

T.C
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YENİ AMİD – SİLİKA KOLON DOLGU MADDESİ
KULLANILARAK SİTOKİNİNLERİN HPLC İLE AYRILMASI
VE OPTİMİZASYONU**

Duygu HAŞİMİ

YÜKSEKLİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR

EYLÜL 2013

TEŞEKKÜR

Yüksek lisansıma başladığım günden bugüne , beni öğrencisi olarak kabul ettiği andan itibaren , değerli bilgilerini, sevgisini, anlayışını ve güler yüzünü benden esirgemeyen , bana en güzel biçimde örnek ve maddi manevi destek olan, çok değerli hocam , danışmanım Prof.Dr.Berrin ZİYADANOĞULLARI'na ,

Bana hem çalışkanlığı hem de azmiyle çok şey öğreten ve sentezledikleri kolon dolgu maddesini benle paylaşan , bu yüksek lisans projesinin ortaya çıkmasında en az benim kadar çabalayan , destek veren değerli hocalarım başta Batman Üniversitesi Kimya Bölümü Araştırma Görevlisi Dr.Hayriye ARAL ve eşi Batman Üniversitesi Öğretim Üyesi Yar.Doç.Dr. Tarık ARAL'a ,

Kantitatif tayinimde yardımcı olan yol gösteren hocam Batman Üniversitesi Öğretim Üyesi Doç.Dr. Abdülkadir LEVENT'e,

Çalışmalarımın tamamını laboratuvarlarında yürütmeme müsaade eden Batman Üniversitesi Kimya Bölümü Başkanlığı'na

Çalışmalarına DÜBAP 13-FF-55 nolu projeye katkı sağlayan DÜBAP'a , Fen Bilimleri Enstitüsü'ne ve Kimya Bölüm Başkanlığı'na,

Her arayıp makale isteyişimde bana olumlu geri dönen, çalışkan hocam Uzm.Dr. Cezmi KAYAN'a ,

Her aradığımda konuşmamızın sonunda beni kendime getiren, iyi hissettiren ,sırdaşım, hem büyüğüm hem küçüğüm , canım kardeşim Durul DOKTOROĞLU'na,

Batman'daki geniş ailem-Batman'da olamayanlar da dahil- tüm Haşimi ailesi üyeleri;erkek kardeşlerim Muhammed Nur HAŞİMİ ,Mehmet Sait HAŞİMİ, Ahmet HAŞİMİ ve kız kardeşlerim Dilay HAŞİMİ, Zeynep KIZILTEPE ve Hicret HAŞİMİ, yeğenlerim Ekrem Arda, Yusuf Kerem 'e,

Evladıma benden daha güzel bakan , sabrıyla ve güler yüzüyle bana hep örnek olan , beni her zaman sabırla idare eden sevgili kayınvalidem ikinci annem Teveddüd HAŞİMİ'ye,

Hayatımın anlamı , bir gülüşüyle tüm sıkıntımı bana unutturan, güzel yavrum Zehra HAŞİMİ'ye,

Yüksek lisansımın başlamasını sağlayan , her zaman yanımda olan ve bana benden daha fazla güvenen, destek olan ,akıl veren, yolumun ışığı gözümün nuru sevgili eşim Nurullah HAŞİMİ'ye,

Beni bugünlere tek başına getiren, gece gündüz çalışarak okumamız için her türlü fedakarlığı bana ve kardeşime yapan , başaramayacağımı bir gün bile düşünmeyen , hem annem hem babam , en güçlü kadın ve en güzel azim örneğim, canım annem Reyhan DOKTOROĞLU'na,

Teşekkürü bir borç bilirim

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
ÖZET	IV
ABSTRACT	V
ÇİZELGELER LİSTESİ	VI
ŞEKİL LİSTESİ	VII
KISALTMA VE SİMGELER	IX
1. GİRİŞ	1
1.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi.....	1
1.1.1. HPLC Sistemleri.....	1
1.1.2. Sürekli Faz.....	2
1.1.3. Sabit Faz.....	3
1.1.4. Pompa.....	3
1.1.5. Kolon.....	4
1.1.6. Dedektör.....	4
1.1.7. HPLC Türleri.....	5
1.1.7.1. Normal Faz Kromatografisi (Normal Phase Chromatography, NPC).....	5
1.1.7.2. Ters Faz Kromatografisi (Reversed Phase Chromatography, RPC).....	5
1.1.7.3. Büyüklükçe Ayırma Kromatografisi (Size Exclusion Chromatography, SEC).....	5
1.1.7.4. İyon Değişim Kromatografisi (Ion Exchange Chromatography, IEC).....	5
1.1.8. HPLC Kullanım Alanları.....	6
1.1.9. Alıkonma Parametreleri.....	7
1.1.10. Bant Genişliği.....	8
1.1.11. Kolon Verimliliği.....	9
2. KAYNAK ÖZETLERİ	11
2.1. Sitokininler.....	11
2.1.1. Sitokininlerin Analizleri.....	12
2.2. HPLC’de Kolon Dolgu Maddeleri.....	18
2.2.1. Silika jel.....	19
2.2.2. Polar Gömülü (Embedded) Fazlar.....	20

3. MATERYAL VE METOD	23
3.1. Materyal.....	23
3.2. Metod.....	24
3.2.1. HPLC Koşulları.....	24
3.2.2. Tampon Çözeltilerin Hazırlanması.....	26
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	27
4.1. Sitokinlerin Ayrılmasında pH Optimizasyonu.....	27
4.2. Sitokinlerin Ayrılmasında Çözücü Optimizasyonu.....	29
4.2.1. ACN Oranı Değişimi.....	30
4.2.2. Tampon Çözelti Derişimi Değişimi.....	32
4.2.3. Tampon Çözelti Cinsi Değişimi.....	33
4.3. Sitokinlerin Ayrılmasında Sıcaklık Optimizasyonu.....	35
4.4. Sitokinlerin Kantitatif Tayini.....	37
4.4.1. LOD ,LOQ , Tekrarlanabilirlik Hesaplamaları.....	37
4.4.2. Standart Ekleme Yöntemi ve Geri Kazanım Hesaplamaları.....	42
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	53
6. KAYNAKLAR	57
ÖZGEÇMİŞ	67

ÖZET

YENİ AMİD – SİLİKA KOLON DOLGU MADDESİ KULLANILARAK SİTOKİNİNLERİN HPLC İLE AYRILMASI VE OPTİMİZASYONU

YÜKSEKLİSANS TEZİ

Duygu HAŞİMİ

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

2013

Kompleks yapılar gösteren yüksek organizasyonlu canlılar düzenli olarak büyüyüp gelişebilmek için hücreler arası iletişime ihtiyaç duyarlar. Bitkilerde bu iletişimi bitki büyüme hücreleri sağlar. Sitokininler bitkinin büyüme ve gelişmesini uyarıp hızlandıran azotlu purin bazı türevleridir.

Kromatografik ayırma yöntemleri arasında en yaygın kullanım alanına sahip olan ayırma çeşidi yüksek performanslı sıvı kromatografisidir. Son yıllarda polar gömülü denilen ve genellikle amid , karbamat , sülfonamid gibi grupları bünyesinde bulunduran kolon dolgu maddeleri , bilinen C₁₈ kolonlarına nazaran bazik analitlerin ayrılmasında daha iyi sonuç vermiş ve ayırma üstünlüğünde bir adım daha öne geçmişlerdir.

Bu çalışmada daha önce Aral. (2013) doktora tezinde sentezlenen SP1 amid bağlı polar gömülü kolon dolgu maddesi kullanılarak sitokinin örnekleri ayırmaya çalışılmıştır. Yapılan çalışmada mobil faz , pH, sıcaklık gibi parametreler kullanılarak optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Ayrıca elimizde bulunan doğal bitki özü numunesi ile kantitatif olarak çalışma hazırlanmıştır. Yapılan çalışmada LOD , LOQ gibi validasyon parametreleri uygulanmış ve kolonun çeşitli doğal analitlerin kantitatif tayininde de uygulanabileceği kanıtlanmıştır.

ABSTRACT

SEPARATION AND OPTIMIZATION OF CYTOKININS WITH USING NEW AMIDE - SILICA STATIONARY PHASE WITH HPLC

M.Sc THESIS

Duygu Haşimi

DİCLE UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

2013

Highly organised organisms which shows complex structures for growing and developing, need communications between cells. In plants , plant growth regulators provide this communication. Cytokinins are nitrogen purine base derivatives that, accelerates plant growth and development.

High performance liquid chromatography is the most common separation type which is used in chromatographic separation methods. In recent years , the stationary phases which is called polar embedded and generally includes groups like amide , cabamate and sulfonamide , gave better results in separation of basic analytes instead of conventional C₁₈ columns and moved one step forward about separation superiority.

In this study, cytokinin examples was tried to separate with using SP1 amide –bonded polar embedded stationary phase which was synthesized in Ph.D.Thesis of Aral (2013) earlier. In the study, with using some parameters like mobile phase , pH, temperature some optimizations studies were made. Also , a quantitative study was prepared with natural plant extract that we had. In the study , some validation parameters like LOD ,LOQ were applied and proved that column can be applied the quantitative determination of the various natural analytes.

ÇİZELGELER LİSTESİ

<u>Çizelge No</u>		<u>Sayfa</u>
Çizelge 4.1	Zeatin için derişim ve pik yüksekliği değerleri ve kalibrasyon grafiği	38
Çizelge 4.2	Kinetin için derişim ve pik yüksekliği değerleri ve kalibrasyon grafiği	38
Çizelge 4.3	Thidiazuron için derişim ve pik yüksekliği değerleri ve kalibrasyon grafiği	39
Çizelge 4.4	6-(V-V)dimetilallilaminopürin için derişim ve pik yüksekliği değerleri ve kalibrasyon grafiği	39
Çizelge 4.5	Benzilaminopürin için derişim ve pik yüksekliği değerleri ve kalibrasyon grafiği	40
Çizelge 4.6	Sitokinin örneklerinin 0.9mg/L derişimde tekrarlanabilirlik sonuçları	40
Çizelge 4.7	Maddelerin hesaplanan standart sapma , LOD ve LOQ değerleri	41
Çizelge 4.8	İlave edilen CK çözeltisiyle numunedeki zeatin piki ve derişimi değişimi	45
Çizelge 4.9	İlave edilen CK çözeltisiyle numunedeki kinetin piki ve derişimi değişimi	46
Çizelge 4.10	İlave edilen CK çözeltisiyle numunedeki thidiazuron piki ve derişimi değişimi	47
Çizelge 4.11	İlave edilen CK çözeltisiyle numunedeki AAP piki ve derişimi değişimi	48
Çizelge 4.12	İlave edilen CK çözeltisiyle numunedeki BAP piki ve derişimi değişimi	49
Çizelge 4.13	Zeatin için elde edilen derişim değerleri ve % geri kazanım	50
Çizelge 4.14	Kinetin için elde edilen derişim değerleri ve % geri kazanım sonuçları	50
Çizelge 4.15	TDZ için elde edilen derişim değerleri ve % geri kazanım sonuçları	51
Çizelge 4.16	AAP için elde edilen derişim değerleri ve % geri kazanım sonuçları	51
Çizelge 4.17	BAP için elde edilen derişim değerleri ve % geri kazanım sonuçları	52

