

**BAZI FENOLİK ASİT BİLEŞİKLERİNİN  
KAPİLER ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE TAYİNİ**

Ayşe Ceren AKKAN

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Ocak-2008

## JÜRİ ve ENSTİTÜ ONAYI

Ayşe Ceren AKKAN'ın "Bazı Fenolik Asit Bileşiklerinin Kapiler Elektroforez Yöntemi İle Tayini" başlıklı Kimya Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans Tezi 27/12/2007 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

|                     | Adı Soyadı                  | İmza  |
|---------------------|-----------------------------|-------|
| Üye (Tez Danışmanı) | : Doç. Dr. ÜLKÜ DİLEK UYSAL | ..... |
| Üye                 | : Prof. Dr. DİLEK AK        | ..... |
| Üye                 | : Doç. Dr. ARZU ERSÖZ       | ..... |

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun  
.....tarih ve .....sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

## ÖZET

**Yüksek Lisans Tezi**

### **BAZI FENOLİK ASİT BİLEŞİKLERİNİN KAPİLER ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE TAYİNİ**

**Ayşe Ceren AKKAN**

**Anadolu Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı**

**Danışman: Doç. Dr. Ülkü Dilek UYSAL  
2008, 39 sayfa**

Bu çalışmada, fenolik asitlerin tayini için Kapiler elektroforez (CE) metodu geliştirilmiştir.

Bu metod, toplam uzunluğu 75 cm, etkin uzunluğu 25 cm ve iç çapı 75 µm olan çıplak silika kapiler kolon kullanılarak 20 mM %10 metanol'lü pH 9.1 tampon çözeltisi kullanılarak geliştirilmiştir. Analizler 18 kV ve 200 nm'de yapılmıştır. Bu şartlarda, iç standart (IS) olarak propil paraben ve t-Sinamik asit, Klorojenik asit, Gentisik asit, Şirinjik asit, o-Kumarik asit, p-Kumarik asit, Vanilik asit, p-Hidroksibenzoik asit, Kafeik asit, Protokateşik asit sırasıyla 7.601, 9.107, 9.640, 9.854, 10.145, 10.446, 10.949, 11.254, 12.288, 13.608, 15.706 dakikalarda gözlenmiştir.

Geliştirilen bu metod, yeşil çay ve bitki ekstraktlarındaki fenolik asitlerin tayini için uygulanmıştır. Sonuçlar metodun fenolik asit bileşikleri için basit ve uygulanabilir bir metod olduğunu göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Fenolik Asitler, Kapiler Elektroforez, Antioksidan, Elektroosmoz, Yeşil Çay

**ABSTRACT****Master of Science Thesis****DETERMINATION OF SOME PHENOLIC ACIDS COMPOUNDS BY  
CAPILLARY ELECTROPHORESIS METHOD****Ayşe Ceren AKKAN****Anadolu University  
Graduate School of Sciences  
Chemistry Program****Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ülkü Dilek UYSAL  
2008, 39 pages**

The method has developed using a running buffer consisting of 20 mM of 10% methanol with pH 9.1, employing a fused silica column with a total length of 75 cm an effective length of 25 cm, and internal diameter of 75  $\mu$ m. 18 kV were applied and produced signals that were detected at 200 nm. Under these conditions, propylparaben was an internal standard and t-Cinnamic acid, Chlorogenic acid, Gentisic acid, Syringic acid, *p*-Coumaric acid, *o*-Coumaric acid, vanillic acid, *p*-Hydroxybenzoic acid, Caffeic acid, Protocatechuic Acid appeared at 7.601, 9.107, 9.640, 9.854, 10.145, 10.446, 10.949, 11.254, 12.288, 13.608, 15.706 minutes, respectively. The proposed method has applied to phenolic acid compounds in green tea and plant extracts. The results have shown that the method is a simple and applicable method for phenolic acids.

**Keywords:** Phenolic Acids, Capillary Electrophoresis, Antioxidant Electroosmosis, Green Tea.

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında bilgi, tecrübe ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, bana her zaman büyük bir anlayışla yaklaşan, fikirleriyle beni yönlendiren danışman hocam Sayın Doç. Dr. Ülkü Dilek UYSAL'a, tecrübeleriyle her zaman desteğini hissettiğim Prof. Dr. Muzaffer TUNÇEL'e, yardımları için Yard. Doç. Dr Nilgün ÖZTÜRK'e,

Çalışmalarım için bitkisel materyal sağlayan Osmangazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Dr. İsmühan POTOĞLU-ERKARA'ya,

Sevgilerini ve desteklerini her an hissedebildiğim, bana her zaman destek olan annem Gülümser AKKAN, babam Mustafa AKKAN ve ağabeyim Burak AKKAN'a

Her zaman yanımda olan, bana hep yardım eden, destek olan Araş.Gör. Elif Mine ÖNCÜ'ye

En kötü anlarımda hep yanımda bulunan canım arkadaşım gerçek dostum Müzeyyen CILAZ YILMAZ'a

Teşekkürlerimi sunarım.

Ayşe Ceren AKKAN

2008 Ocak

## İÇİNDEKİLER

|  | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| <b>ÖZET</b> .....  | <b>i</b>     |
| <b>ABSTRACT</b> .....                                      | <b>ii</b>    |
| <b>TEŞEKKÜR</b> .....                                      | <b>iii</b>   |
| <b>İÇİNDEKİLER</b> .....                                   | <b>iv</b>    |
| <b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....                               | <b>vi</b>    |
| <b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....                             | <b>vii</b>   |
| <b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....                | <b>viii</b>  |
| <br>   |              |
| <b>1. GİRİŞ ve AMAÇ</b> .....                              | <b>1</b>     |
| <b>2. KONUYLA İLGİLİ ÖNCEDEN YAPILMIŞ ÇALIŞMALAR</b> ..... | <b>2</b>     |
| <b>3. BİTKİSEL FENOLİK ASİTLER</b> .....                   | <b>4</b>     |
| 3.1 Fenolik Asitlerin Fiziksel ve Kimyasal Özellikler..... | 5            |
| 3.1.1. tr-Sinamik Asit.....                                | 5            |
| 3.1.2. Klorojenik Asit.....                                | 5            |
| 3.1.3. Gentisik Asit.....                                  | 6            |
| 3.1.4. Sirinjik Asit.....                                  | 6            |
| 3.1.5. Vanilik Asit.....                                   | 6            |
| 3.1.6. p-Kumarik Asit ve o-Kumarik Asit.....               | 6            |
| 3.1.7. p-Hidroksibenzoik Asit.....                         | 7            |
| 3.1.8. Protokateşik Asit.....                              | 7            |
| 3.1.9. Kafeik Asit.....                                    | 7            |
| <br>   |              |
| <b>4. ELEKTROFOREZ</b> .....                               | <b>8</b>     |
| 4.1. Elektroforetik Ayırma Temelleri.....                  | 9            |
| 4.2. Kapiler Elektroforez.....                             | 9            |
| 4.3. Elektroforetik Göç ve Göç Hızları.....                | 11           |
| 4.4. Elektroosmoz Göçü.....                                | 13           |
| 4.5. Kapiler Elektroforez Tipleri.....                     | 15           |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>5. DENEYSEL BÖLÜM.....</b>   | <b>18</b> |
| 5.1. Kimyasallar ve Bitkisel Ürünler.....   | 18        |
| 5.2. Kullanılan Cihazlar.....   | 18        |
| 5.3. Ayırma Tamponlarının Hazırlanması.....   | 19        |
| 5.4. Standart Çözeltilerinin Hazırlanması.....  | 19        |
| 5.5. Yıkama Programı.....   | 21        |
| 5.6. Fenolik Asit Tayini için Optimum Koşullarının<br>belirlenmesi.....   | 21        |
| 5.7. Kapiler Elektforezin Kesinliği.....  | 22        |
| 5.8. Fenolik Asit Bileşiklerinin Tayini için Kalibrasyon Eğrilerinin<br>Çizilmesi.....  | 22        |
| 5.9. Geliştirilen Kapiler Elektforez Metodunun Fenolik Asit<br>Tayini için Numunelere Uygulanması.....                                    | 23        |
| <b>6. SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....</b>   | <b>25</b> |
| 6.1. Kapiler Elektforezin Optimizasyonu ile İlgili Çalışmalar.....  | 25        |
| 6.2. Kapiler Elektforezin Kesinliği.....  | 28        |
| 6.3. Fenolik Asit Bileşiklerinin Analizi için Kalibrasyon<br>Eğrilerinin Çizilmesi ve Fenolik Asit Bileşikleri<br>için Tayin Aralığı..... | 29        |
| 6.4. Kapiler Elektforez ile Fenolik Asit Bileşikleri İçeren<br>Numunelerde Miktar Tayini.....   | 29        |
| <b>KAYNAKLAR.....</b>   | <b>37</b> |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|   | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| 4.1. Kapiler elektroforez sistemi için genel bir gösterim.....  | 10           |
| 4.2. Kapiler kolonun kabaca gösterimi.....  | 11           |
| 4.3. Kapilerdeki elektroosmotik ayrılma.....  | 14           |
| 4.4. Kapilerde iyonların akış şeması.....   | 14           |
| 6.1. Tampon derişimi ile pik normalizasyonları arasındaki ilişki.....   | 26           |
| 6.2. Fenolik asit karışımına ait elektroferogram IS: propil paraben.<br>1: tSinA, 2: K1A, 3:GenA, 4: ŞirA 5: oKumA, 6: pKumA,<br>7: VanA,8: pHidA, 9:KafA, 10: PrtA (18kV,200nm, 20mM<br>boraks tamponu (pH 9.06))..... | 28           |
| 6.3. Yeşil çay numunesine ait elektroferogram. IS: propil paraben,<br>1: tSinA, 2: oKumA, 3: pHidA (18 kV, 200 nm, 20 mM boraks<br>tamponu (pH 9.1)).....   | 30           |
| 6.4. MeOH'lü bitki ekstraktına (123C) ait elektroferogram.<br>IS: propil paraben, 1 tSinA, 2: K1A, 3: pKumA, 4: KafA<br>(18 kV, 200 nm,20 mM boraks tamponu (pH9.1)).....   | 30           |
| 6.5. MeOH'lü bitki ekstraktına (125C ) ait elektroferogram.<br>IS: propil paraben,1: tSinA,2: oKumA. (18 kV, 200 nm,<br>20 mM boraks tamponu (pH 9.1)).....   | 31           |
| 6.6. Yeşil çay numunesinde IS yerinin belirlenmesi (18 kV,<br>200 nm,20 mM boraks tamponu (pH 9.1)).....  | 32           |
| 6.7. Yeşil çay numunesinde oKumA ve pHidA'in yerinin<br>Belirlenmesi (18 kV, 200 nm,20 mM boraks tamponu<br>(pH 9.1)).....  | 32           |
| 6.8. 123C'de IS yerinin belirlenmesi (18 kV, 200 nm, 20 mM<br>Boraks tamponu (pH9.1)).....  | 33           |
| 6.9. 123C'de K1A'nın yerinin belirlenmesi (18 kV, 200 nm,<br>20 mM boraks tamponu (pH 9.1)).....  | 33           |
| 6.10. 123C'de tSinA ve pKumA'nın yerinin belirlenmesi (18 kV,<br>200 nm,20 mM boraks tamponu (pH 9.1)).....   | 34           |



|   |    |
|---|----|
| 6.11. 123C’de KafA’nın yerinin belirlenmesi (18 kV, 200 nm,<br>20 mM boraks tamponu (pH 9.1)).....  | 34 |
| 6.12. 125C’de IS yerinin belirlenmesi (18 kV, 200 nm,<br>20 mM boraks tamponu (pH 9.1)).....        | 35 |
| 6.13. 125C’de oKumA’nın yerinin belirlenmesi (18 kV, 200 nm,<br>20 mM boraks tamponu (pH 9.1))..... | 35 |
| 6.14. 125C’de tSinA’nın yerinin belirlenmesi (18 kV, 200 nm,<br>20 mM boraks tamponu (pH 9.1))..... | 36 |

**ÇİZELGELER DİZİNİ**

|  | <b><u>Sayfa</u></b> |
|--|---------------------|
| 3.1. Fenolik asitlerin yapıları .....  | 4                   |
| 5.1. Fenolik asit standart çözeltilerinin hazırlanışı.....   | 20                  |
| 5.2. Analiz çözeltilerinin hazırlanışı.....  | 20                  |
| 5.3. Tekrar edilebilirlik deneylerinde kullanılan karışımdaki<br>fenolik asitlerin derişim değerleri.....  | 22                  |
| 5.4. Kalibrasyon çözeltisindeki fenolik asit bileşiklerinin<br>Miktarları.....   | 23                  |
| 6.1. Fenolik asit karışımındaki bileşenlerin derişimleri ve uygun<br>parametreler altında analiz sonucundaki<br>alıkonma zamanları.....                    | 27                  |
| 6.2. Günler arası tekraredilebilirlik değerleri (n=18).....  | 28                  |
| 6.3. Gerçek numuneler için tayin edilen fenolik asitlerin kalibrasyon<br>eğrileri grafik denklemleri ve kalibrasyon çözeltileri<br>derişim aralıkları..... | 29                  |
| 6.4. Numunelerde fenolik asit bileşenlerinin dağılımı.....   | 31                  |

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

|                |   |
|----------------|---|
| IS             | : İç Standart   |
| CE             | : Kapiler Elektroforez                                    |
| CZE            | : Kapiler Zon Elektroforez                                |
| CGE            | : Kapiler Jel Elektroforez                                |
| CITP           | : Kapiler İzotakoforez                                    |
| CIEF           | : Kapiler İzoelektrik Odaklama                            |
| CEC            | : Kapiler Elektrokromatografi                             |
| MEKC           | : Miselli Elektrokinetik Kapiler Kromatografi             |
| HPLC           | : Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi                 |
| THF            | :Tetrahidrafuran  |
| tSinA          | : t-Sinamik Asit  |
| KIA            | : Klorojenik Asit   |
| GenA           | : Gentisik Asit   |
| ŞirA           | : Şirinjik Asit   |
| oKumA          | : o-Kumarik Asit  |
| pKumA          | : p-Kumarik Asit  |
| VanA           | : Vanilik Asit  |
| pHidA          | : p-Hidroksibenzoik Asit                                  |
| KafA           | : Kafeik Asit   |
| PrtA           | : Protokateşik Asit                                       |
| 123C           | : <i>Hypericum origanifolium</i> bitkisinin MeOH ekstresi |
| 125C           | : <i>Hypericum montbretti</i> bitkisinin MeOH ekstresi    |
| µm             | : Mikrometre  |
| nm             | : Nanometre   |
| η              | : Viskozite   |
| µ <sub>e</sub> | : Elektroforetik Hareketlilik                             |

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kapiler Elektroforez (CE) yöntemi; yeni gelişen bir yöntem olmasına rağmen diğer analiz yöntemlerine göre pek çok üstünlükleri vardır. Az çözücü sarfiyatı, küçük hacimlerde (nL) numune enjeksiyonu, aynı kolonla hem polar hem apolar maddelerin, kation ve anyonların büyük moleküllerin aynı anda analiz edilebilmesi, basitliği, yüksek ayırım gücü gibi avantajlarından dolayı son yıllarda hızla gelişen ve kullanılmaya başlanmış bir yöntemdir. Birçok maddenin analizinde, DNA gibi büyük moleküllerin analizlerinde, inorganik anyon ve metal iyonlarının analizinde oldukça fazla kullanılan bir yöntemdir (Baker, 1995).

