım kromatografisinde çözünmüş maddenin ayırımı sıvı kromatografik teknikler içinde ters faz sıvı kromatografisi en yaygın kullanılanıdır. Sabit faz polaritesi, hareketli faz polaritesinden daha düşüktür. Bu kromatografi türü, apolar sabit fazda tutunmaları farklı olan türlerin ayırımında kullanılır. Kimyasal olarak bağlı alkil zincirlerinin sabit faz olarak kullanıldığı ters faz sıvı kromatografisinde, ODS (18 karbon atomu zincirinden oluşan oktadesilsilan) en fazla kullanılan sabit fazdır. Ayrıca C₈ ve daha kısa alkil zincirleri, sikloheksil ve fenil bağlanmış sabit fazlar da kullanılmaktadır. Ters faz kromatografisinde hareketli fazlar genellikle su veya sulu tampon çözeltileri ile suyla karışabilen organik çözücü karışımlarından oluşmaktadır.

Normal faz sıvı kromatografisinde sabit faz polaritesi hareketli faz polaritesinden daha yüksektir. Sabit faz genellikle silika veya alümina, kullanılan hareketli fazlar ise heksan, metilen klorür, kloroform, dietil eter ve bunların karışımıdır. Silika jelin üzerine kimyasal bağlarla -CN, -NO₂ veya -NH₂ gibi polar fonksiyonel gruplar bağlanarak farklı normal fazlar elde edilir. Normal faz ayırımlarında polaritesi

yüksek olan maddeler, polar olan sabit faz ile daha fazla etkileşmekte, buna bağlı olarak kolonu daha geç terk etmektedir [22].

Sabit fazın kimyasal olarak etkisiz bir desteğe bağlanmasıyla daha sağlam kolonlar elde edilmiştir. Bu tür kolonlar ise, partiyon kromatografisinin bağlı faz kromatografisi denen türü ortaya çıkmıştır [19].

3.1.1.3. İyon Değişirme Kromatografisi

İyon değiştirme kromatografisi, dolgu maddesinin iyonik kısımlarıyla mobil faz arasında meydana gelen iyon değişimleri esasına dayanan bir tekniktir. İyon değiştirici maddeler olarak stiredivinilbenzen kopolimerlerine fonksiyonel grupların eklenmesiyle elde edilen reçineler kullanılmaktadır. Sülfonik asit ya da kuarternar amin türü reçineler uygulamalarda çoğunlukla tercih edilmektedir [19,23].

Bu kromatografi türü sağlık bilimlerinde aminoasitlerin ayrılmasında kullanılmaktadır. İyon değiştirme kromatografisi hem katyonlara hem de anyonlara uygulanabilmektedir [20].

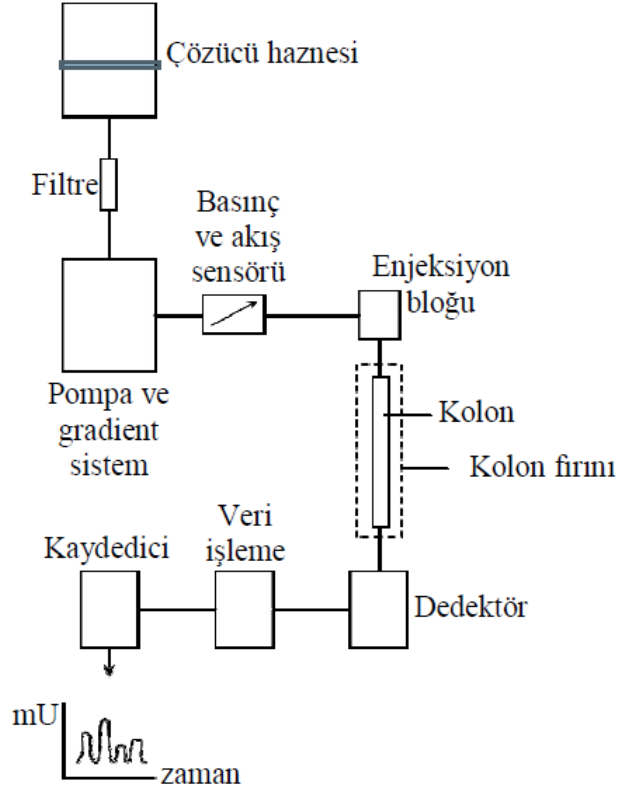
3.1.1.4. Jel Filtrasyon Kromatografisi

Jel filtrasyonkromatografisi, karışımın içerisindeki bileşenlerin molekül büyüklüklerine göre ayrılmasına özgü bir tekniktir. Jel filtrasyon kromatografisinin birçok adı vardır. Bunların en yaygın olanları *jel geçirim kromatografisi* ve *dışlama kromatografisidir*. Bu teknikte kullanılan dolgu maddesi, gözenekli inert bir yüzeye sahip bir jeldir. Küçük moleküller bu gözenekli ağ yapısına girmekte ve durgun haldeki mobil fazda tutulmaktadır. Büyük moleküller ise gözenekli yapıya giremeyip kolonu tutulmadan terk etmektedirler [19-21].

3.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi, sıvı kromatografi tekniğinin özel bir uygulamasıdır ve HPLC olarak da adlandırılmaktadır. Bu yöntemde sabit faz olarak kullanılan dolgu maddelerinin tanecik boyutunun küçültülmesi sonucu, hareketli faz ile etkileşen sabit faz yüzey alanı büyümektedir. Böylece kolonun etkinliği arttırılmış

olmaktadır. Çok sıkı olarak doldurulmuş kolondan hareketli fazın belirli bir hızla geçebilmesi için basınç uygulanması gerekmektedir [18,19].



Şekil 3.1. HPLC cihazının diyagramı [23]

Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC)'nin diğer kromatografi türlerinden üstünlükleri şunlardır:

- ✓ HPLC kolonu, rejenerasyon olmaksızın pek çok kez kullanılabilir.
- ✓ Bu teknik kullanıcının becerisine daha az bağımlıdır ve tekrarlanabilirlik daha yüksektir.
- ✓ Nitel ve nicel analiz amaçları için kullanılabilir.
- ✓ Analiz süresi oldukça kısadır.
- ✓ Duyarlık çok yüksektir. 10 µg'lık bir örnek bile, floresans veya elektron yakalama detektörleri kullanılarak tayin edilebilir.

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi sistemi 6 ana kısımdan oluşmaktadır. Bunlar mobil faz, degazör, pompa, örnekleyici (autosampler), kolon ve detektördür. Ayrıca dataların işlendiği bir bilgisayar sistemi de mevcuttur. Şekil 5.1’de HPLC cihazından bir görünüm mevcuttur.

3.2.1. Mobil Faz

Numunelerin kolon içinde hareket etmesini sağlayan çözücü karışımlarıdır. Sabit bileşimdeki tek bir çözücü kullanılarak yapılan bir ayırma *izokratik elüsyon* olarak adlandırılır. Polarlıkları birbirinden farklı iki (veya bazen daha fazla) çözücü sistemlerinin kullanıldığı tekniğe *gradient elüsyon* adı verilir. İzokratik elüsyon ile ayrılamayan maddeler, gradient elüsyonla ayrılabilen, farklı kapasite faktörüne sahip madde karışımlarının alıkonma zamanları kısaltılabilmektedir.

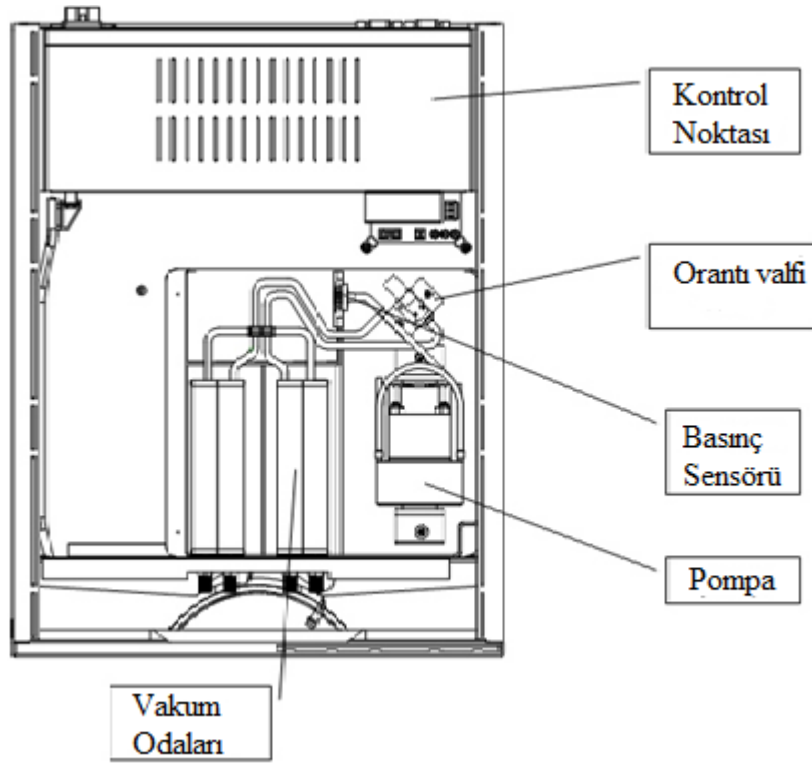


Şekil 3.2. Mobil faz

3.2.2. Degazör

Mobil faz haznelerinde bulunabilecek tozları, kolon ve detektör sisteminde gaz oluşturarak bozucu etkilere sebep olan çözülmüş gazların (genellikle oksijen ve

azot) giderilmesi için kullanılan cihazlar vardır. Bu çözülmüş gazlar kolonda kabarcıklar oluşturarak pik genişlemesine; ayrıca, çoğu zaman gerek gaz kabarcıkları gerekse tozlar, detektörle girişim yaparak performansında azalmaya sebep olurlar. Bu etkileri yok etmek için kullanılan bir cihazdır. Kullanılan mobil faz adedi ve pompa tiplerine göre uygun degazörler bulunmaktadır. Şekil 3.3’de şematik olarak bir degazör gösterilmektedir.



Şekil 3.3. HPLC degazörünün diyagramı

3.2.3. Pompa

Bir HPLC pompalama sistemi için gerekli şartlar şunlardır:

- 400 atm’ye kadar basınç üretimi
- 0,1-10 mL.dk⁻¹ aralığında akış hızları
- % 0,5 veya daha iyi bir bağıl tekrarlanabilirlikte akış kontrolü
- Korozyona dayanıklı parçalar.

Sıvılar çok fazla sıkıştırılmadığından dolayı HPLC pompaları tarafından üretilen basınç bir patlama tehlikesi oluşturmaz. Böylece sistemin parçalarından herhangi birinde meydana gelecek bir çatlak sadece çözücünün dışarı sızmasına neden olur. Ama sızıntılar bir yangın tehlikesi oluşturabilir.

Pistonlu Pompalar: HPLC sistemlerinin % 90'ında pistonlu pompalar kullanılmıştır. Pistonlu pompalar genellikle motor kontrollü bir pistonun ileri ve geri hareketleriyle çözücünün pompalandığı küçük bir silindirden meydana gelmiştir. Sırasıyla açılıp kapanan iki tane küresel kontrol musluğu, çözücünün silindir içine giriş ve çıkış akışını kontrol eder. Piston çözücü ile doğrudan temas etmektedir.

Pistonlu pompaların üstünlükleri;

- ✓ Küçük iç hacimleri (35-400 µL)
- ✓ Yüksek çıkış basıncı (700 atm'ye kadar)
- ✓ Gradient elüsyona uygun oluşları
- ✓ Kolon geri basıncından ve çözücü viskozitesinden büyük ölçüde bağımsız olan sabit akış hızlarıdır.

Sürgülü Pompalar: Sürgülü pompalar, bir kademeli motordan güç alan vidalı güdüm mekanizması ile kontrol edilen sızdırmaz bir sürgüsü olan şırınga benzeri silindirik bir kaptan oluşur. Sürgülü pompalarda çıkış akımı pulssuzdur. Dezavantajları ise sınırlı çözücü kapasitesi (~ 250 mL) ve çözücü değiştirilmesi gerektiğinde karşılaşılan güçlüklerdir.

Pnömatik Pompalar: En basit pnömatik pompalarda sıvı hareketli, sıkıştırılmış bir gaz ile basınçlandırılabilen bir kap içine yerleştirilmiş bir kap içine konur. Pnömatik pompalarda çıkış basıncı düşüktür ve akış hızı çözücü viskozitesine ve kolon geri basıncına bağlıdır. Ayrıca pnömatik pompalar, gradient elüsyona uygun değildir. Ve basınçları genellikle 135 atm'den daha düşüktür [24].

Şekil 3.4'de bir HPLC pompası gösterilmektedir.



Şekil 3.4. HPLC'si pompası

3.2.4. Örnekleyici (Autosampler)

Örnekleyici; analitlerin (numunelerin) kolon ve dedektöre gönderilmesini sağlar. Örnekleyici temel olarak iki tiptedir; Manuel (El tipi) ve Oto örnekleyici (Otomatik) modeller. Manuel örnekleyicilerde numune bir şırıngaya çekilip valf yardımıyla sisteme gönderilir. Oto örnekleyicilerde ise bu işlemleri cihaz kendisi yapabilmektedir. Bazı ünitelerde soğutma, ısıtma, seyreltme ve karıştırma özellikleri vardır. 10 vialden 1000 vial kadar değişik kapasitede olanları bulunabilir. Oto örnekleyiciye numune verirken en önemli konu numunenin temiz olmasıdır, aksi halde sistem çabuk kirlenir veya tıkanır. Numuneleri cihaza göndermeden önce muhakkak şırınga filtresinden veya kartuştan geçirmek gerekir, numunenin mümkün olduğunca berrak ve renksiz olmasını tercih edilmelidir. Şekil 3.5'de bir örnekleyici görülmektedir.



Şekil 3.5. HPLC' si örnekleyicisi

3.2.5. Kolon

Sıvı kromatografi kolonları bir HPLC cihazının en önemli parçasıdır ve genellikle paslanmaz çelikten imal edilir. Pek çok üretici tarafından üretilen analitik kolonlar 2-5 mm iç çaplı, 5-30 cm boyundadır. Tanecik çapları ise 2-10 μm arasında değişmektedir. Bu tip kolonların 1 metresinde 40000-60000 kadar tabaka bulunur.

Son yıllarda uzunluğu 3-7,5 cm ve iç çapı 1-4,6 mm olan yüksek performanslı mikro kolonlar da imal edilmeye başlanmıştır. Bu kolonların dolgu maddelerin parçacık boyutları 2-5 μm ve tabaka sayısı 10000 tabaka. m^{-1} 'ye kadar çıkmaktadır. Bu mikrokolonlar ile çok az miktarda çözücü ile hızlı bir şekilde ayırma yapabilmektedir. Sıvı kromatografisinde kullanılan çözücülerin saflıkları yüksek olmasından dolayı pahalıdır. Çözücüler kullanıldıktan sonra atıldığı için mikro kolon kullanımı çok önemli bir üstünlük sağlamaktadır. 15 saniye gibi çok kısa bir zamanda sekiz farklı madde birbirinden ayrılabilir.

Kolon dolgu maddeleri, film dolgular ve gözenekli dolgular olmak üzere iki tiptir. Film dolgular, gözenekli olmayan cam veya polimer tanelerinden oluşur. Yüzeylerine gözenekli yapıda silika, alümina veya iyon değiştirici reçineden oluşan ince bir gözenekli film kaplanmıştır. Gözenekli dolgular, silika, alümina ve iyon değiştirici reçineden yapılırlar. Sıvı kromatografisinde kullanılan en yaygın kolon dolgu maddeleri silisyum dioksittir. Mikrondan daha küçük boyutlardaki silisyum dioksit parçacıklarının aglomerasyonu, daha büyük ve yaklaşık aynı boyutlarda parçacıklar elde edilir. Hazırlanan, parçacıkların yüzeyi, genellikle bu yüzeye fiziksel veya kimyasal bağlarla bağlanmış ince bir organik filmle kaplanır. Silika temelli bağlı fazlar, yüzeyde bulunan silanol gruplarının organosilanlarla reaksiyonları sonucu elde edilir.

En çok kullanılan, klorodimetilsilanların yüzey silanol grupları ile reaksiyonudur. Ters faz sıvı kromatografisi için kullanılan çeşitli alkil ve süstitüe alkil silikalar bu yolla elde edilir. Alümina parçacıkları, gözenekli polimer parçacıkları ve iyon değiştirici reçineler de dolgu maddesi olarak kullanılabilirler. Anyonları ve kationları tutan iyon reçinelerin dolgu maddesi olarak kullanılması halinde, numunede iyon halinde bulunan türler birbirinden ayrılır.

İyonların bu reçinelere olan ilgilerine etki eden faktörler;

- ✓ İyonun yükü,
- ✓ İyonun büyüklüğü,
- ✓ pH,
- ✓ İyon şiddeti,
- ✓ Kullanılan reçinelerin gözenek büyüklüğü,
- ✓ Çözücü cinsi,
- ✓ Çözücü derişimi,
- ✓ Çalışma sıcaklığıdır.

Kullanılan iyon değiştirici reçineler doğrudan kolona doldurulabilen katı reçineler olabileceği gibi, bir katı yzeyine kaplanmış sıvı reçineler de olabilir. Katyon değiştirici reçinelerin ortak zelliği, kuvvetli bir asit olan sũlfonik asit grupları ile zayıf bir asit olan karboksilik asit gruplarını iğermeleridir. Anyon değiştirici reçineler ise, kuvvetli baz olan kuarterner amin grupları ile zayıf baz olan primer amin grupları iğerirler.

Sıvı kromatografisinde kolon verimliliği, bir bileşiğin kolondan geğişi sırasında meydana gelen bant genişliğinin derecesi tarafından etkilenir. Bant genişlemesi ve dolayısıyla kolon verimliliğinin kaybı, çzũnen bileşenlerin kolondan aşağıya gœçleri sırasında yer alan çok sayıda kũtle-aktarım işlemlerinin sonucudur. Bu hızları etkileyen bazı değişkenler kontrol edilebilir ve ayırmalar için kullanılabilir.

Kolon Verimliliğine Etkiyen Değişkenler;

- ✓ Hareketli fazın doğrusal hızı,
- ✓ Hareketli fazda difũzyon katsayısı,
- ✓ Durgun fazda difũzyon katsayısı,
- ✓ Kapasite faktœrũ,
- ✓ Dolgu paręacık çapı,
- ✓ Durgun fazda sıvı kaplamanın kalınlığıdır [22].