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil No</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1	Bir HPLC Cihazının Bileşenleri	2
Şekil.2.1	Tipik Bir Polar Gömülü(embedded) Faz Gösterimi	21
Şekil 3.1.	SP1'in Sentez Şeması. Reaktifler ve Koşullar; <i>i</i> : DCC, 0°C-oş, saat; <i>ii</i> : TFA/AcOH (1:1, v:v), DCM; <i>iii</i> : toluen, riflaks, 4 gün	24 23
Şekil 3.2	SP1 Dolgu Maddesinin Yapısı	24
Şekil 3.3	Çalışmada Bulunan Sitokininlerin Molekül Şekilleri	25
Şekil 4.1	Sitokininlerin Ayrılmasında Farklı pH kullanılarak Yapılan Ayırma ve Etkisi	
a)	pH:3.37 10 mmol İzokratik elüsyon %20 ACN/fosfat tampon akış hızı:1ml/dk T:22°C dalgaboyu:270nm enjeksiyon hacmi:10µl	28
b)	pH:4.15 10 mmol İzokratik elüsyon %20 ACN/fosfat tampon akış hızı:1ml/dk T:22°C dalgaboyu:270nm enjeksiyon hacmi:10µl	28
c)	pH:5.09 10 mmol İzokratik elüsyon %20 ACN/fosfat tampon akış hızı:1ml/dk T:22°C dalgaboyu:270nm enjeksiyon hacmi:10µl	28
d)	pH:6.11 10 mmol İzokratik elüsyon %20 ACN/fosfat tampon akış hızı:1ml/dk T:22°C dalgaboyu:270nm enjeksiyon hacmi:10µl	29
e)	pH:8.09 10 mmol İzokratik elüsyon %20 ACN/fosfat tampon akış hızı:1ml/dk T:22°C dalgaboyu:270nm enjeksiyon hacmi:10µl	29
Şekil 4.2	Sitokininlerin Ayrılmasında ACN Oranı Değişimi ve Etkisi	
a)	pH:5.48 10mmol İzokratik elüsyon akış hızı:1ml/dk %18 ACN/ fosfat tamponu T:22°C dalgaboyu:270nm enjeksiyon hacmi:10µl	30
b)	pH:5.48 10mmol İzokratik elüsyon akış hızı:1ml/dk %19 ACN/ fosfat tamponu T:22°C dalga boyu:270nm enjeksiyon hacmi:10µl	30
c)	pH:5.48 10mmol İzokratik elüsyon akış hızı:1ml/ %20 ACN/ fosfat tamponu T:22°C dalga boyu:270nm enjeksiyon hacmi:10µl	31
d)	pH:5.48 10mmol Gradyent elüsyon akış hızı:1ml/dk 0-30 dk %30 -%10 ACN/ fosfat tamponu T:22°C dalga boyu:270nm enjeksiyon hacmi:10µl	31
e)	pH:5.48 10mmol Gradyent elüsyon akış hızı:1ml/dk 0-20 dk %30 -%10 ACN/ fosfat tamponu T:22°C dalga boyu:270nm enjeksiyon hacmi:10µl	31
Şekil 4.3	Sitokininlerin Ayrılmasında Tampon Derişimi Değişimi ve Etkisi	
a)	pH:5.48 10 mmol İzokratik elüsyon akış hızı:1ml/min %20 ACN/ fosfat tamponu dalga boyu:270nm T:22°C enjeksiyon hacmi:10µl	32
b)	pH:5.48 20 mmol İzokratik elüsyon akış hızı:1ml/min %20 ACN/ fosfat tamponu dalga boyu:270nm T:22°C enjeksiyon hacmi:10µl	32
c)	pH:5.48 30 mmol İzokratik elüsyon akış hızı:1ml/min %20 ACN/ fosfat tamponu dalga boyu:270nm T:22°C enjeksiyon hacmi:10µl	33
d)	pH:5.48 40 mmol İzokratik elüsyon akış hızı:1ml/min %20 ACN/ fosfat tamponu dalga boyu:270nm T:22°C enjeksiyon hacmi:10µl	33

Şekil 4.4	Sitokininlerin Ayrılmasında Tampon Cinsi Değişimi ve Etkisi	
a)	pH:5.48 10 mmol İzokratik elüsyon Akış hızı:1ml/min %20 ACN/Fosfat tamponu dalga boyu:270nm T:22 ⁰ C enjeksiyon hacmi:10µl	34
b)	pH:5.48 10 mmol İzokratik elüsyon Akış hızı:1ml/min %20 ACN/Asetat tamponu dalga boyu:270nm T:22 ⁰ C enjeksiyon hacmi:10µl	34
Şekil 4.5	Sitokininlerin Ayrılmasında Sıcaklık Değişimi ve Etkisi	
a)	pH:5.48 10 mmol İzokratik elüsyon akış hızı:1ml/dk %20 ACN/fosfat tamponu dalga boyu :270nm enjeksiyon hacmi:10µl T:20 ⁰ C	35
b)	pH:5.48 10 mmol İzokratik elüsyon akış hızı:1ml/dk %20 ACN/fosfat tamponu dalga boyu :270nm enjeksiyon hacmi:10µl T:25 ⁰ C	35
c)	pH:5.48 10 mmol İzokratik elüsyon akış hızı:1ml/dk %20 ACN/fosfat tamponu dalga boyu :270nm enjeksiyon hacmi:10µl T:30 ⁰ C	36
d)	pH:5.48 10 mmol İzokratik elüsyon akış hızı:1ml/dk %20 ACN/fosfat tamponu dalga boyu :270nm enjeksiyon hacmi:10µl T:40 ⁰ C	36
e)	pH:5.48 10 mmol İzokratik elüsyon akış hızı:1ml/dk %20 ACN/fosfat tamponu dalga boyu :270nm enjeksiyon hacmi:10µl T:60 ⁰ C	36
Şekil 4.5	Bitki Özü Numunesinin Optimum Şartlarda Ayrılması	42
Şekil 4.6	Optimum Şartlarda 4 defa Aşamalı Olarak Eklenen CK Çözeltilisinin Bitki Özü Örneğinde Oluşan Etkisi	
a)	Bitki numunesine 1.kez 50µl eklenen CK çözeltisiyle oluşan kromatogram	43
b)	Bitki numunesine 2.kez 50µl eklenen CK çözeltisiyle oluşan kromatogram	43
c)	Bitki numunesine 3.kez 50µl eklenen CK çözeltisiyle oluşan Kromatogram	44
d)	Bitki numunesine 4.kez 50µl eklenen CK çözeltisiyle oluşan Kromatogram	44
Şekil 4.7	Zeatinin Eklenen Çözelti İlavesiyle Değişen Derişimine Karşılık Pik Yüksekliği Kalibrasyon Grafiği	45
Şekil 4.8	Kinetinin Eklenen Çözelti İlavesiyle Değişen Derişimine Karşılık Pik Yüksekliği Kalibrasyon Grafiği	46
Şekil 4.9	Thidiazuron Eklenen Çözelti İlavesiyle Değişen Derişimine Karşılık Pik Yüksekliği Kalibrasyon Grafiği	47
Şekil 4.10	AAP Eklenen Çözelti İlavesiyle Değişen Derişimine Karşılık Pik Yüksekliği Kalibrasyon Grafiği	48
Şekil 4.11	BAP Eklenen Çözelti İlavesiyle Değişen Derişimine Karşılık Pik Yüksekliği Kalibrasyon Grafiği	49

SİMGELER VE KISALTMALAR

HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
RPLC	: Ters Faz Sıvı Kromatografisi
LC	: Sıvı Kromatografisi
MS	: Kütle Spektrometresi
CE	: Kapiler Elektroforez
ELISA	: Enzim Bağlı İmmünosorbent Analizi
ESI	: Elektron Sprey İyonlaştırıcı
HILIC	: Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi
DCC	: Disiklohegzilkarbodiimid
TFA	: Trifloroasetikasit
AcOH	: Asetik Asit
DCM	: Diklorometan
CK	: Sitokinin
Z	: Zeatin
K	: Kinetin
TDZ	: Thidiazuron
AAP	: 6-(γ - γ)dimetilallilaminopürin
BAP	: Benzilaminopürin
ACN	: Asetonitril
T	: Sıcaklık
LOD	: Tayin Sınırı
LOQ	: Ölçüm Sınırı
SS	: Standart Sapma
RSD	: Bağıl Standart Sapma

1.GİRİŞ

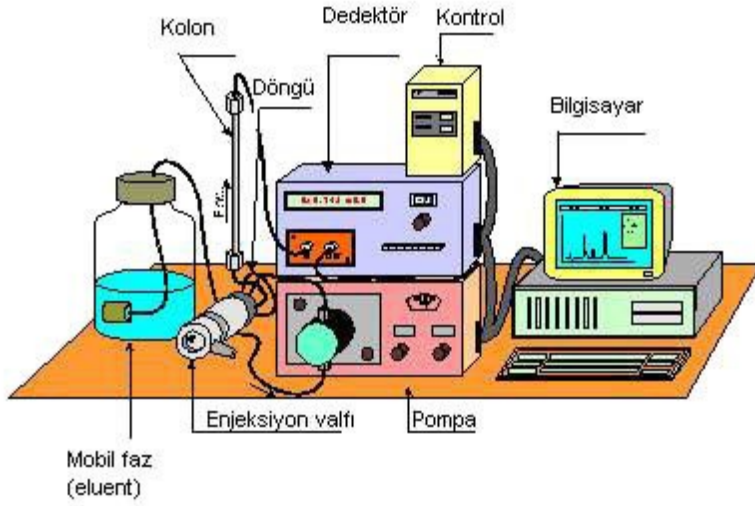
1.1 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

Kromatografik yöntemler, sabit faz ve hareketli faz arasında olan kütle aktarımını içeren ayırma teknikleri olarak tanımlanabilir. Bu yöntemlerden biri olan sıvı kromatografisi, 1900'lü yılların başlarında bulunmuş ve 1960'lı yıllardan itibaren sıvı kromatografisinin geliştirilmesi için geniş çapta araştırmalar yapılmaktadır.

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ise sıvı fazda çözünebilen bir kimyasal karışımın kolay ve hızlı bir şekilde bileŐenlerine ayrılabilmesi oldukça duyarlı bir yöntemdir (LC Applications). Uygun çözücü kullanılarak çözülen örnek karışımı (analitler), yüksek basınç altında kromatografik kolondan geçirilir ve burada bileŐenlerine ayrılır. Bileşenlerin birbirinden ayrılması ve bunun derecesi (resolution parameter), analitler ile sabit faz arasındaki etkileşime bağlıdır ve önemlidir. Sabit faz, kolon içerisindeki hareketsiz dolgu materyali olarak tanımlanır. Analitler ile sabit ve sürekli fazlar arasında istenilen etkileşim sürekli faz olarak kullanılan çözücülerin ve sabit fazın deėiŐtirilmesi ile elde edilebilir.

1.1.1 HPLC Sistemleri

HPLC sistemi, Sekil 1.1'de de görüldüğü gibi pompa, enjektör, kolon, dedektör ve bilgisayar birimlerinden oluşmaktadır. Kromatografik analiz süreci, çözücüde çözülmüş örneğin sisteme enjekte edilmesi ile başlar. Bu sistemin kalbi, ayırmanın gerçekleştiği kolondur. Hareketli (sürekli) faz ile birlikte kolona pompalanan örnek, kolon içinde bileŐenlerine ayrılmaya başlar. Her bileşenin gönderdiği sinyaller dedektör tarafından kaydedilir. Dedektör tarafından kaydedilen ve bilgisayara aktarılan sinyallerin tamamı kromatogram olarak adlandırılır.



Şekil 1.1 BirHPLC cihazının bileşenleri

1.1.2 Sürekli Faz

HPLC uygulamalarında sürekli faz (elüent) türü ve bileşimi kromatografik performansı etkileyen faktörlerden biridir. HPLC sistemlerinde birçok sürekli faz kullanılmasına rağmen, bunların bazı ortak özellikleri şunlardır:

- Yüksek derecede saflık
- Dedektör ile uyumluluk
- Düşük viskozite
- Örneği çözebilme
- Kimyasal acıdan inert olması
- Uygun fiyat

Her bir HPLC türünde kullanılan sürekli fazlar birbirinden farklıdır. Normal-faz sıvı kromatografisinde apolar, ters-faz sıvı kromatografisinde su ve asetonitril karışımı gibi polar çözücüler sürekli faz olarak kullanılır.

1.1.3 Sabit Faz

HPLC uygulamalarındaki ayırma, yüzey etkileşimlerinden yararlanılarak yapılır ve adsorbent çeşidine ve özelliklerine bağlıdır. Modern HPLC adsorbentleri geniş yüzey alanına sahip, küçük, rijit yapıdaki partiküllerdir. Temel adsorbent özellikleri şunlardır: (Chromatography, 1995; Hossoyova ve ark. , 2001):

- 3-10 µm partikül boyutu
- Olabildiğince eş boyutlu, ortalamanın \pm % 10'una denk gelecek partikül boy dağılımı
- 70-300 Å gözenek boyutu
- 50-250 m²/g yüzey alanı
- Yüzeye tutturulan ligand türüne bağlı olarak, adsorbent normal faz (-OH, -NH₂) veya ters faz (C₈, C₁₈, fenil) hatta anyon (NH₄) ya da kation (-COO-) değiştirici yapıda olabilir.

1.1.4 Pompa

Kolon dolgu materyali olarak üretilen partiküllerin kolon içerisine doldurulması işlemi ve uygun çözücüde çözünen örneğin bu sabit faz ve sürekli faz yatağıyla etkileşmesi için yüksek basınçlı pompalara ihtiyaç vardır. Kullanılan partiküllerin boyutu küçüldükçe uygulanan basıncın da artırılması gerekmektedir. Ancak küçük partiküller yüksek çözünürlük, hızlı analiz ve yüksek örnek yükleme kapasitesi gibi bir takım avantajlara da sahiptir. Kararlı akış hızı pompalarda aranan bir özelliktir.