Kapiler elektroforez gıdalardaki uygulamaları ile övgüye değerdir. Uzun süren ekstraksiyon işlemlerine gerek olmaksızın gıda örneklerinin proteinleri uzaklaştırıldıktan sonra doğrudan enjeksiyonu veya basit bir ön işleme enjeksiyonu, zaman, reaktif harcaması, ekstraksiyon işlemleri sırasında olası hatalar, vb. gibi analizi etkileyen ve performansının azalmasına neden olan etkileri yok ederek kısa sürede kesin ve doğru sonuç alınan bir yöntem olarak önemli bir duruma kavuşmuştur.

Antioksidanlar; radyasyon, çevre kirliliği gibi olaylardan etkilenen canlı metabolizmada kendiliğinden oluşan serbest radikallerin neden olduğu hücre hasarını önleme yeteneğine sahip maddelerdir. Bitkilerin rengi, kokusu ve tadından sorumlu olan fenolik asitler ise antioksidan aktiviteden sorumlu bileşiklerdir. Bitkilerde doğal olarak buldukları için çok önemli antioksidan kaynaklarıdır. Bu özelliklerinden dolayı literatürde fenolik asitler ile ilgili pek çok çalışma yapılmıştır (Bektaş, 2005).

Bu tez kapsamında öncelikle antioksidan özelliğe sahip bazı fenolik asit bileşiklerinin tayini için en iyi koşullar belirlenip bu bileşiklerin gerçek numunelerde tayini için kapiler elektroforez yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen bu yöntem yeşil çay, *Hypericum origanifalium* ve *Hypericum montbretti* bitki ekstraktlarına uygulanabilmiştir. Analizlerde yöntemin doğruluğu ve tekraredilebilirliğini arttırmak için iç standart (IS) olarak probil paraben kullanılmıştır.

## 2. KONUYLA İLGİLİ DAHA ÖNCEDEN YAPILMIŞ ÇALIŞMALAR

Carrasco-Pancorbo ve arkadaşları portakal, elma suyu, ekmek, havuç, beyaz şarap ve kırmızı şarap gibi çeşitli gıdalarda fenolik asit ve amino asitleri polimer kaplı kapiler kolon kullanarak Kapiler elektroforez (CE) yöntemiyle tayin etmişlerdir. Kolonu kaplamak için N,N dimetilakrilamid-etilprolidin metasilat polimerini kullanmışlardır. Analizler 25 kV'ta 0.2 M sodyum bikarbonat tamponu (pH 9) ile yapılmıştır. Elektroferogramlar diod dizisi dedektörü kullanılarak 200 nm ve 275 nm dalga boylarında alınmıştır. Kullanılan kapilerin toplam boyu 57 cm etkin boyu 50 cm, numune enjeksiyon süresi 8 sn'dir. Toplam analiz süresi 20–25 dkdır (Carrasco-Pancorbo ve ark. 2006).

Matteo Scampicchio ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise Mikroçip Kapiler Elektroforez yöntemi kullanılarak fenolik asitlerin tayini yapılmıştır. Dedektör olarak amperometrik dedektör kullanmışlardır. Enjeksiyon süresi 5 sn'dir. 2 kV'ta %10 (v/v) metanol içeren 15 mM pH 9.5 borat tamponu kullanarak kırmızı şarapta klorojenik asit ve ferulik asiti tayin etmişlerdir (Scampicchio ve ark. 2004).

Andrade ve arkadaşları farklı çiçek türlerinden elde edilen ballarda CE yöntemini kullanarak fenolik asit tayini yapmışlardır. Analizi 20 kV'ta %20 (v/v) metanol içeren sodyum borat tamponu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz süresi 19 dk, enjeksiyon süresi ise 5 sn'dir. Elektroferogramlar diyod dizisi dedektör (DAD) kullanılarak 280 nm'de alınmıştır. Kapiler uzunluğu toplam 50 cm'dir. Bu analiz şartlarına toplam 11 numune kullanarak yaptıkları deneylerde 26 çeşit fenolik asit bileşiği tayin etmişlerdir (Andrade ve ark. 1997).

Hamoudová ve arkadaşları kırmızı şarapta bulunan fenolik asitleri Kapiler İzotakofrez ve Kapiler Elektroforez yöntemlerini birlikte kullanarak analiz etmişlerdir. Kapiler İzotakofrez ve Kapiler Elektroforez yöntemlerinin birlikte kullanılması ile yöntemin ayırma ve seçicilik yeteneğini arttırdığı bildirilmektedir. Ön ayırma işlemi İzotakofrez yöntemi ile tam ayırma işlemi Kapiler Elektroforez ile yapılmıştır ve iki farklı tampon kullanılmıştır. Tampon 1; 25 mM MOPSO ( $\beta$ -hidroksi-4-morfolinopropansülfonic asit), 50 mM Tris [tris(hidroksimetilamino)metan], 15mM borik asit (pH 8.5) ve Tampon 2; 25 mM TAPS N-[tris(hidroksimetil)metil]-3-

aminopropansülfonik asit, 50mM Tris [tris(hidroksimetilamino)metan], 15mM borik asit (pH 8.7)'tir. Analiz 2.7 kV'ta, 5 sn enjeksiyon ile yapılmıştır. Elektroferogramlar UV dedektor kullanılarak 254 nm'de alınmıştır. Kullanılan kolonun toplam uzunluğu 15 cm, etkin uzunluğu 0.3 mm'dir. Analiz 45 dk da tamamlanmıştır. İç standart olarak apijenin ( $0.5 \text{ g ml}^{-1}$ ) kullanılmıştır (Hamoudová ve ark. 2004).

Minussi ve arkadaşları fenolik asitlerin antioksidan etkilerini CE yöntemi ile 7 çeşit şarap numunesindeki fenolik asitler, 15 kV'ta, fosfat tamponu (pH 7.0) kullanılarak, toplam uzunluğu 57 cm, etkin uzunluğu 50 cm olan kapiler kolonda analiz edilmiştir. Elektroferogramlar 734 nm'de alınmıştır. Analiz süresi 22 dk, enjeksiyon süresi 7 sn olarak uygulanmıştır. Rosana C. Minussi ve arkadaşları yaptıkları deneyler sonunda protokateşik asit, gallik asit, o-kumarik asit, p-kumarik asit, p-hidroksibenzoik asit ve gentisik asidi tayinini gerçekleştirmişlerdir (Minussi ve ark. 2003).

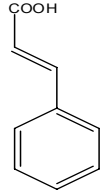
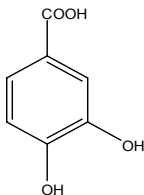
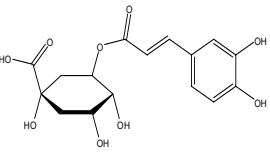
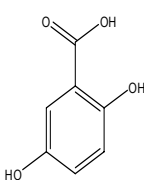
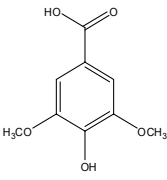
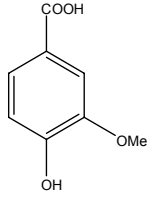
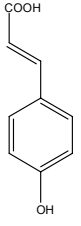
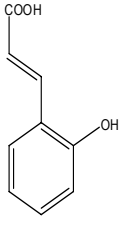
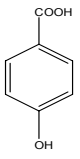
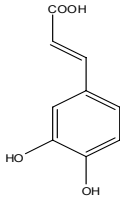
Esteves ve arkadaşları CE yöntemini kullanarak fenolik bileşikleri tayin etmişlerdir. Analizler 25 kV'ta, 0.3 psi basınçta ve pH 9.15 borat tamponu ile gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyon süresi 5 s'dir. Deneyde iç standart olarak etilvanilin kullanılmıştır. Elektroferogramlar 214 nm'de DAD dedektör kullanılarak alınmıştır. Kullanılan kolonun toplam uzunluğu 42.8 cm etkin uzunluğu 36 cm'dir (Esteves ve ark. 2007).

### 3. BİTKİSEL FENOLİK ASİTLER

Fenolik asitler (Çizelge 3.1), bitkilerde yaygın olarak bulunan doğal antioksidan maddelerdir. Fenolik asitler, bitkilerin rengi, kokusu ve tadlarından sorumludurlar. Sadece küçük bir grubu doğada serbest olarak bulunmaktadır. Bu tip bileşiklerin gıdalarda bulunması besinlerin kararlılığını, rengini, kokusunu, besin değerini ve kalitesini belirgin olarak etkilemektedir (Robbins, 2003). Bu yüzden fenolik asitler gıdalarda raf ömrünü uzatıcı koruyucu madde olarak kullanılmaktadırlar. Ayrıca fenolik asit içeren pek çok bitki bazı hastalıklarda tedavi edici olarak kullanılmaktadır (Bektaş, 2005).

Fenolik asitler temel olarak, hidroksibenzoik asit ve hidroksisinnamik asit türevlerinden oluşmaktadır (Ho, 1991). p-hidroksibenzoik asit, protokateşik asit, vanilik asit, şirinjik asit hidroksibenzoik; kafeik asit, o-kumarik asit, p-kumarik asit, klorojenik asit, t-sinnamik asit, hidrosinamik asit türevleridir.

Çizelge 3.1. Fenolik asitlerin yapıları.

|  |  |  |   |  |
|--|--|--|---|--|
| trans-sinnamik Asit<br> | Protokateşik Asit<br> | Klorojenik Asit<br> | Gentisik Asit<br>          | Sirinjik Asit<br> |
| Vanilik Asit<br>        | p-kumarik Asit<br>    | o-kumarik Asit<br>  | p-hidroksibenzoik Asit<br> | Kafeik Asit<br>   |

Fenolik asitlerin antioksidan etkileri yapılarıyla ilgilidir (Tapiero ve ark., 2002). Bu etki aromatik halkada taşıdıkları hidroksil gruplarının sayısına, bağlanma yerine ve pozisyonlarına bağlıdır (Marinova ve Yanishlieva, 2003; Sroka ve Cisowski, 2003; Peyrat-Maillard ve ark., 2000). Hidroksi grubunun sayısının artmasıyla antioksidan etkinin arttığı gözlenmiştir (Peyrat-Maillard ve ark., 2000; Fukumoto ve Mazza, 2000). Metoksi grubu taşıyan fenolik asit türevinin taşımayana göre daha etkin olduğu saptanmıştır (Marinova ve Yanishlieva, 2003; Fukumoto ve Mazza, 2000).

### 3.1. Fenolik asitlerin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

#### 3.1.1. t-Sinamik Asit:

Kimyasal formülü  $C_9H_8O_2$ 'dir ((E)-3-fenil-2-propenoik asit). Moleküler ağırlığı  $148.17 \text{ g mol}^{-1}$ 'dür. Monoklinik kristaller halinde bulunur. Yoğunluğu  $1.25 \text{ g cm}^{-3}$ , kaynama noktası  $300 \text{ }^\circ\text{C}$ , erime noktası  $133 \text{ }^\circ\text{C}$ ' dir. Kokusuz beyaz kristal halinde bulunur. Suda çözünürlüğü oldukça azdır. Ancak etanol, aseton ve THF' deki çözünürlükleri iyidir (Anonim, 2007).

tSinA sığala yağı, tarçın yağı ve yeşil çay gibi maddelerde bulunmaktadır. Tatlandırıcı olarak, sentetik çivit olarak ve ilaç endüstrisinde oldukça fazla kullanılır. Başlıca kullanım alanı; parfüm endüstrisinde metil, etil ve benzil esterlerin eldesidir.

#### 3.1.2. Klorojenik Asit:

Kimyasal formülü  $C_{16}H_{18}O_9$ , molekül ağırlığı  $354.31 \text{ g mol}^{-1}$  'dir. Açık kimyasal formülü (3-[[3-(3,4-Dihidroksifenil)-1-okzo-2-propenil]oksi]-1,4,5-trihidroksisikloheksan karboksilik asit). Yoğunluğu  $1.28 \text{ g cm}^{-3}$ , erime noktası  $207\text{--}209 \text{ }^\circ\text{C}$  arasında olan KlA, KafA ve kuinik asitin esteridir. Bitki metabolizmasında en önemli faktörlerdendir. Antioksidan özelliği ile bilinir. Kahvedeki en önemli fenolik bileşiktir. Çoğunlukla ilaç endüstrisinde, gıda endüstrisinde ve kozmetik endüstrisinde kullanılır (Anonim, 2007).



### 3.1.3. Gentsik Asit:

Molekül formülü (2,5-dihidroksibenzoik asit)  $C_7H_6O_4$ , molekül ağırlığı 154.12 olan gentsik asit; beyaza yakın sarı renkte pudra kıvamında bulunur. Erime noktası 200–205 °C'dir. Suda, etanolde, polar organik çözücü ve tuzlarda çözünürlüğü iyidir (Anonim, 2007).

### 3.1.4. Sirinjik Asit:

Molekül formülü (4-Hidroksi-3,5-dimetoksibenzoik asit)  $C_9H_{10}O_5$ , molekül ağırlığı 198.17 g mol<sup>-1</sup>'dür. Kaynama noktası 205–209 °C'dir (Anonim, 2007).

### 3.1.5. Vanilik Asit:

Molekül formülü (3-metoksi 4-hidroksi benzoik asit)  $C_8H_8O_4$ , molekül ağırlığı 168.14 g mol<sup>-1</sup>'dür. Alkoldeki çözünürlüğü çok iyidir. Erime noktası 210–230 °C'dir (Anonim, 2007).

Beyaz renkli pudra şeklindedir. Şarap (Minussi ve ark., 2003), buğday kepeği (Yu ve Zhou, 2005) ve okaliptusta (*Eucalyptus globulus*) (Gonzalez ve ark., 2004) bulunmaktadır.

### 3.1.6. p-kumarik Asit: (3-hidroksisinnamik asit) ve o-kumarik Asit: (2 hidroksisinnamik asit)

Kumarik asit sinnamik asitten türemiş organik bileşiktir. Yapıdaki hidroksi grubunun yerine bağlı olarak orto, para ve meta olmak üzere üç tane izomeri vardır. Molekül formülü  $C_9H_8O_3$ , molekül ağırlığı 164.15 g mol<sup>-1</sup>'dür. Erime noktası 210 ile 213 °C arasındadır (Anonim, 2007). Portakal (Sousa ve ark., 2004), kiraz (Cadenas ve Packer, 2002) kahve, çikolata ve şarapta (Abdel-Wahab ve ark., 2003) bulunmaktadır. Strese karşı koruma sağladığı rapor edilmiştir. Tümör hücrelerini öldürme yeteneğinin yanında DNA'da oksidatif hasara neden olduğu bildirilmiştir. Yüksek miktarlarda alındığı zaman

toksik etki göstermektedir (Labienc ve ark., 2003). pK<sub>umA</sub> özellikle mide kanserine karşı oldukça yararlı olduğu bildirilmiştir (Ferguson ve ark., 1999).

### 3.1.7. p-Hidroksibenzoik Asit:

Molekül formülü (4-hidroksi benzoik asit) C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>, molekül ağırlığı 138.12 g mol<sup>-1</sup>'dir. Erime noktası 214–217 °C' dir. p-hidroksibenzoik asit benzoik asidin fenolik türevidir. Beyaz kristaller şeklinde bulunur. Suda çözünürlüğü azdır, ancak alkoller, eter ve asetonda oldukça iyi çözünür (Anonim, 2007).