şekil 3.6'da kolon ve kolon fırını gœsterilmektedir.



Şekil 3.6. HPLC kolon fırını ve HPLC kolonu

3.2.6. Dedektör

Kolondan çıkan maddelerin derişimi kolon çıkışına yerleştirilen uygun bir dedektör ile ölçülür. Dedektör seçimi doğru ve hassas bir analiz yapabilmek için son derece önemlidir. Genellikle tek dedektör sistemi kullanılmakla beraber, birden fazla dedektör sisteminin yer aldığı cihazlar da vardır.

Dedektörde bulunması gereken önemli özellikler şunlardır;

- ✓ Yüksek duyarlılık,
- ✓ İyi bir kararlılık ve tekrarlanabilirlik,
- ✓ Geniş ve doğrusal bir çalışma aralığı,
- ✓ Akış hızından bağımsız bir cevap verme süresi,
- ✓ Bütün bileşenler için benzer cevaplar vermeli,
- ✓ Numuneyi bozmamalı,

- ✓ Ucuz ve kullanım kolaylığı olmalıdır.

Dedektörler iki grup altında toplanırlar. Bunlar *maddeye yönelik dedektörler* ve *çözeltiye yönelik dedektörler*dir.

Maddeye Yönelik Dedektörler: Hareketli faz içindeki maddenin özelliklerini tayin ederler ve en yaygın kullanılan türleri aşağıda verilmiştir:

1. Fotometrik dedektörler (UV/GB, Floresans, Dizi diyot, Infrared),
2. Elektrokimyasal dedektörler,
3. Ayırım sonrası tepkime dedektörleri,
4. Radyoaktivite dedektörleri,
5. Kütle spektrometreleri.

Çözeltiye Yönelik Dedektörler: Örnek özelliklerinin ölçülmesine yönelik dedektörlerdir ve aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir:

1. Refraktif indeks dedektörleri
2. Dielektrik sabiti dedektörleri
3. İletkenlik dedektörleri
4. Yoğunluk dedektörleridir.

Bu çalışmada sadece DAD dedektörü kullanıldığı için sadece DAD dedektörü anlatılmaktadır.

UV- Görünür Bölge Dedektörü (DAD)

Absorbans ölçen detektörler olup HPLC’de kullanılan detektörlerin yaklaşık % 60’ını oluşturmaktadırlar. Lambert-Beer yasası geçerlidir. Spektrum taraması yapmak, farklı dalga boyunda çalışmak veya dalga boyunu zamana karşı programlamak mümkündür. Hareketli faz, UV/VIS fotometre ya da spektrofotometrenin bulunduğu Z şeklindeki küçük bir akış hücresinden geçirilir.

Kolon dışı bant genişlemesini en aza indirmek için, bu gibi hücrelerin hacimleri mümkün olduğunca düşük tutulmaktadır. Hacimler, 1-10 µL ve hücre uzunluğu 2-10 mm arasında sınırlandırılmıştır. Bu tip hücreler, yaklaşık 600 psi'den büyük basınçlarda çalışmazlar. Bunun sonucu olarak, bir basınç düşürme düzeneği genellikle gereklidir.

Hücreden geçen analit, bir miktar UV ışınını absorblar ve dedektör tarafından bu absorpsiyona bağlı olarak bir sinyal oluşturulur. Bu sinyal, analit derişimi ile orantılıdır. Tek bir dalga boyunda çalışan dedektörler kullanılabildiği gibi bir monokromatör ile çeşitli dalga boylarını seçerek çalışan dedektörler de vardır. Tek dalga boyunda çalışan dedektörlerde ışık kaynağı olarak genellikle 254 nm'de ışımaya yapan Hg lambası, çeşitli dalga boylarını ölçebilen dedektörler de ise döteryum lambası kullanılır. Dalga boyunun her bir bileşene göre ayarlanabilmesi nedeni ile seçimli bir dedektör türü olan UV-görünür bölge dedektör sisteminde seçilen çözücülerin UV-ışınlarını absorbladığı dalga boylarına dikkat edilmeli ve seçilen çalışma dalga boyu çözücünün absorpsiyon yaptığı dalga boyu değerinden yüksek olmalıdır. Bu durum özellikle düşük dalga boylarında absorpsiyon yapan örnekler için son derece önemlidir (CH₃OH 205 nm, CH₃CN 190 nm, v.b.). Ayrıca elüe edicinin pH değerinin UV-görünür bölge spektrumunu etkileyeceği de göz önünde bulundurulmalıdır. En güçlü ultraviyole spektrofotometrik dedektörler diyod-serili cihazlardır. Bu cihazlar, spektrumun tamamı için gerekli olan verileri yaklaşık bir saniyede toplayabilmektedir. Böylece, her bir kromatografik pik için spektral veriler, analit kolondan çıkarken toplanıp saklanabilir. Türlerin teşhisine ve kantitatif tayin için şartların seçimine yardımcı olan bu spektrum şekli, üç boyutlu grafik olarak verilebilmektedir.

İdeal UV dedektörün karakteristikleri şunlardır:

- Örneklerin UV- görünür bölgede absorpsiyon yapması gerekir.
- Hareketli faz akış hızı ve sıcaklık değişimlerinden etkilenmez.
- Band genişletme etkisi küçüktür.
- Çok güvenilirdir.

-Örnek çözeltiyi bozmaz [22].

Şekil 3.7’de bir dedektör görülmektedir.



Şekil 3.7. Diode Array Detection (DAD) dedektörü

3.2.7. Kaydedici

Mikro işlemciler ve bilgisayarların kullanıldığı sistemlerde hareketli faz akış hızı, enjektör, kolon fırını, örnek alma sistemi, dedektör ve veri kaydı sistemi merkezi bir veri kayıt cihazı ile kontrol edilmektedir. Mikro işlemciler ve bilgisayarların kullanılması kromatografik sistemde tekrarlanabilirliği arttırmakta, sistem validasyon parametrelerinde daha doğru değerler elde edilmesine olanak sağlamaktadır.

3.3. Kromatografi Parametreleri

Kromatografik yöntemlerde etkili bir ayırım gerçekleştirebilmek için dikkat edilmesi gereken üç nokta vardır.

1. Numune bileşenleri kolonda tutunabilmelidir.
2. Numune bileşenleri diğerlerinden ayrılabilenlidir.
3. Numune bileşenlerinin bant genişlikleri nispeten dar olmalıdır.

Kimyasal ve fiziksel etkileşimler sonucu oluşan bu koşullar sağlanmazsa, uygun bir çalışma süresinde ayırım gerçekleşmez. Ayırımı iyileştirmek, uygun sabit faz ve hareketli faz seçimiyle doğrudan ilişkilidir. Koşulların uygunluğu ise kromatogramlar yorumlanarak kontrol edilir.

Kromatogram; kromatografik bir yöntemde numune bileşenlerinin kolona verilmesinden dedektöre gelene kadar geçen zamana karşı, dedektör tarafından elektronik olarak verilen sinyalle oluşturulan grafikdir.

Bir kromatogramı yorumlamak için gerekli parametreler;

- ✓ Alıkonma zamanı, t_R
- ✓ Kapasite faktörü, k'
- ✓ Seçicilik faktörü, α
- ✓ Kolon ayırma gücü, R_s
- ✓ Kolon verimliliği, N ve L olarak verilmiştir [18].

3.3.1. Alıkonma Zamanı (t_R)

Alıkonma zamanı (t_R), numunenin kolona verilmesinden sonra dedektöre ulaşması için geçen süredir. Alıkonma davranışı numune bileşenlerinin hareketli faz ile sabit faz arasındaki dağılımını gösterir. Alıkonmayı zaman olarak da hacim olarak da ifade edebiliriz.

Alıkonma hacmi; numune bileşenlerinin kolona verildikten sonra kolon boyunca ilerlemesi ve dedektöre ulaşabilmesi için gerekli olan mobil faz hacmidir. t_R alıkonma zamanı ve F_c volumetrik akış hızının çarpımı ile hesaplanır.

$$V_R = t_R \cdot F_c \quad (3.1)$$

Fakat GC ve HPLC gibi kromatografik sistemlerde hareketli fazın volumetrik akış hızını doğru olarak ölçmek mümkün olmayabilir. Bu nedenle alıkonma zamanı ifadesini kullanmak doğru olur.

Numune veya hareketli faz genellikle kolonda alıkonmayan bir madde içerir. Olmadığı durumlarda da pik tanımlanmasına yardımcı olması için kolonda tutulmayan bir madde analiz örneğine ilave edilebilir.

Kolonda tutunmayan maddenin dedektöre ulaşma süresi ölü zaman (t_M) olarak ifade edilir ve kolonda ilerleme hızı hareketli faz moleküllerinin dedektöre ulaşması için gereken süreye eşittir [25,26].

3.3.2. Kapasite Faktörü (k')

Kapasite faktörü, kolonda çözünen numune bileşenlerinin göç hızlarını açıklamak için kullanılan bir ifadedir. Bir diğer adı ise alıkonma faktörüdür.

$$k'_A = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (3.2)$$

eşitliği ile ifade edilir.

Burada k'_A numune bileşenlerinden herhangi birinin kapasite faktörüdür. t_M ; ölü zaman, t_R ise analitin alıkonma süresidir.

Bir analit için alıkonma faktörünün 1'den küçük olması, numunenin kolondan çıkış süresinin çok hızlı olduğunu gösterir ve bu durum alıkonma zamanının doğru tayinini zorlaştırır. Alıkonma faktörünün 20-30 birimden büyük olması, numunenin kolondan çıkış süresinin çok uzun olduğunu gösterir.

İdeal ayırmalar ise alıkonma faktörünün 2 ile 10 arasında olduğu koşullarda sağlanır [18,26].

3.3.3. Seçicilik Faktörü

İki bileşen arasında ayrımı sağlama yeteneği ve onların hassas olarak kolonda alıkonulması kolon seçiciliği olarak adlandırılır. Bu seçicilik ayırma faktörü (α) olarak ifade edilir. A ve B gibi iki tür için bir kolonun seçicilik faktörü (α) eşitlikte görüldüğü gibi tanımlanır.

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} \quad (3.3)$$

k_2 ' kolonda daha kuvvetli tutulan analit için kapasite faktörüdür. k_1 ' ise kolondan hızla ayrılan analit için kapasite faktörüdür. Bu yüzden α daima 1'den büyüktür.

k' değerleri t_R ve t_M cinsinden yazılarak α 'nın deneysel kromatogramdan hesaplanabileceği bir bağıntı elde edilir.

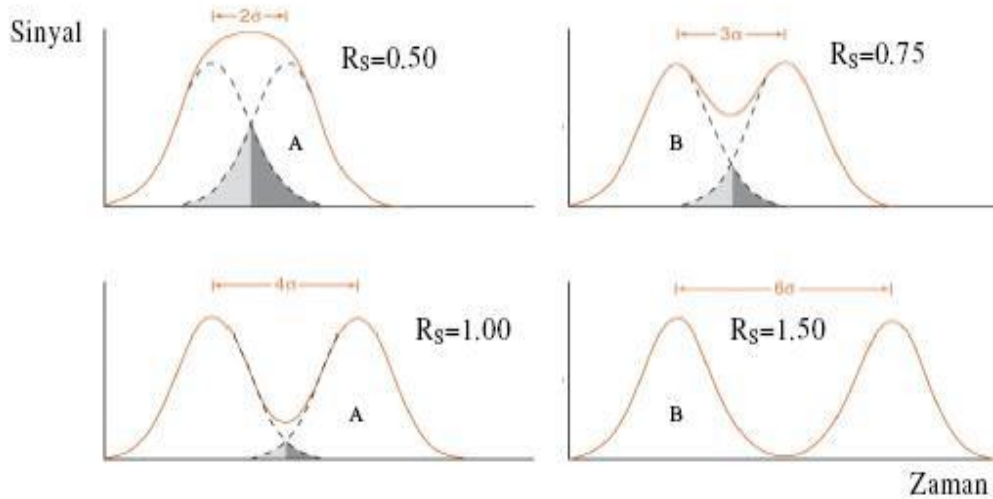
$$\alpha = \frac{(t_R)_2 - t_M}{(t_R)_1 - t_M} \quad (3.4)$$

3.3.4. Kolon Ayırma Gücü

Kolon ayırma gücü (R_s), kolonun iki analiti birbirinden ayrabilmesinin kantitatif bir ölçüsüdür. Kolon ayırma gücü, pik genişliklerinin orta noktaları açısından komşu iki pik arasındaki mesafeyi ifade eder. Ayırma gücü eşitlikte verildiği gibi hesaplanır.

$$R_s = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B} \quad (3.5)$$

Burada W , pik genişliğini ifade eder. $R_s=1$ olduğu zaman neredeyse % 2'lik çakışmayla ayırım sağlandığı anlamına gelir. Şekil 3.8'de bu kromatogram gösterilmiştir [27].



Şekil 3.8. Kolon ayırma gücünün gösterildiği bir kromatogram [22].

Ayırma gücünün en az 1.5 olduğu durumlarda ideal ayırma gerçekleşir.

3.3.5. Kolon Verimliliği

Kromatografik analizlerde pik genişliği ölçülebilir ve bu kolon verimliliğine işaret eder. Pik genişliği ne kadar küçükse o kadar yüksek verimle çalışılmıştır. Kromatografik kolon verimliliğinin kantitatif bir ölçüsü olarak genellikle birbirleri ile ilgili iki terim kullanılmaktadır: Tabaka yüksekliği (H), ve Tabaka sayısı (N)'dir. Bu iki terim arasındaki ilişki eşitlikte verilmiştir.

$$H = \frac{L}{N} \quad (3.6)$$

Bu ilişkide L, kolonun uzunluğudur (cm). Kromatografik kolonun verimliliği tabaka sayısı arttıkça ve tabaka yüksekliği azaldıkça artar.

Kromatografik kolon, teorik tabaka olarak adlandırılan, birbirini izleyen, fakat ayrı ince tabakalardan oluşmuş bir damıtma kolonuna benzermiş gibi düşünülür. Her bir tabakada, analitin sabit ve hareketli fazlar arasında dengeye ulaştığı kabul edilir.

$$N = 16\left(\frac{t_R}{W}\right)^2 \quad (3.7)$$

Bu eşitlik kullanılarak N, iki zaman ölçümü (t_R ve W) ile hesaplanabilir.

3.4. Yöntem Validasyon Parametreleri

3.4.1. Doğruluk

Analiz sonucu elde edilen değerlerin gerçek değere yakınlığının ölçüsüdür. Sonuçlar ortalama % geri kazanım olarak verilir. Ortama ilave edilen analitin (analizi yapılacak madde) analiz yapılan ortamdan hangi oranda geri alınabildiğini gösterir [28].

Geri kazanım çalışmaları için 3 yol izlenebilir. Bunlar:

3.4.1.1. Referans bir yöntemle karşılaştırmak

Geliştirilen analiz yöntemi ile, 3 farklı derişimde, 3'er ölçüm alınır ve bu değerler % geri kazanım değerlerine çevrildikten sonra tümü bir araya getirilir. Sonuçlar referans kabul edilen olan başka bir yöntem sonuçları ile istatistiksel olarak karşılaştırılır.

Sonuçların ortalamaları, % bağıl standart sapma (% BSS) ve/veya % bağıl hata (BH) (% Bias) ile beraber verilir (3.8, 3.9) [29].

$$\%BSS = \frac{SS}{X} \times 100 \quad (3.8)$$

$$\%BH = \frac{GD - x}{GD} \times 100 \quad (3.9)$$

3.4.1.2. Kör (matriks) ortamına analizi yapılan maddeyi ilave etmek

Farmasötik dozaj formları gibi matriks etkisi olan numunelerle çalışıldığı zaman kullanılan bir yöntemdir. Analizi yapılacak madde boş matrikse değişik derişimlerde eklenir. Boş matriks, ilaç dozaj formları için (etken maddesiz) yardımcı maddelerden, pestisit kalıntıları için pestisit ile muamele edilmemiş ekinlerden oluşur.

Genellikle % 50, 75, 100, 125 ve 150 oranında madde ilavesi yapılır ve her seviyede en az 3'er ölçüm yapılır. Sonuçlar % geri kazanım olarak ifade edilir ve % bağıl standart sapma ve/veya % bağıl hata (% Bias) ile beraber verilir.

3.4.1.3. Standart ekleme yöntemi ile saf madde ilavesi

Analizi yapılacak maddenin bilinen ve değişik miktarları, matriks içerisinde yer alan ve miktarı bilinmeyen veya daha önce tayin edilmiş aynı maddenin üzerine ilave edilir. Asıl numunedeki etken madde derişimi, deney verilerinden matematiksel olarak hesaplanır. Genellikle % 25, 50, 100 oranında madde ilave etmek iyi bir yaklaşımdır. Madde ilave edilmiş ve ilave edilmemiş bütün numuneler en az 3'er defa analiz edilir. Sonuçlar, ilave edilen ve ölçülen madde miktarları verilerek ifade edilir. Bu teknik, katkı maddelerinin ve yardımcı maddelerin bilinmediği durumlarda kullanılır. Sonuçların ortalamaları, % bağıl standart sapma ve/veya % bağıl hata (% Bias) ile beraber verilir.

3.4.2. Kesinlik

Geliştirilen yöntemin çalışılan koşullar altında tekrarlanabilirliğinin ölçüsüdür. Başka bir ifade ile aynı yöntem birden çok sayıda uygulandığında analit için bulunan

sonuçların birbirine yakınlığının bir ölçüsüdür. % BSS (Bağıl Standart Sapma) veya % VK (Varyasyon Katsayısı) olarak ifade edilir. Ölçüm yapılan her bir derişim için minimum 5-6 tayin yapılmalıdır. Bunlardan en az 3 deney sonucunun % BSS'ı, teorik değerin % 15'inden daha fazla sapma göstermemelidir. Kesinliğin en yaygın kullanılan ölçüsü standart sapmadır [30-32].

3.4.3. Seçicilik

Analizi yapılacak maddenin, numunede mevcut girişim yapma ihtimali bulunan diğer yardımcı veya etken maddeler yanında miktarının tam ve doğru olarak tayin edilebileceğini gösteren bir parametredir. Özellikle kararlılık tayini çalışmalarında yapılması kesinlikle zorunlu olan bir parametredir. Seçicilik yeterli düzeyde değilse, yöntemin doğruluğu, kesinliği ve doğrusallığı hakkında bir şüphe oluşur [31].