Modern pompalar aşağıdaki özelliklere sahiptir:

- 0.01-10 ml/dk arasında akış hızı
- % 1'den fazla sapmayan akış hızı kararlılığı. Bu akış hızı kararlılığı büyüklükçe ayırma kromatografisinde % 0.2'den az olmalıdır.
- 5000 psi'ye kadar çıkabilen maksimum basınç değeri

1.1.5. Kolon

Tipik HPLC kolonları 10, 15, 25 cm uzunluğunda, küçük boyutlu partikül içeren (3, 5 veya 10 µm) ve iç çapı 4, 4.6 ya da 7.8 mm olan yüksek basınca dayanıklı çelik kolonlardır. Bu boyutlar örnek kapasitesi, sürekli faz tüketimi, hız ve ayırıcılık açısından yüksek performans sağlayan değerlerdir. Kolonun küçük çaptaki partiküllerle doldurulması ve verimli bir şekilde çalıştırılması deneyim, beceri ve özel cihazlar gerektiren bir çalışmadır. Bu yüzden çoğu HPLC kullanıcısına hazır doldurulmuş kolonları kullanmaları önerilir.

1.1.6. Dedektör

Günümüzde kromatografik sistemlerde yaygın olarak kullanılan dedektör tipi optik dedektörlerdir. Örnek bileşenleri dedektörden geçerken, UV absorpsiyonundan, floresans emisyonundan ya da kırılma indisindeki değişimden dolayı ışık şiddetindeki değişim belirlenir ve kaydedilir. Belirlenen bu değişimler (kromatogramlar) üzerinden alıkonma süreleri, pik alanları gibi değerler tayin edilerek, kolon performans parametreleri hesaplanır. Sıvı kromatografisinde en çok kullanılan dedektör tipi UV absorpsiyon dedektörleridir. Bu dedektörler ile 190 nm'den 460-600 nm'ye kadar olan dalga boylarında örneğin analizinin yapılması mümkün olmaktadır. Kullanılan diğer dedektör türleri içinde kırılma indisi (refractive index, RI), floresans (FL), elektrokimyasal (EC) ve kütle spektrometrik (mass-spectrometric, MS) dedektörler bulunmaktadır. RI dedektörleri yaygın olarak kullanılan ancak az hassasiyete sahip dedektörlerdir. FL ve EC, RI'ya göre daha hassas, ancak daha seçici dedektörlerdir. MS dedektörleri ise çok hassas, güçlü ancak pahalı ve karmaşık sistemlerdir.

İdeal bir dedektör şu özelliklere sahip olmalıdır:

- Yüksek duyarlılık
- Hızlı tepki
- Düşük sinyal gürültüsü
- Minimum pik yayılması
- Ayrılan bantların tekrar karışmasını engelleyen hücre yapısı

- Çalışma kolaylığı ve genişliği

1.1.7. HPLC Türleri

Sıvı kromatografisini sınıflandırmanın birçok yolu vardır. Eğer bu sınıflandırma sabit fazın yapısına ve ayırma prosesine göre yapılırsa, HPLC 4 farklı türde incelenebilir.

1.1.7.1. Normal Faz Kromatografisi (Normal Phase Chromatography, NPC):

Bu türde sabit faz oldukça polar yapıda (örneğin silika jel), sürekli faz ise n-hekzan ya da tetrahidrofurana gibi apolar yapıdadır. Burada polar olan kolon dolgu materyali ile etkileşen polar örneklerin alıkonma süreleri daha az polar olan örneklere oranla daha fazladır. Bu nedenle örnek bileşenlerinden daha polar olanlar, kolondan daha geç çıkarlar ve ayırma gerçekleşir.

1.1.7.2. Ters Faz Kromatografisi (Reversed Phase Chromatography, RPC):

Normal faz kromatografisinin tam tersidir. Sabit faz apolar (hidrofobik), sürekli faz ise su ve asetonyitril karışımı gibi polar yapıdadır. Burada apolar yapıdaki örnek bileşenleri kolonda daha uzun kalırlar

1.1.7.3. Büyüklükçe Ayırma Kromatografisi (Size Exclusion Chromatography, SEC):

Kolon, gözenek boyutu ve hacmi kontrol edilebilen partiküller ile doldurulur. Kolona enjekte edilen örnek içerisindeki bileşenler molekül büyüklüklerine göre kolondan filtre edilirler. Büyük moleküller hızlı bir şekilde kolondan ayrılırken, daha küçük moleküller partiküllerin gözeneklerine doğru difüzlenererek kolondan daha geç çıkarlar. Bu yöntemde jel geçirgenlik kromatografisi (Gel Permeation Chromatography, GPC) de denir.

1.1.7.4. İyon Değişim Kromatografisi (Ion Exchange Chromatography, IEC):

Sabit faz, örnek bileşenleri üzerinde yer alan iyonik yapının tersi şeklinde yüklenmiştir. Bu sayede iyonik yapıda olan veya iyonlaşabilen örneklerin analizi ve ayrılması yapılmaktadır. Sabit faz ile daha güçlü etkileşime giren bileşen kolondan daha

geç çıkar. Etkileşim düştükçe alıkonma süresi azalır. Mobil faz sulu tampon çözeltileridir. pH ve iyonik şiddet alıkonma sürelerinin kontrolünde kullanılır.

HPLC’de kullanılan sürekli fazın polaritesi ayırma işleminde önemli rol oynar. İki farklı elüsyon tipi vardır:

- **İzokratik Elüsyon:** Kolona sabit bileşimdeki sürekli faz pompalanır. Sürekli fazın polaritesi sabit olduğu için kolona çok fazla ilgi duyan bileşenleri kolondan atmak zorlaşır ve elüsyon süresi uzar. Maddelerin molekül büyüklüğüne göre tayini de bu elüsyon türü ile gerçekleşir.
- **Gradient Elüsyonu:** Sürekli faz bileşimi analiz boyunca doğrusal olarak değişir. Analiz örneğinin kolon dolgu materyali yüzeyine afinitesi önemlidir. Ortamdaki elüentin polaritesi zamanla değiştirilerek örneklerin partikül yüzeyine afinitesi değiştirilir ve ayırma sağlanır

1.1.8. HPLC Kullanım Alanları

Günümüzde yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Başlıca kullanım amaçları kimyasal ayırma, saflaştırma, tanımlama ve derişim tayinidir.

- **Kimyasal Ayırma:** HPLC’de kimyasal ayırma işlemi, her maddenin belli bir sabit faz ve mobil faz bileşiminde farklı çıkış süresinin olmasından yararlanılarak yapılmaktadır. Yapılan kimyasal ayırmanın derecesi çoğunlukla sabit faz ve mobil faz seçimine bağlıdır.
- **Saflaştırma:** Saflaştırma hedeflenen bir maddenin diğer maddelerden ya da atıklardan ayrılması işlemidir. Her maddenin belli kromatografik koşullar altında karakteristik bir piki bulunur. Ayrılması istenen maddeye göre ve diğer maddelerle olan ilişkisine göre koşullar belirlenir. Kromatografik saflaştırma işleminde, istenilen madde kolon çıkışında toplanarak diğer fraksiyonlardan izole edilir, bu ise ancak doğru bir mobil faz seçimiyle mümkündür. İstenilen maddenin kolondan çıkış süresi herhangi bir safsızlık veya istenmeyen bir maddenin karışmasını engelleyecek kadar kısa olması gereklidir.

• Tanımlama: Bir maddenin HPLC ile tanımlanması HPLC analizlerinin önemli bir parçasını oluşturur. HPLC’de madde tanımlaması, bilinmeyene ait olan pik alıkonma süresinin standarda ait alıkonma süresiyle karşılaştırılması ile yapılabilir. Herhangi bir maddenin HPLC ile tanımlanabilmesi için öncelikle dedektörün doğru seçilmesi gerekir. Dedektör seçildikten ve optimum koşullarda ayarlandıktan sonra bir ayırma analizi yapılmalıdır. Tanımlanmaya çalışılan maddenin seçilen dedektör ve analiz koşullarında kabul edilebilir bir çıkış süresi ve belirgin bir piki olmalıdır. Çıkış süresini kısaltmak için bazı ayarlamalar yapılabilir. Bunlardan ilki kolon seçimi, diğeri mobil faz seçimi ve son olarak da akış hızı seçimidir. Kesin bir tanımlama için bilinen bir örneğin kullanılması gerekir. Güvenilir bir tanımlama için birden çok metot kullanılmalıdır.

• Derişim Tayini: HPLC’de tanımlı bir maddenin, bir sıvı çözeltilisinde derişimi tayin edilebilir. Bu işlem istenilen maddenin değişik konsantrasyonlarda HPLC’ye enjekte edilmesi işlemini içerir. Bilinen konsantrasyonlar bir seri pik verir. Bu piklerin altında kalan alanlar hesaplanarak derişime karşı grafiğe geçirilir ve kalibrasyon grafiği çizilir. Bilinmeyen derişime ait pik alanı saptanarak kalibrasyon eğrisi aracılığıyla bilinmeyen derişim bulunur.

1.1.9. Alıkonma Parametreleri

Kromatografik alıkonmayı öğrenmenin en kolay yolu, örneğin kolona enjekte edildiği noktadan kolon boyunca ilerleyen bileşiğin dedektörde verdiği maksimum cevap arasındaki zamanı ölçmektir. Bu zamana alıkonma zamanı (retention time, tR) denir. Alıkonma zamanı sürekli faz akış hızı ile ters orantılıdır. Diğer bir parametre alıkonma hacmidir (VR). Alıkonma hacmi, bir bileşenin kolondan çıkması için gerekli olan elüent miktarıdır. Alıkonma süresi ve sürekli faz akış hızının çarpımına eşittir. Akışkanın hızına bağlı değildir, ancak partiküllerin geometrik şekli yani gözenek büyüklüğüne bağlıdır.

1.1.10. Bant Genişliği

Bir kromatografik analiz sırasında örneğin sisteme enjekte edilmesinden sonra kolon içindeki akışkanın hareketi sırasında kromatografik piklerin aralığı genişler. Daha büyük kolon bant genişliği, belli bir zaman aralığında daha az miktarda bileşenin ayrışması anlamına gelir. Başka bir deyişle piklerin keskinliği kolon veriminin ne kadar iyi olduğunu gösterir. Kolonda bant genişlemesi üç ana sebepten kaynaklanır.

1. Kolon içinde ilerleyen bir bileşene ait moleköl veya iyonların farklı yollarizlemesi: Bu parametre sürekli fazın akış hızından bağımsızdır. Kolon dolgu maddesinin çok küçük tanecikli olarak alınması bu parametrenin etkisini azaltabilir.

2. Fazlar arasındaki kütle transferi etkisi: Bileşenlerin sabit faz ile hareketli faz arasında dağılma dengesine ulaşması için belirli bir süreye ihtiyaç vardır. Eğer akış hızı yüksekse ve örneğin kolona güçlü bir afinitesi varsa , hareketli fazdaki örneğ sabit fazdaki örneğin önüne geçecektir. Bu da dengenin tam olarak kurulamamasına yani bant genişlemesine neden olacaktır. Hareketli faz viskozitesi düşürmek ve kolon sıcaklığını arttırmak bu terimin etkisini azaltabilir.

3. Kolonda bileşenlerin yüksek derişimli bölgelerden düşük derişimli bölgelere doğru difüzyonla dağılması: Örneğ konsantrasyonu kolon kenarlarında kolon merkezinde olduğundan daha düşüktür. Örneğ kolon merkezinden dışarıya doğru difüzenir. Bu etki düşük akış hızlarında daha da önem kazanır. Ayrıca bu parametre bileşenlerin hareketli faz içindeki difüzyon katsayılarının değerleri ile doğru orantılı olarak artar. Hareketli fazın akış hızını düşürmek örneğin kolonda daha az zaman harcamasına neden olur bu da difüzyonunun artması demektir. Ayrıca sıcaklığın düşürölmesi de bu etkiyi azaltıcı yönde etki yapar.

1.1.11 Kolon Verimliliği

Bir kromatografik analizde optimum bir ayırma gerçekleştirmek yani kolon veriminin en üst seviyede olduğunu göstermek için keskin ve simetrik piklerin eldesi şarttır. Kolon verimliliğini tayin edilirken pik genişliği, teorik tabaka sayısı, indirgenmiş plaka yüksekliği, seçicilik ve çözünürlük gibi parametreler göz önüne alınır.

- Pikin genişliği, pikin keskinliğini ve kolon verimini gösterir. Bununla beraber pik genişliği kolonun uzunluğu, akış hızı ve partikül büyüklüğü gibi birçok parametreden etkilenir. Aynı kolonda yapılan analizlerde akış hızı değiştirilebilecek tek parametre olduğundan, akış hızı kolon verimliliğinin en iyi olacağı değerde seçilmelidir.
- Teorik tabaka sayısı; damıtma prosesindeki benzerlikten gelir. Kolonun hızlı çalışmasının önemli bir göstergesidir. Elde edilen kromatografik piklerin keskinliği bir kolonun verimini gösteriyorsa, bu verimin nicel ölçüsü de teorik tabaka sayısıdır. Tabaka sayısı ya da diğer adıyla teorik tabaka sayısı N ile gösterilmektedir ve aşağıdaki gibi hesaplanır:

$$N = 16 \times (t / W)^2$$

$$N = 5.54 \times (t / W^{1/2})^2$$

Burada t; bileşiğin alıkonma süresini, W; bileşik pikinin taban genişliğini ve $W^{1/2}$; pik yüksekliğinin yarısındaki taban genişliğini ifade etmektedir.