### 3.1.8. Protokateşik Asit:

Molekül formülü (3,4-dihidroksi benzoik asit) C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub>, molekül ağırlığı 154.12 g mol<sup>-1</sup>'dir. Beyaz kristal pudra şeklinde bulunur. Erime noktası 200–202 °C'dir. Sudaki çözünürlüğü çok azdır. Alkol ve eterdeki çözünürlüğü çok güçlüdür (Anonim, 2007). Soya fasulyesi ve kekikte oldukça çok bulunmaktadır (Bektaş, 2005).

### 3.1.9. Kafeik Asit :

Molekül formülü (3,4-dihidroksi sinamik asit) C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>, molekül ağırlığı 180.16 g mol<sup>-1</sup>'dir. Sarı kristalize şeklinde bulunur. Erime noktası 223–225 °C'dir. Sıcak suda ve alkolde çözünürlüğü oldukça iyidir (Anonim, 2007). Doğal bir fenolik asittir, bu nedenle pek çok bitkide bulunmaktadır. Hidrosinamik asitlerin doğada en çok rastlanılan türevidir. Elma, üzüm, erik, yulaf gibi çeşitli meyvelerde mevcuttur. Nitrite hızlı bir şekilde etki ederek nitrik oksite indirgemektedir (Huang ve Ferraro, 1991).

#### 4. ELEKTROFOREZ

Elektroforez doğru akım potansiyelinin uygulandığı bir tampon çözeltide yüklü taneciklerin diferansiyel göç hızlarına dayanan bir ayırma yöntemidir. Elektroforez; inorganik anyon ve katyonlar, aminoasitler, ilaçlar, vitaminler, karbonhidratlar, peptitler, proteinlerin ayrılması ve tayini gibi birçok zor analitik ayırma problemine uygulanmaktadır.

Elektroforetik ayırma, ince bir tüp içindeki veya düz gözenekli bir destek ortamındaki (örneğin, kağıt veya katı jel) sulu bir tampon çözeltiye numunenin küçük bir bant halinde uygulanması ile gerçekleştirilmektedir. Tampon çözeltiye, her iki ucundaki elektrotlar vasıtasıyla yüksek bir doğru akım potansiyeli uygulanır. Uygulanan bu potansiyel, numunedeki iyonların elektrotlardan birine veya diğerine göç etmesini sağlar. Numunedeki çeşitli analitlerin ayrılması göç hızlarına ve taneciklerin yük/boyut oranlarındaki farka bağlıdır. Bu oranın büyük olması, elektrik alanda ilgili iyonun daha hızlı hareket etmesini sağlar.

Elektroforez iki şekilde gerçekleştirilir;

- Tabaka elektroforez
- Kapiler elektroforez

Tabaka elektroforezde ayırım; sulu bir tampon çözelti ortamında yarı-katı, gözenekli bir jel tabakası kullanılarak yapılır. Tabaka genişliği birkaç cm'dir. Aynı anda birden fazla numuneye çalışılabilir. Analiz edilecek numune bant veya bir damla şeklinde tabakaya eklenir, belli bir süre doğru akım potansiyeli uygulanır. Ayırma işlemi tamamlandıktan sonra ince tabaka kromotografisinde kullanılan boyama teknikleri ile moleküller belirlenir. Bu yöntem, biyoloji ve biyokimya alanında tercih edilen bir yöntemdir. Ancak tabaka elektroforez aletsel bir yöntem değildir.

Kapiler elektroforez ise tabaka elektroforezin aksine aletsel bir yöntemdir. Küçük hacimlerdeki (10 ile 100 nL) numunelerde yüksek ayırma gücüne sahiptir. Aynı zamanda tabaka elektroforezinde kullanılan boyama işlemi kapiler elektroforezde kullanılmaz. Ayrılan maddeler kapiler kolonun çıkışında bulunan dedektör tarafından algılanarak kalitatif ve kantitatif analiz yapılabilir.

#### 4.1. Elektroforetik Ayırma Temelleri

Elektroforetik ayırma, yüklü taneciklerin hareketliliklerinin farklı olması temeline dayanır. Bir iyonun bir elektriksel alandaki göç hızı ( $V$ ,  $\text{cm s}^{-1}$ ), elektriksel alan şiddeti ( $E$ ,  $\text{V cm}^{-1}$ ) ile elektroforetik hareketliliğin ( $\mu_e$ ,  $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) çarpımına eşittir (Baker, 1995):

$$V = E \mu_e \quad (4.1)$$

Buna bağlı olarak, elektroforetik hareketlilik analitin iyonik yükü ile doğru, sürtünme katsayısı ile ters orantılıdır. Sürtünme kuvvetleri de taneciklerin büyüklüğüne, şekline ve ortamın viskozitesine bağlıdır. Aynı boyuttaki iyonlar için yük ne kadar büyükse, yürütücü kuvvet ve göç hızı da o kadar büyük olur. Ayrıca, iyonik şiddet, pH, dielektrik sabiti gibi çözelti özellikleri de elektroforetik hareketlilik üzerinde etkilidir. Çünkü bunlar taneciğin büyüklüğüne ve şekline bağlı olarak tanecik yükünü değiştirirler.

Elektrik alan sadece iyonlar üzerinde etkilidir. Eğer iki farklı tür hem farklı iyon yüküne hem de tampondan geçerken farklı sürtünme kuvvetine sahipse, bu iki tür birbirinden ayrılabilir. Aynı yükteki iyonlar için, iyon küçüldükçe sürtünme kuvveti küçülür ve göç hızı artar.

#### 4.2. Kapiler Elektroforez

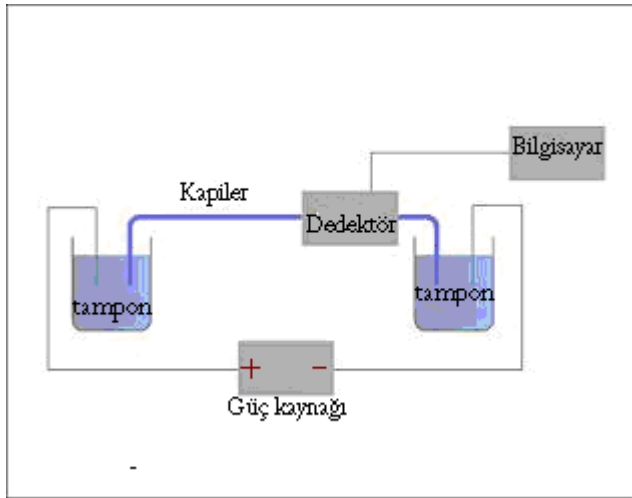
Kapiler elektroforez (Şekil 4.1), küçük hacimlerdeki örneklerde bulunan parçacıkların hızlı ve verimli ayrılmalarına ve analizine olanak sağlayan modern bir analitik tekniktir. Gıda, eczacılık ve çevre gibi birçok alanda gittikçe artan sayıda uygulama bulmaktadır.

Kapiler elektroforez, yüksek performanslı sıvı kromatografisi, gaz kromatografisi ve slab jel elektroforez gibi yaygın kullanılan ayırma tekniklerinin tamamlayıcısıdır. Gelecek yıllarda, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ve slab jel elektroforez gibi çok kullanılan birçok analiz yöntemlerinin yerini olasılıkla kapiler elektroforez alacaktır. Yüksek verimlilikte ve hızlı ayrımlar, diğer yöntemlerdeki madde ve malzemelere göre

ucuz ve dayanıklı kapiler kolonlar, küçük hacimli örnek ile çalışabilme ve reaktif harcamasının az olması gibi bazı üstünlükler taşımaktadır.

Aynı kapiler ile polar bileşiklerin, nonpolar bileşiklerin, kiral bileşiklerin, proteinler gibi büyük moleküllerin, oda sıcaklığında ve bir sıvı pompasına gerek duyulmaksızın düşük basınçta ayırma ve analizleri yapılabilmektedir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi kolonları ile karşılaştırıldığında kapiler kolonlar daha ucuz, kullanımı kolay ve daha uzun ömürlüdür (Skoog, 1997).

Kapiler elektroforez, kapiler bir kolon içine konan bileşenlerin, kolonun her iki ucundan uygulanan yüksek bir doğru akım potansiyeli ile ayrılması üzerine kurulmuş oldukça hızlı bir ayırma tekniğidir. Kapiler elektroforez metodu ile yüklü tanecikler (iyonlar, kolloidal parçacıklar vs.) elektrik alanda farklı hızlarda hareket etmelerinden yararlanılarak ayrılabilir. Bu yüklü taneciklerin göç hızları taneciklerin yüküne ve büyüklüklerine bağlıdır. Böylece, numunedeki çeşitli analitlerin ayrılması yük/boyut oranlarındaki farka dayanır. Bu oranın büyük olması, elektrik alanda ilgili iyonun daha hızlı hareket etmesini sağlar.

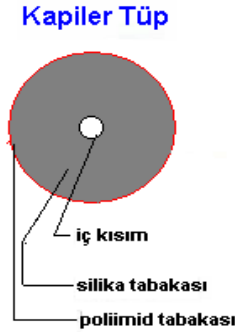


**Şekil 4.1.** Kapiler elektroforez sistemi için genel bir gösterim (Anonim, 2003)

Kapiler kolon bir tampon çözeltiyle doldurulur. Kapilerin uçları aynı tamponu içeren bir çözeltiye daldırılır. Kapiler kolonlar (Şekil 4.2.) boyları 50-100 cm, iç çapları 25-100  $\mu\text{m}$  olup eritilmiş silikadan yapılmışlardır. Kapilerin esnekliğini sağlamak için kapiler borunun üzeri poliimit tabakasıyla kaplanmıştır. Tampon çözeltiye daldırılan

elektrotlar, uygulanan gerilimden etkilenmemeleri için, platinden yapılmışlardır. Elektrotlar arasına  $\pm 30$  kV'luk bir doğru akım potansiyeli uygulanır.

Numune kapilerin pozitif ucuna (anoda) enjekte edilir. Numunedeki bileşenler elektrik alanının etkisiyle negatif elektroda (katoda) geçmeye başlarlar. Bu esnada bir dedektörden geçerler ve tanınır ve tayin edilirler.



**Şekil 4.2.** Kapiler kolonun kabaca gösterimi (Anonim, 2003)

Kapiler elektroforezde parçacıkların göç hızları üzerine elektroforetik ve elektroozmotik olmak üzere iki kuvvet etki eder. Parçacıklar bu iki etkinin altında sabit bir hızla bir uçtan diğer uca hareket eder.

Kapiler elektroforez yönteminin iyonların analizinde kullanımı birçok araştırmacı tarafından ele alınmıştır.

### 4.3. Elektroforetik Göç ve Göç Hızları

Elektroforetik göç, yüklü taneciklerin hareketliliklerinin farklı olması temeline dayanır.

Parçacık üzerinde harcanan elektrostatik kuvvet ( $F$ ), çözeltildeki voltaj gradienti ( $X$ ) ve elektriksel alan gücü ve parçacığın net yüküyle ( $q_i$ ) orantılıdır.

$$F = Xq_i \quad (4.2)$$

Kuvvetin yönü, parçacığın yükünün tersi yönündedir. Yüklü parçacık sabit bir hız elde edene kadar hızlanır. Bu hareket, çözeltinin viskozite kuvveti ile önlenmeye çalışılır.

Viskozite kuvveti parçacığın hızının artmasıyla artar. Küresel parçacıklar için viskozite kuvveti Stokes eşitliği ile verilir;

$$F = -6\eta r_i V_i \pi \quad (4.3)$$

$\eta$ ; çözeltilinin viskozitesi

$r_i$ ; parçacığın çapı

$V_i$ ; parçacığın hızı

$\pi$ ; pi sabiti

F; viskozite kuvveti

Kısa bir hızlanmadan sonra karşı koyucu kuvvetler (elektrostatik kuvvet ve viskozite kuvveti) denk olurlar. Elektrostatik kuvvet her durumda viskozite kuvvetinden büyük olduğundan; elektrostatik kuvvetin yönünde sabit bir hız artışı olur.

$$V_i = Xq_i / 6\eta r_i \pi \quad (4.4)$$

Elektroforetik hareketlilik analitin iyonik yükü ile doğru ve sürtünme katsayısıyla ters orantılıdır. Elektrik alan sadece iyonlar üzerinde etkilidir. Eğer iki farklı tür hem farklı iyon yüküne hem de tampondan geçerken farklı sürtünme kuvvetine sahipse, bu iki madde birbirlerinden ayrılabilir. Nötral türler ayrılamazlar. Analit iyonunun sürtünme kuvveti, o iyonun yüküne, şekline ve içinde göç ettiği ortamın viskozitesine bağlıdır. Aynı boyuttaki iyonlar için, yük ne kadar büyükse, yürütücü kuvvet ve göç hızı da o kadar büyük olur. Aynı yükteki iyonlar için ise, iyon küçüldükçe sürtünme kuvveti küçülür ve göç hızı artar. İyonun iyon/yük oranı bu iki etkiyi birleştirmektedir.

Deneysel verilerin değerlendirilmesi konusunda iyonun elektroforetik hareketliliği;

$$U_i = v_i / E \quad (4.5)$$

eşitliği ile ve küresel parçacıklar için ise;

$$U_i = q_i / 6 \eta r_i \pi \quad (4.6)$$

Eşitliği ile verilmektedir.

#### 4.4. Elektroosmoz Göçü

Tampon çözelti içeren bir kapiler kolona yüksek potansiyel uygulandığında bir elektroosmotik göç (Şekil 4.3.) oluşur. Bu olay, birbirleri ile temasta bulunan iki maddenin sınırında bulunan bir elektriksel çift tabakanın varlığından kaynaklanır.

Elektroosmozda sıvı akımının yönü, sıvının içerdiği parçacığa göre taşıdığı elektriğin yüküne bağlıdır. Kapiler kolonun yüzeyinde bulunan negatif yük, silika kapileri kaplayan sabit fazın yüzeyinde bulunan fonksiyonel grubun iyonlaşmasından oluşur. Kapiler borunun yüzeyindeki bu negatif yük tampon çözeltilerden pozitif iyonları çeker. Bunun sonucu elektriksel çift tabaka oluşur. Kapiler borunun orta kısımlarında toplanan hareketli pozitif tanecikler, negatif elektrot tarafından şiddetle çekilerek negatif elektroda doğru hareket ederler. Bu esnada kendilerine bağlanmış çözücü moleküllerini de sürüklerler. Böylece katoda doğru bir sıvı akımı oluşur. Buna *elektroosmotik sıvı akımı* denir ve  $U_{osm}$  ile gösterilir.