3.4.4. Teşhis Sınırı (LOD)

Analitin belirlenebildiği fakat nicel sınırlar içerisine girmediği en alt derişimdir. Doğrudan, yapılan deneylerden veya hesapla bulunabilir. Doğrudan yapılan deneylerden, gözlenerek yapılan hesaplamalarda genel olarak Sinyal/Gürültü (signal/noise) oranı 3,3 olarak alınır.

Teşhis Sınırı (3.10) kullanılarak hesaplanır.

$$\text{LOD} = 3,3 \times \text{SS} / m \quad (3.10)$$

eşitliği kullanılır. Bu eşitlikte SS, kör çözeltilerinde (en az 5 adet) yöntem uygulandığında elde edilen sonuçların veya ilgili kalibrasyon doğrusunun kesim değerinin standart sapması; m, ilgili kalibrasyon doğrusunun eğim değeridir.

3.4.5. Tayin Alt Sınırı (LOQ)

Analizi yapılan maddenin miktarının kabul edilebilir düzeyde kesinlikte ve doğrulukta tayin edilebileceği kalibrasyon eğrisinin en alt derişimini oluşturan derişim düzeyidir. Doğrudan yapılan deneylerden veya hesapla bulunabilir. Doğrudan yapılan deneylerden gözlenerek LOQ tespiti için genel olarak Sinyal/Gürültü oranı 10 olarak alınır.

Tayin Alt Sınırı (3.11) kullanılarak hesaplanır.

$$LOQ= 10 \times SS / m \quad (3.11)$$

Burada SS, kör çözeltilerinde (en az 5 adet) yöntem uygulandığında elde edilen sonuçların veya y eksenindeki kesim değerinin standart sapması; m, ilgili kalibrasyon doğrusunun eğim değeridir. Bir yöntemde SS ve m değerleri, LOD eşitliğinde kullanılan değerlerle aynıdır.

3.4.6. Doğrusallık

Derişime karşı cevabın doğru orantılı olarak artması ve çizilen grafikte noktaların düz bir çizgi üzerinde yer almasıdır. Korelasyon katsayısı (r), doğrusallığı veren parametredir. Doğrusallık, korelasyon katsayısı $r = 0,999$ ise sağlanmış demektir. Doğrusallığı belirleyebilmek için stok çözeltiden en az 5 değişik derişimin hazırlanması ve analiz edilmesi gerekir. Bu derişimin alt sınırı hedef seviyenin % 50'sinden düşük ve üst sınır da % 150'sinden yüksek olacak aralıkta seçilmelidir. Bu 5 değerle yapılan doğrusallığın saptanması işleminin en az 3 defa tekrarlanması gerekir. Doğrusallığın tam validasyonu için ayrıca eğim ve kesim değerlerinin % BSS'ları veya standart hataları da hesaplanmalı ve raporda verilmelidir.

3.4.6.1. Kalibrasyon Grafiği

Analitin bilinen derişimleri ile değişen değişkenin cevapları arasındaki ilişkidir. Bir kalibrasyon eğrisi hazırlanırken seçilen derişimler daha önce yapılan çalışmalarla belirlenir. Doğrusal veya doğrusal olmayan sonuçlar elde edilebilir. Tayin alt sınırı ve tayin üst sınırı derişimleri de dahil olmak üzere çalışma aralığında en az 5 derişim için cihazdan ölçülen değerler kullanılarak hazırlanır. Doğrusal olmayan eğriler için daha fazla standart derişimin seçilmesi uygun olur.

3.4.6.2. Duyarlık

Duyarlık, doğrusallığın geçerli olduğu aralıktaki doğru denkleminin eğimidir. Eğim ne kadar büyükse uyarlık o kadar iyidir. Pek çok kitapta aynı zamanda tayin alt sınırı olarak da tanımlanmıştır. Tayin alt sınırı ne kadar küçükse yöntem o derece duyarlıdır.

3.4.6.3. Çalışma Aralığı

Yeterli doğruluk ve duyarlılıkta doğrusallığa sahip yöntemin geçerli olduğu alt ve üst sınırlar arasında yer alan derişim aralığıdır. Derişim aralığı genellikle seçilen yöntemin tipine göre değişir. Bu aralık yöntemin doğrusallığı bulunduktan sonra belirlenir. Ana maddenin analizinde standartların derişimleri genellikle hedeflenen seviyede veya ona yakın ölçülür. Bu derişimin alt sınırı hedef seviyenin % 50'sinden düşük ve % 150'sinden yüksek olacak aralıkta seçilmelidir. Hedef miktarın % 50, 75, 100, 125 ve 150 olacak şekilde aralık düzenlenebilir.

3.4.6.4. Sağlamlık

Yöntemin, analiz parametrelerindeki ufak değişimlerden etkilenmeden kalabilme kapasitesidir. Bu parametreler organik çözücü yüzdesi, pH, iyonik güç, sıcaklık gibi etkenlerdir. Kararlılık yöntemin normal kullanımındaki güvenilirliğinin bir ölçüsüdür ve yöntem geliştirilirken değerlendirilmesi gereken bir parametredir.

3.4.6.5. Tutarlılık

Yöntemin gerçek kullanım koşulları altında tekrar edilebilirliğinin saptanmasıdır. Bunun için çalışma, aynı laboratuarda farklı analizciler tarafından; aynı laboratuarda farklı cihazlar tarafından farklı laboratuarda gerçekleştirilmesi gerekir. Reaktif ve çözücülerin markalarının değiştirilmesi; farklı günlerde ve sıcaklıklarda yapılması gibi normal test şartlarının değiştirilmesi; aynı marka ve modele sahip yeni bir kolon kullanarak tekrarlanması gereklidir [33].

4. ORGANİK ASİTLER

Organik asitler; yapıları karbon iskeletine dayalı ve molekülünde –OH ve –COOH grupları bulunan doğal bileşiklerdir. Doğada saf olarak bitkisel ve hayvansal organizmada bulunabilirler ve ayrıca doğal yollardan elde edilebilirler. Bu asitler, meyve ve sebzelerde çoğunlukla serbest halde, ancak bir kısmı tuz, ester, glikozit gibi değişik bileşikler halinde, ancak daima suda erimiş halde bulunurlar. Meyve ve sebzelerde çeşide bağlı olarak değişik cins ve miktarlarda organik asitler bulunmaktadır. Organik asitler bazı ham meyvelerde, kalsiyum oksalat veya potasyum bitartarat gibi hücre içi kristalleri halinde de bulunabilmektedir [34].

Genel özellikleri şunlardır:

1. Sulu çözeltilerinde (H_3O^+) iyonu verir.
2. Mavi turnusol kağıdını etki ederek kırmızıya dönüştürür.
3. Ekşi bir tada sahiptirler.
4. Bazlarla tepkimeye girdiklerinde tuz ve su oluştururlar.
5. Sudaki çözünürlükleri sınırlıdır. Zayıf asitlerin sulu çözeltileri, denge halinde iyonlaşmamış asit molekülleri, H_3O^+ iyonları ve konjuge baz karışımını içerir. Zayıf asit örnekleri, hidrofluorik asit (HF), asetik asit (CH_3COOH) ve amonyum iyonu (NH_4^+)'dur [35].

Bu çalışmada kullanılan organik asitler ile ilgili bilgiler aşağıda bulunmaktadır.

4.1. Bazı Organik Asitler Ve Genel Özellikleri

4.1.1. Oksalik Asit

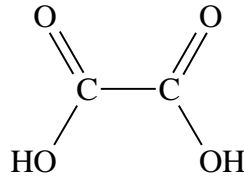
Karboksilli asitler grubundan olup, kristal yapıda, renksiz ve zehirli bir organik bileşiktir. Çözünemeyen demir bileşiklerini çözebilen karmaşık iyonlara dönüştürebilme özelliği vardır. Genellikle sulu kristaller halinde bulunur [36].

Oksalik asit hemen her çeşit meyve ve sebze de mevcuttur. Oksalik asit kuzu kulağı bitkisinin yapraklarında vardır ve ona ekşi tadını verir [37]. Bu nedenle bu aside kuzu kulağı asidi denilmektedir. Kuzu kulağı tuzu monopotasyum oksalattır. Oksalik asit ıspanak, marul, greyfurt, portakal, limon, misket limonu gibi meyvelerde fazla miktarlarda bulunmaktadır [38].

Günümüzde sentetik olarak elde edilmektedir. Sodyum formiyatın 300°C'a kadar ısıtılmasıyla meydana gelir. Oksalik asit orta kuvvette bir asittir [39].

Oksalik asit kristalize olabilmektedir. 110°C'de ısıtılınca suyunu kaybeder ve anhidrit şekline dönüşür [37].

Oksalik asidin kimyasal yapısı ve bazı özellikleri:



Şekil 4.1. Oksalik asidin kimyasal yapısı

| | |
|-------------------------|--|
| Formülü | : C ₂ H ₂ O ₄ |
| Molekül Ağırlığı | : 90.04 g.mol ⁻¹ |
| Kaynama Noktası | : 149 – 160 °C |
| Yoğunluğu | : 1.90 g.mL ⁻¹ |
| K_{a1} | : 5.6 x 10 ⁻² |
| K_{a2} | : 5.42 x 10 ⁻⁵ |

4.1.2. Tartarik Asit

Tartarik asit “üzüm asidi” olarak bilinmektedir. Çünkü; doğada tartarik aside üzümde başka bir meyvede pek rastlanmaz [40]. Tartarik asit dikarboksilli bir asittir. İki asimetrik karbon atomu vardır. Tartarikasitler ve bunların yaygın tartarat

tuzları suda çözünebilen, kristal yapılı, renksiz, kokusuz, beyaz tanecikli katılardır [36].

Tartarik asit meyvelerde doğal aromayı artırır. Organik asitler içinde suda en çok çözünen ve en fazla ekşiliğe sahip olan asittir. Meyve kökenli olduğu için, çoğunlukla meyve içeren işlenmiş gıda ürünlerinde kullanılmaktadır. Tartarik asit üzüm aromalı gıdaların koyu pembemsi doğal renklerini belirgin bir şekilde arttırdığından, çoğu kez üzüm aromalı ve ekşimsi reçellerde, jölelerde ve şekerlemelerde asitlendirici olarak özellikle tercih edilmektedir [41-43].

Tartarik asidin 4 stereoizomeri vardır. Bunlar; üzümde ve başka meyvelerde bulunan d-(dekstro) tartarik asit, rasemik karışımından elde edilen L-(levo) tartarik asit, potasyum bitartarat ana çözültisinden elde edilen ya da yapay yolla hazırlanan rasemik tartarik asit ve yine yapay olarak hazırlanan ama levo ve dekstro tartarik asit ayrılmayan mezo tartarik asittir [36]. Bunlar aşağıda kısaca açıklanmıştır.

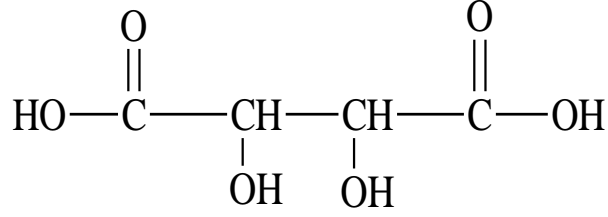
L(+)-Tartarik Asit: Genellikle tartarik asit olarak adlandırılmaktadır. Bu form potasyum bitartarat olarak bilinir. Erime noktası 170°C'dir. Sodyum potasyum tartarat Fehling çözültisinin bir bileşenidir. L-Tartarik asit meyveve yapraklarda oldukça yaygın bir şekilde bulunmaktadır.

D-Tartarik Asit: Doğal olarak bulunmaz. DL-Tartarik asidin ayrışmasıyla elde edilebilmektedir. D-Tartarik asidin erime noktası 170°C'dir.

Rasemik Tartarik Asit (DL-Tartarik Asit): Doğada bulunmamaktadır. Erime noktası 206°C'dir.

Mezo Tartarik Asit: Doğada bulunmamaktadır, kristalize olabilmektedir ve erime noktası 140°C'dir.

Tartarik asidin kimyasal yapısı ve bazı özellikleri:



Şekil 4.2. Tartarik asidin kimyasal yapısı

Formülü : C₄H₆O₆

Molekül Ağırlığı : 150.09 g.mol⁻¹

Kaynama Noktası : 275 °C

Yoğunluğu : 1.79 g.mL⁻¹

K_{a1} : 9.20 x 10⁻⁴

K_{a2} : 4.31 x 10⁻⁵

Tartarik asit ve kremtartar kabartma tozu üretiminde ve sert şekerlemelerin bileşiminde kullanılmaktadır. Ayrıca bu asit gazozların, suda çözüldüğünde gaz çıkaran tabletlerin, tatlıların ve meyve şekerlemelerinin üretiminde de kullanılmaktadır [36].

4.1.3. Sitrik Asit

Sitrik asit özellikle limonda bulunur ve ona ekşi tadını verir. Limon asidi biyolojide de önemli bir asittir, yağların ve karbonhidratların metabolitik çevrimlerine girer. Tribazik bir hidroksi asittir. Aynı zamanda güçlü bir organik asittir. Molekülünde asimetik karbon atomu bulunmadığı için optikçe aktif şekli yoktur [37].

Sitrik asit birçok meyvede (üzüm, kuşburnu, kızılcık, portakal, greyfurt, erik, incir, limon, şeftali, ahududu, ananas, siyah ve kırmızı frenk üzümü, dut, çilek) serbest halde ya da potasyum ve kalsiyum tuzu halinde bulunmaktadır. Sitrik asit sulu çözeltilerinde kristalize olabilme özelliğindedir, eşkenar dörtgen prizma formundadır

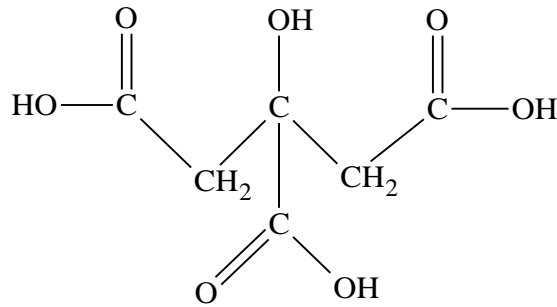
ve suda kolayca çözünür. Tuzları sitrat olarak adlandırılmaktadır. Olgunlaşmamış limonda % 5-7 oranında sitrik asit ve tuzlarına rastlanmıştır.

Sitrik asit hafifçe kaynamış limon suyunun kaynar haldeki kalsiyum karbonatla işlenmesinden elde edilir. Çökelen trikalsiyum sitrat sülfirik asitle ayrıştırılır. Ayrıca sitrik asit, sitromiset denen mantarların etkisiyle glikozun mayalanması sırasında da elde edilmektedir [39].

Kalsiyum ve magnezyum ile yaptığı bileşikler; kansızlığı önlemekte oldukça etkili olmaktadır. Üre sitrat; idrar yollarında kalsiyum tuzlarının çökmesi ile oluşabilecek taşları engelleyerek önemli bir görev üstlenmektedir [44]. Sitrik asidin kalsiyum tuzları aynı zamanda çivi otu (baklagil yapraklarından çivit çıkarılan indigofera) [46]), patates ve pancar kökünde de yaygın olarak bulunmaktadır [45].

Sitrik asit ve tuzları üzümden yapılan içeceklerde, tatlılarda, jellerde, reçellerde, marmelatlarda, şekerlemelerde kullanılmaktadır. Ayrıca sitrik asit gazlı içeceklerde tat-koku verici, asitlendirici ve koruyucu olarak görev yapmakta, aroma ve renk kaybını önlemektedir.

Sitrik asidin kimyasal yapısı ve bazı özellikleri:



Şekil 4.3. Sitrik asidin kimyasal yapısı

Formülü : C₆H₈O₇

Molekül Ağırlığı : 192.12 g.mol⁻¹

Erime Noktası :153 °C

Yoğunluğu : 1.66 g.mL⁻¹

Kaynama Noktası : 310 °C

K_{a1} : 7.45 x 10⁻⁴

K_{a2} : 1.73 x 10⁻⁵

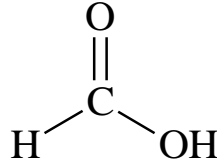
K_{a3} : 4.02 x 10⁻⁷

4.1.4. Formik Asit

Tek karbonlu karboksilik asittir. Formik asit, karbonil karbonuna bağı alkil grubu içermemesiyle en basit karboksilli asit özelliği taşır. Karınca asidi olarak da bilinir. Doğada ilk olarak karıncaların salgılarında rastlanmış ve buradan çekilerek elde edilmiştir. Özellikle arıcılığı gelişmiş ülkelerde organik bal üreticileri tarafından yaygın olarak kullanılmaktadır. Trake akarına karşı mücadele yöntemi olarak da kullanılmaktadır.

Formik asit; su, metanol, etanol, aseton, eter gibi çözücülerde çok iyi çözünür [47].

Formik asidin kimyasal formülü ve özellikleri:



Şekil 4.4. Formik asidin kimyasal yapısı

Formülü : CH₂O₂

Molekül ağırlığı :46.0254 g.mol⁻¹

Yoğunluğu : 1.22 g.mL⁻¹ (sıvı)

Erime noktası : 8.4 °C

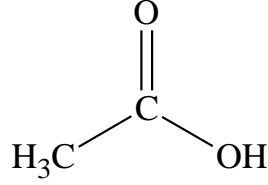
Kaynama Noktası : 100.8 °C

K_a Sabiti : 1.80 x 10⁻⁴

4.1.5. Asetik Asit

Asetik asit sirkeye ekşi tadını ve keskin kokusunu vermesiyle bilinir. Doğada karbonhidratların yükseltgenmesiyle oluşur. Sanayide asetik asit hem biyolojik yolla hem de kimyasal yolla imal edilir. Tuz ve esterine asetat denir. Suda tamamen çözünür. Asetik asidin bir diğer önemli kullanımı çözücü olarak kullanılmasıdır. PET plastiklerin üretiminin de kullanılan tereftalik asit üretiminde asetik asit çözücü olarak kullanılır, bu kullanım asetik asidin tüm kullanımının % 5-10'unu oluşturur [48,49].