Bir kolonda teorik tabaka sayısı ne kadar yüksekse kolonun verimi o kadar yüksek demektir. Kolon boyu arttıkça teorik tabaka sayısında da artış gözlenir.

- İndirgenmiş tabaka yüksekliği; h ile gösterilir. Kolonun ne kadar hızlı ve etkili çalıştığını gösterir. N ile ters orantılıdır. Bir kolonda N değeri ne kadar büyükse yani h değeri ne kadar küçükse kolonun verimi o kadar yüksektir. Daha düşük indirgenmiş tabaka yüksekliği ve daha fazla teorik tabaka sayısı kısa sürede kromatografik sonuçların elde edilmesi demektir. h değerini büyüten her etken kolon verimini düşürür ve pik genişlemesine neden olur. h değeri aşağıdaki gibi hesaplanır:

$$H = (L / N \times dp)$$

burada H; indirgenmiş tabaka yüksekliği, L; kolon boyu ve dp de partikül çapıdır.

• Seçicilik, her bir pikin kapasite oranları veya bunların düzenlenmiş alıkonma zamanlarının oranıdır. Seçicilik karışımdaki bileşenlerin partikül yüzeyine adsorplanmasındaki ilgisi olarak ifade edilmektedir. Bu parametre kolonun veriminden bağımsızdır. Sadece bileşenin doğal yapısına, elüent tipine, elüent bileşimine ve yüzey adsorbansına bağlıdır. Genellikle iki bileşiğin seçiciliği 1'e ne kadar yakınsa iki pikin birbirinden ayrılması o kadar güçleşir. Aşağıdaki gibi hesaplanır:

$$\alpha = \frac{tr_{,B} - t_0}{tr_{,A} - t_0}$$

Burada $tr_{,B}$ ve $tr_{,A}$ sırasıyla B ve A bileşenlerinin alıkonma sürelerini, t_0 ise kolondaki boşluk hacmi yani kolonla etkileşime girmeden hareketli bir fazın kolondan çıkması gerekli olan süreyi ifade etmektedir.

• Çözünürlük (ayırıcılık, R), kromatografide iki pikin birbirinden ayrılma derecesine denir. İki pikin birbirinden ayrıldığını kabul etmek için $R = 1$ olması gerekir ve bu çözünürlük değeri iki bandın birbiri ile % 2 oranında örtüştüğü anlamına gelir. Bu değer 1.5'den büyük ise pikler tamamen ayrılmış ve iyi bir çözünürlük elde edilmiş demektir. Çözünürlük aşağıdaki formül ile hesaplanmaktadır:

$$R_{(i+1)/i} = 2 \times (t_{i+1} - t_i) / (W_i + W_{i+1})$$

Burada t_i ve t_{i+1} ; sırasıyla i ve i+1 no'lu bileşenlerin alıkonma süreleri, W_i ve W_{i+1} ise sırasıyla i ve i+1 no'lu bileşenler için elde edilen taban genişliklerini ifade etmektedir.(Tomruk E. , 2005)

2.KAYNAK ÖZETLERİ

Kompleks yapılar gösteren yüksek organizasyonlu canlılar düzenli olarak büyüyüp gelişebilmek için hücreler arası iletişime ihtiyaç duyarlar. Bitkilerde bu iletişimi sağlayan temel araç, bilgiyi kimyasal mesaj olarak hücreden hücreye taşıyan bitki büyüme düzenleyicileridir (Özen ve Onay, 1999 , Öktüren ve Sönmez , 2005). Genel anlamda doğal olarak bitkilerde sentezlenen, büyüme ve buna bağlı diğer fizyolojik olayları kontrol eden, meydana geldiği yerden bitkilerin diğer kısımlarına taşınarak taşındığı bölgelerde de etkin olabilen, çok az konsantrasyonlarda bile etkisini gösterebilen organik moleküllere hormon (bitki büyüme düzenleyicileri) adı verilmektedir. (Akman ve Darıcı, 1998 , Öktüren ve Sönmez , 2005).

Bitki büyüme düzenleyicileri çok küçük miktarlarda (mikromolar ya da mikro molardan daha düşük) etkili , doğal olarak elde edilen ya da sentetik olan maddelerdir. (Hui ve ark.2001) Kompleks karışımlardaki hormonların analizleri için sofistike analitik teknikler vardır.(Kelen ve ark. , 2004)

2.1.Sitokininler

Sitokininler , bitki hücresi döngüsünün devamlılığında ve çok sayıda gelişimsel proste merkez rolü oynayan bitki özellikli kimyasal mesaj taşıyıcıları (hormonlar)dır.(Schmülung , 2004) Bitki dokularında özellikler hücre bölünmeleri esnasında ortaya çıkan , diğer hormonların aksine , hem bitkilerde hem de hayvanlarda bulunan kinin yapısındaki organik maddelerdir. (Kumlay ve ark. , 2011) (Te – chato ve ark. , 2008) Hücre bölünmesinin uyarılmasına ek olarak , sitokininler , doku kültüründe sürgün ve kök farklılaşması , lateral tomurcukların büyümesi , yaprak gelişimi , kloroplast gelişimi ve senesens üzerinde de etkilidir. (Özen ve Onay , 1999) (Öktüren ve Sönmez , 2005)

Bilinen sitokininler , (örn;kinetin ve zeatin) anti-aging , anti-karsinojen ve anti – trombotik etkiler gösterir. (Vermeulen ve ark. , 2002) (Rattan ve ark. , 2005) Sitokininlerin hızlı analizleri bitki fizyologları için çeşitli fizyolojik prosesi anlamada ve diğer çeşitli disiplinlerden bilim adamları için (örn, moleküler biyologlar ve klinisyenler) özellikle meme kanseri gelişimini önlemedeki potansiyel rolü nedeniyle büyük önem taşımaktadır. (Ge ve ark. , 2004)

Doğal olarak oluşmuş sitokinler N^6 pozisyonundaki yan zinciri olan adenin türevleridir. N^6 –bağlı yan zincirin yapısı ve konformasyonu sitokininin biyolojik aktivitesini çok net bir şekilde etkileyebilmektedir.(Schmülung , 2004) N^6 ekine bağlı olarak bu maddeler , izoprenoid (zeatin- tipi) , türevleştirilmiş – izoprenoid (dihidrozeatin- tipi) ve aromatik sitokinler (benziladenin tipi)olarak sınıflandırılabilir ve serbest bazlar halinde ortaya çıkabileceklerinin yanısıra aminoasit ve şekerlerin konjugesi de olabilirler. (Letham ve Palni, 1983) Sitokinler , nükleotitler , nükleozitler , bazlar ve pürin halkasında 3- , 7- , ya da 9- pozisyonu ile ya da N^6 izoprenoid zinciri ile şekerler ile konjuge olabilir.(Mok ve Mok , 2001 ; Sakakibara , 2006 ; Chen ve ark. , 2010) Ayrıca bilinen fenilüre türevleri gibi sitokinin aktivitesine sahip diğer bileşikler de mevcuttur. (Novak ve ark., 2003)

2.1.1.Sitokin Analizleri

Sitokin analizi yapabilmek için aşılması gereken ana konular şunlardır: Kompleks matrislerde , eser miktardaki ağırlıkları (fmol – pmol/gram miktar) ; farklı kimyasal özelliklerde ve sitokin izomerleri oluşumuna sebep olan büyük yapısal çeşitlilik (bilinen yaklaşık 50 adet sitokin türevi tanımlanmıştır.) (K.Podlesakova , 2012)

Bitki ekstraktlarının kompleks , multi komponent karışım halinde olması nedeniyle , net sitokin tayini yalnızca yüksek saflıktaki örnekler ve immünoanalizler ve kütle spektrometri gibi seçici tayin metotları ile yapılabilir. (Astot ve ark. , 1998) Analitik teknikleri gelişmesiyle , birçok kesin ve duyarlı sitokin tayini metotları kullanılmış ve yazılmıştır. Biyoanalizler , immünoanalizler , elektroanaliz ve özellikle gaz kromatografisi , kapiler elektroforez ve en çok da çiftlendirildiği farklı dedektörlerle yüksek performanslı sıvı kromatografisi , bitkilerdeki sitokin tayini için geliştirilmiştir.(Liang ve ark. , 2009 ; Tarkowski ve ark. , 2009 ; Du ve ark. , 2012)

Kapiler elektroforez sitokin analizleri için uygun gibi görünebilir. Yöntemin temel avantajları yüksek hız , yüksek ayırma verimliliği , basitliği ve düşük tampon ve madde gereksinimidir.(Ge ve ark. , 2006) Ancak kapiler elektroforez uygulamalarında temel bir geri çekilme ile karşılaşılır: tayin sınırı HPLC ve GC ‘ye kıyasla daha yüksektir ve bu durum kısıtlanmış enjeksiyon hacimlerine ve UV tayininde daha kısa

optik yola sebep olur. (K.Podlesakova , 2012) Sitokinin tayini için CE yöntemleri olarak CZE (kapiler zone elektroforez) ve MEKC (miselar elektrokinetik kromatografi) sayılabilir.(Tarkowski ve ark.2009) CZE için Ge ve ark.'nın (2005) yaptığı hindistan cevizi suyunda kinetin ve kinetin ribozit tayini , MEKC için Liu ve ark.'nın (2001) yaptığı tütünde bitki hormonu tayini sayılabilir.

Sitokininler sık sık yapısal olarak benzer maddelerle birlikte oluşurlar ve bu nedenle CE tayin sınırlarının altında olabilirler. Bu sınırlandırmayı aşmak için sıvı – sıvı çözücü ekstraksiyonu (Redig ve ark. , 1996) , büyük hacim madde istiflemesi (Liu ve ark. , 2001) ve katı faz ekstraksiyonu (Dobrev ve Kaminek , 2002) gibi saflaştırma ve ön deriştirme yöntemleri sitokinin analizlerinde kullanılır. (Ge ve ark . , 2004)

Gaz kromatografisine bağlı metotlar yüksek çözünürlük ve düşük LOD 'ye sahiptir , çok iş gerektiren ve çok pahalı olmasına rağmen 1970'ler öncesinden beri sitokininlerin analizinde kullanılmaktadırlar. (Tarkowski ve ark. , 2009) Doğal olarak oluşmuş sitokininler uçucu olmayan bileşiklerdir. Çalışılan maddelerin analiz öncesi türevleştirilmesi , analizlerde GC kullanımı gerilemesine neden olmuştur. (Novak ve ark. , 2003) GC için sitokininlerin uçucu türevlerine dönüşmelerindeki ön koşul , hidrojen bağlı fonksiyonel grupların kimyasal modifikasyonudur.(Astot ve ark. , 1998) Türevleştirme metotları bazı teknik problemlere sebep olmuştur. Trimetilsilil (Most ve ark. , 1968 ; MacLeold ve ark. , 1976), trifloroasetil (Ludewig ve ark. , 1982)ve *t*-bütildimetilsilil (Hockart ve ark. , 1986) türevleri hidrolize maruz bırakılmıştır. Ayrıca permetilasyon (Scott ve Horgan , 1984 ; Horgan ve ark. , 1987) ve trimetilsililasyon sonuçları çoklu ürün türevleri vermiştir. Asetilasyon kararlı ve kolay türev üretilmesini sağlamıştır ancak türevlerde uçuculuk yeterli değildir.(Björkman ve Tillberg , 1996 ; Novak ve ark. , 2003) Yine de hem sitokininlerin tanınmasında hem de kantitatif tayini için GC – MS , LC – MS ile yer değiştirinceye kadar , rutin analitik metot olarak kullanılmıştır. (Tarkowski ve ark . 2004 ; Tarkowski ve ark. , 2010) Örnekler arasında Huntley ve ark.'nın sitokinin ve giberellinleri palmye yağından ELISA ile tayini ve bunları GC-MS ile onaylaması verilebilir.