Ayırım serbest bir çözeltilde gerçekleştirildiğinden, elektroosmoz olayı kapiler elektroforezin çok önemli bir yönünü oluşturur. Elektroosmotik akışın hızı alan kuvveti ile orantılıdır. Buna göre;

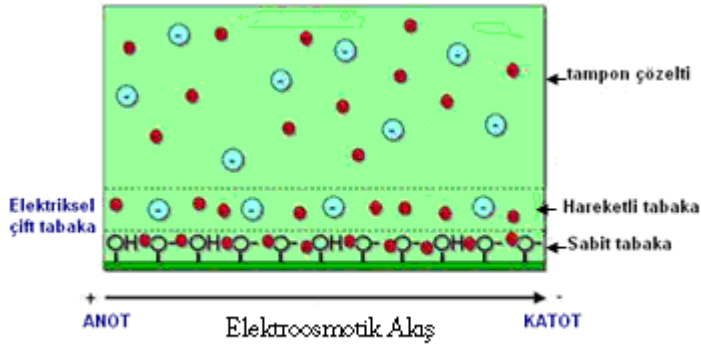
$$U_{osm} = \frac{V_{osm}}{E} \quad (4.7)$$

$V_{osm}$ : Elektriksel alandaki hız

E: Elektrik alan kuvveti

Kapiler uçları arasına bir potansiyel uygulandığında, elektriksel alan kapilerdeki çözelti üzerinde bir kuvvet yaratır ve çözelti kapiler içerisinde hareket eder (Şekil 4.4.). Çeper dolayındaki ince tabakada viskozite kuvveti elektrostatik kuvveti yok ettiğinde, çözeltinin hızı sabit bir değere ulaşır. Elektroosmotik hareketlilik, çözelti bileşenlerinin elektroforetik hareketliliklerinden daha büyüktür (Baker, 1995).





Şekil 4.3. Kapilerdeki elektroosmotik akış (Anonim, 2003).

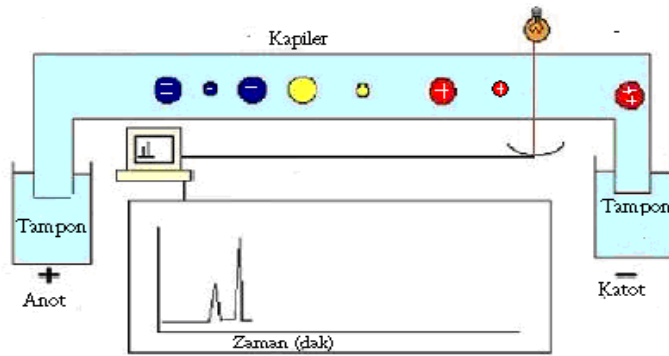
Pozitif yüklü tanecikler, kapiler içinde elektroosmotik akış hızından daha hızlı hareket ederler. Çünkü bunlar elektroforetik hareketlilikten dolayı negatif elektrodun çekim gücü altındadırlar. Buna karşılık negatif iyonlar negatif elektrot tarafından itildiklerinden, bunların hızı elektroosmatik akış hızından da daha az olur. Hatta bazı hallerde negatif yüklü iyonlar elektroosmatik akış yönünün tersine de giderler. Nötr iyonların hızları bir kriter olarak kabul edilir. Nötr iyonun hızı elektroosmoz hızına eşit olmalıdır.

İyon hızlarının aşağıdaki gibi verilmesi mümkündür.

$$(+) \text{ iyon} \Rightarrow v_i = (U_{osm} + U_i) E$$

$$\text{nötr iyon} \Rightarrow v_i = U_{osm} E$$

$$(-) \text{ iyon} \Rightarrow v_i = (U_{osm} - U_i) E$$



Şekil 4.4. Kapilerde iyonların akış şeması. (Anonim, 2003).

İstenilen hızda iyonik göçü ve ayırmayı sağlamak için yüksek bir potansiyel uygulanmalıdır. Hızlı ayırmanın yanında en önemli amaç yüksek bir ayırım gücü elde etmektir. Bunun için, elektroforezde ayırma gücünü etkileyen hareketli faz bileşimi, pH, tampon konsantrasyonu, enjeksiyon hacmi gibi faktörlerin incelenmesi gerekir (Baker, 1995).

İyi bir ayırım için enjekte edilen numune hacminin, kapilerin hacminden daha küçük olması gerekir. Örneğin, 1m uzunluğunda 75 µm çapında kapiler bir kolonun hacmi 5 µm 'dir. Böyle bir kolona enjekte edilecek numune 5-50 nL olmalıdır. Aksi halde kolon aşırı yüklenmiş olur (Baker,1995).

Numuneler kapilere farklı şekillerde enjekte edilir. En yaygın olanları Hidrodinamik ve Elektrokinetik enjeksiyonlardır. Hidrodinamik enjeksiyon basınç veya sifon ile yapılabilir. Sifon enjeksiyona gravite enjeksiyon da denir ve numune vialı, numunenin kapiler içine sifon etkisi sağlayacak düzeye kadar yükseltmek suretiyle yapılır. Basınç enjeksiyonu ya numune vialine basınç uygulayarak ya da son vialle vakum uygulayarak yapılır. Elektrokinetik enjeksiyon da, numune bileşenlerinin kapiler içine göç etmesini sağlayacak şekilde, numune vialine elektrik alanı uygulanır. Bileşikler elektroosmotik akış ve elektroforetik hareketlilik ile kapilere taşınır. Bu enjeksiyon tekniğinde hızlı hareket eden iyonlar, yavaş hareket eden iyonlara göre daha fazla oranda kapilere alınmaktadır. Hidrodinamik enjeksiyonlar jel ile doldurulmuş kapilerde uygun değildir. Bu yüzden böyle durumlarda genellikle elektrokinetik enjeksiyon uygulanır.

Nicel analizlerde ise hidrodinamik enjeksiyon tercih edilir. Hidrodinamik enjeksiyonda iyon yükünden dolayı hareketlilikte herhangi bir fark meydana gelmez.

#### **4.5. Kapiler elektroforez tipleri**

Kapiler elektroforezin tiplerini şu şekilde sıralayabiliriz; Kapiler zon elektroforez, Kapiler jel elektroforez, Kapiler izotakoforez, Kapiler izoelektrik odaklama ve Kapiler elektrokromatografi .

*Kapiler Zon Elektroforez:* Kapiler zon elektroforez'de (CZE) tampon çözeltinin bileşimi ayırma bölgesinin her yerinde aynıdır. Uygulanan potansiyel ile karışımı oluşturan

parçacıklar kendi iyonik hareketliliklerine göre zonlara ayrılırlar Tamamen ayrılan zonların arasında tampon vardır. Küçük iyonların elektroforetik ayrılmasında, analit iyonlarını elektroozmotik akış yönünde hareket ettirmek için gerekli zamanın küçük olması yöntemin en önemli özelliğidir. Katyon ayırmalarında kapilerin iç kısmına herhangi bir işlem yapılmaz ve elektroozmotik akış ile katyon hareket yönü katoda doğru olur. Anyonların analizinde ise; kapilerin iç yüzeyi alkil amonyum tuzları ile muamele edilerek elektroozmotik akış yönü ters çevrilir.

Çeşitli küçük moleküllü pestisit ve ilaçlar veya bunların iyonlaşabilen türevleri CZE ile ayrılabilirler. Aynı şekilde proteinler, aminoasitler ve karbonhidratların hepsi CZE ile tayin edilebilirler. Nötral karbonhidratlar ise, negatif yüklü borat kompleksleri oluşturularak ayırma yapılır.

Kapiler Jel Elektroforez: Kapiler jel elektroforez (CGE) genellikle gözenekli polimer matris içinde yapılır. Gözenekler içinde ayrılmanın meydana geldiği bir tampon karışımı vardır. Bu tip bir ortam elek etkisi yaparak numune göçünü geciktirici, yaklaşık olarak aynı yüke sahip olan fakat büyüklükleri farklı olan proteinler, DNA parçaları ve oligomerler gibi makromoleküllerin ayrılmasında önemlidir.

Kapiler İzotakoforez: Kapiler izotakoforez (CITP)'de tüm analitin bantları aynı hızda göçer. Bu tekniğin kullanıldığı özel bir uygulamada ya katyonlar ya da anyonlar ayrılır. Her ikisi de aynı anda ayrılmaz. Ayırma işleminde, numune iki tampon arasına enjekte edilir. Öndeki tampon hareketliliği numunedeki en hızlı iyondan daha hızlı iyonları, ikinci tampon ise hareketliliği daha düşük iyonları içerir.

Kapiler İzoelektrik Odaklama: Kapiler izoelektrik odaklama (CIEF) yöntemi, bir zayıf karboksilik asit grubu ve bir zayıf bazik amino grubu içeren protein ve aminoasitler gibi amfiprotik türlerin ayrılmasında kullanılır.

Kapiler Elektrokromatografi: Kapiler elektrokromatografi (CEC), kapiler elektroforez ve HPLC'nin bir karışımıdır. CEC kendini oluşturan her iki tekniğe göre bazı üstünlüklere sahiptir. HPLC'de olduğu gibi yüksüz taneciklerin ayrılmasında uygulanabilir ve kapilerde olduğu gibi mikro hacimlerdeki numuneleri ayırabilir. Dolgu Kolon

Elektrokromatografi ve Miselli Elektrokinetik Kapiler Kromatografi olmak üzere iki tekniği vardır. Dolgu Kolon Elektrokromatografi yönteminde, polar bir çözücü elektroosmotik basınç ile ters-faz HPLC dolgusu ile doldurulmuş kapilerden geçer. Ayırma, numune bileşenlerinin durgun faz ile hareketli faz arasındaki dağılımına bağlıdır. Miselli Elektrokinetik Kapiler Kromatografi ise yüksüz çözünen maddelerin ayrılmasını misel oluşturarak sağlama ilkesine dayanır (Skoog, 1997).

## 5. DENEYSEL BÖLÜM

### 5.1. Kimyasallar ve Bitkisel Ürünler

t-Sinamik asit (tSinA), klorojenik asit (KlA), gentisik asit (GenA), şirinjik asit (ŞirA), o-kumarik asit (oKumA), p-kumarik asit (pKumA), vanilik asit (VanA), p-hidroksibenzoik asit (pHidA), kafeik asit (KafA), protokateşik asit (PrtA) standartları Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) firmasından temin edilmiştir.

Boraks, sodyum hidroksit ve metanol Merck (Darmstadt, Germany) firmasından, iç standart (IS) olarak kullanılan propil paraben Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) firmasından satın alınmıştır.

Kullanılan kimyasalların tümü analitik saflıktadır.

Çalışmalarda kullanılan distile su, Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü laboratuvarında elde edilmiş olup, tüm çözeltilerin hazırlanmasında aynı su kullanılmıştır.

Bitkisel materyal olarak kullanılan *Hypericum origanifalium* Willd., Sivrihisar, Tekören köyü 1100m, (Haziran 2002)'den, *Hypericum montbretti* Spach, Kalabak köyü 1300m (Haziran 2002)'den temin edilmiştir.

### 5.2. Kullanılan Cihazlar

Deneysel enjeksiyon modülü ve güç kaynağını içeren CE-L1 (CE Resources, Pte Ltd, Ayer Rajah Crescent, Singapore) model kapiler elektroforez cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Sinyaller SPD-M10 A model VP Diode Array Dedektör (DAD) ile kaydedilmiştir. Alınan veriler, Class VP (Shimadzu, Kyoto, Japonya) veri işletim programı ile işlenmiştir.

Ayırım, 75 µm iç çaplı, 375 µm dış çaplı, etkin uzunluğu 50 cm ve toplam uzunluğu 75 cm olan silika kolon (Unimicro Technologies Inc., Kaliforniya, USA) kullanılarak yapılmıştır.

Çözeltilerin pH'sı, Hanna 301 model pH/İyon metre ve Hanna HI 1131 model kombine cam elektrot (Sarmeola di Rubano, İtalya) kullanılarak ölçülmüştür.

Bütün çözeltilerdeki çözülmüş gazlar Sonorex (Bandelin, Berlin, Almanya) marka ultrasonik banyo kullanılarak uzaklaştırılmıştır.

Santrifüjleme işlemleri Labofuge 200 model (Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Almanya) santrifüj cihazı ile yapılmıştır ile yapılmıştır.

Çözeltileri süzme işlemlerinde GyroDisk Syr. CA-PC marka 0.45 µm çapında (Orange Scientific, Belçika) mikro filtre kullanılmıştır.

Katı faz ekstraksiyonları için Supelclean LC-18 (Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA) katı faz ekstraksiyon kolonu kullanılmıştır.

### 5.3. Ayırma Tamponlarının Hazırlanması

Ayırma tamponu, Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>.10H<sub>2</sub>O (boraks) katısından 0.9534 g tartılıp su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır (20 mM). Ayırma tamponunun pH'sı seyreltik HCl ve NaOH çözeltileri kullanılarak pH metre yardımıyla 9.1'e ayarlanmıştır.

Bu çözeltinin hazırlanması sırasında içerisinde parçacık bulunmaması için süzölmüş, çözelti içindeki çözülmüş gazlar uzaklaştırılmıştır.

LiCl çözeltisi, LiCl katısından 1.08 g tartılıp 25 mL'ye su ile tamamlanarak hazırlanmıştır. Çözeltinin derişimi 1mM'dır.

Analiz işleminde kullanılan LiCl'lu boraks tamponu 0.1 M LiCl içerecek şekilde 20 mM derişimde hazırlanmıştır. Bu tamponu hazırlarken 1.97 g boraks katısı kullanılmıştır. Hazırlanan çözeltinin pH'ı 9.01'e pH metre ile ayarlanmıştır.

### 5.4. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

tSinA, K1A, GenA, ŞirA, oKumA, pKumA, VanA, pHidA, KafA, PrtA standartlarından Çizelge 5.1.'de belirtilen miktarlarda alınarak, 10 mL'lik balon jodelere aktarılıp bir miktar MeOH ile tam çözümleri sağlandıktan sonra yine MeOH ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan bu stok çözeltilerin derişimleri Çizelge 5.1.'de gösterilmiştir. İç standart olarak kullanılan propil parabenden de 0.208 mg tartılıp 100 mL'lik balon jodede su ile çözülmüştür ( $1.15 \times 10^{-2}$  M).