Asetik asidin kimyasal formülü ve özellikleri:



Şekil 4.5. Asetik asidin kimyasal yapısı

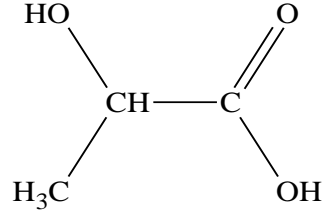
| | |
|-----------------------------|---|
| Formülü | :C ₂ H ₄ O ₂ |
| Molekül ağırlığı | : 60.05 g.mol ⁻¹ |
| Yoğunluğu | :1.0495 g.mL ⁻¹ |
| Erime noktası | :16.5 °C |
| Kaynama noktası | :118.1 °C |
| K_a Sabiti | :1.75 x 10 ⁻⁵ |

4.1.6. Laktik Asit

Kimyasal adı 2-hidroksi propiyonik asittir. Ekşimiş süttten elde edilen ve kaslarda bulunan laktik asidin iki şekli birçok özellik bakımından birbirlerine benzemekle beraber, polarize ışık düzlemini ayrı yönler çevirmeleriyle farklılık gösterirler. Her ikisinin de erime noktası 53 °C'dir. Laktik asit, genel elde edilmiş yöntemlerine uygun

olarak elde edilir α - klor propiyonik asidin, bazik ortamda hidrolizi laktik asidi verir [50].

Laktik asidin kimyasal formülü ve bazı özellikleri:



Şekil 4.6. Laktik asidin kimyasal yapısı

| | |
|-----------------------------|--|
| Formülü | : C ₃ H ₆ O ₃ |
| Molekül ağırlığı | : 90.08 g.mol ⁻¹ |
| Kaynama noktası | : 122 °C |
| Yoğunluğu | : 1.79 g.mL ⁻¹ (H ₂ O) |
| K_a Sabiti | : 1.38 x 10 ⁻⁴ |

5. MATERYAL VE METOT

5.1. Kullanılan Bazı Kimyasallar Ve Özellikleri

Tez çalışması sırasında mobil faz karışımlarının hazırlanmasında ve optimizasyonun parametrelerinin taranmasında kullanılan standart çözeltiler ve özellikleri Tablo 5.1’de verildi.

Tablo 5.1. Kullanılan Kimyasallar Ve Özellikleri

| KİMYASALIN ADI | KULLANIM AMACI | AÇIKLAMA |
|---------------------------------------|-------------------------------|--------------|
| Asetonitril (ACN) | Standart olarak | HPLC saflığı |
| Metil alkol (MeOH) | Standart olarak | HPLC saflığı |
| 0.001M H ₂ SO ₄ | Mobil faz standardizasyonunda | |
| 0.004M CaCl ₂ | Mobil faz standardizasyonunda | |
| 0.01M KH ₂ PO ₄ | Mobil faz standardizasyonunda | |
| Oksalik asit | Standart olarak | Merck |
| Tartarik asit | Standart olarak | Merck |
| Formik asit | Standart olarak | Merck |
| Laktik asit | Standart olarak | Merck |
| Asetik asit | Standart olarak | Merck |
| Sitrik asit | Standart olarak | Merck |

5.2. Kullanılan Cihazlar

5.2.1. Yüksel Performanslı Sıvı Kromatografisi

Karaçam ve bileşenlerin de HPLC yöntemiyle organik asit tayininde, Shimadzu marka HPLC cihazı kullanıldı. Sistemde pompa ünitesi (LC 20AT), örnekleyici (SIL

20 AHT), degazör (DGU 20A5R), kolon fırını (CTO 10AS) ve dedektör (SPD M20A) kısımları bulunmaktadır.

Bu çalışmada, inertsil ODS – 3,5 μm 4,6 x 250 mm kolonu kullanıldı. Bu kolonda farklı mobil faz karışımlarında alıkonma süreleri incelendi ve akış hızı ve kolon sıcaklığı taramaları sonucunda en uygun kolon sıcaklığı ve akış hızı belirlendi. Akış hızı taraması; 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 1,2, 1,4, 1,6 ve 1,8 mL.dk⁻¹ olarak incelendi ve 1,0 mL.dk⁻¹ akış hızının uygun olduğuna karar verildi. Kolon sıcaklığı taraması; 10, 20, 30, 40, 50, 60 ve 75°C’de incelendi ve uygun kolon sıcaklığı olarak 60°C olduğuna karar verildi.



Şekil 5.1. Shimadzu marka HPLC cihazı

5.2.2. Ultrasonik Banyo

Hazırlanan mobil fazlardaki çözünmeyen gazların giderilmesi için Şekil 5.2’de görülmekte olan ultrasonik banyo kullanıldı.



Şekil 5.2. Ultrasonik banyo

5.2.3. Terazi

Tartım işlemleri Şekil 5.3’de görülmekte olan Shimadzu AUX 320 marka terazi kullanılarak gerçekleştirildi.



Şekil 5.3. Shimadzu marka hassas terazi

5.2.4. UV-VIS Spektrofotometresi

Standartların dalga boyu taramasında Şekil 5.4’de görülmekte olan UV-VIS spektrometre kullanıldı.



Şekil 5.4. UV-VIS Spektrofotometre cihazı

5.2.5. Ultra Saf Su Cihazı

HPLC de çalışılan çözeltilerin tamamında Şekil 5.5’de görülmekte olan ultra saf su cihazından elde edildi. $18.2 \mu\Omega$ dirence sahip ultra saf su kullanıldı.



Şekil 5.5. Ultra saf su cihazı

5.2.6. Filtrasyon Düzenegi

Hazırlanan çözeltiler HPLC cihazında kullanılmadan önce Şekil 5.6’da görülmekte olan filtrasyon düzeneğinden filtre edildi.



Şekil 5.6. Filtrasyon Düzeneği

5.2.7. Öğütücü Cihazı

Kozalak kısmının numunelerinin boyutunun küçültülmesinde Şekil 5.7’de görülmekte olan öğütücü cihazı kullanıldı.

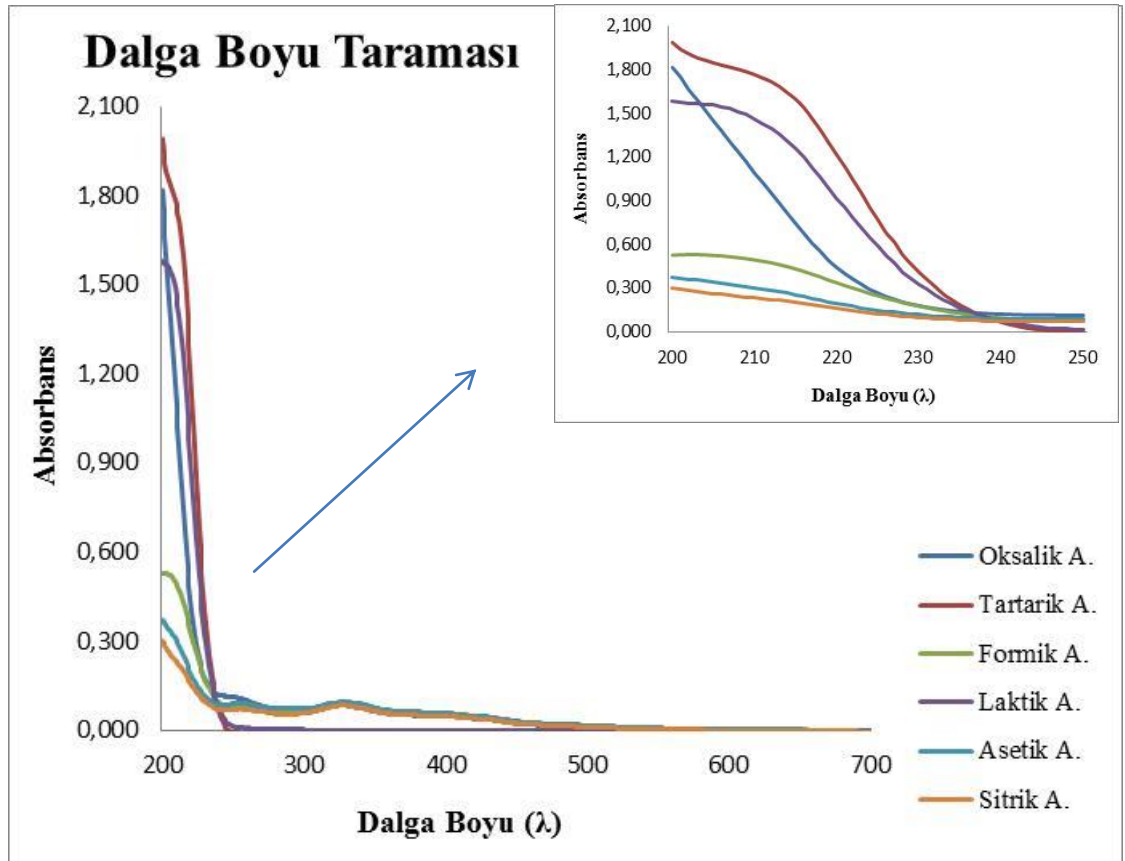


Şekil 5.7. Pulverisette 9 marka öğütücü cihazı

6. DENEYSEL

6.1. Organik Asitler İçin Optimum Koşulların Tayini

Standart olarak hazırlanan oksalik asit, tartarik asit, formik asit, laktik asit, asetik asit ve sitrik asit çözeltileri UV-VIS spektrofotometre kullanılarak 200-700 nm dalga boyları arasında dalga boyu taramaları yapıldı. Her bir asidin maksimum absorbans yaptığı birçok dalga boyu olsa da literatür dikkate alınarak altı asit için ortak olabilecek optimum dalga boyunun 210 nm olduğuna karar verildi [24,51]. Dalga boyu absorbans grafiği Şekil 6.1'de verilmektedir. Optimum dalga boyunun belirlenmesinin ardından altı asit için en uygun mobil faz, akış hızı, kolon sıcaklığı ve pH'ın etkisi incelenerek optimum şartlar belirlendi.



Şekil 6.1. Dalga boyu taraması

6.1.1. Organik Asitler İçin Optimum Mobil Faz Seçimi

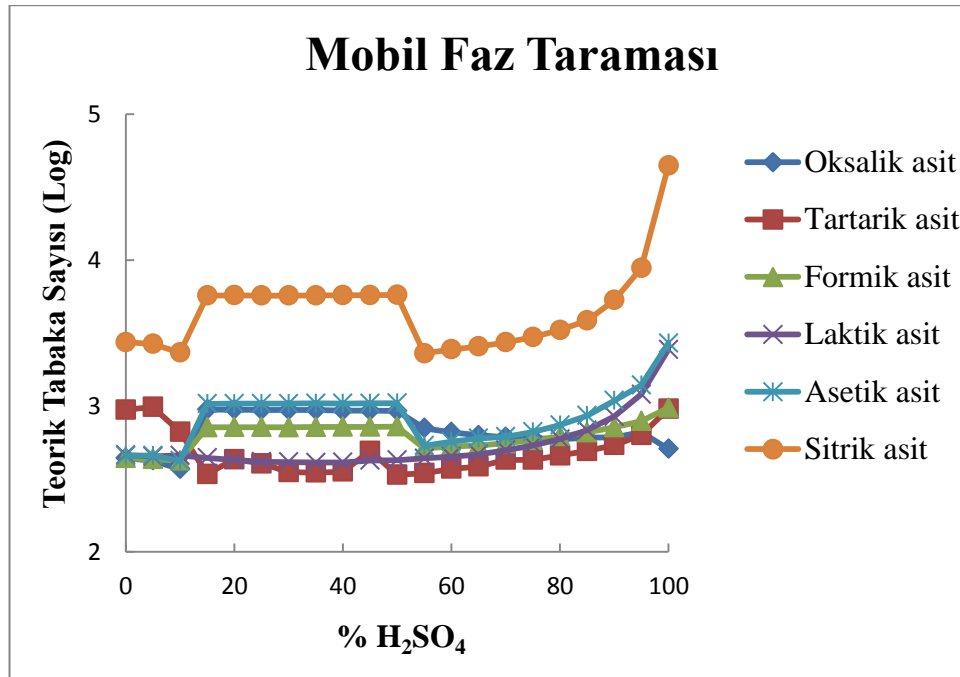
Literatür taraması sonucunda organik asitlerin tayininde kullanılan en yaygın mobil fazlar şunlardır; Kalsiyum klorür – Metil alkol (0,004 M CaCl_2 – MeOH), Potasyum dihidrojen fosfat - Asetonitril (0,01M KH_2PO_4 (H_3PO_4); ACN), Sülfirik asit - Asetonitril (0,001 M H_2SO_4 ; ACN) karışımlarıdır. Çalışılan altı asit için bu mobil fazlarda ayrı ayrı analizler yapılarak alıkonma zamanları ve teorik tabaka sayıları incelendi. Analizler sonunda altı asit için optimum mobil faz olarak farklı oranlarda H_2SO_4 ; ACN karışımı olarak belirlendi. Analiz sonucunda denemesi yapılan 3 farklı karışım için elde edilen veriler Tablo 6.1, 2, 3 ve Şekil 6.2, 3, 4’de verildi.

Tablo 6.1. H_2SO_4 – ACN mobil faz karışımı verileri

| H_2SO_4 | Oksalik asit | Tartarik asit | Formik asit | Laktik asit | Asetik asit | Sitrik asit |
|-------------------------|--------------|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| % | N* | | | | | |
| 100 | 507,51 | 958,52 | 971,94 | 2437,99 | 2695,69 | 44478,81 |
| 95 | 663,99 | 631,01 | 787,59 | 1201,59 | 1386,82 | 8809,7 |
| 90 | 608,71 | 540,09 | 714,39 | 847,97 | 1088,47 | 5317,33 |
| 85 | 607,52 | 491,77 | 659,46 | 681,84 | 858,25 | 3851,44 |
| 80 | 589,52 | 457,96 | 617,82 | 593,02 | 739,40 | 3315,46 |
| 75 | 602,80 | 428,32 | 583,32 | 537,50 | 663,99 | 2961,54 |
| 70 | 612,26 | 428,32 | 554,70 | 498,18 | 616,23 | 2731,12 |
| 65 | 629,81 | 384,79 | 536,38 | 465,87 | 600,84 | 2558,34 |
| 60 | 661,11 | 371,72 | 528,26 | 449,44 | 570,64 | 2442,34 |
| 55 | 705,86 | 345,96 | 511,84 | 437,65 | 534,90 | 2296,33 |
| 50 | 923,67 | 338,56 | 724,26 | 426,01 | 1047,17 | 5772,96 |
| 45 | 930,01 | 491,07 | 720,38 | 423,04 | 1043,55 | 5760,81 |
| 40 | 930,01 | 355,25 | 720,38 | 410,95 | 1039,93 | 5739,58 |
| 35 | 938,32 | 349,54 | 718,67 | 410,31 | 1042,52 | 5724,44 |

| | | | | | | |
|----|--------|--------|--------|--------|---------|---------|
| 30 | 938,32 | 352,54 | 715,24 | 412,58 | 1037,35 | 5712,34 |
| 25 | 939,30 | 403,85 | 715,67 | 414,85 | 1039,42 | 5715,36 |
| 20 | 945,19 | 430,98 | 715,67 | 428,32 | 1037,87 | 5733,52 |
| 15 | 944,70 | 341,81 | 714,39 | 441,00 | 1035,29 | 5709,31 |
| 10 | 369,56 | 664,81 | 422,38 | 458,30 | 421,07 | 2323,24 |
| 5 | 423,37 | 983,95 | 432,64 | 451,14 | 457,96 | 2660,50 |
| 0 | 438,65 | 943,23 | 438,99 | 461,05 | 455,22 | 2741,57 |

N*: Teorik Tabaka Sayısı



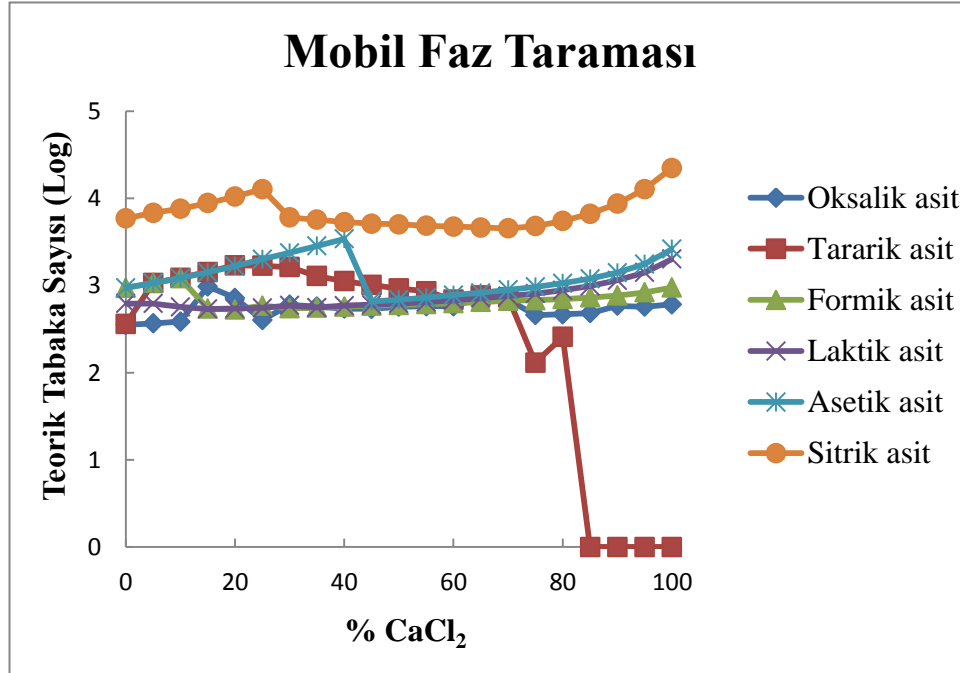
Şekil 6.2. H₂SO₄ – ACN mobil faz taraması