İmmünoanaliz teknikleri , sitokinin seviyesini tayin etmek için duyarlı ve oldukça ucuz bir alternatif olarak kullanılabilir.(Novak ve ark. , 2003) Her ayırma tekniği diğerinden daha fazla avantajı olduğunu önerirken , immünolojik metotlar , hızı , duyarlılığı ve örnek kullanma kabiliyeti ile etkileyicidir ve çok sayıda fitohormonun

çeşitli derecedeki başarılı analizinde geniş biçimde kullanılmıştır.(Maldiney ve ark. , 1986 ; Rosher ve ark. , 1985 ; Yamaguchi ve ark. , 1987 ; Morris ve ark. 1991) İki adet bilinen sitokinin immünoanaliz formu; radyoimmünoanaliz (RIA)(Grayling ve Hanke , 1992) ve enzim bağlı immünoanalizdir.(ELISA)(Maldiney ve ark. , 1986) Fakat sinsilasyon yaklaşım analizi de ayrıca sayılabilir.(SPA)(Wang ve ark. , 1995 ; Tarkowski ve ark. , 2009)

Bitki ekstraktlarının özel HPLC birimlerinin radyoimmünoanalizi ya da enzim bağlı immünomadde analizi yöntemi ile analizinde temel dezavantaj - antibodylerin zıt reaktivitesi – üstesinden gelinebilir.(Strnad ve ark. 1992 ; Novak ve ark. , 2003). Diğer dezavantajları olarak , doğru olmayan validasyon ve bitkisel örneklerinin analizlerinin değişken sonuçları sayılabilir. (Tarkowski ve ark. , 2009)

Diğer metotlarla kıyaslandığında sıvı kromatografisi – kütle spektrometresi (LC-MS) sitokinlerin biyolojik örneklerden karakterizasyonunda , kalitatif ve kantitatif tayininde en geniş çaplı kullanılan metottur. (Du ve ark. , 2012) HPLC-MS , özellikle ters faz sıvı kromatografisi ile MS (RPLC – MS) yüksek çözünürlüklü ayırması , yüksek duyarlılığı ve hedef analitlerin kaçamaksız direkt tanımlanabilmesi ile en sık kullanılabilen tekniktir. (Liu ve ark. , 2012) HPLC ile ayırma yöntemlerinin kullanımı 1970’li yıllardan itibaren kendini göstermeye başlamıştır. Carnes ve arkadaşları (1975) , sitokinlerin C₁₈ kolonuyla ters fazla ayrılabilceğini savunurken , Thomas ve arkadaşları (1975) , izokratik elüsyon ve polivinilpirolidon (PVP) destek maddesiyle , basit ve ucuz biçimde sitokinlerin ayrılabilceğini göstermiştir.90’lı yıllara gelindiğinde sitokinler için kromatografik ayırma çalışmaları da çeşitlenmiştir. Morris ve arkadaşları (1990) sitokinlerin hızlı tanımlanmasında HPLC – ELISA yöntemini kullanırken , Genkov ve ark. (1996) aynı yöntemi kantitatif tayin için uygulamıştır. Chen , (1990) tomurcuklanma döneminde lychee bitkisindeki sitokinin değişimini HPLC’yi biyoanaliz ve GC – MS – iyon seçici gözlem sistemiyle (SIM) açıklamıştır.

LC-MS uygulaması , bitki dokusu ekstraktlarında bulunan biyolojik olarak anlamlı seviyelerdeki sitokinlerin tanınması , miktarının belirlenmesi ve karakterizasyonu için yeni bir araç olarak önerilmiştir.(Tarkowski ve ark. , 2009) Sitokinlerin , MS analizlerinin RP – HPLC olan kombinasyonunda elektrosprey (ES) , termosprey (TS) atmosfer basınçlı kimyasal iyonizasyon (APCI) ve hızlı atom bombardımanı gibi farklı iyonizasyon teknikleri kullanılmıştır. Prinsen ve arkadaşları

(1997) , ilk LC-ESI-MS/MS ile çoklu reaksiyon gözlemcisi (MRM) uygulamasını izopentenil transferaz gönderilmiş *Nicotiana tabacumcalli* 'deki sitokinin tayininde yapmıştır. Burada 1 pmol tayin sınırı olan 16 farklı maddenin enjeksiyonuyla kantitatif tayini sağlanmıştır.(Novak ve ark. , 2003) Prinsen ve arkadaşları (1995) ayrıca , kapsamlı biçimde mikro , kapiler ve bilinen LC yönteminin sıralı MS (MS²) dedektörüyle önemli analitik parametreleri (duyarlılık , doğrusal aralık , dayanıklılık , ve örnek verileri) fitohormon analizinde karşılaştırmıştır. (Tarkowski ve ark. , 2009)

Görülüyor ki , LC-MS yönteminin GC – MS 'e olan en temel avantajı , türevleştirme basamağının olmayışıdır. Fakat , duyarlılığı arttırmak ve LC -MS analizlerinde , daha iyi spektral bilgi alabilmek için ön kolon türevleştirilmesi yapılmıştır.(Astot ve ark. , 1998 ; Tarkowski ve ark. , 2009) Astot ve ark.(1998) , ön kolon deriştirilmesi ve kapiler sıvı kromatografi / hızlı atom bombardımanlı (FAB) kütle spektrometresi kullanılarak *Arabidopsis Thaliana* bitkisinden 10 izoprenoid sitokinini tanımlama ve kantitatif tayinini gerçekleştirmeye çalışmıştır. Diğer bir FAB kullanılan yöntem olarak Tarkowska ve ark.'nın (2003) LC-(+)ESI – MS ve kapiler sıvı kromatografisi/FAB-MS yaptığı çalışmayı sayabiliriz.Bu çalışmada 12 sitokinin 20 dakika gibi bir zamanda fakat çok kapsamlı ve ayrıntılı bir çalışma ile ayrılmıştır.

Frit – FAB – MS kullanımı yazılsa da ESI-MS en sık kullanılan sitokinin analiz yöntemi olmuştur. (Tarkowski ve ark. , 2009) Novak ve ark. (2003) LC – tekli kuadrapol –MS ile hem ayırma hem de kantitatif tayin yapmış ve 20 sitokinin çeşidini 30 dakikada ayırmıştır. Tarkowska ve ark. (2003) polar maddelerin analizi için yukarıda anlattığımız çalışmasını burada da örnek verebiliriz. Çalışmada hem LC – ESI –MS hem de Frit – FAB – MS kullanılmış aynı zamanda ön kolon deriştirilmesi de eklenerek sitokinin analizlerine farklı bir bakış açısı kazandırılmaya çalışılmıştır. Ge ve ark. (2005) , LC –MS yöntemine HPLC ve CZE eklemiş ve bunların kombine haliyle hindistan cevizi suyundan kinetin ve kinetin ribozit tayinine çalışmıştır. Çalışmaya baktığımızda 18 sitokinin standardının 10 dakika gibi kısa bir sürede ayrıldığını görebiliriz. Chen ve ark. (2010) , HPLC'ne ESI- iyon yakalayıcı – MS dedektörünü eklemiştir. Bu şekilde 12 adet sitokinini 60dk.da ayırırken , kantitatif tayininde yüksek oranda geri dönüşüm sağlanmıştır. Tarkowski ve ark. (2010) 2-metiltiyo sitokinin türevlerini ayırmada HPLC-MS kullanırken 6 adet türev uygun kromatografik ayırmayla tüm parametreleri (alığınma zaman duyarlılığı , LOD , geri dönüşüm ,

doğrusal ara ve analitik kesinlik) çalışılmış ve önceki yapılan çalışmalarla kıyas yapılmıştır. Beres ve ark.(2010) , ters faz sıvı kromatografisi ve kütle spektrometresi kullanarak insan K – 562 lösemi hücresinde sitokin nükleotit miktarını tayin etmeye çalışmıştır. Bu çalışmada iyon paylaşım reaktifi kullanılmamıştır.

HPLC – ESI – MS ayırma yöntemi dışında sitokin çalışmalarına farklı örnekler de verebiliriz. Fletcher ve Mader (2007) , *Macadomia Integrifolia* bitkisini kullanarak sitokinler , giberellinler , absisik asit ve oksin tayin etmeye çalışmıştır. Bu tayin sırasında yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi kuadrapol uçuş süreli sıralı kütle spektrometresi (HPLC – QToF –MS) ile birlikte kullanılmıştır. QToF – MS kullanımıyla yüksek seviyede duyarlılığı artırılmış yöntem daha kesin ve yüksek çözünürlüğe sahip olmuştur. (Fletcher ve Mader , 2007) Başka farklı bir yorum da Du ve ark. (2012) tarafından çalışılmıştır. Burada LC-MS/MS monolitik moleküler baskılı katı faz ekstraksiyonu(mMI-SPE-LC-MS/MS) daha seçici ve duyarlı bir ayırma gerçekleştirmeye çalışılmıştır. Bu metotla bitki ekstraktlarındaki 4 adet sitokin ayrılması ve tayini başarılı şekilde uygulanmıştır.

Sitokinler 220 nm ve 300 nm arasında kuvvetli UV absorbanları sergilediği için kantitatif tayinlerde UV dedektörü uygun olabilmektedir. (Tarkowski ve ark. , 2009) Diopan ve ark. (2009) bitki hormonları ve onların metabolitlerini HPLC ve UV-Vis dedektörü kullanarak tayin etmeye çalışmıştır. Bu amaçla yapmış oldukları deneyde 14 adet sitokin 30 dk . sürede ayrıldığı gözlenmiş ve ayırmanın hassaslığı için sonrasında MS dedektörü de eklenmiştir. Türkiye’de de Kelen ve ark. (2004) absisik asit , indol – 3 – asetik asit ve giberellik asiti , 99R (*Vitis berlandieri x Vitis Rupestris*) ve gül yağından RP-HPLC kullanarak ayırmış ve burada hareketli fazın pH ve polaritesinin önemine dikkat çekmiştir.

Sitokin ayırmalarında farklı bir yorum Liu ve arkadaşlarından gelmiştir. Liu ve ark. (2010) , hidrofilik etkileşim kromatografisi (HILIC) ile sitokin çalışmalarına katılmıştır. Başka bir çalışmada Liu ve ark. (2012) manyetik katı faz ekstraksiyonunu , HILIC ve MS ile birleştirmiştir ve ortaya MSPE – HILIC – MS/MS yöntemi çıkmıştır. Bu yöntem oldukça hızlı ve duyarlı bir yöntemdir. 8 adet sitokinini 20 dakika süresinde tayin edebilmiştir.

Günümüzde , sitokinlerin HPLC ile ayırma ve analizi RP-C₁₈ ya da C₈ kolonları kullanılarak uygulanmaktadır. (Novak ve ark. , 2003 ; Ge ve ark. , 2005 ; Van

Rhijn ve ark. , 2001) İyi bir ayırma elde edebilmek için genellikle , gradiyent elüsyonun içerisinde giderek artan organik değiştirici madde kullanılır. Sitokinlerin hazırlayıcı saflaştırma safhası için 150x10 mm boyutlu kolonlar hem madde yükleme kapasitesi hem de fiyatı arasında karşılıklı iyi bir anlaşma olabilmektedir.(Horgan ve Scott , 1987) Sitokinin analizinde kullanılan HPLC kolonları ; geleneksel (4,6 mm) , dar – delikli (2,1 mm) , mikro (1 mm) ve kapiler kolonlar (0,3 mm) olarak sayılabilir. (Ge ve ark. , 2005 ; Van Rhijn ve ark. , 2001 ; Fernandez ve ark. , 1995 ; Tarkowski ve ark. , 2009)

Yeni gelişmeye başlamış olan ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi (UHPLC-MS/MS) metodu HPLC –MS/MS yönteminin tüm parametrelerinde daha iyi performans göstermiştir. (Novak ve ark. , 2003 ; Podlesakova , 2012) UPPLC enstrümantasyonu , 1000 bar'a kadar basınçta sıvı akışını değiştirebilmiş ve 1,7µm partiküllü kolon dolgusuyla doldurulmuştur, bu nedenle UPLC , bilinen HPLC enstrümantasyonunun kromatografik limitlerinin üstünde gelişmiştir. UPLC daha yüksek çözünürlük , daha düşük maddelere duyarlılık ve daha hızlı ayırmaları başarabilmiştir. (Dolezal ve ark. , 2007 ; Schwartzberg ve ark. , 2007) UPLC-MS , seçicilik , duyarlılık ve hızın içinde bulunduğu mükemmel avantajlarıyla sitokinin çalışmaları için şüphesiz çok uygun olduğunu göstermiştir. (Dolezal ve ark. , 2007 ; Schwartzberg ve ark. , 2007 ; Novak ve ark. , 2008) Schwartzberg ve ark. (2007) , hızlı ve verimli bir UPLC –MS² metoduyla biryofit *Phycomitrella Pantens* 'te bulunan 40 çeşit sitokinin profilini tespit etmiştir. Dolezal ve ark. (2007) , *Arabidopsis Thaliana* ve *Agro BacteriumTumefaciens* ekstraktlarındaki aromatik sitokinlerde bulunan sitotoksik maddeleri ayırmada UPLC –MS² metodunu uygulamıştır. Novak ve ark. (2008) bitkilerdeki sitokinin profili için , standart bir HPLC analizinden 4 kat daha hızlı olan hızlı ve verimli UPLC – MS² yöntemi kullanmıştır. (Tarkowski ve ark. , 2009) Kojima ve ark. (2009) UPLC'yi sıralı kuadrapol kütle spektrometresi ve elektrosprey arayüz ile birleştirilmiş ve böylece sitokinler , oksinler , absisik asit , ve giberellinlerin 43 adet moleküler çeşidinin hızlı analizi için bir metot geliştirilmiştir. Bu yöntem 100 mg'dan daha az bitkisel madde tayinine izin verirken , 180 'den fazla bitki örneğinin analizine yardımcı olmaktadır.