**Çizelge 5.1.** Fenolik asit standart çözeltilerinin hazırlanışı.

| Madde | Molekül ağırlık, Ma | Tartılan miktar, mg | Molarite ( $\times 10^{-2}$ M) |
|-------|---------------------|---------------------|--------------------------------|
| tSinA | 148.2               | 14.9                | 1.01                           |
| KIA   | 354.3               | 39.3                | 1.10                           |
| GenA  | 164.1               | 17.0                | 1.03                           |
| ŞirA  | 198.2               | 20.8                | 1.04                           |
| oKumA | 164.2               | 19.0                | 1.15                           |
| pKumA | 164.2               | 18.9                | 1.10                           |
| VanA  | 168.1               | 17.6                | 1.02                           |
| pHidA | 135.1               | 15.9                | 1.10                           |
| KafA  | 180.2               | 18.6                | 1.03                           |
| PrtA  | 154.1               | 18.3                | 1.18                           |

Hazırlanan bu standart fenolik asit çözeltilerinin herbirinden Çizelge 5.2’de belirtilen hacimlerde alınmıştır. 4.6 mL MeOH eklenmiş ve suyla 50 mL’ye tamamlanarak %10 MeOH içeren standart fenolik asit karışımı elde edilmiştir. Bu karışımdan 2 mL alınıp, üzerine 2 mL LiCl’lü tampon çözeltisi (0.1 M LiCl içeren, 20 mM boraks çözeltisi, pH 9.2) ve 1 M birkaç damla NaOH çözeltisi eklenmiştir. Bu 4 mL ‘lik son karışımdaki fenolik asitlerin derişimleri Çizelge 5.2’de verilmiştir

**Çizelge 5.2.** Analiz çözeltilerinin hazırlanması.

| Madde | Çizelge 4.2.’deki fenolik asit standart çözeltilerinden alınan, mL | Derişimi, M ( $\times 10^{-5}$ ) | Son karışımdaki derişim, M ( $\times 10^{-5}$ ) |
|-------|--|----------------------------------|---|
| tSinA | 0.25   | 5.05                             | 2.53  |
| KIA   | 0.40   | 8.80                             | 4.40  |
| GenA  | 0.25   | 5.15                             | 2.58  |
| ŞirA  | 0.25   | 5.20                             | 2.60  |
| oKumA | 0.30   | 6.90                             | 3.45  |
| pKumA | 0.25   | 5.50                             | 2.75  |
| VanA  | 0.25   | 5.10                             | 2.55  |
| pHidA | 0.25   | 5.50                             | 2.75  |
| KafA  | 0.30   | 5.15                             | 2.58  |
| PrtA  | 0.30   | 7.08                             | 2.54  |
| IS    | 0.25   | 5.75                             | 2.88  |

### 5.5. Yıkama Programı

Kapiler kolon ilk defa kullanırken 1 M NaOH çözeltisi ile 20 dk yıkanmıştır. Her bir enjeksiyondan önce ve sonra sırasıyla MeOH (%100) (5 dk. ), su (5 dk.) ve ayırma tamponu (elektrolit çözeltisi, 20 mM pH 9.1, 5 dk.) çözeltileriyle yıkanmıştır. Her iki analiz arasında bu yıkama programına ek olarak sırasıyla %1'lik HClO<sub>4</sub> (2 dk), 0,1 M NaOH (2 dk), %1 HClO<sub>4</sub> (2 dk), su (2 dk), MeOH (2 dk), ayırma tamponu (5 dk) ile yıkanarak ikinci bir yıkama programı uygulanmıştır.

### 5.6. Fenolik Asit Tayini için Optimum Koşullarının Belirlenmesi

Fenolik asitlerin tayini için optimum koşulların belirlenmesinden önce, karışımdaki her bir fenolik asitin yerinin belirlenmesine çalışılmıştır. Her bir fenolik asidin standardı fenolik asit karışımına eklenerek fenolik asitlerin yerleri, sıraları ve alıkonma zamanları belirlenmiştir. Daha sonra, deneysel parametrelerin optimize edilmesi aşamasına geçilmiştir. Optimum koşulların belirlenmesi sırasında, her seferinde sadece bir çalışma parametresinin değiştirilip diğerleri sabit tutulmuştur.

Optimum deneysel koşulların belirlenmesine ilk olarak borat ayırma tamponunun en uygun olduğu konsantrasyonunun belirlenmesi işlemi ile başlanmıştır. pH 9.1'de 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 mM'lık boraks tampon çözeltileri hazırlanmıştır. Fenolik asit karışımı, belirtilen derişimlerdeki ayırma tamponu olarak kullanılarak analiz edilmiştir.

İkinci aşama olarak 20 mM tampon çözelti derişimindeki sistemde pH derişimi incelenmiştir. 20 mM'lık pH'ları 7.1; 7.5; 8.0; 8.5; 9.1; 9.6 arasında derişen tampon çözeltiler hazırlanmış ve bu parametrelerde deneyler yapılmıştır.

Bu koşullar belirlendikten sonra, ayırma tamponu içerisindeki MeOH ve asetonitril çözücüsü etkisi incelenmiştir. pH'ları 9.1 olan %5, %10, %15, %20, %25, %30, %35 (v/v)'lik MeOH'lü ve yine pH'ları 9.1 olan %5, %10, %15, %20 (v/v)'lik asetonitrilli tampon çözeltiler hazırlanmıştır.

Sonraki aşamada pH 9.1'deki 20 mM boraks tamponu ayırma tamponu olarak kullanarak enjeksiyon süresinin fenolik asit karışımının analizini nasıl etkilediğine bakılmıştır. 6, 8, 10 ve 12 sn'lik enjeksiyonlar yapılmıştır.



Bu şartlarda uygun dalga boyunu tespit etmek için de 200 nm, 210 nm, 215 nm'de denemeler yapıldığında 200 nm'de en uygun pikler elde edilmiştir.

Son olarak da voltaj etkisine bakılmıştır. pH 9.1'deki 20 mM boraks tamponu kullanılarak 200 nm'de 10 kV, 15 kV 18 kV ve 20 kV'da 10 sn enjeksiyon yapılmış ve sonuçlar değerlendirilmek üzere kaydedilmiştir.

### 5.7. Kapiler Elektrofrezin Kesinliği

%10 MeOH'lü 50 mL fenolik asit karışımı içeren ana çözeltiden 2 mL alınıp, 2 mL LiCl'lü Borat tamponu (pH 9.1) ile 4 mL'ye tamamlanmıştır. Üzerine bir iki damla 1 N NaOH çözeltisi damlatılmış ve kesinlik deneyleri bu hazırlanan son çözelti ile yapılmıştır.

**Çizelge 5.3.** Tekrar edilebilirlik deneylerinde kullanılan karışımdaki fenolik asitlerin derişim değerleri

| Madde | Son karışımdaki derişim, M |
|-------|----------------------------|
| tSinA | $2.53 \times 10^{-5}$      |
| KIA   | $4.40 \times 10^{-5}$      |
| GenA  | $2.58 \times 10^{-5}$      |
| ŞirA  | $2.60 \times 10^{-5}$      |
| oKumA | $3.45 \times 10^{-5}$      |
| pKumA | $2.75 \times 10^{-5}$      |
| VanA  | $2.55 \times 10^{-5}$      |
| pHidA | $2.75 \times 10^{-5}$      |
| KafA  | $2.58 \times 10^{-5}$      |
| PrtA  | $2.54 \times 10^{-5}$      |

### 5.8. Fenolik Asit Bileşiklerinin Tayini için Kalibrasyon Eğrilerinin Çizilmesi

Çizelge 5.3. deki derişim değerlerine sahip fenolik asitlerin hepsini içeren 5 farklı derişimde karışım hazırlanmıştır. Kalibrasyon eğrisi için 5 noktayı verecek olan bu çözeltiler hazırlanırken, ilk olarak stok çözeltiler hazırlanmış (Çizelge 5.1.) ve diğer karışımlar için ise bu stok çözeltiler kullanılmıştır. Daha sonra kalan 4 noktayı temsil eden diğer karışımlar bu derişik çözeltiden seyreltme yöntemiyle hazırlanmıştır.

**Çizelge 5.4.** Kalibrasyon çözeltisindeki fenolik asit bileşiklerinin miktarları

| MADDE | Molarite<br>( $\times 10^{-2}$ M) | Karışım 1,<br>M       | Karışım 2,<br>M       | Karışım 3,<br>M       | Karışım 4,<br>M       | Karışım 5,<br>M       |
|-------|-----------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| tSinA | 1.01                              | $1.24 \times 10^{-4}$ | $6.06 \times 10^{-5}$ | $3.03 \times 10^{-5}$ | $2.42 \times 10^{-5}$ | $1.21 \times 10^{-5}$ |
| KIA   | 1.10                              | $7.92 \times 10^{-4}$ | $3.96 \times 10^{-4}$ | $1.98 \times 10^{-4}$ | $1.60 \times 10^{-4}$ | $7.92 \times 10^{-5}$ |
| GenA  | 1.03                              | $4.12 \times 10^{-5}$ | $2.06 \times 10^{-5}$ | $1.03 \times 10^{-5}$ | $8.24 \times 10^{-6}$ | $4.12 \times 10^{-6}$ |
| ŞirA  | 1.04                              | $1.04 \times 10^{-5}$ | $5.20 \times 10^{-6}$ | $2.60 \times 10^{-6}$ | $2.08 \times 10^{-6}$ | $1.04 \times 10^{-6}$ |
| oKumA | 1.15                              | $4.60 \times 10^{-5}$ | $2.30 \times 10^{-5}$ | $1.15 \times 10^{-5}$ | $9.20 \times 10^{-6}$ | $4.60 \times 10^{-6}$ |
| pKumA | 1.10                              | $1.32 \times 10^{-4}$ | $6.60 \times 10^{-5}$ | $3.3 \times 10^{-5}$  | $2.64 \times 10^{-5}$ | $1.32 \times 10^{-5}$ |
| VanA  | 1.02                              | $1.02 \times 10^{-5}$ | $5.10 \times 10^{-5}$ | $2.55 \times 10^{-6}$ | $2.04 \times 10^{-6}$ | $1.02 \times 10^{-6}$ |
| pHidA | 1.10                              | $2.20 \times 10^{-5}$ | $1.10 \times 10^{-5}$ | $5.50 \times 10^{-6}$ | $4.40 \times 10^{-6}$ | $2.20 \times 10^{-6}$ |
| KafA  | 1.03                              | $2.47 \times 10^{-4}$ | $1.24 \times 10^{-4}$ | $6.18 \times 10^{-5}$ | $4.94 \times 10^{-5}$ | $2.47 \times 10^{-5}$ |
| PrtA  | 1.18                              | $1.18 \times 10^{-5}$ | $5.90 \times 10^{-6}$ | $2.95 \times 10^{-6}$ | $2.36 \times 10^{-6}$ | $1.18 \times 10^{-6}$ |

### 5.9. Geliştirilen Kapiler Elektforez Yönteminin Fenolik Asit Tayini için Numunelere Uygulanması

0.5 g tartılan yeşil çay numunesi 40 mL kaynar distile su eklenerek 15 dk su banyosunda bekletilmiştir. Soğutulup süzülen süzüntünün üzerine 0.4 mL derişik HCl eklenmiş ve alınan süzüntüye 10 mL MeOH ile katı faz ekstraksiyonu uygulanmıştır. Bu işlemden sonra elde edilen çözeltiden 1 mL alınıp üzerine 3.8  $\mu$ L IS eklenerek, su ile 2 mL'ye tamamlanmış ve kapiler elektforez cihazına verilmiştir.

İkinci numune olarak *Hypericum origanifolium* bitkisinin MeOH ekstresi kullanılmıştır. 12.5 mg numune tartılmış ve MeOH ile 5 mL'ye tamamlanmıştır. Bu çözeltiden 1 mL alınmış ve 0.01 mL IS eklenerek su ile 2 mL'ye tamamlanıp cihaza verilmiştir.

Üçüncü numune olarak yine bir bitki olan *Hypericum montbretti* bitkisinin MeOH ekstresi kullanılmıştır. 12.8 mg numune tartılmış MeOH ile 5 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan stoktan 1 mL alınıp üzerine 0.01 mL IS (propil paraben) eklenip su ile 2 mL'ye tamamlanarak cihaza verilmiştir.

Bitki türlerinin MeOH'lü ekstraktları hazırlanırken, çalışmada kullanılan *Hypericum* türlerinin çiçekleri gölgede kurularak toz edilmiştir. Her iki numune için de aynı ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Yaklaşık 30 g toz numune Soxhlet sisteminde

yağlarından kurtarılmak için petrol eteri ile 8 saat ekstre edilmiş, geride kalan numune petrol eteri uzaklaştırıldıktan sonra kurutulmuştur. Kuru numune %70'lik MeOH ile 40 °C'deki su banyosunda 30 dk (4 kez) ekstrakte edilmiş, süzüntüler alçak basınç altında MeOH'den kurtarıldıktan sonra sulu kısım liyofilize edilmiştir.

## 6. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

### 6.1. Optimizasyon ile İlgili Çalışmalar

Tampon seçimi kapiler elektroforezde çok önemlidir. Tamponun, seçilen pH aralığında tamponlama kapasitesi iyi olmalıdır ve çalışılan dalga boyunda düşük absorban vermeli.

Deneylerin yapılışında bazik bir çözelti tercih edilmiştir. Düşük pH'larda iyonların kapiler çeperinde çift tabaka oluşturması zorlaşmakta, buna bağlı olarak da kapiler elektroforezin iki ana temelinden biri olan elektroozmoz azalmaktadır. Yani asidik bir tampon kullanıldığında kapiler çeperi ile anyonik formda bulunan numune iyonları arasındaki etkileşim ortadan kalkmaktadır. Bu nedenle bazik bir tampon kullanımı tercih edilmiştir.

Tampon derişiminin yüksek olması sıcaklık artışının neden olduğu joule ısınmasını ortadan kaldırıp pik genişlemesini önler ve daha verimli sonuçlar elde edilir. Ancak konsantrasyonun çok yüksek olduğu durumlarda da sorunlar meydana gelmektedir. Kapiler çapı çok küçük olduğu için, yüksek derişimli tamponla çalışıldığında, kolon çok fazla maddeyle yüklenmiş olduğundan yüzeyinin kapanması gibi sorunlarla karşılaşmaktadır. Bu nedenle tampon konsantrasyonunun ayarlanması çok önemlidir.

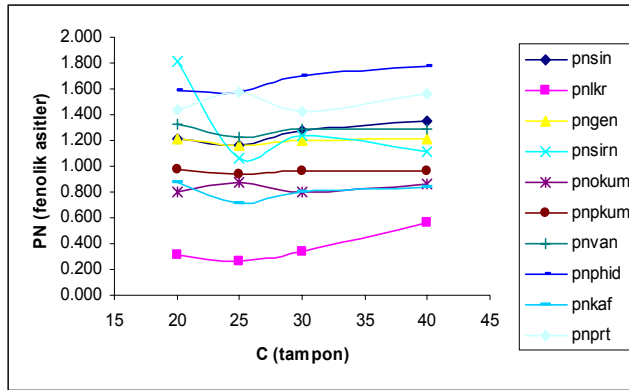
Kapiler elektroforez ile yapılan analiz çalışmalarında yıkama işlemi, doğrudan tekrar edilebilirliği etkilemektedir. Bu nedenle analiz öncesi ve sonrası yıkama işlemi mutlaka uygulanmalıdır. Çünkü ortamda bulunan silanol grupları her seferinde aynı şekilde şartlanmalı ve aktiflikleri her analizde eşit olmalıdır. Aktiflikleri farklı olan silanol grupları göç zamanına etki ederler. Bunun yanında bir önceki analizden sonra kolonda atık madde kalabilmesi ihtimali de göz önünde bulundurulmalıdır. Kolonun kirli olması da şüphesiz tekrar edilebilirliği etkileyecektir.

Bu çalışmada, stok çözeltiler MeOH'de hazırlanırken, tampon çözeltisinin çözücüsü su olduğundan, bu iki çözücü arasındaki etkileşme dolayısıyla kolonda yüzey tıkanmalarına engel olabilmek amacıyla analiz öncesi ve sonrası yıkama programları çok dikkatli seçilmiştir. Yıkama çözeltisi olarak, tamponla numune çözücüsü arasındaki

etkileşimi bir ölçüde bertaraf edebilmek için, saf MeOH, su ve tampon birlikte kullanılmıştır. Her iki analiz arasında %1(v/v)'lik HClO<sub>4</sub> çözeltisi kullanılarak bir ara yıkama programı uygulanmıştır.

Ayrıca kapiler elektroforez çalışma parametrelerinin belirlenmesi işleminde, analiz sırasında hangi tampon kullanılacaksa, analiz öncesi yıkamanın bu tamponla uygulanmasının verimi arttırdığı gözlenmiştir.