Tablo 6.2. CaCl₂ – MeOH mobil faz karışımı verileri

| CaCl ₂ | Oksalik asit | Tartarik asit | Formik asit | Laktik asit | Asetik asit | Sitrik asit |
|-------------------|--------------|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| % | N* | | | | | |
| 100 | 608,31 | 0,00 | 946,67 | 2014,93 | 2613,25 | 22302,44 |
| 95 | 571,78 | 0,00 | 834,52 | 1414,36 | 1767,36 | 12805,19 |
| 90 | 584,86 | 0,00 | 766,62 | 1146,77 | 1404,15 | 8704,89 |
| 85 | 481,19 | 0,00 | 729,43 | 986,46 | 1197,16 | 6668,36 |

| | | | | | | |
|----|--------|---------|---------|--------|---------|----------|
| 80 | 468,98 | 257,8 | 700,34 | 882,80 | 1064,32 | 5514,55 |
| 75 | 458,99 | 130,32 | 680,17 | 806,56 | 964,97 | 4819,14 |
| 70 | 692,74 | 732,03 | 666,46 | 759,55 | 893,29 | 4534,68 |
| 65 | 718,67 | 767,51 | 647,19 | 717,81 | 825,76 | 4637,61 |
| 60 | 578,31 | 686,86 | 627,80 | 677,25 | 776,85 | 4741,70 |
| 55 | 577,92 | 860,6 | 611,47 | 646,79 | 728,14 | 4844,16 |
| 50 | 572,17 | 926,11 | 598,09 | 621,01 | 688,54 | 5046,68 |
| 45 | 539,72 | 1015,82 | 585,25 | 603,98 | 658,23 | 5126,56 |
| 40 | 541,96 | 1123,05 | 572,93 | 587,19 | 3425,53 | 5349,46 |
| 35 | 572,55 | 1286,8 | 557,72 | 558,85 | 2849,85 | 5706,29 |
| 30 | 600,45 | 1631,51 | 547,56 | 590,68 | 2375,20 | 6059,07 |
| 25 | 401,28 | 1684,28 | 588,35 | 555,45 | 2006,32 | 12769 |
| 20 | 719,96 | 1706,68 | 529,74 | 546,06 | 1671,83 | 10481,66 |
| 15 | 976,44 | 1432,47 | 545,32 | 537,50 | 1415,56 | 8862,34 |
| 10 | 385,10 | 1227,24 | 1213,27 | 568,73 | 1217,73 | 7610,82 |
| 5 | 367,10 | 1065,89 | 1076,36 | 621,40 | 1067,98 | 6839,29 |
| 0 | 353,44 | 363,74 | 941,75 | 621,01 | 943,23 | 5898,24 |

N*: Teorik Tabaka Sayısı

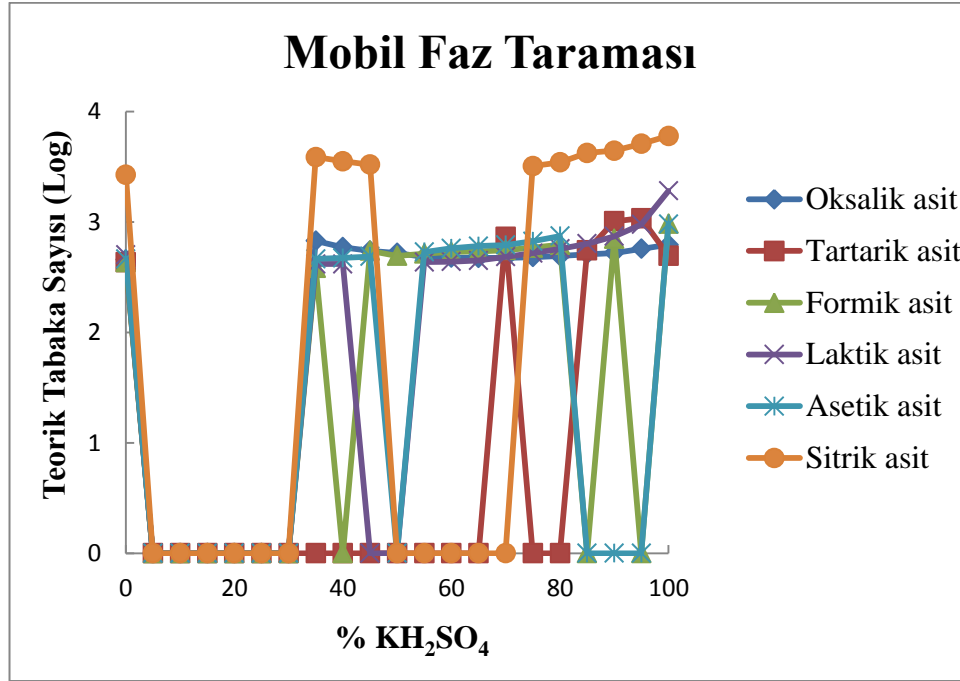


Şekil 6.3. CaCl₂ – MeOH mobil faz taraması

Tablo 6.3. KH₂PO₄ – ACN mobil faz karışımı

| KH ₂ PO ₄ | Oksalik asit | Tartarik asit | Formik asit | Laktik asit | Asetik asit | Sitrik asit |
|---------------------------------|--------------|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| % | N* | | | | | |
| 100 | 621,01 | 495,33 | 962,98 | 1911,44 | 959,51 | 6018,66 |
| 95 | 571,40 | 1081,09 | 0,00 | 951,11 | 0,00 | 5103,67 |
| 90 | 524,23 | 1016,84 | 706,28 | 741,15 | 0,00 | 4419,59 |
| 85 | 510,04 | 552,44 | 0,00 | 635,85 | 0,00 | 4227,60 |
| 80 | 491,42 | 0,00 | 621,40 | 571,40 | 745,94 | 3464,50 |
| 75 | 481,54 | 0,00 | 584,87 | 523,13 | 668,53 | 3208,09 |
| 70 | 472,11 | 732,03 | 557,34 | 484,70 | 619,41 | 0,00 |
| 65 | 473,15 | 0,00 | 540,47 | 448,42 | 605,16 | 0,00 |
| 60 | 475,59 | 0,00 | 536,39 | 437,31 | 577,15 | 0,00 |
| 55 | 483,62 | 0,00 | 516,56 | 433,97 | 534,90 | 0,00 |
| 50 | 523,49 | 0,00 | 493,55 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 45 | 549,06 | 0,00 | 550,18 | 0,00 | 487,88 | 3313,15 |
| 40 | 590,30 | 0,00 | 0,00 | 416,16 | 473,15 | 3545,01 |
| 35 | 675,17 | 0,00 | 382,91 | 415,83 | 463,45 | 3871,33 |
| 30 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 25 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 20 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 15 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 10 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 5 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 0 | 457,28 | 433,31 | 431,98 | 503,55 | 462,77 | 2683,24 |

N*: Teorik Tabaka Sayısı



Şekil 6.4. KH₂PO₄ – ACN mobil faz karışımı

Üç farklı mobil faz karışımlarından elde edilen veriler incelendiğinde de görüldüğü gibi H₂SO₄ – ACN karışımındaki sonuçların daha doğrusal olması ve farklı oranlarda pik elde etmede sorun yaşanmadığı için H₂SO₄ – ACN karışımı Tablo 6.4’de verilen oranlardaki karışımı mobil faz olarak seçildi.

Tablo 6.4. H₂SO₄ – ACN karışımı oranları

| dk | % H ₂ SO ₄ | % ACN |
|-------|----------------------------------|-------|
| 3.70 | 100 | 0 |
| 3.71 | 98 | 2 |
| 4.50 | 96 | 4 |
| 11.01 | 100 | 0 |

6.1.2. Organik Asitler İçin Optimum Akış Hızının Belirlenmesi

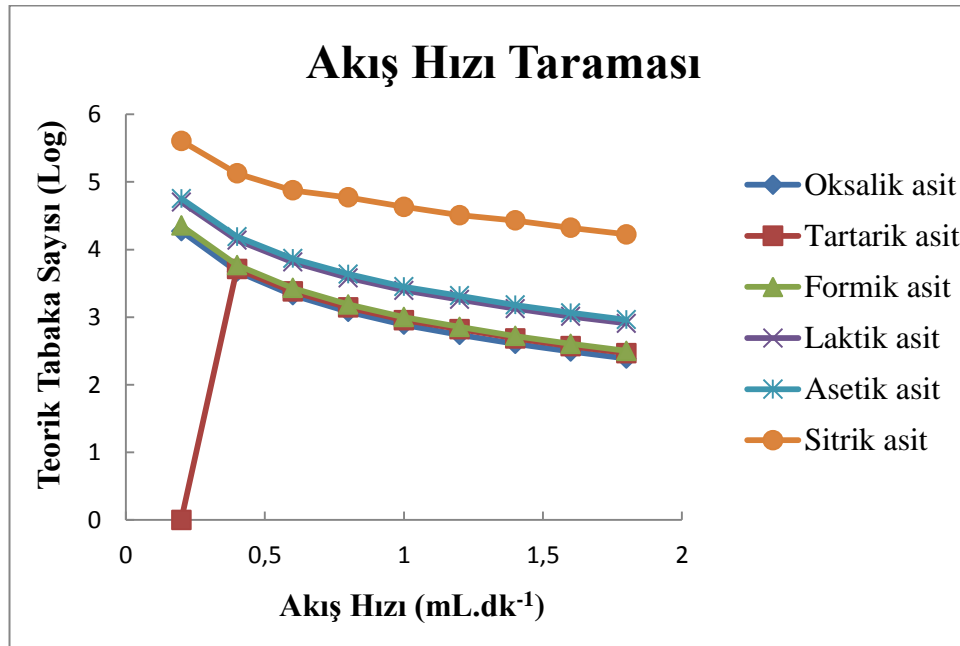
Organik asitler için optimum mobil fazın belirlenmesinin ardından optimum akış hızını belirlemek amacıyla 0,2 – 1,8 ml.dk⁻¹ aralığında akış hızı taraması yapıldı. Yapılan analizler sonucunda altı asit için analiz süresi, alıkonma süreleri ve teorik

tabaka sayıları incelenerek optimum akış hızının 1,0 ml.dk⁻¹ olduğuna karar verildi. Aşağıdaki grafikte akış hızının teorik tabaka sayısına etkisi görülmektedir.

Tablo 6.5. Akış hızı taraması verileri

| ml/min | Oksalik asit | Tartarik asit | Formik asit | Laktik asit | Asetik asit | Sitrik asit |
|--------|--------------|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | N* | | | | | |
| 0,2 | 18618,06 | 0,00 | 22548,03 | 50423,60 | 56720,19 | 404750,40 |
| 0,4 | 4715,84 | 5150,65 | 5887,19 | 13743,34 | 15493,28 | 133254,20 |
| 0,6 | 2114,53 | 2395,52 | 2696,52 | 6502,81 | 7358,90 | 74846,02 |
| 0,8 | 1194,95 | 1385,63 | 1542,29 | 3807,38 | 4332,80 | 58971,27 |
| 1 | 771,06 | 903,36 | 1000,58 | 2486,42 | 2814,94 | 42633,99 |
| 1,2 | 547,19 | 664,40 | 717,38 | 1823,63 | 2071,34 | 32263,34 |
| 1,4 | 402,24 | 483,30 | 524,59 | 1335,46 | 1516,01 | 26941,94 |
| 1,6 | 309,76 | 371,72 | 402,88 | 1024,00 | 1161,45 | 20978,63 |
| 1,8 | 243,61 | 293,37 | 316,84 | 810,20 | 917,36 | 16759,89 |

N*: Terik Tabaka Sayısı



Şekil 6.5. Akış hızı taraması

Tablo 6.6. Akış hızı taraması analiz sürelerinin verileri

| ml.dk ⁻¹ | dk |
|---------------------|----|
| 0,2 | 70 |
| 0,4 | 40 |
| 0,6 | 30 |
| 0,8 | 20 |
| 1,0 | 14 |
| 1,2 | 14 |
| 1,8 | 14 |

Tablo 6.6’da verilen veriler incelendiğinde analizde kullanılan mobil fazlardan ve zamandan tasarruf için optimum akış hızı olarak 1 ml.dk⁻¹ seçildi.

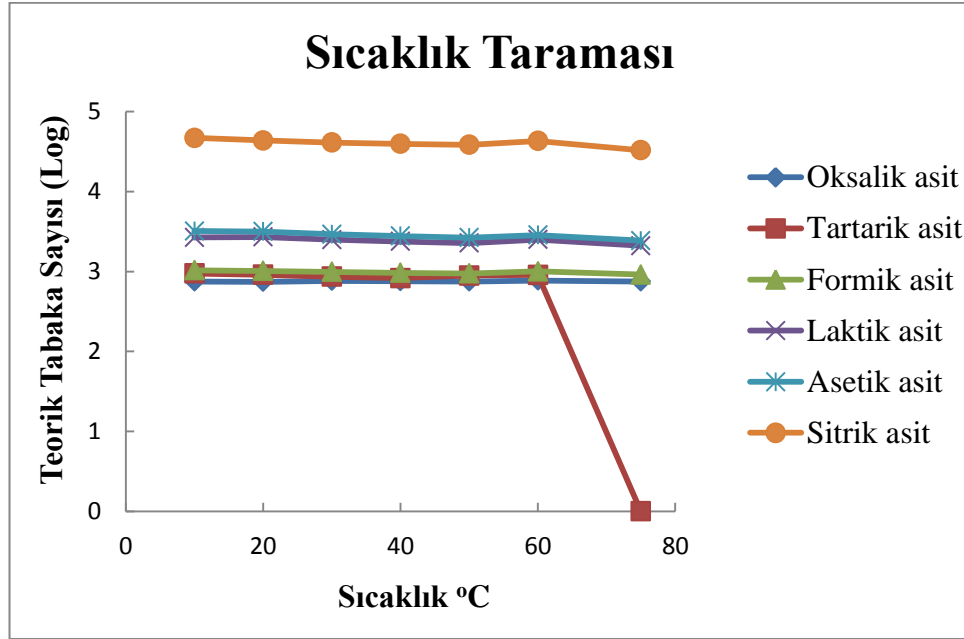
6.1.3. Organik Asitler İçin Optimum Kolon Sıcaklığının Belirlenmesi

Organik asitlerin tayini için optimum kolon sıcaklığının belirlenmesi amacıyla 10-75°C aralığında analizler yapıldı ve optimum sıcaklık olarak 60°C belirlendi. Aşağıdaki grafikte kolon sıcaklığının teorik tabaka sayısına etkisi gösterilmektedir.

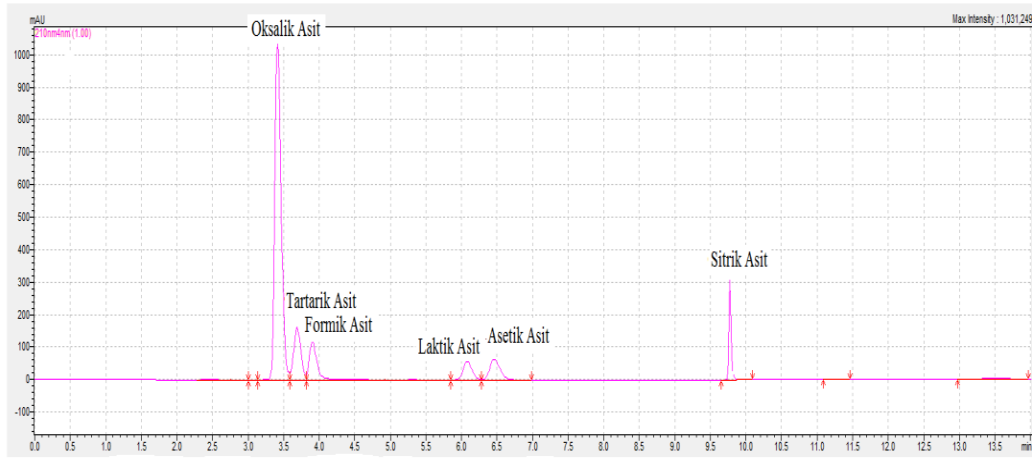
Tablo 6.7. Kolon sıcaklığı taramasının verileri

| T | Oksalik asit | Tartarik asit | Formik asit | Laktik asit | Asetik asit | Sitrik asit |
|----|--------------|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| °C | N* | | | | | |
| 10 | 750,32 | 943,23 | 1035,81 | 2659,26 | 3200,84 | 46820,30 |
| 20 | 742,02 | 908,18 | 1016,33 | 2705,66 | 3156,64 | 43455,57 |
| 30 | 763,53 | 862,01 | 986,96 | 2498,40 | 2921,19 | 41046,76 |
| 40 | 755,15 | 827,14 | 963,48 | 2375,98 | 2777,71 | 39434,02 |
| 50 | 751,20 | 889,47 | 943,23 | 2271,09 | 2647,72 | 38400,32 |
| 60 | 771,95 | 906,73 | 1002,61 | 2509,61 | 2848,14 | 43023,06 |
| 75 | 748,13 | 0,00 | 912,52 | 2094,71 | 2426,15 | 32927,73 |

N*: Teorik Tabaka Sayısı



Şekil 6.6. Kolon Sıcaklığı Taraması



Şekil 6.7. Optimum sıcaklıkta elde edilen kromatogram

Şekil 6.6,7 incelendiğinde pik alanlarının yüksek olması ve altı pikinde birbirinden daha iyi ayrıldığı sıcaklık olduğu için optimum sıcaklık olarak 60 °C seçildi.