2.2.HPLC’de Kolon Dolgu Maddeleri

HPLC’de kolon dolgu fazları üçe ayrılabilir. Bunlar polimerik , inorganik ve hibrid materyallerdir. Günümüzde silika , hidroksiapatit , grafit ve metal oksit içeren inorganik materyaller , araştırma ve uygulamada geniş çapta kullanılmaktadır. Bu materyaller arasında , silika oldukça ideal bir destek maddesidir. Şöyle ki; silika mekanik dayanıklılık , yüksek kimyasal ve termal kararlılık , yüzeyindeki silanol gruplarının , por yapısının ve yüzey alanının kontrol edilebilmesi bakımından oldukça avantajlıdır. Bundan dolayı silika en yaygın olarak kullanılan HPLC dolgu materyali olarak gelişmektedir.(Qui ve ark. , 2011 ;)

Ters faz sıvı kromatografisinde , ayırma işleminde dolgu maddesi önemli bir rol oynar. HPLC ilk geliştirildiğinde , dolgu maddesi viskoz bir sıvı ile kaplı inert desteklerden oluşmaktaydı. (Dorsey ve ark . , 1994) Ancak böyle bir dolgu maddesi üzerinden geçen bir hareketli faz varlığında, dolgu maddesinin kaplı olduğu viskoz sıvıyı korumanın olanaksız olması dolgu maddelerinin yetersiz ve sınırlı olduğunun kanıtıydı. Bir ligandın silil eter (-Si – O – Si -) bağları üzerinden katı bir desteğe kovalent olarak bağlanmasıyla elde edilen dolgu maddelerinin gelişimi bu problemi gidermiş ve modern sıvı kromatografisinin gelişimine katkıda bulunmuştur. Çeşitli fonksiyonel gruplara sahip dolgu maddeleri ticari olarak mevcuttur. Bununla beraber , katı desteğin ligand ile birçok firma kendi silikasını geliştirmektedir. (Dorsey ve ark. , 1994)

Sentez reaksiyonu üreticiler tarafından değişse de genel reaksiyon uygun bir ligandın silika destek maddesi üzerindeki silanol (Si – OH) ya da siloksanlara (Si-O-Si) kimyasal olarak bağlanmasını içerir. Genel olarak siloksanların düşük aktiviteye sahip oldukları kabul edilir , bundan dolayı , bağlanma işleminde sonuç göstermezler. Silanoller böylece bağlanma fazı için birinci bağlantı noktası olarak görev yapar. (Sander ve Wise , 1987)

İdeal olarak, dolgu fazı çeşitli karakteristik özelliklere sahip olmalıdır. Birincisi , destek materyali homojen bir yüzeye sahip olmasının yanı sıra kimyasal modifikasyonlara karşı cevap verebilmelidir. Ayrıca kimyasal ve termal olarak kararlı olmalı ve pH değişimine karşı uzun süre kararlılık göstermelidir. Bunlara ek olarak , HPLC’de yüksek basınç değerine direnmek için yüksek mekanik kararlılığa sahip

olmalıdır. Ticari olarak uygulanabilir olması için , üretim prosedürü son derece yinelenebilir olmalıdır. En önemlisi de dolgu fazları ayırma için gerekli selektiviteyi , tutunmayı ve geniş analit sınıfına uygulanabilirliği sağlanmalıdır.(Nawrocki ve ark. , 2004)

2.2.1 Silika Jel

Ticari olarak mevcut kolonların büyük bir kısmı silikajel tabanlıdır. Silikayı diğer dolgun fazlarından üstün kılan bazı avantajları vardır. Birincisi , silikanın kimyası iyi bilinmektedir ve fabrikasyon koşulları kolaylıkla kontrol altına alınabildiğinden istenilen ürünü elde etmek mümkündür. Silika jeller dar gözenek çapı dağılımlı , çok gözenekli ve yüzey alanlı ve düşük miktarda metal içeriği barındırabilirler. Silika ayrıca HPLC koşulları altında görülen basınçtan kaynaklı mekanik etki için ihtiyaç duyulan dayanıklılığa sahiptir. İlaveten , bu gözenekli parçalar çok büyük yüzey alanlarına sahiptir ki bu sayede örnek analitlerin alıkonması çok iyidir.(Kirkland ve ark. , 2002)

Mevcut silika jel tabanlı dolgu fazları geleneksel olarak düz bir alkil zinciri içeren ligand ile modifiye olmuştur. Bir çok sıvı kromatografisi analizleri oktadesilsiloksan (ODS) olarak bilinen C₁₈ dolgu fazlı kolon ile yapılır. Bunun yanı sıra karbon sayısı birden otuza kadar değişen dolgu fazları da mevcuttur. Son zamanlarda , alkil zincirinin iç kısmında polar bir grup içeren dolgu fazları popüler olmuştur. Bu tür dolgu fazları polar gömülü (embedded) dolgu fazları olarak adlandırılırlar. Temel polar gömülü gruplar amitler , karbamatlar yada eterlerdir. Bu polar gruplar silika yüzeyine yakın noktada bulunurlar. Devamında ise dolgu fazının hidrofobik doğası için gerekli karbon sayısı sekizden on sekize kadar değişen alkil grupları vardır.

Ligandın birinci bağlanma reaksiyonuna ilaveten trimetilklorosiloksan gibi kısa zincirli alkil silanlar kullanılarak geriye kalan silanollerle bloke edilmesi işlemine end-capping denir. Bu şekilde hem dolgu fazının kararlılığı hem de pik keskinliği artar. (Kirkland ve ark. , 1997 ; Kirkland ve ark., 1998 ; Pesek ve ark. , 2002) Benzer şekilde , dolgu fazın kararlılığını arttırmak için sterik engelli hacimli bağlanma fazları kullanılabilir. Bu dolgu fazları , dolgu fazını hidrolizden koruyan hacimli yan gruplara sahip monofonksiyonel alkilsilan içerir.

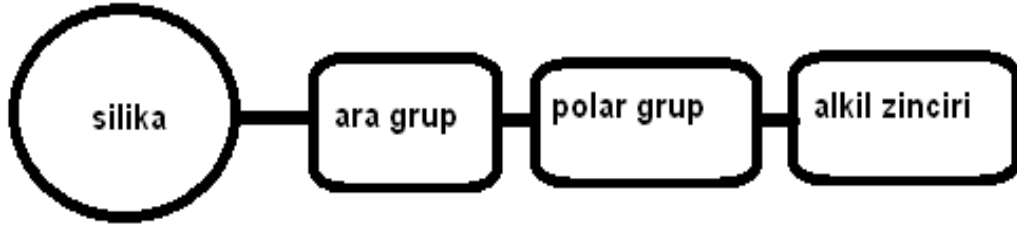
Çift dişli dolgu fazları özellikle daha yüksek pH değerlerinde üstün kararlılığa sahiptir. Bunlar monomerik dolgu fazlarına benzer , fakat bu dolgu fazları ek bir ara linke sahiptir ve bu ara link genellikle propilen grubudur. (Kirkland ve ark. , 1989 ; Kirkland ve ark. , 1998) Polimer içeren dolgu fazları ideal olarak kimyasal kararlılığı artırır. Kobayashi ve ark. (1998) , bu kolonların yüksek oranda karbon içerdiğini ve bunun da pik keskinliğini ve bazik hareketli fazlarda kararlılığı arttırdığını bulmuştur.

Son zamanlarda özel amaçlı dolgu fazları popüler olmakta ve spesifik uygulamalar için kullanılmaktadır. Örneğin , kiral dolgu fazları enantiyomerik ayırmalarda önemlidir. Tipik kiral dolgu fazları poliakkarit , protein , taç eter ve siklodekstrin içerir.(Zhou ve ark. , 2009) Fenil halkası içeren dolgu fazları da polisiklik aromatik hidrokarbonlara (PAHs) karşı aromatik selektivite göstermeye meyillidir. (Kayillo ve ark. , 2006 ; Euerby ve ark. 2007) Geleneksel alkil zincirli ligandlarla kıyaslandığında , siyano grubu bağlı dolgu fazları daha az hidrofobik özelliktedir. (Merchand ve ark. , 2005) Flor bağlı dolgu fazlarının özellikle halojenli analitlerin ayrılmasında popülerliği artmaktadır. Bu kolonlar , C₁₈ kolonlarla kıyaslandığında daha uzun alıkonma süresi ve daha yüksek bir selektivite gösterir. İlaveten , bu dolgu fazları süperkritik akışkan kromatografisi (SFC) , micellar elektrokinetik sıvı kromatografisi (MEKC) ve iyon kromatografisi gibi diğer ayırma modlarında da uygunluk gösterir.(Zhang , 2008 ; Aral, 2013)

2.2.2. Polar Gömülü(Embedded) Fazlar

Geleneksel C₈-C₁₈ durgun fazlar , ters faz ayırmalarında geniş kullanım alanına sahiptir. Fakat bu fazlarda doldurulmuş kolonlar , yüksek sulu hareketli fazlar ve bazik maddeler için zayıf pik şekilleri ve bazı dezavantajlara sahiptir. (Przybyciel ve Majors , 2002 ; Majors ve Przybyciel , 2002 ; Layne , 2002) Son on yılda , araştırmacılar , bunun gibi zorlukların üstesinden gelebilmek için polar – embedded serili durgun fazlar üretmişlerdir. (Ascah ve Feibush , 1990 ; Czajkowska ve Jaroniec , 1997 ; O’Gara ve ark. , 1995 ; Liu ve ark. , 2006 ; Majors , 2001 ; Majors , 2003) Bu fazlar silika yüzeyinin yanında birincil hidrofobik ve hidrofilik grupları içermektedir. Sıklıkla , amit , amin , karbamat , eter , ve sülfonamit fonksiyonel gruplar kullanılır. Genellikle polar – embedded grupların faydaları bazik maddeler için iyi pik şekil vermesi , yüksek sulu

derecedeki hareketli fazlarla uyumluluk göstermesi ve bilinen C₁₈ kolonlarına kıyasla yüksek ve özel seçicilik karakterine sahip olmasıdır. (Layne , 2002 ; Czajkowska ve Jaroniec , 1997 ; O’Gara ve ark. , 1995 ; Liu ve ark. , 2006 ; Liu ve ark., 2006)



Polar grup = amid, karbamat, üre, sülfonamid, alkil yada fenil eter

Ara grup = tipik propil ligandı

Alkil zinciri = C8 - C18

Şekil. 2.1 Tipik bir polar gömülü (embedded) faz gösterimi

Şekil 2.1 ‘de şematik diyagramı verilen polar – embedded gruplarının şekli verilmiştir , bir propil grubu olan ara grup , silika yüzeyi ve polar gruplar arasında yer alır. Son oluşan madde kimyasal fonksiyonları açısından bir miktar farklı olabilir. (amid , karbamat , alkil eter , fenil eter grupları...) C-alkil ligandı , liganda lifofilik karakter verir ve C₈’den C₁₈’e kadar zincir uzunluğu çeşitlendirilebilir. (Euerby ve Petersson , 2005) . Polar embedded gruplu fazlar , azalmış hidrofobisite ve metilen seçiciliği , azalmış hidrojen bağı kapasitesi , silanol aktivitesi ve iyon değişimi veya azot içeren dipol etkileşime bakarak çok özel ve spesifik seçiciliğe sahiptir. Azot içeren polar embedded fazlardaki pozitif karakterin bulunması nedeniyle asidik bileşikler nötral araştırmalara yakın olarak gelişmiş alıkonma karakteri gösterebilir ve bazik bileşikler , iyonik veya dipol etkileşimle fazlara azalmış alıkonma faktörleri özellikle düşük pH’da denenebilir. (Layne, 2002)

Silika tabanlı ters faz dolgu fazları pH 2 ile 8 arasında güvenli bir şekilde kullanılabilseler de pH 8’den sonra silika hidroliz olduğundan kullanımlarında ciddi sınırlamalar vardır. Bazik bileşiklerin analizi düşük pik keskinliği ve etkinliklerinden dolayı kromatografiler için bir problem olmuştur. Son araştırmalar asıl sebeplerin

daha karmaşık olduğunu gösterse de geleneksel bakış açısı bunu silanoller üzerindeki zayıf etkileşime bağlamaktadır. Nedenlere bakmaksızın yeni dolgu fazlarının gelişimi bazik analitler söz konusu olduğunda etkileşimi arttırmaya çalışmaktadır. Bu dolgu fazları geleneksel bağlanma fazından fiziksel olarak farklıdır. Çünkü bunlar alkil zincirinin içinde bir polar grup içerirler. Bu kolonlar ayırmada önemli avantajlar sağlasa da bazı dezavantajlara da sahiptir. Daha kısa alkil zincirine ve polar gruplara sahip olan gömülü (embedded) kolonlar yüksek ve düşük pH değerinde saf alkil zinciri içeren kolonlara göre daha zayıf kararlılık gösterir. (Kirkland ve ark., 1989)(Kirkland ve ark., 1995)(Kirkland ve ark., 1997)(Kirkland ve ark., 1998) Bundan dolayı daha kısa alkil zinciri ya da daha polar fonksiyonel grup içeren dolgu fazları yüksek polarlıktaki bileşiklerin ayırımında yüksek performans gösterse de daha kısa kolon ömrüne sahiptir.