Analiz için uygun optimum şartları bulabilmek için analiz parametreleri değiştirilip pik normalizasyonları ile karşılaştırılmıştır. Alınan değerlerden pik morfolojileri, alıkonma zamanları gibi kriterler göz önüne alınarak en uygun parametreler seçilmiştir. Optimum tampon konsantrasyonu 20–25–30–40 mM'lık 4 ayrı derişim kullanılarak belirlenmiştir. Tampon konsantrasyonu ve pik normalizasyonlarını karşılaştıran grafik Şekil 6.1.'de verilmiştir. Bu grafikten her bir fenolik bileşik için optimum derişimin farklı olduğu görülmektedir. Ancak tüm fenolik bileşiklerin pik morfolojileri ve alıkonma zamanlarına bakıldığında en uygun olan tampon derişiminin 20 mM olduğuna karar verilmiştir.



**Şekil 6.1.** Tampon derişimi ile pik normalizasyonları arasındaki ilişki.

Pik normalizasyonlarına enjeksiyon süresinin etkisine bakıldığında yine 8–10–11–12 sn olmak üzere 4 değişik değer denenmiştir. 8 sn'lik enjeksiyon süresi kolonu maddeyle doldurmak için yeterli bir süre olmadığı 12 sn'in ise kolonda çok fazla yüklemeye neden olacağı düşünülerek seçilmemiştir. 10 sn'de pik morfolojileri ve alıkonma zamanları oldukça uygun görülmüştür.

Enjeksiyon süresinden sonra voltaj ve pH'ın pik normalizasyonuna etkisine incelendiğinde en uygun voltajın 18 kV, pH'ın ise 9 olduğu görülmüştür. Bu iki değerde de maddeler oldukça kısa sürede ve düzgün pikler halinde görülmüştür.

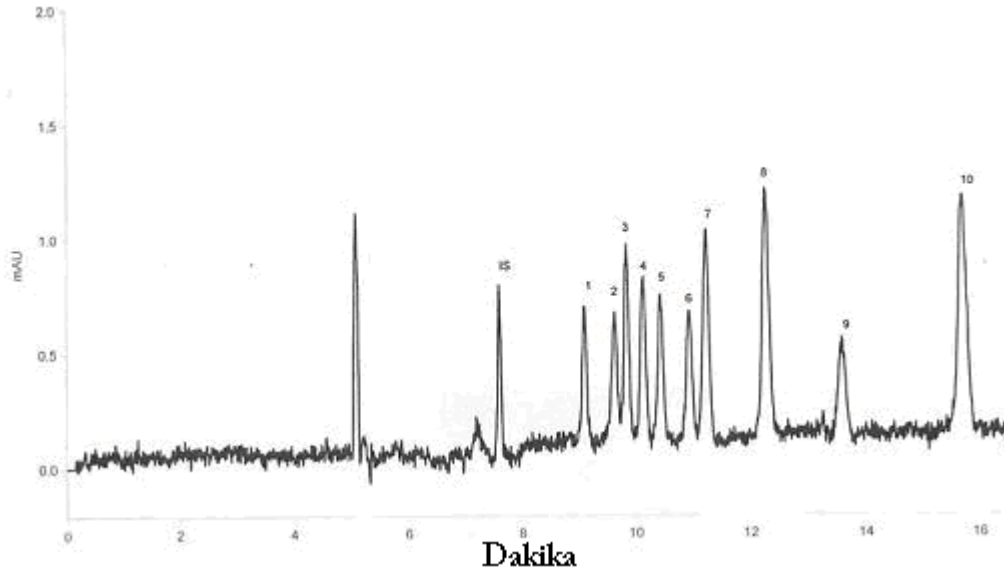
Son olarak organik çözücü etkisine bakılmıştır. Değişik yüzdelerde MeOH ve asetonitrilli tampon kullanarak deneyler yapılmıştır. Ancak organik çözücülerin herhangi bir düzeltici etkisinin olmadığı gözlenmiştir.

Belirlenen optimum koşullarda (18kV, 200 nm, 10 sn enjeksiyon, 20 mM borat tamponu (pH 9.06)) alınan elektroferogram Şekil 6.1'de gösterilmiştir. Analizin toplam süresi 20 dk civarındadır. Bu süre IS ile birlikte toplam 11 maddeyi içeren bir karışım için oldukça uygun bir süredir.

Kapiler elektroforez yüklü ve yüksüz parçacıkların taşınmaları ile ilgili bir yöntem olduğundan, kromatografik yöntemlere benzer olarak uygun sürede elektroferogramda gözlenebilecek bir IS'ye ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla propil paraben IS olarak seçilmiştir. Bütün analizlerde, elektroforez cihazına verilen son çözeltide IS derişimi  $2.87 \times 10^{-5}$  M olacak şekilde sabit tutulmuştur Bu son çözelti analiz edildiğinde, IS'nin karışımdaki tüm asitlerden önce geldiği görülmüştür. IS ve fenolik asitlerden oluşan karışımın enjekte edildiğindeki elektroferogram Şekil 6.2.' de verilmiştir.

**Çizelge 6.1.** Fenolik asit karışımındaki bileşenlerin derişimleri ve alıkonma zamanları (18kV, 200nm, 20 mM boraks tamponu (pH 9.06)).

| Madde | Derişim               | Alıkonma zamanı |
|-------|-----------------------|-----------------|
| IS    | $2.87 \times 10^{-5}$ | 7.601           |
| tSinA | $2.53 \times 10^{-5}$ | 9.107           |
| KIA   | $4.40 \times 10^{-5}$ | 9.640           |
| GenA  | $2.58 \times 10^{-5}$ | 9.854           |
| ŞirA  | $2.60 \times 10^{-5}$ | 10.145          |
| oKumA | $3.45 \times 10^{-5}$ | 10.446          |
| pKumA | $2.75 \times 10^{-5}$ | 10.949          |
| VanA  | $2.55 \times 10^{-5}$ | 11.254          |
| pHidA | $2.75 \times 10^{-5}$ | 12.288          |
| KafA  | $2.58 \times 10^{-5}$ | 13.608          |
| PrtA  | $2.54 \times 10^{-5}$ | 15.706          |



**Şekil 6.2** Fenolik asit karışımına ait elektroferogram IS: propil paraben. 1: tSinA, 2: KlA, 3:GenA, 4: ŞirA 5: oKumA, 6: pKumA, 7: VanA, 8: pHidA, 9:KafA, 10: PrtA (18kV, 200nm, 20 mM boraks tamponu (pH 9.06)).

## 6.2. Kapiler Elektroforezin Kesinliği

Çizelge 5.1.'de ayrıntıları verildiği şekilde hazırlanan farklı derişimdeki fenolik asit bileşikleri ve IS ( $2,875 \times 10^{-5}$  M), aynı analiz şartlarında (pH 9.09 20 mM Borat tamponu, 18 kV, 10sn enjeksiyon, 200nm ) 18 defa enjekte edilmiştir (n=6). Pik alanları, pik normalizasyonları ( $PN = \text{pik alanı} / \text{pik alıkonma zamanı}$ ) ve pik normalizasyon oranları ( $R = PN_{\text{fenolik asit}} / PN_{\text{IS}}$ ) kullanılarak geliştirilen metodun kesinliği kontrol edilmiştir.

**Çizelge.6.2.** Günler arası tekraredilebilirlik değerleri (n=18)

| Günler arası (n=18) |        |       |      |      |        |        |      |        |       |      |
|---------------------|--------|-------|------|------|--------|--------|------|--------|-------|------|
|                     | t-sinA | klA   | GenA | ŞirA | o-KumA | p-KumA | VanA | p-HidA | KafA  | PrtA |
| <b>ort</b>          | 0.90   | 0.80  | 0.40 | 1.20 | 1.10   | 1.00   | 1.60 | 1.80   | 0.40  | 1.80 |
| <b>SD</b>           | 0.10   | 0.20  | 0.00 | 0.10 | 0.10   | 0.10   | 0.10 | 0.20   | 0.10  | 0.10 |
| <b>RSD</b>          | 9.93   | 21.00 | 7.66 | 7.10 | 9.98   | 8.37   | 8.63 | 10.08  | 37.05 | 4.01 |

### 6.3. Fenolik Asit Bileşiklerinin Analizi için Kalibrasyon Eğrilerinin Çizilmesi ve Fenolik Asit Bileşikleri için Tayin Aralığı

Kalibrasyon işlemleri için 5 farklı derişimde çözelti hazırlanmış ve her bir çözelti 5'li setler halinde analiz edilmiştir. Kalibrasyon işlemleri; pH 9.1'deki 20 mM boraks tamponu kullanılarak, 200 nm'de 18 kV'da 10 sn enjeksiyon şartları altında yapılmıştır. Çizelge 6.3.'de kalibrasyon eğrileri ile ilgili bilgiler verilmektedir.

**Çizelge 6.3.** Gerçek numuneler için tayin edilen fenolik asitlerin kalibrasyon eğrileri grafik denklemleri ve kalibrasyon çözeltileri derişim aralıkları.

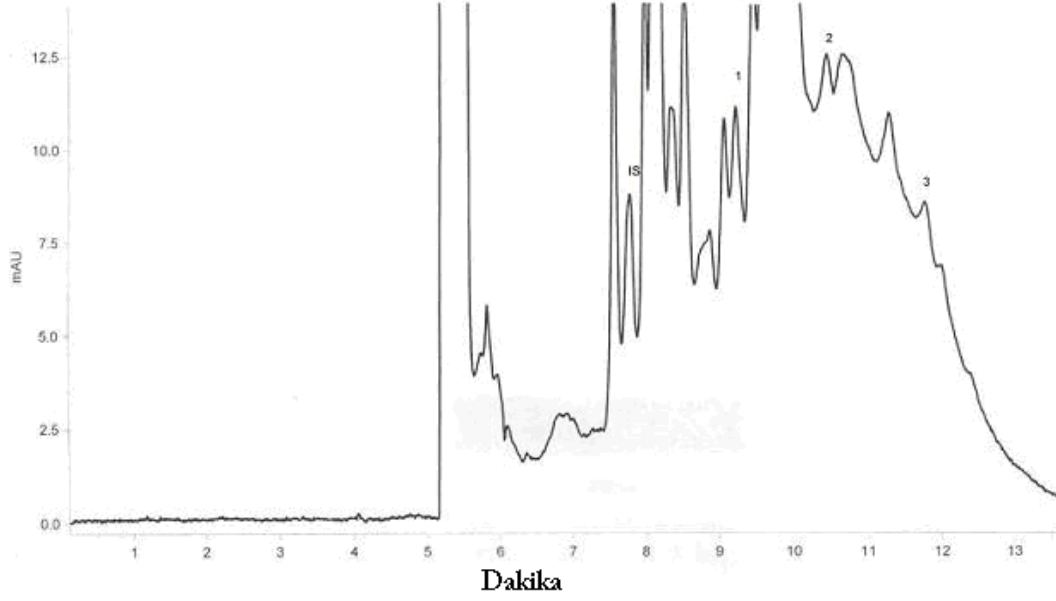
| madde | Denklem               | R2    | Derişim aralığı                             |
|-------|-----------------------|-------|---|
| tSinA | $y = 18901x + 0.2126$ | 0.998 | $1.24 \times 10^{-4} / 1.21 \times 10^{-5}$ |
| K1A   | $y = 12041x - 0.1945$ | 0.998 | $7.92 \times 10^{-4} / 7.92 \times 10^{-5}$ |
| oKumA | $y = 14139x + 0.019$  | 0.997 | $4.60 \times 10^{-5} / 4.60 \times 10^{-6}$ |
| pKumA | $y = 17933x + 0.0729$ | 0.997 | $1.32 \times 10^{-4} / 1.32 \times 10^{-5}$ |
| pHidA | $y = 31021x + 0.0415$ | 0.998 | $2.20 \times 10^{-5} / 2.20 \times 10^{-6}$ |
| KafA  | $y = 13468x - 0.3531$ | 0.998 | $2.47 \times 10^{-4} / 2.47 \times 10^{-5}$ |

### 6.4. Kapiler Elektroferez ile Fenolik Asit Bileşikleri İçeren Numunelerde Miktar Tayini

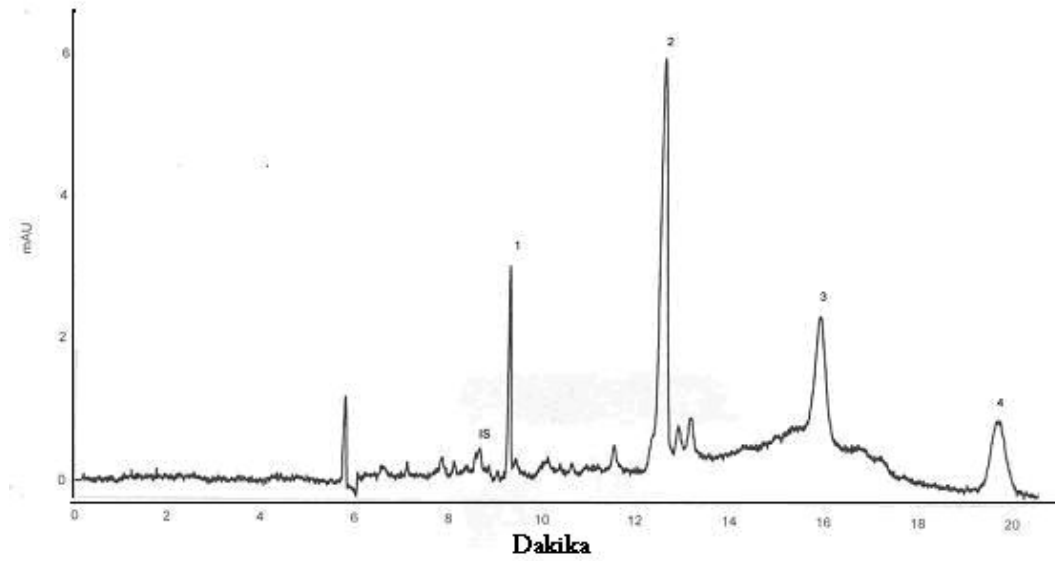
Kapiler elektroferez metodu ile fenolik asitlerin tayini için gerçek numune olarak yeşil çay, *Hypericum origanifalium* bitkisinin metanollü ekstresi ve yine *Hypericum montbretti* bitkisinin metanollü ekstresi kullanılmıştır.

Numunelere gerekli işlemler uygulandıktan sonra, optimum çalışma parametrelerinde (20 mM Borat tamponu, pH 9.1, 200 nm, 18 kV, 10 sn enjeksiyon), Kapiler elektroferez yöntemiyle analiz yapılmış ve Şekil 6.3, 6.4 ve 6.5'de verilen aşağıdaki elektroferogramlar elde edilmiştir.