6.1.4. Organik Asitler İçin Optimum H₂SO₄'in Konsantrasyonunun Belirlenmesi

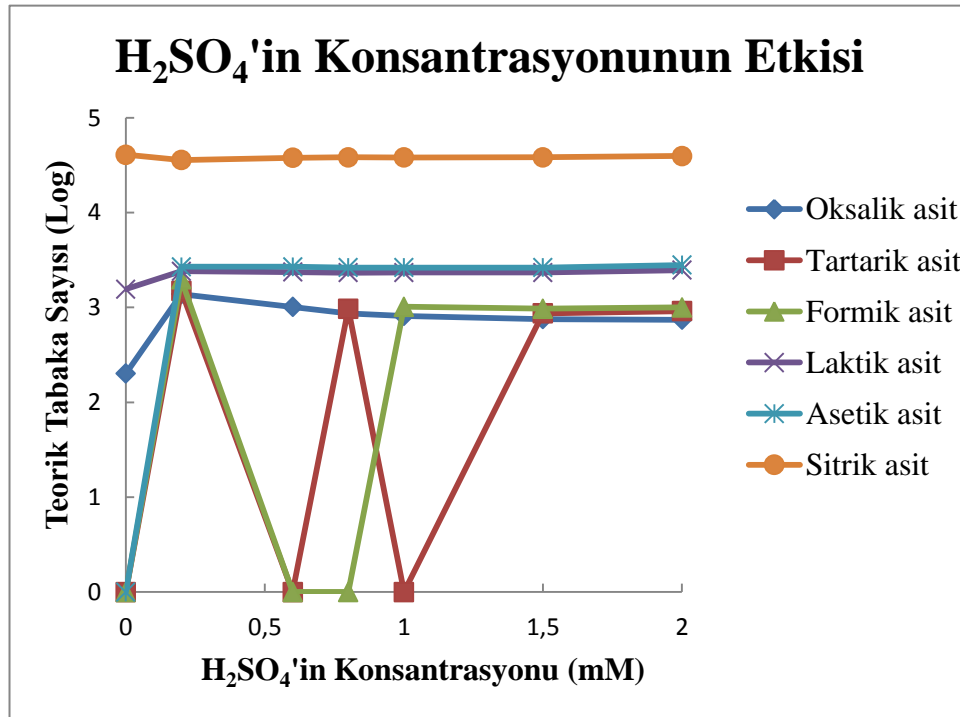
Organik asit analizlerinde mobil faz olarak kullanılan H₂SO₄'in konsantrasyonunun etkisi 0,2-2 mM aralığında incelendi. Optimum derişimin 1 mM ve pH'ın 2,5

olduğuna karar verildi. Yapılan analizler sonucunda derişimin teorik tabaka sayısına etkisi aşağıdaki grafikte gösterilmektedir.

Tablo 6.8. H₂SO₄'in konsantrasyon etkisinin verileri

| Konsantrasyon | Oksalik asit | Tartarik asit | Formik asit | Laktik asit | Asetik asit | Sitrik asit |
|---------------|--------------|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| mM | N* | | | | | |
| 0 | 201,41 | 0,00 | 0,00 | 1559,93 | 0,00 | 40787,84 |
| 0,2 | 1384,43 | 1499,24 | 1972,07 | 2404,92 | 2689,04 | 35834,49 |
| 0,6 | 1014,30 | 0,00 | 0,00 | 2363,52 | 2689,87 | 37869,16 |
| 0,8 | 863,89 | 969,45 | 0,00 | 2325,55 | 2634,56 | 38345,47 |
| 1 | 814,76 | 0,00 | 1016,33 | 2334,05 | 2637,85 | 38087,43 |
| 1,5 | 754,71 | 866,71 | 968,95 | 2338,69 | 2634,56 | 38275,01 |
| 2 | 742,89 | 916,39 | 1001,09 | 2475,26 | 2797,99 | 39561,21 |

N*: Teorik Tabaka Sayısı



Şekil 6.8. H₂SO₄'in Konsantrasyonunun Etkisi

Şekil 6.7 incelendiğinde 1-1,5 mM aralığındaki konsantrasyonun doğrusal olduğu anlaşılmaktadır. Pik alanları 1mM H₂SO₄'de daha yüksek olduğu için H₂SO₄'in konsantrasyonu olarak 1 mM seğıildi.

6.2. Örneklerin Analize Hazırlanması

Yozgat amlığı Mili Parkı (Şekil 6.9) karaçam ve bileşenlerinin örnekleri örnek alma kurallarına uygun olarak toplandı. Daha sonra karaçamın odun, iğne ve kozalak kısımları ayrı ayrı ekstraksiyona uygun hale getirildi.



Şekil 6.9. Yozgat amlığı Mili Parkı karaçam (*pinus nigra*) örnekleri

Odun kısmı uygun malzemeler kullanılarak Şekil 6.10’da görüldüğü gibi gerekli boyutlara küçültüldü.



Şekil 6.10. Karaçamın odunun kısmı numunesi

İğne kısmı Şekil 6.11’de görüldüğü gibi hazırlandı.



Şekil 6.11. Karaçamın iğne kısmının hazırlanması ve numunesi

Kozalak kısmı ise gerekli gereçler kullanılarak önce boyutu küçültüldü. Daha sonra öğütücü (Şekil 5.7) yardımıyla tanecik boyutu Şekil 6.12’de görüldüğü gibi küçültüldü.



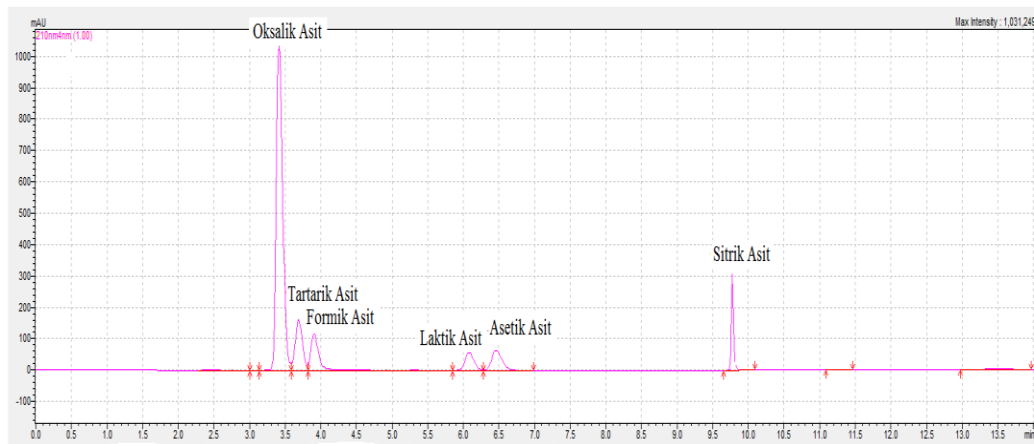
Şekil 6.12. Karaçamın kozalak kısmının hazırlanması ve numunesi

Örnekler analize uygun hale getirildikten sonra ayrı ayrı hepsinden 50g alınarak $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2]$ (5.0 mmol.L^{-1}), $[\text{K}_2\text{SO}_4]$ (1.75 mmol.L^{-1}), $[\text{MgSO}_4]$ (1.25 mmol.L^{-1}), $[\text{KCl}]$ (0.25 mmol.L^{-1}), $[\text{Fe(III)-EDTA}]$ (20 mmol.L^{-1}), $[\text{H}_3\text{BO}_3]$ (25 mmol.L^{-1}), $[\text{MnSO}_4]$ (1.5

mmol.L⁻¹), ZnSO₄ (1.5 mmol.L⁻¹), CuSO₄ (0.5 mmol.L⁻¹) ve (NH₄)₆Mo₇O₂₄ (0.025 mmol.L⁻¹) maddeleri karıştırılarak hazırlanan çözeltide 6 gün 4°C’de bekletildi], [EDTA (20 mmol.L⁻¹) çözeltisinde 2 gün 4°C’de bekletildi], [Ba(OH)₂ (0.30 N) ve ZnSO₄ (0.28 N) karıştırılarak hazırlanan çözeltide 1 gün 4°C’de bekletildi], [0.5 g.L⁻¹ (NH₄)₂HPO₄ ve ACN (0.4 mL) karıştırılarak hazırlanan çözeltide 1 gün 4°C’de bekletildi], [Saf su içerisinde de 1 gün 4°C’de bekletildi] 5 farklı yöntem denendi ve elde edilen sonuçlar ve geri kazanımın yeterli olmaması nedeniyle 0,01M NaOH çözeltisi ekstraksiyon çözeltisi olarak belirlendi. Örneklerden ayrı ayrı 50g alınarak 0,01M, 500 mL NaOH çözeltisinde 4°C’de 24 saat bekletildi. Analiz öncesi numuneler ultrasonik banyoda 10 dk bekletilip süzüldü ve pH’lar kontrol edildikten sonra 0,1M H₃PO₄ çözeltisi eklenerek pH’lar 5’e ayarlandıktan sonra 45µ’luk filtrasyondan geçirilerek yaklaşık 1mL numune HPLC’si de analiz edildi.

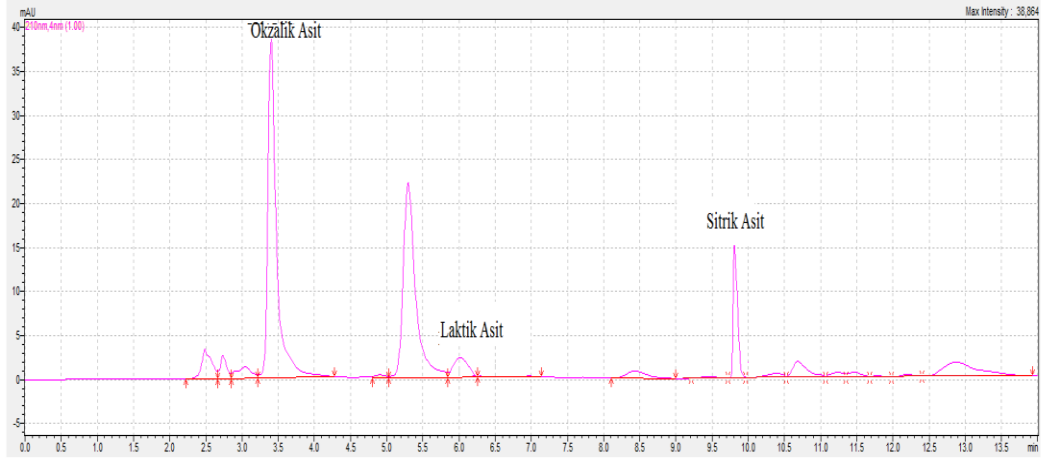
6.3. Optimum Şartlarda Elde Edilen Kromatogramlar

Optimum şartlar; dalga boyu 210 nm, mobil faz akış hızı 1mL.dk⁻¹, H₂SO₄’ün konsantrasyonu 1 mM ve kolon sıcaklığı 60°C’de elde edilen 500 ppm’lik standart asit karışımlarına ait kromatogram Şekil 6.13’de verilmektedir. Optimum şartlar altında ekstrakte edilmiş karaçamın odun, iğne ve kozalak kısımlarının kromatogramları da Şekil 6.13, 14 ve 15’de verilmektedir.



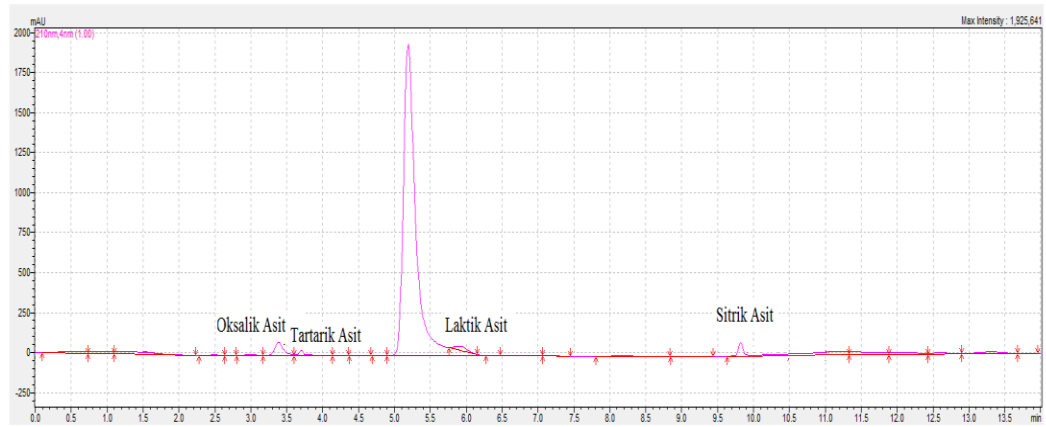
Şekil 6.13. 500 ppm’lik standart çözeltisine ait kromatogram

Şekil 6.13’de standart asit karışımlarının kromatogramında da görüldüğü gibi altı farklı asit eş zamanlı olarak birbirlerinden ayrılmışlardır.



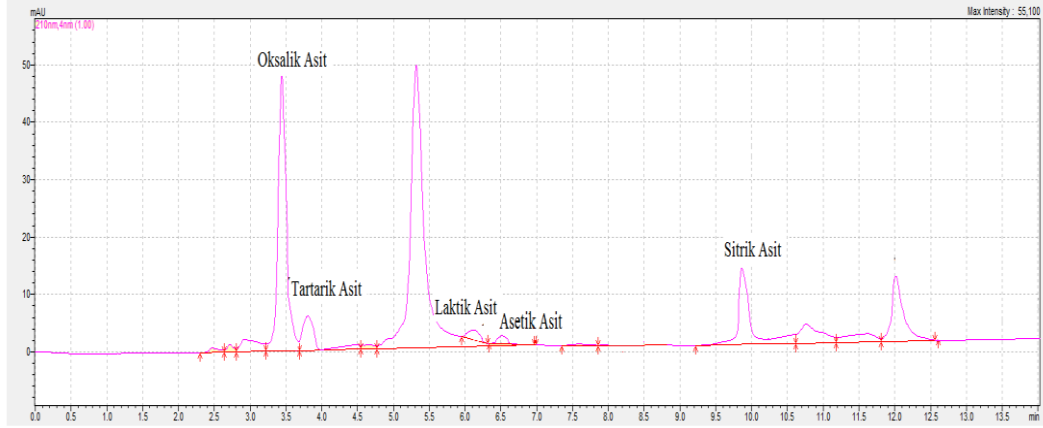
Şekil 6.14. 0,01M NaOH’de karaçam odununa ait kromatogram

Şekil 6.14’de kromatogramda görüldüğü gibi karaçamın odun kısmında 3.37, 5.96 ve 9.80 alıkonma sürelerine sahip üç asit optimum şartlarda birbirlerinden ayrılmışlardır.



Şekil 6.15. 0,01M NaOH’ de karaçam iğnesine ait kromatogram

Şekil 6.15’de kromatogramda görüldüğü gibi karaçamın iğne kısmında 3.37, 3.68, 5.89 ve 9.78 alıkonma sürelerine sahip dört asit optimum şartlarda birbirlerinden ayrılmışlardır.



Şekil 6.16. 0,01M NaOH’de karaçam kozalağına ait kromatogram

Şekil 6.16’da kromatogramda görüldüğü gibi karaçamın kozalak kısmında 3.39, 3.68, 5.94, 6.36 ve 9.79 alıkonma sürelerine sahip beş asit optimum şartlarda birbirlerinden ayrılmışlardır.

6.4. Kalibrasyon Grafiklerinin Çizilmesi

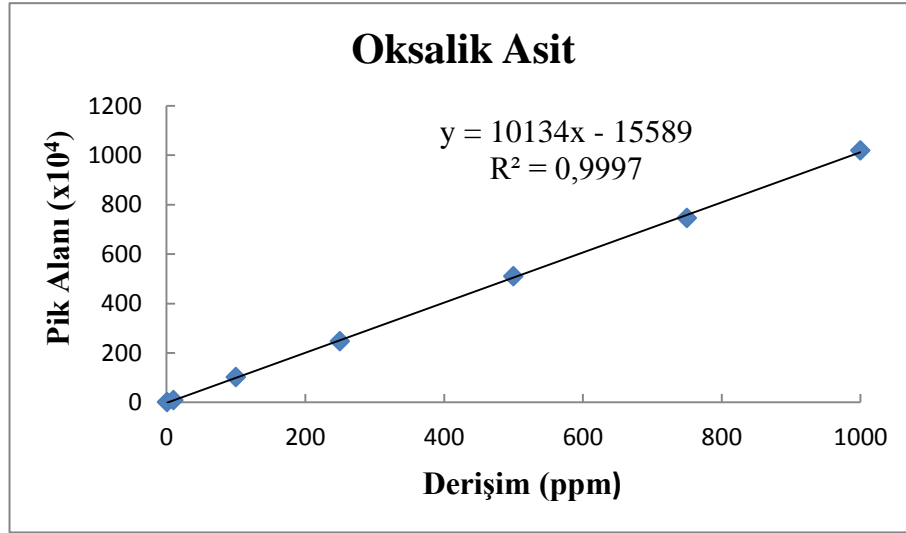
Kalibrasyon grafikleri optimum koşullarda (Dalga boyu 210 nm, akış hızı 1,0 mL.dk⁻¹, mobil faz 1 mM H₂SO₄; ACN, pH: 2.5 ve kolon sıcaklığı 60°C’dir.) altı asidin farklı derişimlerdeki karışımlarının analizlerinden elde edilen sonuçlara göre çizildi. Bu grafiklerden yararlanılarak örneklerdeki organik asitlerin miktarları belirlendi.

6.4.1. Oksalik Asidin Kalibrasyon Grafiğı

Kalibrasyon grafiğini çizmek için ilk olarak 10000 ppm’lik stok standart asitlerin karışım çözeltisi ve 100 ppm’lik bir ara stok standart asitlerin karışım çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltilerden gerekli seyreltmeler yapılarak alınan analiz sonuçlarından Tablo 6.8’de görülen veriler elde edildi. Bu veriler kullanılarak da Şekil 6.17’de görülen grafik elde edildi.

Tablo 6.9. Oksalik asidin kalibrasyon verileri

| Oksalik asit | | | | |
|--------------|-------------|-------------|-------------|----------|
| ppm | Pik alanı 1 | Pik alanı 2 | Pik alanı 3 | Ortalama |
| 1 | 0,0 | 10581,2 | 10250,6 | 10415,9 |
| 10 | 91812,2 | 93410,5 | 92710,2 | 92644,3 |
| 100 | 1020102,9 | 1019010 | 1014611 | 1017908 |
| 250 | 2462805,9 | 2478501 | 2461731 | 2467680 |
| 500 | 5119490,8 | 5099215 | 5099211 | 5105973 |
| 750 | 7452660 | 7467500 | 7472506 | 7464222 |
| 1000 | 10197804 | 10190106 | 10190001 | 10192637 |



Şekil 6.17. Oksalik asidin kalibrasyon grafiği

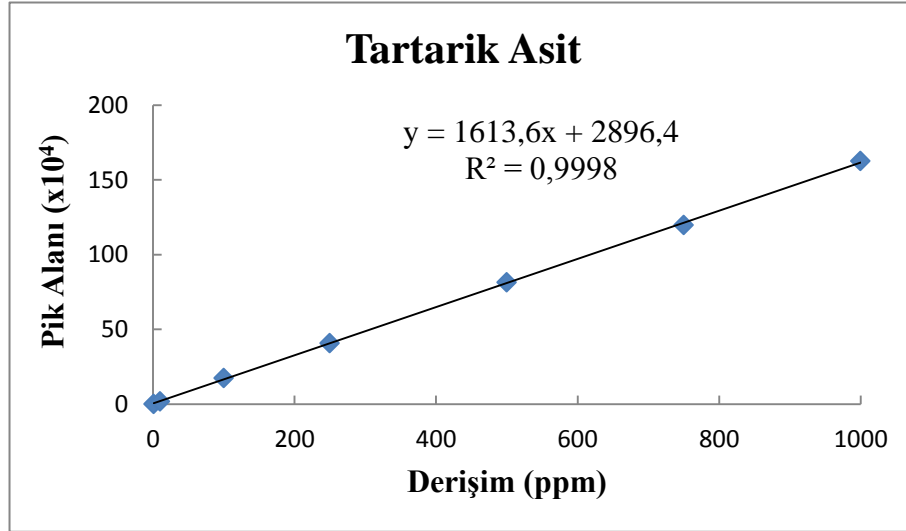
Kalibrasyon grafiğinde pik alanları kullanılmış alıkonma sürelerinde arasında belirgin bir fark gözlenmedi.