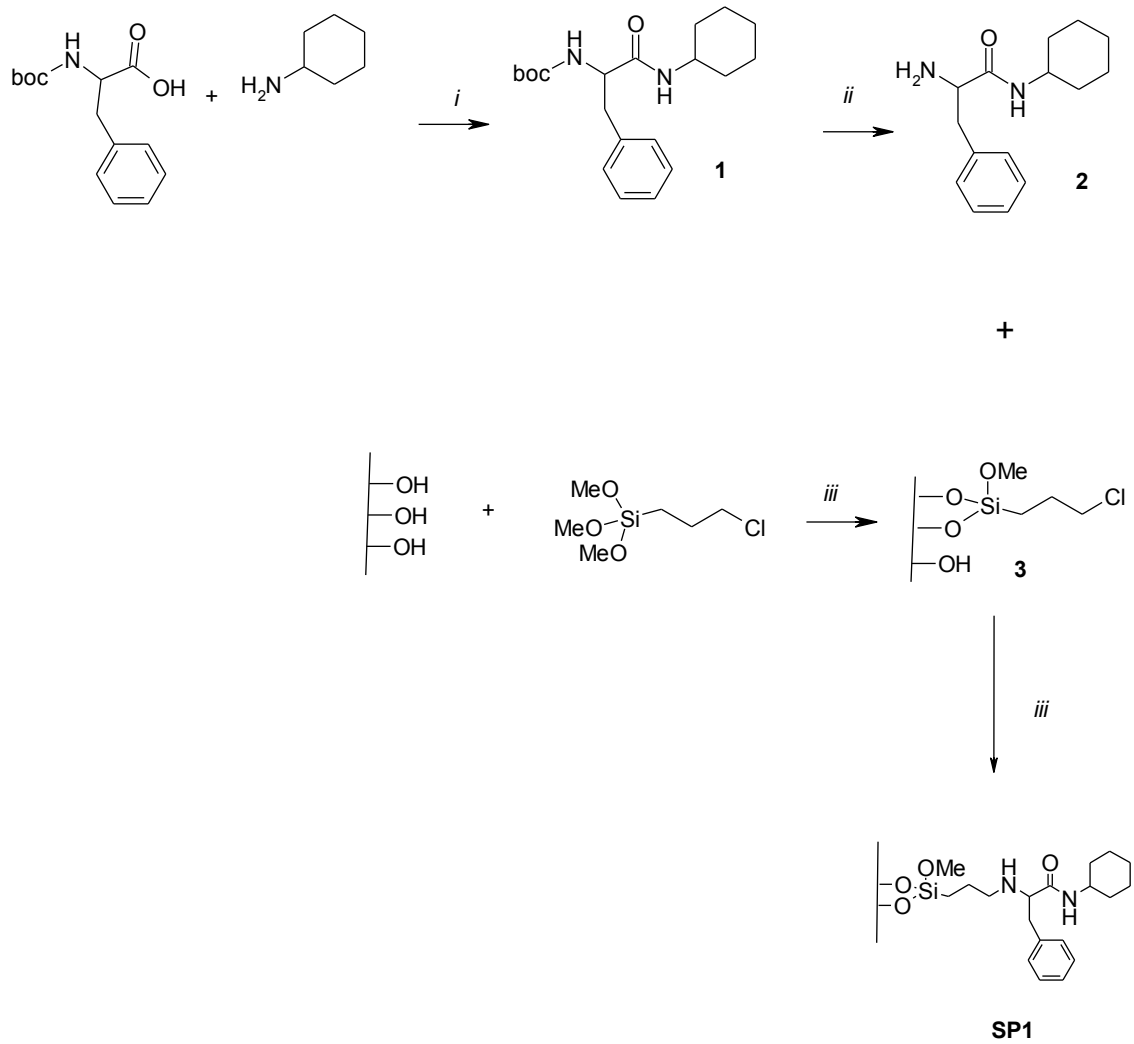
Ayrıca polar gömülü kolonların daha yüksek oranda su içeren hareketli fazın kullanımına izin verdiği tespit edilmiştir. Yüksek bağlanma yoğunluklu geleneksel kolonlarda ise su bakımından zengin hareketli faz kullanıldığında zincir kopmasının meydana geldiği saptanmıştır. Zincir kopması su bakımından zengin hareketli fazda hidrofobik alkil zincirinin toplanmasından kaynaklanır. Bu alıkonmanın geri dönüşümsüz olmasından ve azalan kromatografik etkinlikten kaynaklanabilir. (Neue ve ark.,2001). Walter ve ark. (2005) tarafından yapılan son çalışmalarda yüksek oranda sulu hareketli faz kullanıldığında alıkonma süresindeki azalmanın zincir kopmasından değil dolgu fazı gözeneklerinden hareketli fazın ekstrüzyonundan kaynaklandığı belirtilmiştir. Alıkonmadaki düşüşün gözenek boyutuna bağlılığı , boş hacim ve akış durdurulduktan sonraki gözenek boyutundaki değişiklikler arasındaki ilişki ve alıkonmadaki düşüşün basınca bağımlılığı bu fikri doğrular.

Bazik analitler için pik keskinleşmesinin artmasına neden olan başka bir faktör polar gömülü kolonların artan ıslaklıklarından kaynaklanır.(McCalley,1999). Bir görüşe göre polar grup analiti silanollerden koruyan silika yüzeyindeki bir su tabakasıyla kaplanır. (Neue ve ark.,2001). Diğer görüşlere göre ise polar grup serbest silanollerle etkileşmeyi tercih edebilir. (O’Gara ve ark.,1995). İlaveten , eğer hareketli fazın pH’sı gömülü grubun pKa’sının altına düşerse , gömülü grup protonlanır ve pozitif yüklenir. Bu , gömülü grubu yüzeydeki silanollerden koruyarak dolgu fazı ve analitin elektrostatik itmesine neden olabilir.(Aral, 2013)

3.MATERYAL VE METOT

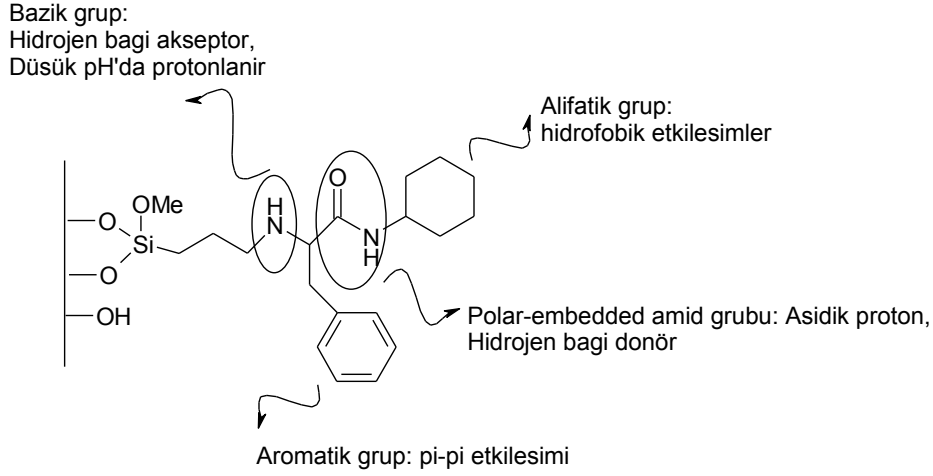
3.1. Materyal

Sentezlenen kolon dolgu maddesi Aral.H.(2013), doktora tezi çalışmasından temin edilmiştir.Kullanılan kolon SP1 isimli, alifatik sikloheksil ve aromatik fenil gruplarını içermesinin yanısıra polar amid ve amin gruplarını içeren polar gömülü yapıda bir dolgu maddesini içeren kolondur.Şekil 3.1’de SP1 kolon dolgu maddesinin elde edilme aşamaları şematik olarak verilmiştir.



Şekil 3.1SP1’in Sentez Şeması. Reaktifler ve Koşullar; *i*: DCC, 0°C-oş, 24 saat; *ii*: TFA/AcOH (1:1, v:v), DCM; *iii*: toluen, riflaks, 4 gün

SP1 dolgu maddesinin yapısı Şekil 3.2’de gösterilmektedir.



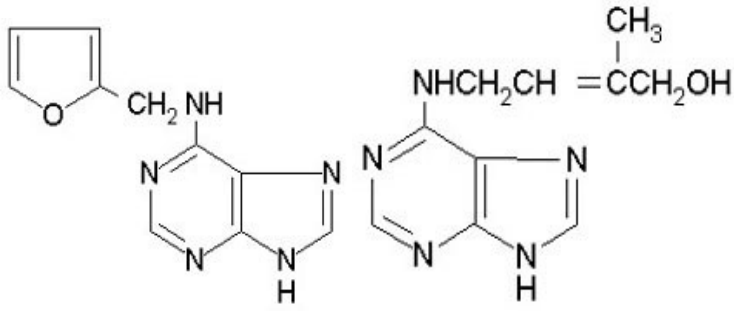
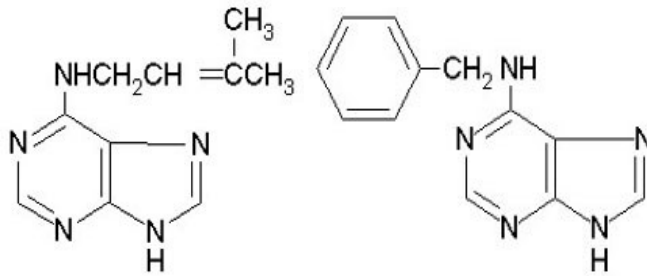
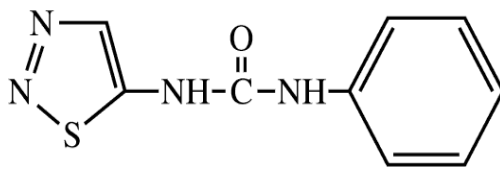
Şekil 3.2 SP1 dolgu maddesinin yapısı (Aral , 2013)

HPLC’de kullanılan tüm çözücüler HPLC kalitesinde olup Merck’ten temin edilmiştir. Kullanılan analitler , Sigma-Aldrich ya da Merck’ten temin edilmiştir. Tüm çözelti ve tampon hazırlama çalışmalarında ultra saf su kullanılmıştır. Ultra saf su Millipore Milli-Q ultra saf su cihazı ile elde edilmiştir.pH ölçümlerinde Hanna Instruments HI 221 Calibration Check Microprocessor pH meter kullanılmıştır.

3.2 Metot

3.2.1. HPLC Koşulları

Kromatografik çalışmada dört yollu bir pompa, degasser, autosampler, DAD dedektör , termostat kolon bölmesine sahip Agilent 1260 HPLC (Agilent , Waldbronn , Germany) sistemi kullanılmıştır. Kullanılan her analitin standart çözeltisi 30:70 asetonitril :0.1N NaOH karışımında hazırlandı. Tüm analitler ve çözeltiler - 25⁰ C’de korundu. Çalışılan dalgaboyu 270nm seçildi. Çalışılan analit örnekleri aşağıda gösterilmiştir:

**KINETİN****ZEATİN****6-(γ-γ) DİMETİL ALLİL AMİNOPÜRİN****BENZİLAMİNOPÜRİN****THIDIAZURON****Şekil 3.3** Çalışmada bulunan sitokininlerin molekül şekilleri

3.2.2.Tampon Çözeltilerin Hazırlanması

Sulu fazda pH ayarı yapılması için tampon çözelti kullanılmıştır. Tampon çözeltileri kullanırken fosforik asit , asetik asit ve onların tuzları ile çalışılmıştır.pH 3 ve 4 tampon çözeltileri için $H_3PO_4 - KH_2PO_4$, pH 5,6,7 ve 8 tamponlarını hesaplamada $KH_2PO_4 - K_2HPO_4$ kullanılmıştır. Aynı şekilde asetik asit ve sodyum asetat ile de optimizasyon nedeniyle aynı pH çalışması yapılmıştır. Tüm tampon çözeltiler pH metre ile ölçülmüş ve gerekli olduğunda asit ve baz kullanılarak pH'ları ayarlanmıştır.