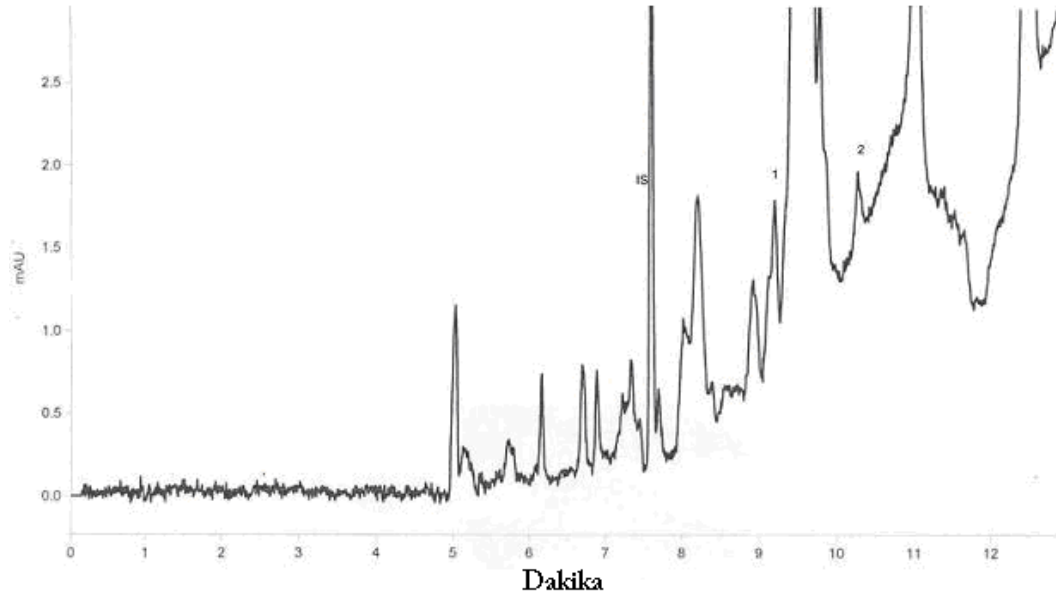




**Şekil 6.3.** Yeşil çay numunesine ait elektroferogram. IS: propil paraben, 1: tSinA, 2: oKumA, 3: pHidA (18 kV, 200 nm, 20 mM boraks tamponu (pH 9.1))



**Şekil 6.4.** MeOH'lü bitki ekstraktına (123C) ait elektroferogram. IS: propil paraben, 1: tSinA, 2: KIA, 3: pKumA, 4: KafA (18 kV, 200 nm, 20 mM boraks tamponu (pH 9.1)).

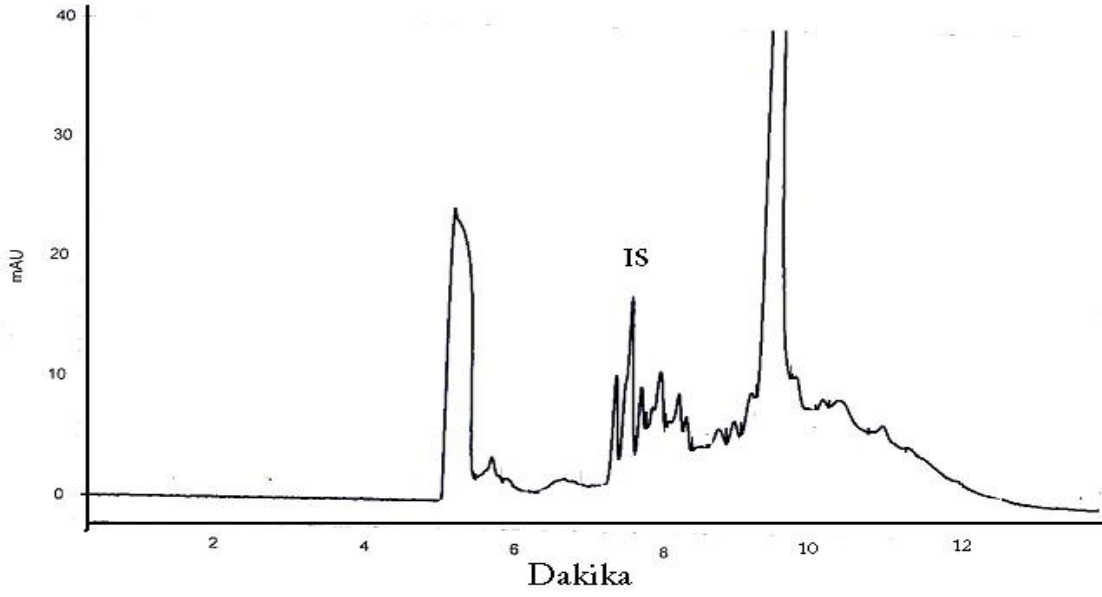


**Şekil 6.5.** MeOH'lü bitki ekstraktına (125C ) ait elektroferogram. IS: propil paraben, 1: tSinA, 2: oKumA. (18 kV, 200 nm, 20 mM boraks tamponu (pH 9.1)).

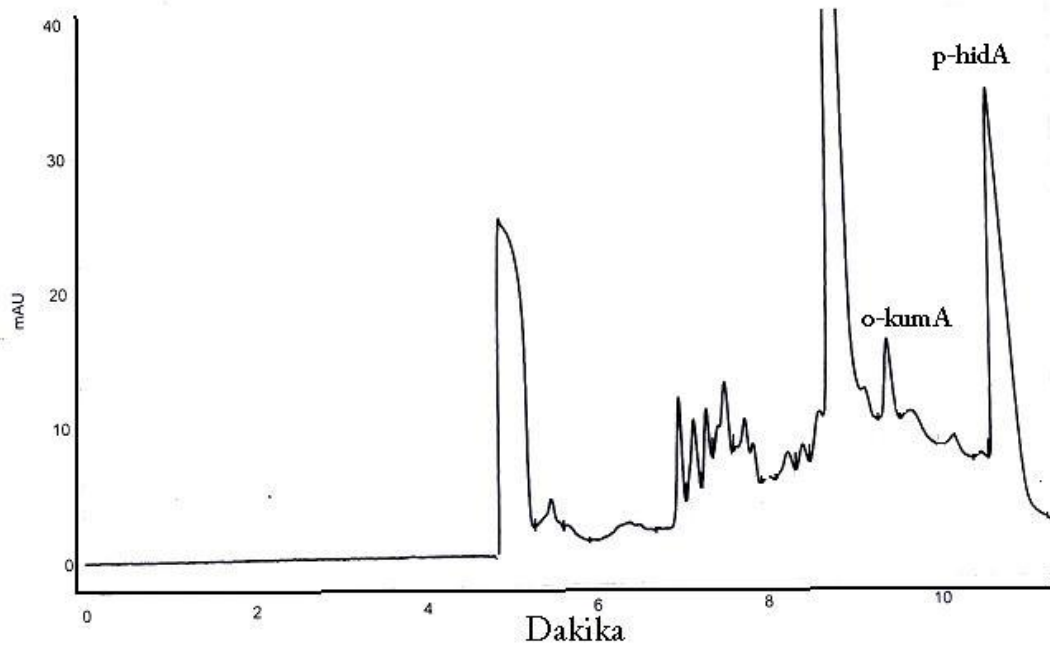
Numunelerdeki fenolik bileşenleri ve iç standardın yerini bulabilmek için fenolik asit standart çözeltilerinden ve iç standart olarak kullanılan propil parabenden numunelere teker teker eklenmiştir (Şekil. 6.5., Şekil. 6.6., Şekil. 6.7., Şekil. 6.8., Şekil. 6.9., Şekil.6.10., Şekil. 6.11., Şekil.6.12, Şekil.6.13.,Şekil.). Analizi yapılan numunelerde, bulunan fenolik asit bileşenleri ve oranları Çizelge 6.4' de verilmiştir.

**Çizelge 6.4.** Numunelerde fenolik asit bileşenlerinin dağılımı (n=5)

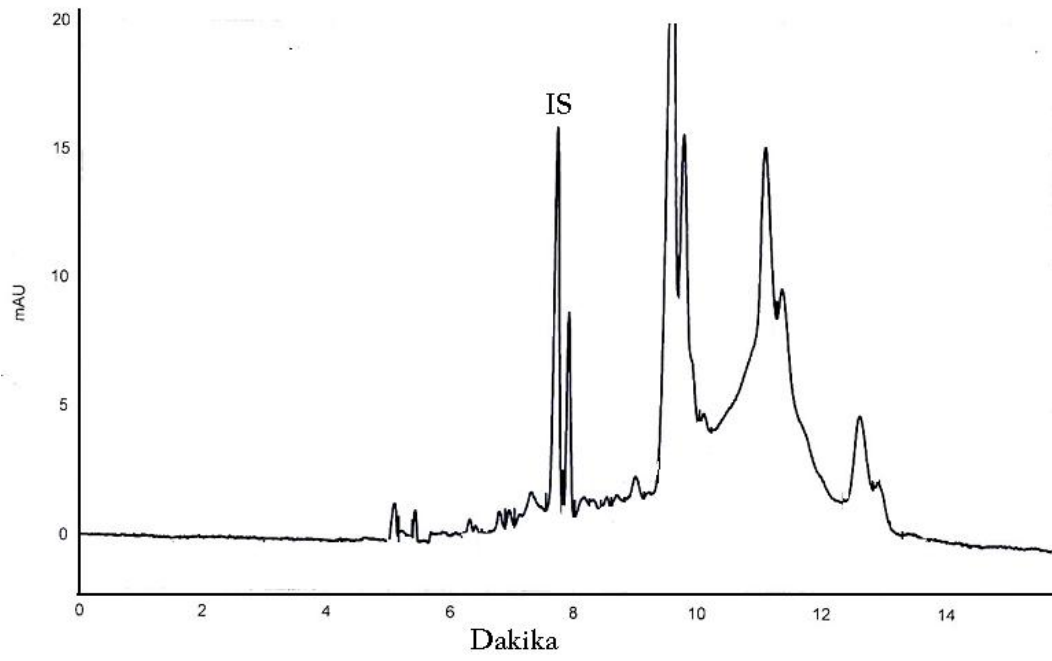
| Madde | Yeşilçay                | Bitki Ekstresi<br>123C  | Bitki Ekstresi<br>125C  |
|-------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| tSinA | $6.18 \times 10^{-5}$ M | $9.11 \times 10^{-5}$ M | $1.88 \times 10^{-5}$ M |
| KIA   | -                       | $7.65 \times 10^{-4}$ M | -                       |
| GenA  | -                       | -                       | -                       |
| ŞirA  | -                       | -                       | -                       |
| oKumA | $2.20 \times 10^{-5}$ M | -                       | $8.47 \times 10^{-6}$ M |
| pKumA | -                       | $1.12 \times 10^{-4}$ M | -                       |
| VanA  | -                       | -                       | -                       |
| pHidA | $1.07 \times 10^{-5}$ M | -                       | -                       |
| KafA  | -                       | $1.65 \times 10^{-4}$ M | -                       |
| PrtA  | -                       | -                       | -                       |



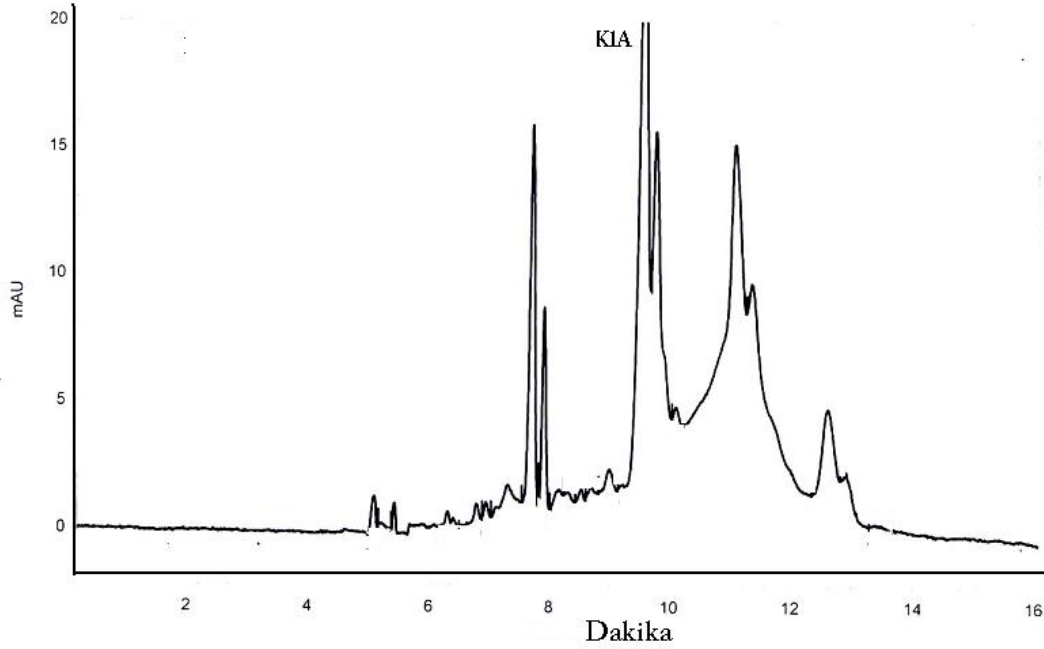
**Şekil 6.6.** Yeşil çay numunesinde IS yerinin belirlenmesi (18 kV, 200 nm, 20 mM boraks tamponu (pH 9.1)).



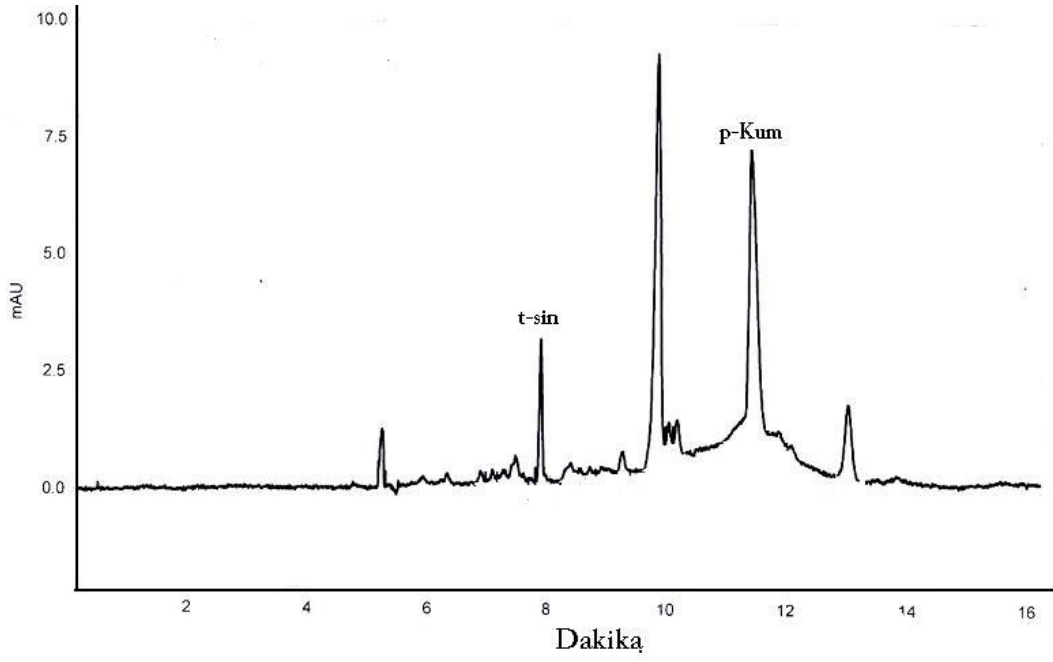
**Şekil 6.7.** Yeşil çay numunesinde o-KumA ve p-HidA'in yerinin belirlenmesi (18 kV, 200 nm, 20 mM boraks tamponu (pH 9.1)).