6.4.2. Tartarik Asidin Kalibrasyonu

Kalibrasyon grafiğini çizmek için ilk olarak 10000 ppm'lik stok standart asitlerin karışım çözeltisi ve 100 ppm'lik bir ara stok standart asitlerin karışım çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltilerden gerekli seyreltmeler yapılarak alınan analiz sonuçlarından Tablo 6.9'de görülen veriler elde edildi. Bu veriler kullanılarak da Şekil 6.18'de görülen grafik elde edildi.

Tablo 6.10. Tartarik asidin kalibrasyon verileri

| Tartarik asit | | | | |
|---------------|-------------|-------------|-------------|----------|
| ppm | Pik alanı 1 | Pik alanı 2 | Pik alanı 3 | Ortalama |
| 1 | 1017,5 | 1055,8 | 1030,6 | 1034,633 |
| 10 | 16454,6 | 16404,9 | 16444 | 16434,5 |
| 100 | 173076,2 | 173081,5 | 173147,3 | 173101,7 |
| 250 | 408014,9 | 404276,8 | 408381,3 | 406891 |
| 500 | 819564,2 | 817541 | 802106,2 | 813070,5 |
| 750 | 1191860 | 1197316 | 1201198 | 1196792 |
| 1000 | 1627724 | 1624842 | 1625332 | 1625966 |



Şekil 6.18. Tartarik asidin kalibrasyon grafiği

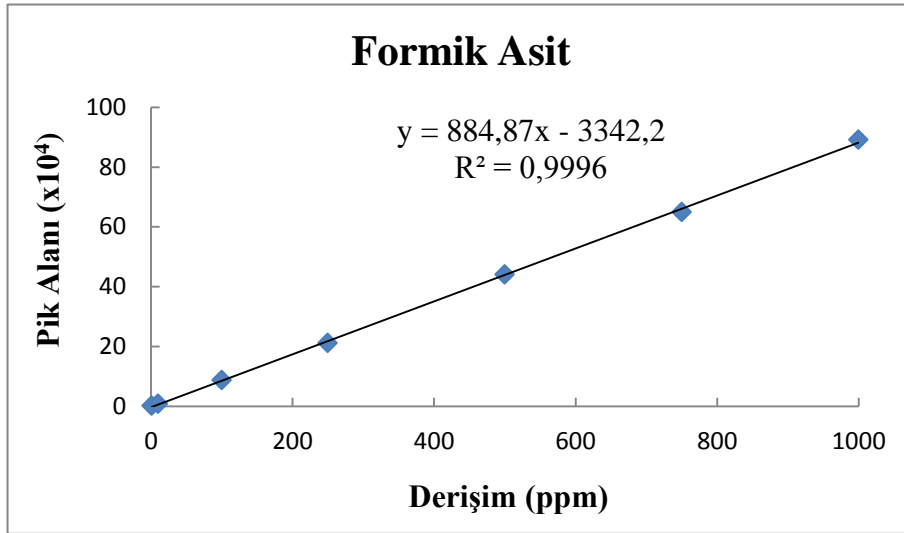
Kalibrasyon grafiğinde pik alanları kullanılmış alıkonma sürelerinde arasında belirgin bir fark gözlenmedi.

6.4.3. Formik Asidin Kalibrasyon Grafiği

Kalibrasyon grafiğini çizmek için ilk olarak 10000 ppm'lik stok standart asitlerin karışım çözeltisi ve 100 ppm'lik bir ara stok standart asitlerin karışım çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltilerden gerekli seyreltmeler yapılarak alınan analiz sonuçlarından Tablo 6.10'da görülen veriler elde edildi. Bu veriler kullanılarak da Şekil 6.19'de görülen grafik elde edildi.

Tablo 6.11. Formik asidin kalibrasyon verileri

| Formik asit | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|----------|
| ppm | Pik alanı 1 | Pik alanı 2 | Pik alanı 3 | Ortalama |
| 1 | 1344,5 | 1322 | 1417,3 | 1361,267 |
| 10 | 7392,1 | 7609 | 7303,2 | 7434,767 |
| 100 | 86698,7 | 86999,6 | 87671,1 | 87123,13 |
| 250 | 210225 | 211801,3 | 211438,3 | 211154,9 |
| 500 | 438648,8 | 440970,6 | 440418,3 | 440012,6 |
| 750 | 655399,5 | 647752,5 | 642656,6 | 648602,9 |
| 1000 | 888592,2 | 893028,8 | 892278,6 | 891299,9 |



Şekil 6.19. Formik asidin kalibrasyon grafiği

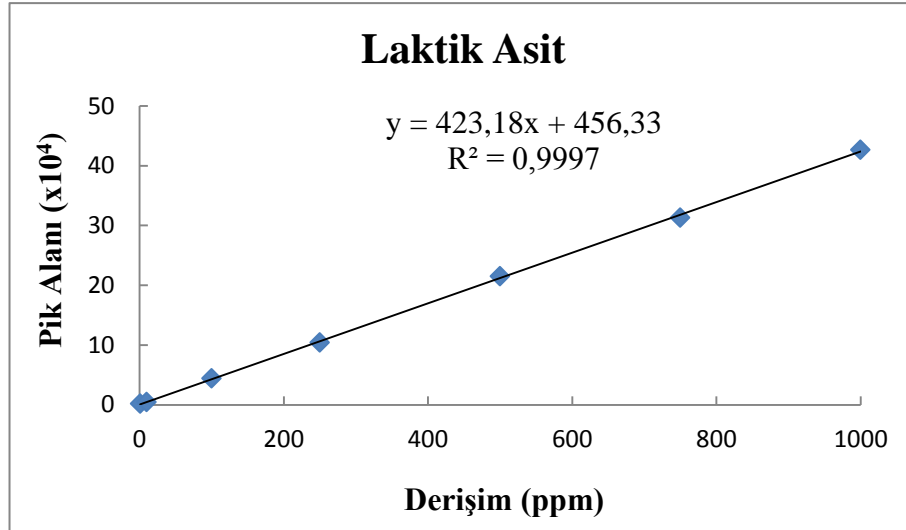
Kalibrasyon grafiğinde pik alanları kullanılmış alıkonma sürelerinde arasında belirgin bir fark gözlenmedi.

6.4.4. Laktik Asidin Kalibrasyon Grafiği

Kalibrasyon grafiğini çizmek için ilk olarak 10000 ppm'lik stok standart asitlerin karışım çözeltisi ve 100 ppm'lik bir ara stok standart asitlerin karışım çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltilerden gerekli seyreltmeler yapılarak alınan analiz sonuçlarından Tablo 6.11'de görülen veriler elde edildi. Bu veriler kullanılarak da Şekil 6.20'de görülen grafik elde edildi.

Tablo 6.12. Laktik asidin kalibrasyon verileri

| Laktik asit | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|----------|
| ppm | Pik alanı 1 | Pik alanı 2 | Pik alanı 3 | Ortalama |
| 1 | 1369,8 | 1415,1 | 1456,6 | 1413,833 |
| 10 | 4488,7 | 4416 | 4446,5 | 4450,4 |
| 100 | 43948,1 | 44121,4 | 44263,9 | 44111,13 |
| 250 | 104165,8 | 104009,7 | 103932,2 | 104035,9 |
| 500 | 214875 | 214667,2 | 214927,5 | 214823,2 |
| 750 | 312781,8 | 312663,6 | 313335,7 | 312927 |
| 1000 | 426566,7 | 426209,8 | 426289,4 | 426355,3 |



Şekil 6.20. Laktik asit kalibrasyon grafiği

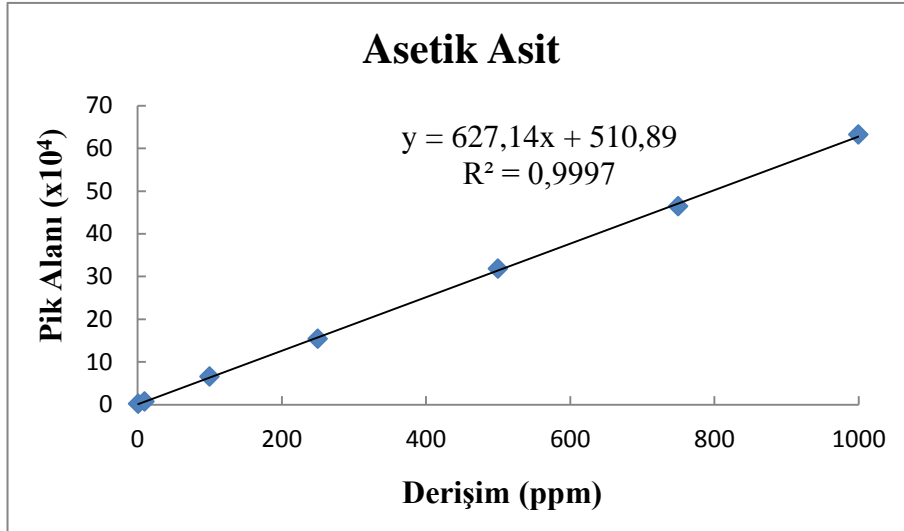
Kalibrasyon grafiğinde pik alanları kullanılmış alıkonma sürelerinde arasında belirgin bir fark gözlenmedi.

6.4.5. Asetik Asidin Kalibrasyon Grafiği

Kalibrasyon grafiğini çizmek için ilk olarak 10000 ppm'lik stok standart asitlerin karışım çözeltisi ve 100 ppm'lik bir ara stok standart asitlerin karışım çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltilerden gerekli seyreltmeler yapılarak alınan analiz sonuçlarından Tablo 6.12'de görülen veriler elde edildi. Bu veriler kullanılarak da Şekil 6.21'de görülen grafik elde edildi.

Tablo 6.13. Asetik asidin kalibrasyon verileri

| Asetik asit | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|----------|
| ppm | Pik alanı 1 | Pik alanı 2 | Pik alanı 3 | Ortalama |
| 1 | 1631 | 1702,9 | 1586,3 | 1640,067 |
| 10 | 6871,2 | 6907,8 | 6805,4 | 6861,467 |
| 100 | 65024,1 | 65227,4 | 65097,8 | 65116,43 |
| 250 | 153958,9 | 154083,8 | 154179,7 | 154074,1 |
| 500 | 317917,9 | 317784,8 | 317971,1 | 317891,3 |
| 750 | 464238,4 | 464241,4 | 462906,1 | 463795,3 |
| 1000 | 631220,5 | 631932,5 | 631865,4 | 631672,8 |



Şekil 6.21. Asetik asidin kalibrasyon grafiği

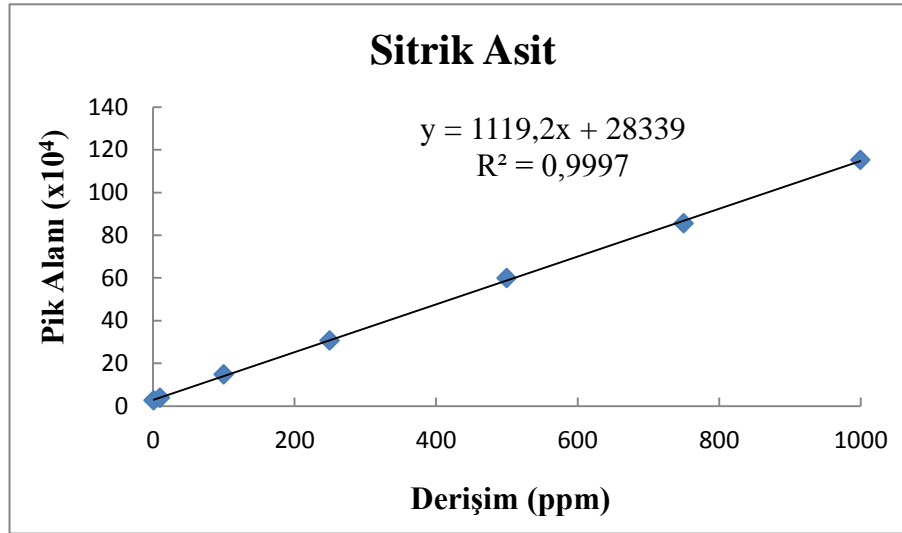
Kalibrasyon grafiğinde pik alanları kullanılmış alıkonma sürelerinde arasında belirgin bir fark gözlenmedi.

6.4.6. Sitrik Asidin Kalibrasyonu

Kalibrasyon grafiğini çizmek için ilk olarak 10000 ppm'lik stok standart asitlerin karışım çözeltisi ve 100 ppm'lik bir ara stok standart asitlerin karışım çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltilerden gerekli seyreltmeler yapılarak alınan analiz sonuçlarından Tablo 6.13'de görülen veriler elde edildi. Bu veriler kullanılarak da Şekil 6.22'de görülen grafik elde edildi.

Tablo 6.14. Sitrik asidin kalibrasyon verileri

| Sitrik asit | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|----------|
| ppm | Pik alanı 1 | Pik alanı 2 | Pik alanı 3 | Ortalama |
| 1 | 24927,1 | 25833,7 | 26335 | 25698,6 |
| 10 | 36458,5 | 36707,9 | 38030,2 | 37065,53 |
| 100 | 147298,2 | 147208,5 | 145424,7 | 146643,8 |
| 250 | 307343,9 | 305580,2 | 306207 | 306377 |
| 500 | 599942,3 | 597484,5 | 595829,2 | 597752 |
| 750 | 856552,5 | 855203,1 | 854175,9 | 855310,5 |
| 1000 | 1151309 | 1151737 | 1152518 | 1151855 |



Şekil 6.22. Sitrik asidin kalibrasyon grafiği

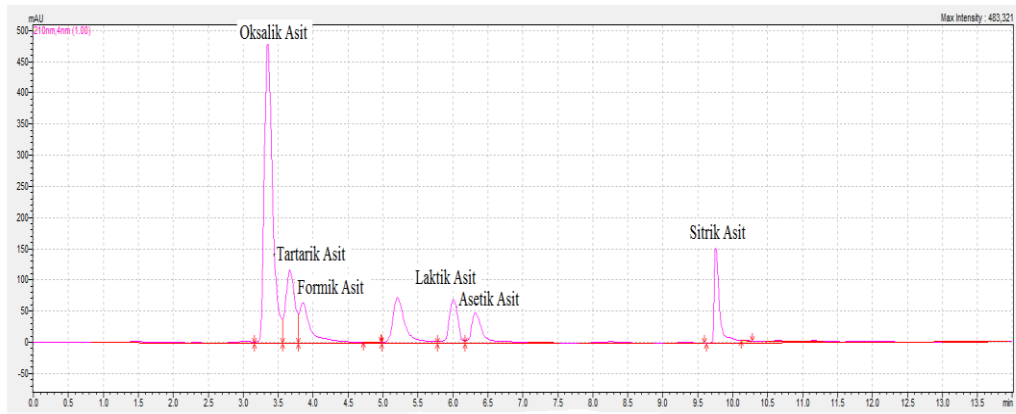
Kalibrasyon grafiğinde pik alanları kullanılmış alıkonma sürelerinde arasında belirgin bir fark gözlenmedi.

Tablo 6.15. Asit türlerine ait analitik veriler

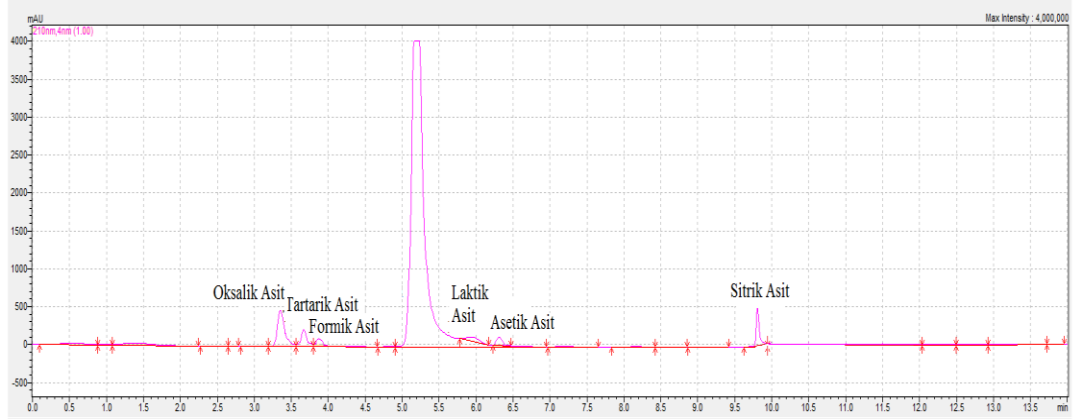
| | $y = mx + n$ | R^2 | LOD | LOQ |
|---------------|------------------------|--------|------|------|
| Oksalik Asit | $y = 10134x - 15589$ | 0.9997 | 0.07 | 0.23 |
| Tartarik Asit | $y = 1613.6x - 2896.4$ | 0.9998 | 0.04 | 0.12 |
| Formik Asit | $y = 884.87x - 3342.2$ | 0.9996 | 0.05 | 0.16 |
| Laktik Asit | $y = 423.18x - 456.33$ | 0.9997 | 0.34 | 1.02 |
| Asetik Asit | $y = 627.14x - 510.89$ | 0.9997 | 0.31 | 0.94 |
| Sitrik Asit | $y = 1119.2x - 28339$ | 0.9997 | 2.10 | 6.36 |

6.5. Karaçamın Odun, İğne ve Kozalak Kısımlarının Ekstraksiyonlarına Standart Çözelti Eklenmesi

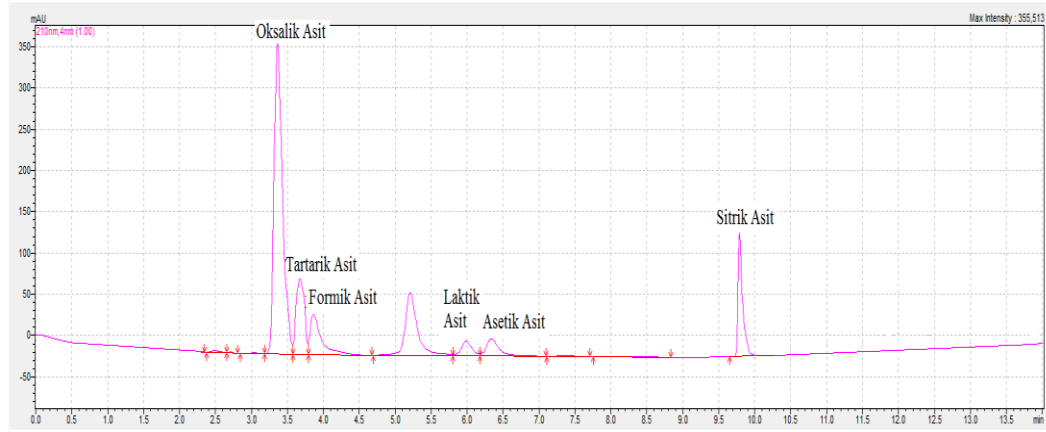
0,01M NaOH çözeltisi içerisindeki odun, iğne ve kozalak ekstraksiyonlarına standart asit çözeltisi (Her bir asidin konsantrasyonu 500 mg.L⁻¹'dir.) eklenerek elde edilen kromatogramlar Şekil 6.23, 24 ve 25'de görülmektedir.



Şekil 6.23. Karaçamın odun kısmının ekstraksiyonu ve standart çözeltiye ait kromatogram



Şekil 6.24. Karaçamın iğne kısmının ekstraksiyonu ve standart çözeltiye ait kromatogram



Şekil 6.25. Karaçamın kozalak kısmının ekstraksiyonu ve standart çözeltiye ait kromatogram

Kromatogramlardan da anlaşılacağı gibi karaçam odun, iğne ve kozalak kısımlarında altı asit eş zamanlı olarak ayrılmasında farklar gözlemlendi. Analizler sonucunda odun, iğne ve kozalak kısımlarının geri kazanım değerleri Tablo 6.15’de verilmektedir.

Tablo 6.16. Odun, iğne ve kozalak kısımlarının geri kazanım sonuçları

| | | % R (50 ppm) | % R (500 ppm) |
|----------------------|----------------------|---------------------|----------------------|
| Odun Kısmı | Oksalik Asit | 99,36 | 90,79 |
| | Tartarik Asit | 117,36 | 119,55 |
| | Formik Asit | 86,72 | 119,64 |
| | Laktik Asit | 85,62 | 109,29 |
| | Asetik Asit | 93,57 | 110,42 |
| | Sitrik Asit | 112,36 | 111,77 |
| İğne Kısmı | Oksalik Asit | 87,75 | 91,56 |
| | Tartarik Asit | 111,50 | 102,97 |
| | Formik Asit | 83,57 | 87,46 |
| | Laktik Asit | 99,75 | 112,19 |
| | Asetik Asit | 80,86 | 90,29 |
| | Sitrik Asit | 111,94 | 107,69 |
| Kozalak Kısmı | Oksalik Asit | 92,00 | 96,09 |
| | Tartarik Asit | 111,14 | 100,89 |
| | Formik Asit | 109,12 | 107,10 |
| | Laktik Asit | 82,29 | 98,02 |
| | Asetik Asit | 84,45 | 90,08 |
| | Sitrik Asit | 106,42 | 117,98 |

7. SONUÇ

Bu çalışmada bazı organik asitler için HPLC-DAD cihazı ile çalışılarak bir tayin metodu geliştirildi. Yapılan denemeler sonucunda farklı oranlarda H₂SO₄ – ACN karışımının mobil faz olarak kullanılması kararlaştırıldı. Kromatogramlar için optimum şartlar Tablo 7.1’de gösterilmektedir.

Tablo 7.1. Geliştirilen yöntem için optimum parametreler

| Parametreler | |
|-----------------|--|
| Mobil faz | H ₂ SO ₄ (1mM) – ACN |
| Dalga boyu | 210 nm |
| Akış hızı | 1 mL.dk ⁻¹ |
| Kolon Sıcaklığı | 60°C |
| pH | 2.5 |

Belirlenen optimum şartlarda oksalik, tartarik, formik, laktik, asetik ve sitrik asit 20 dakikadan az bir sürede bir birinden ayrılmaktadır.

Mobil faz seçimi için üç farklı (CaCl₂; MeOH, KH₂PO₄; ACN ve H₂SO₄; ACN) mobil faz karışımı denendi ve H₂SO₄; ACN karışımı mobil faz olarak seçildi.

Mobil faz akış hızı; 0,2 – 1,8 mL.dk⁻¹ aralığı 0,2 mL arttırılarak çalışıldı ve 1 mL.dk⁻¹ mobil faz akış hızı olarak belirlendi.

Kolon sıcaklığının belirlenmesi için 10 – 75°C’de çalışıldı ve 60°C kolon sıcaklığı olarak belirlendi.

H₂SO₄’in konsantrasyonu 0 – 2 mM aralığında çalışılarak uygun konsantrasyon 1mM olarak belirlendi.

Kalibrasyon grafikleri; organik asit karışımlarında 7 farklı konsantrasyonda çalışılarak belirlendi. Her bir standart asit çözeltisi üç kez tekrar edildi. Her bir asidin kalibrasyon grafiği konsantrasyona karşı pik alanı olarak grafiğe geçirildi. Standart asitler için çizilen kalibrasyon grafikleri şekil 6.17, 18, 19, 20, 21 ve 22'de verilmektedir.

Karaçam ve bileşenlerinde yapılan analizler sonucunda karaçamın odun kısmında oksalik, laktik ve sitrik asit miktarı sırasıyla; 289.26, 40.10 ve 162.14 mg.kg⁻¹ olarak belirlendi. Diğer üç asit (tartarik, formik ve asetik asit) tayin limitinin altında olduğu için belirlenemedi.

Karaçamın iğne kısmında oksalik, tartarik, laktik ve sitrik asit miktarları sırasıyla; 667.04, 75.12, 54.82 ve 223.63 mg.kg⁻¹ olarak belirlendi. Diğer iki asit (formik ve asetik asit) tayin limitinin altında olduğu için belirlenemedi.

Karaçamın kozalak kısmında ise oksalik, tartarik, laktik, asetik ve sitrik asit miktarları sırasıyla; 568.18, 60.13, 90.14, 68.43 ve 105.38 mg.kg⁻¹ olarak belirlendi. Formik asit ise tayin limitinin altında olduğu için belirlenemedi.

Sonuçlar incelendiğinde oksalik, laktik ve sitrik asidin odun kısmın da, oksalik, tartarik, laktik ve sitrik asidin iğne kısmında ve oksalik, tartarik, laktik, asetik ve sitrik asidin de kozalak kısmında tayin edildiği anlaşılmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Çalışkan T., Hızlı Gelişen Türlerle İlgili Rapor, Workshop, Hızlı Gelişen Türlerle Yapılan ağaçlandırma Çalışmalarının değerlendirilmesi ve Yapılacak Çalışmalar, Orman bakanlığı Yayın Dairesi Başkanlığı Yayını, No:83, s:109-130, Ankara, 8-9 Aralık 1998.
2. Lelik K.S., Kızılçam (*Pinus brutia*, Ten.) ve Anadolu Karaçamı [*Pinus nigra* Arnold. Subsp. *pallasiana* (Lamb) Holmboe] MDA Biyolojik Bağımsızlığa Ulaşma Yaşlarının Denizli Orman Bölge Müdürlüğündeki Doğal Karışık Meşcerelerinde Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Isparta, 2013.
3. Chinnici, F., Spinabelli, U., Riponi, C., Amati, A.; Optimization of the determination of organic acids and sugars in fruit juices by ion-exclusion liquid chromatography, Journal of Food Composition and Analysis, 18, 121–130, 2005.
4. Yaltrık F., Dendroloji Ders Kitabı I Gymnospermae., İ.Ü. Orman Fakültesi Yayınlar, İ.Ü. Yayın No:3443, Orman Fakültesi Yayın No:386, I.Baskı, 320s, İstanbul, 1993.
5. Akkaya O., Anadolu Karaçamı [*Pinus nigra* Arnold. Subsp. *pallasiana* (Lamb) Holmboe] Kayı Ağaçlandırma ve Denemesinde Genetik Çeşitlilik, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, 2012.
6. Anşin R., Tohumlu Bitkiler Gymnospermae (Açık Tohumlular), I.Cilt, II. Baskı, Karadeniz Teknik Üniversitesi Yayın No: 122, Fakülte Yayın No: 15, 146-149s, Trabzon, 1994.
7. Alptekin C.Ü., Anadolu Karaçamının (*Pinus nigra* ssp. *pallasiana* Lamb Holmboe) Coğrafik Varyasyonları, İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Silvikültür Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 170s, İstanbul, 1986.
8. Doğdu Y.C., Camiyanı Karaçamı'nın Bazı Teknolojik Özellikleri ve Kurutma Cetvellerinin Oluşturulması, Yüksek Mühendislik Tezi, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, Zonguldak, 2006.
9. Karadağ M., Batı Karadeniz Bölgesinde Karaçam (*Pinus nigra* Arnold ssp. *pallasiana* Lamb. Holmboe) Doğal Gençleştirme Koşulları Üzerine Araştırmalar, TC Orman Bakanlığı Batı Akdeniz Ormancılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yayını, Teknik Bülten, No:4, Bolu, 1999.
10. Bal C., Karaçam İçin Gövde çapı ve Gövde hacmi Denklemlerinin Geliştirilmesinde Tepe tacı Değişkenlerinin Kullanılması, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, 2012.
11. Çolak D., Sarıçam (*Pinus sylvestris* L.), Anadolu Karaçamı [*Pinus nigra* Arn. Subsp. *pallasiana* (Lamb) Holmboe] ve Toros Sedirinde (*Cedrus libani* A.

- Rich.) don Stresi Üzerine Bir Araştırma, Yüksek Lisans Tezi, KTÜ, Trabzon, 2012.
12. Genç M., Silvikültürün Temel Prensipleri, Süleyman Demirel Üniversitesi Orman Fakültesi Yayın No: 44, Süleyman Demirel Üniversitesi Yayın No: 44, SDÜ Basımevi, 357s, Isparta, 2004.
 13. Ertekin M., Yenice Bakraz Orijinli Karaçam [*Pinus nigra* Arnold. Subsp. *pallasiana* (Lamb) Holmboe] Tohum Bahçesinde Çiçeklenme, Kozalak Verimi ve Tohum Özellikleri Açısından Klonal Farklılıklar, Doktora Tezi, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, Bartın, 2006.
 14. Saatçioğlu F., Silvikültürün Biyolojik Esasları ve Prensipleri (Silvikültür I), İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Yayın No: 2187-222s, İstanbul, 1976.
 15. Genç M., Silvikültürün Temel Esasları (2. Baskı), Süleyman Demirel Üniversitesi Yayın No: 44, Isparta, 2011.
 16. Usta, M., Yerli Çam Türlerimizin Kabuk ve Odun Bileşimlerinin Karşılaştırılması "ORENKO 93" II. Ulusal Orman Ürünleri Enstitüsü Kongresi Bildiri Metinleri, 6 – 9 Ekim 93, Trabzon.
 17. Sarıusta S.E., Sarıçam, Karaçam ve Kızılcık reaksiyon Odunun Anatomik Yapısı ve Kimyasal Bileşimi Üzerine Araştırmalar, Yüksek Lisans Tezi, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, Bartın, 2007.
 18. Skoog D., Holler J., Nieman T., Enstrümantel Analiz İlkeleri, Bilim Yayıncılık, s; 498-531, 702-716, Ankara, 1998.
 19. Johnson E.L., Stevenson R., Basic Liquid Chromatography; Varian Associates Palo Alto, CA, s; 1-6, 2008.
 20. Salkım D., Fluoksetin ve Metaboliti Norculu oksetinin GC-MS Yöntemiyle Biyolojik Materyallerden Tayini, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 2008.
 21. Gündüz T., Enstrümantel Analiz, 7. Baskı, s; 1115-1119, 1177-1190, Gazi Kitabevi, Ankara, 2004.
 22. Karaköse A., Piyasada Bulunan Bebek Gıdalarında Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Yöntemi (YPSK) ile Patulin Tayini, Hitit Üniversitesi, Çorum, 2012.
 23. Porgalı, E., Bazı Fenolik Bileşiklerin HPLC Tekniğiyle Yöresel Kırmızı Şaraplarda Tayin Edilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Malatya, 2011.
 24. Kaya, A., Beyaz, Sarı Ve Kırmızı Soğanda Çeşitli Organik Asitlerin Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) İle Tayini, Yüksek Lisans Tezi, Yozgat, 2010.

25. Hamilton R.J., Sewell PA. Introduction to High Performance Liquid Chromatography, 2. Baskı, New York: Chapman and Hall Ltd, 1982.
26. Bidlingmeyer BA., Practical HPLC Methodology and Applications, 1. Baskı, New York: Wiley-Interscience Publication, 1992.
27. Torul. H., Farmasötik Formlarda İlaç Etken Maddelerinin HPLC İle Enantiyomer Tayinleri, Yüksek Lisans Tezi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Gazi Üniversitesi, Ankara, 2009.
28. Riley C.M., Rosanske T.W., Development and Validation of Analytical Methods, Elsevier Science Ltd., New York.
29. Swartz M.E., Krull, Analytical Method Development and Validation, Marcel Dekker, 1.S., New York, 1997.
30. The United States Pharmacopoeia, 24 th Ed, 2000 (CD-ROM).
31. Adamovics J. A., Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals, Marcel Dekker, New York, 1997.
32. Mavi E.E., Bazı Antidepresanların Vücut Sıvılarında Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Yöntemi İle Tayini İçin Metot Optimizasyonu, Süleyman Demirel Üniversitesi, Doktora Tezi, Isparta, 2013.
33. Kutucu T., Telmisartan ve Hidroklorodiazit'in YPSK Yöntemleri ile Aynı Anda Analizi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, s: 125, Ankara, 2008.
34. Ceremoğlu B., Acar J., Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi, Gıda Teknolojisi Derneği, Yayın No: 6, s: 29-30, Ankara, 1986.
35. Pütün, A. E., Güven, A., Kanışkan, N., Berber, H., Türk, H., Kimya, Anadolu Üniversitesi Yayınları No: 1080, Açık Öğretim Fakültesi Yayınları No:598, s: 254, Eskişehir 1999.
36. Anonim, Ana Britannica Ansiklopedisi, Encyclopaedia Britannica, Inc., 1992.
37. Tüzün C., Organik Kimya, Set Ofset Matbaacılık Ltd.Şti., s: 485, Ankara, 1993.
38. Özkaya H., Analitik Gıda Kontrolü, Yayın No: 1086, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, s: 43 – 46, Ankara, 1988.
39. Anonim, Meydan Larousse Ansiklopedisi, Meydan Yayınevi, Çağaloğlu, İstanbul, 1981.
40. Handbook of Enology Volume 1 The Microbiology of Wine and Vinifications 2nd Edition P. Ribereau-Gayon, D. Dubourdieu, B. Doneche and A. Lonvaud, Chichester, England: John Wiley Ltd. 2006.

41. Buhurcu H., Bazı Şaraplık Üzüm Çeşitlerinde Farklı Gelişme Dönemlerinde Tanelerdeki Organik Asit Dağılımı, Yüksek Lisans Tezi, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, 2004.
42. Liebrand J.T., Acidulants. InY. H. Hui (Ed.), Encyclopedia of Food Science And Technology, Vol. 1 (pp 1-6), New York: Wiley, 1992.
43. Lindsay R.C., Food additives. In: O.R.Fennema (Ed.), Food Chemistry (pp 767-825), New York: Marcel Dekker.
44. Schobinger U., Meyve ve Sebze Üretim Teknolojisi, Çeviren: Jale Acar, Hacettepe Üniversitesi Basımevi, s: 63-64, Ankara, 1988.
45. Bernthsen A., Organic Chemistry, Blackie & Son Limited, s: 298, U.S.A., 1945.
46. Anonim, Türkçe Sözlük, Türk Dil Kurumu, Yayın No: 403, 6. Baskı, Ankara, 1982.
47. http://tr.wikipedia.org/wiki/Formik_asit, 2014
48. Özeriş S., Temel Organik Kimya, Mühendislik Fakültesi Yayınları, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, 1993.
49. http://tr.wikipedia.org/wiki/Asetik_asit, 2014
50. http://tr.wikipedia.org/wiki/Laktik_asit, 2014
51. Lian, H. Z., Mao, L., Ye, X. L., Miao, J., Simultaneous determination of oxalic, fumaric, maleic and succinic acids in tartaric and malic acids for pharmaceutical use by ion – suppression reversed – phase high performance liquid chromatography, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 19, 621 – 625, 1999.

ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Sarıkaya’da doğan Kiraz GÜNGÖR, orta ve lise öğrenimini sırasıyla Kadılı Köyü Cumhuriyet İlköğretim okulu, Sarıkaya Lisesinde tamamlamıştır. 2008 yılında kazandığı Bozok Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünü 2012 yılında başarıyla mezun olmuştur.

2012 yılında yüksek lisans eğitimine Bozok Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında başlamıştır. Yrd.Doç.Dr. Orhan HAZER danışmanlığında hazırladığı “Karaçam [*Pinus nigra* Arnold. subsp. *pallasiana* (Lamb) Holmboe] Ve Karaçam Bileşenlerinde Bazı Organik Asitlerin HPLC/DAD İle Eşzamanlı Tayini” başlıklı teziyle 2014 yılında mezun olmuştur.

İletişim Bilgileri

Adres: Kadılı Köyü Sarıkaya/Yozgat

Telefon: (0544) 617 82 76

E-posta: gungor_kiraz@hotmail.com