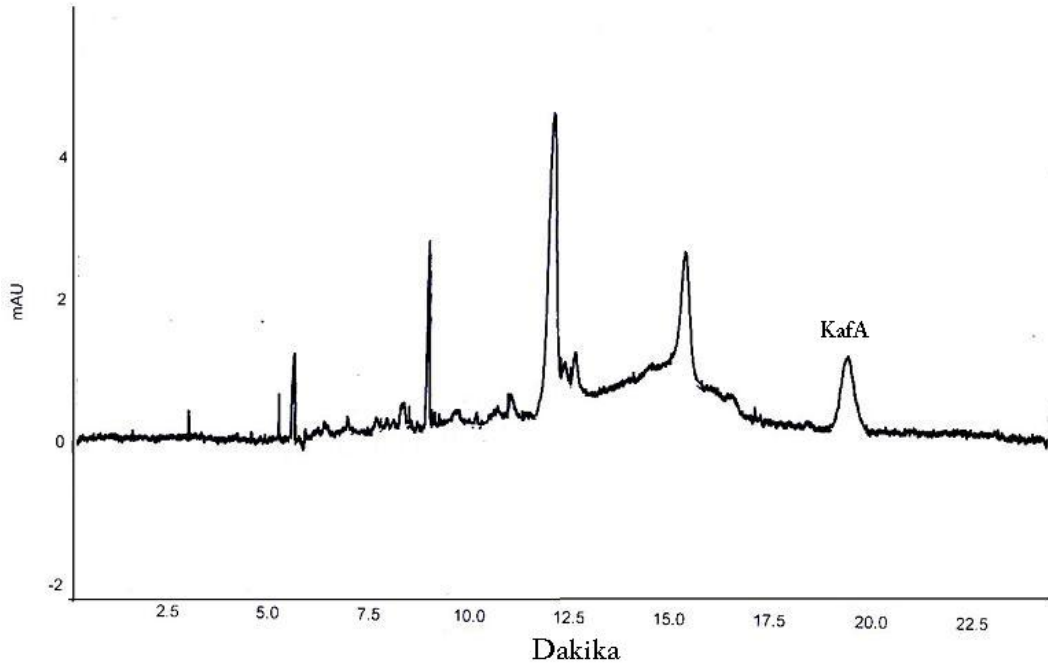
**Şekil 6.8.** 123C'de IS yerinin belirlenmesi (18 kV, 200 nm, 20 mM boraks tamponu (pH 9.1)).



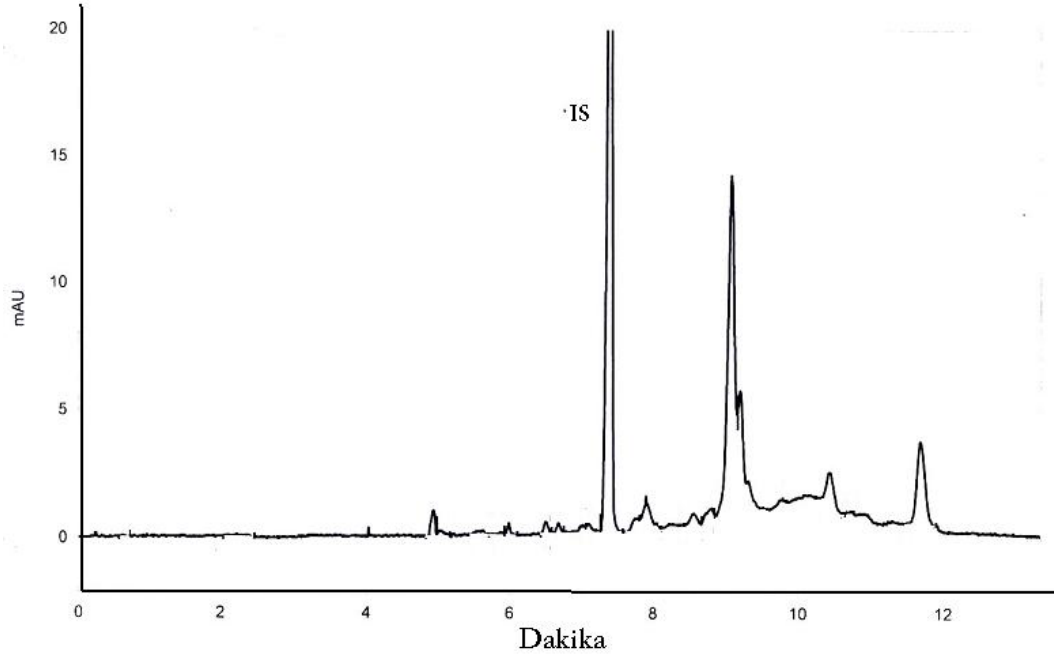
**Şekil 6.9.** 123C'de KIA'nın yerinin belirlenmesi (18 kV, 200 nm, 20 mM boraks tamponu (pH 9.1)).



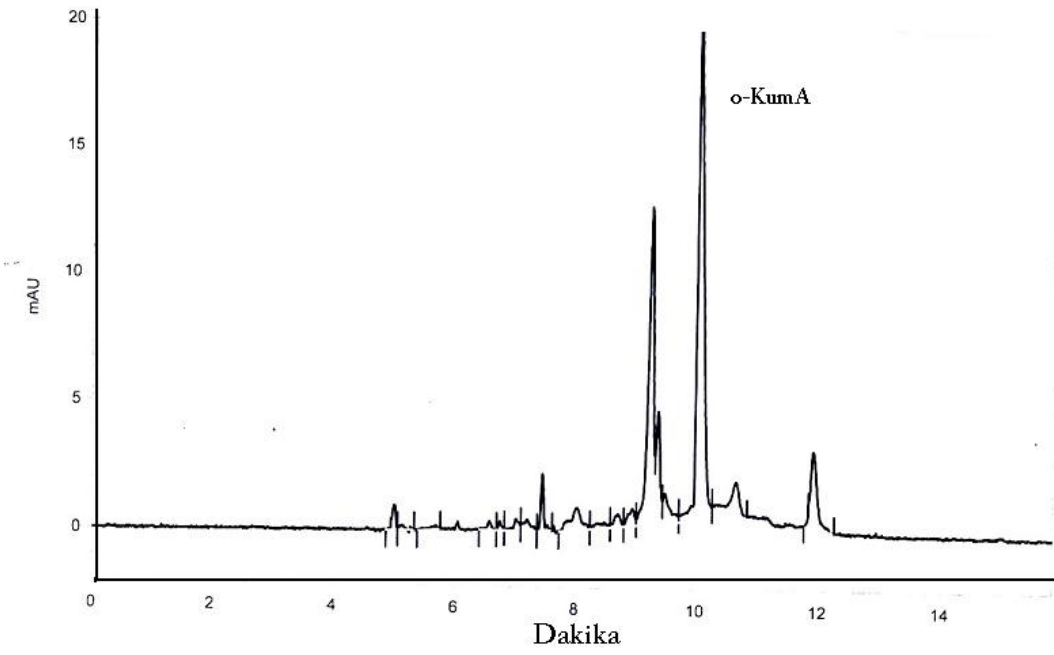
**Şekil 6.10.** 123C'de tSinA ve pKumA'nın yerinin belirlenmesi (18 kV, 200 nm, 20 mM boraks tamponu (pH 9.1)).



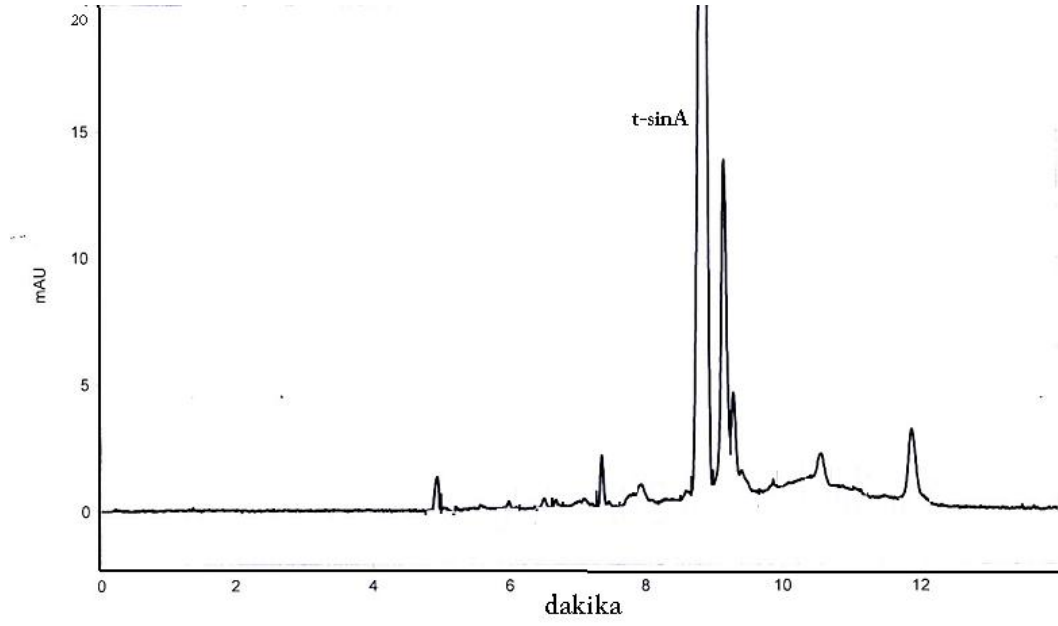
**Şekil 6.11.** 123C'de KafA'nın yerinin belirlenmesi (18 kV, 200 nm, 20 mM boraks tamponu (pH 9.1)).



**Şekil. 6.12.** 125C’de IS yerinin belirlenmesi (18 kV, 200 nm, 20 mM boraks tamponu (pH 9.1)).



**Şekil. 6.13.** 125C’de oKumA’nın yerinin belirlenmesi (18 kV, 200 nm, 20 mM boraks tamponu (pH 9.1)).



**Şekil. 6.14.** 125C’de tSinA’nın yerinin belirlenmesi (18 kV, 200 nm, 20 mM boraks tamponu (pH 9.1)).

Bu tez ile yeşil çay ve bitki ekstralarında fenolik asit tayini için bir CE yöntemi geliştirilmeye çalışılmış, tayin 16 dk gibi kısa sayılabilecek bir sürede, güven içerisinde ve az masrafla yapılmıştır. Literatürde yeşil çay numunesinde fenolik asit bileşiklerinin tayini için geliştirilmiş bir CE yöntemi olmadığı için, yöntemin bu numune için yeni bir yöntem olduğu görülmüştür.

## KAYNAKLAR.

Abdel-Wahab M. H., El-Mahdy M. A., Abd-Ellah M. F., Helal G. K., Khalifa F., Hamada F. M. A. (2003), *Influence of p-coumaric acid on doxorubicin induced oxidative stress in rat's heart*, Pharmacological Research, **48**, 461-465.

Andrade P., Ferreres F., Gilb M. I., Tomas-Barberan F. A. (1997), *Determination of phenolic compounds in honey with different floral origin by capillary zone electrophoresis*, Food Chemistry **60**, 79-84.

Anonim, <http://en.wikipedia.org/wiki/Phenols>", (2007).

Anonim, <http://ull.chemistry.uakron.edu/chemsep/electrophoresis/> (2003).

Baker D. R., Capillary Electrophoresis, John Wiley and Sons Inc. USA (1995).

Bektaş N., *Bazı fenolik asitler ve kombinasyonlarının antioksidan aktivitelerinin değerlendirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniv., Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, (2005).

Carrasco-Parcoba A., Cifuentes A., Cortacero-Ramírez S., Segura-Carretero A., Femández-Gutiérrez A. (2006), *Coelectroosmotic capillary electrophoresis of phenolic acids and derivatized aminoacid using N,N-dimethylacrylamide-ethylpynolidine methacrylate physically coated capillaries*, Talanta, **71 (1)**, 397-405.

Cadenas E., Packer L. (2002), *Handbook of Antioxidants*, Marcel Dekker, Inc., 2nd Edition, New York, p: 279-337, p: 473-489.

Esteves I. V., Lima L. D. D., Duarte C. A. (2007), *Optimization of phenolic compounds analysis by capillary electrophoresis*, Talanta. **72 (4)**, 1404-1409.



Ferguson L.D., Harris P.J.A. (1999), *Protection against cancer by wheat bran: role of dietary fibre and phytochemicals*. Cancer Society Research Centre, University of Auckland Faculty of Medicine and Health Science, New Zealand. *European Journal of Cancer Prevention* **8**, 17-25.

Fukumoto L.R., Mazza G. (2000), *Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds*, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **48**, 3597-3604.

Gonzalez J., Cruz J. M., Dominguez H., Parajo J. C. (2004), *Production of antioxidants from Eucalyptus globulus wood by solvent extraction of hemicellulose hydrolysates*, *Food Chemistry*, **84**, 243-251.

Hamoudova R., Urbanek M., Pospisilova M., Polasek M. (2004), *Assay of phenolic compounds in red wine by on-line combination of capillary isotachopheresis*, *Journal of Chromatography A*, **1032**, 281-287.

Ho C. (1991), *Phenolic compounds in food*, American Chemical Society Symposium Series **506**, 2-6.

Huang M., Ferraro T. (1991), *Phenolic compounds in food cancer prevention*, American Chemical Society Symposium Series **507**, 8-35.

Labieniec M., Gabryelak T., Falcioni G. (2003), *Antioxidant and prooxidant effects of tannins in digestive cells of the freshwater mussel Unio tumidus*, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **539**, 19-28.

Marinova E.M., Yanishlieva N.V. (2003), *Antioxidant activity and mechanism of action of some phenolic acids at ambient and high temperatures*, *Food Chemistry*, **81**, 1019-26.

Minussi R. C., Rossi M., Bologna L., Cordi L., Rotilio D., Pastore G. M., Duran N. (2003), *Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines*, *Food Chemistry*, **82**, 409-416.

Peyrat-Maillard M. N., Bonnely S., Berset C. (2000), *Determination of the antioxidant activity of phenolic compounds by coulometric detection*, *Talanta* **51**, 709-716.

Robbins R.J. (2003), *Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology*, Food Composition Laboratory, Beltsville Human Nutrition Research Center, USA, **10**, 2866-2887.

Scampiochio M., Wanga J., Mannino S., Chatrathi P. M. (2004), *Microchip capillary electrophoresis with amperometric detection for rapid separation and detection of phenolic acids*, *Journal of Chromatography A*, **1049**, 189-194.

Skoog A.D., Holler F. J., Nieman T. A. (1997), *Principles of Instrumental Analysis*.

Sousa W. R., Rocha C., Cardoso C. L., Silva S., Zanoni M. (2004), *Determination of the relative contribution of phenolic antioxidants in orange juice by voltammetric methods*, *Journal of Food Composition and Analysis*, **17**, 619-633.

Sroka Z., Cisowski W. (2003), *Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids*, *Food and Chemical Toxicology* **41**, 753-758.

Stokes K.Y., Cooper D., Tailor A., Granger D.N. (2002), *Hypercholesterolemia promotes inflammation and microvascular dysfunction: role of nitric oxide and superoxide*, *Free Radical Biology and Medicine*, **33**, 1026-1036.

Tapiero H., Tew K.D., Nguyen BA G., Mathe G. (2002), *Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies*, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **56**, 200-207.

Yu L., Zhou K., *Antioxidant properties of bran extracts from 'Palte' wheat grown at different locations*, *Food Chemistry*, **90**, 311-316.