A) pH 3.37 fosfat tamponu

. 1.36. gr KH_2PO_4 ve 27.8 μl H_3PO_4 alındı.1litreye ultra saf su ile tamamlandı.

B) pH 4.15 fosfat tamponu

1.36 gr KH_2PO_4 ve 4.62 μl H_3PO_4 alındı.1litreye ultra saf su ile tamamlandı.

C) pH 5.09 fosfat tamponu

1.35 gr KH_2PO_4 ve 0.013gr K_2HPO_4 alındı.1litreye ultra saf su ile tamamlandı.

D) pH 5.48 fosfat tamponu

1.31 gr KH_2PO_4 ve0.031gr K_2HPO_4 alındı.1litreye ultra saf su ile tamamlandı.

E) pH 5.48 asetat tamponu

108.2 μl CH_3COOH ve1.36 gr CH_3COONa alındı.1litreye ultra saf su ile tamamlandı.

G) pH 6.11 fosfat tamponu

1.17 gr KH_2PO_4 ve 0.12gr K_2HPO_4 alındı.1litreye ultra saf su ile tamamlandı.

H) pH 8.05 fosfat tamponu

0.09 gr KH_2PO_4 ve0.81gr K_2HPO_4 alındı.1litreye ultra saf su ile tamamlandı.

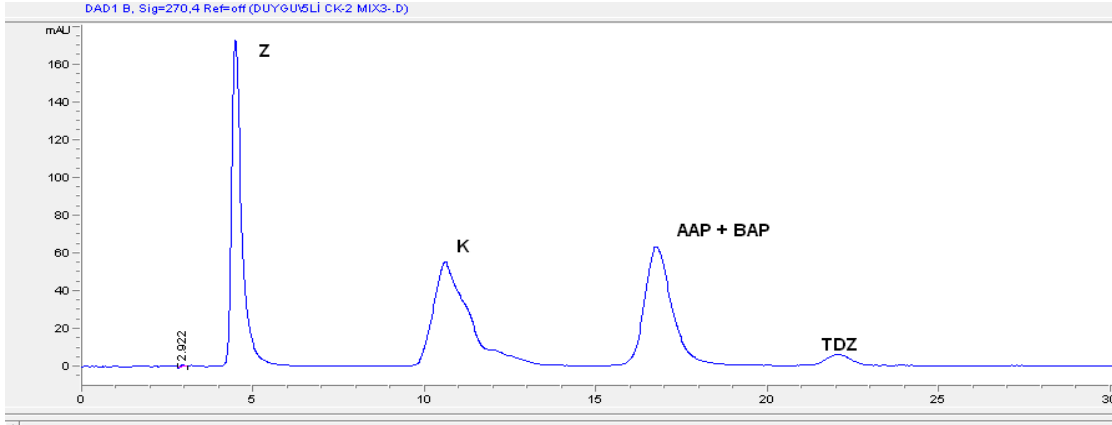
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada kromatografik ayırmalar silika tabanlı amid türevi SP1 dolgu maddesi bulunan kolon ve çeşitli sitokinin örnekleri ile yapılmıştır. Mobil faz , pH , sıcaklık gibi parametreler uygulanarak analitlerin ayrılması ve alıkonmasındaki etkiler gözlenmiştir. Ayrıca elimizde bulunan bitki özü kullanılarak doğada bulunan sitokininlerin bu kolonla kantitatif uygulaması ve validasyonu çalışılmıştır.

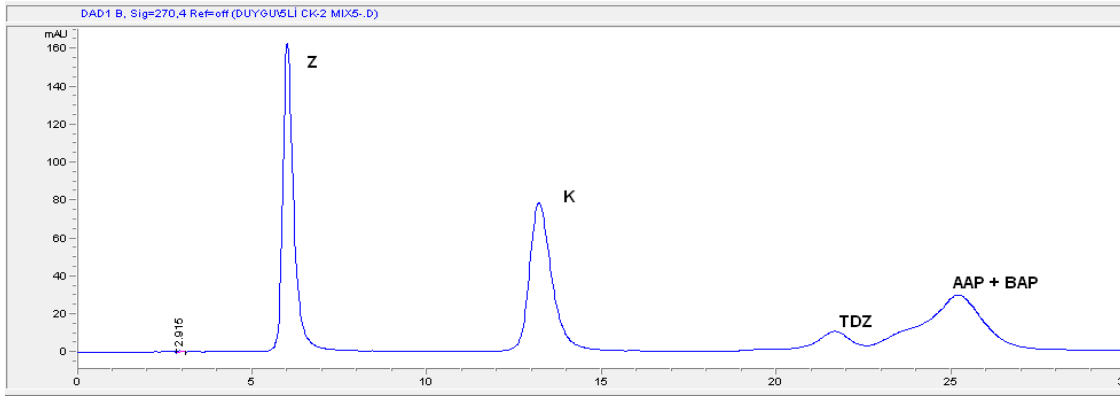
4.1 Sitokininlerin Ayrılmasında pH Optimizasyonu

Ortamın pH'sı ters faz kromatografisinde, analitlerin alıkonma ve seçiciliklerinde çok büyük etkiye sahiptir. pH, hareketli fazda bulunan analitlerin iyonlaşmasında güçlü bir etki yaratır. Bu çalışmada , sitokininlerin ayrılması farklı pH değerlerinde incelenmiştir. pH:3.37 ve pH:4.15 H_3PO_4 / KH_2PO_4 kullanılarak , pH:5.09, pH:6.11 ve pH:8.09 KH_2PO_4 / K_2HPO_4 kullanılarak hazırlanan tampon çözeltilerle elde edilmiştir. pH optimizasyonu için hazırlanan tüm tampon çözeltileri 10mmol olarak hazırlanmıştır. Sitokininler genellikle bazik moleküller olarak kabul edilir. Şekil 4.1 de görüldüğü gibi , pH değeri arttıkça analitlerin kolonda alıkonma süresi de artmaktadır. Z kolonu önce terk ederken en son çıkan analit pH arttıkça değişkenlik göstermektedir. TDZ kolonu en asit şartta en son terk ederken baziklik arttıkça kolonda tutunma süresi de azalmaktadır. Bu durumda AAP ve BAP'e göre daha asidik olarak kabul edilebilir. Diğer taraftan , moleküler yapıları birbirine çok yakın olan AAP ve BAP daha asidik şartlarda içiçe pik verirken , pH arttıkça pikler de birbirinden ayrılmış ve daha net bir ayırma elde edilmiştir. Genel olarak kromatogramlara bakıldığında zeatin ve kinetinin ayırma etkisi asitliğin değişmesiyle çok fazla değişmemektedir. Bir analitin alıkonma ve seçiciliği , hem sabit faz türü ve yüzey kimyasına hem de hareketli faz türü ve hareketli fazın analitle etkileşimi gibi faktörlere bağlı olduğundan , burada da sitokinin grubu hem mobil fazla hem de dolgu fazı ile etkileşir. Yapılarındaki polar gruplar benzerdir fakat farklı apolar gruplar içerdiklerinden kolonda bulunan apolar gruplar ile (fenil ,siklohegzil gibi.) etkileşime girerler ve pH değişimi ile alıkonma süreleri değişirken, ayırma etkileri neredeyse aynıdır. pH arttıkça kolonla etkileşim arttığından alıkonma süreleri de uzar.

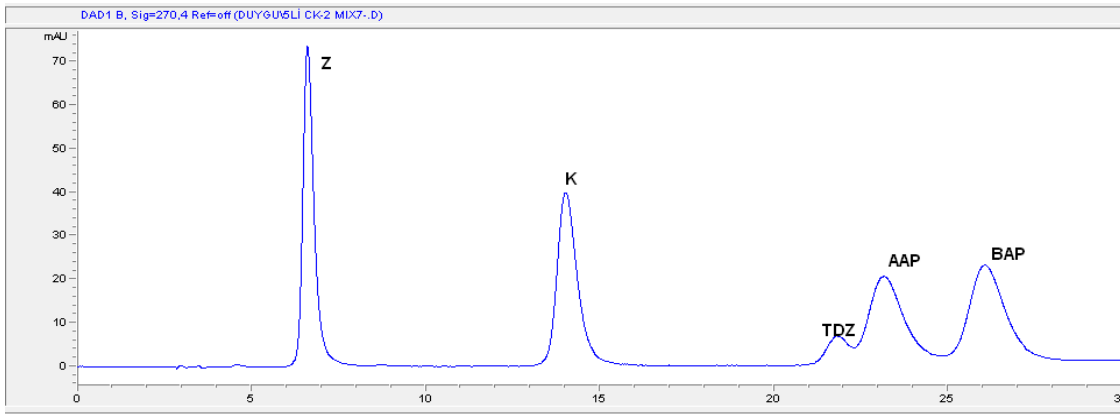
4.BULGULAR VE TARTIŞMA



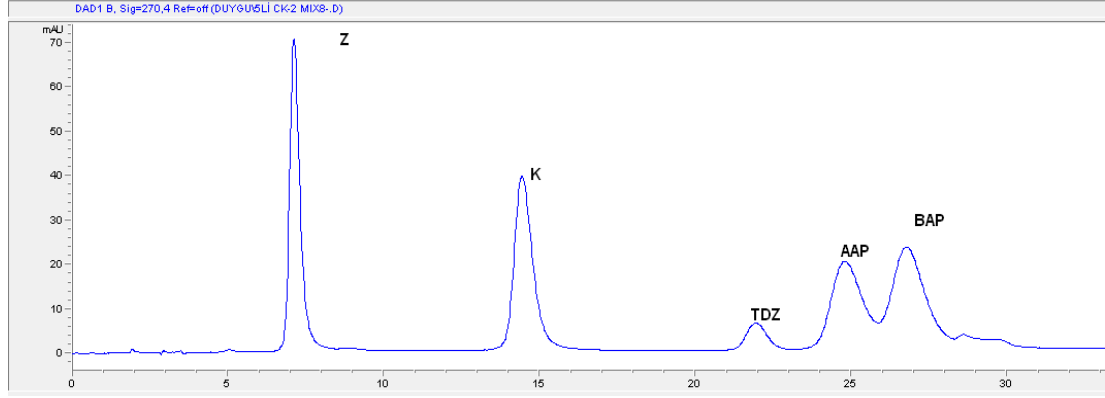
- a) pH:3.37 10 mmol İzokratik elüsyon %20 ACN/Fosfat tampon Akış hızı :1ml/dk T:22⁰C dalgaboyu:270 nm enjeksiyon hacmi:10 μ l



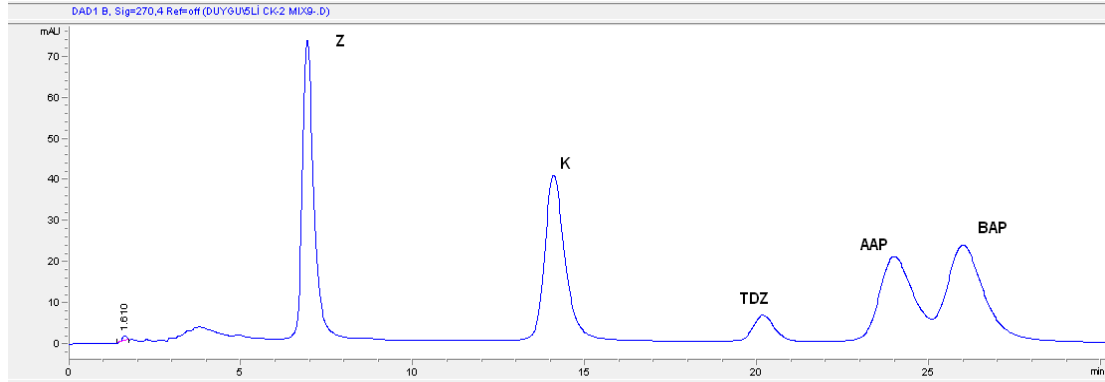
- b) pH:4.15 10 mmol İzokratik elüsyon %20 ACN/Fosfat tampon Akış hızı :1ml/dk T:22⁰C dalgaboyu:270 nm enjeksiyon hacmi:10 μ l



- c) pH:5.09 10 mmol İzokratik elüsyon %20 ACN/Fosfat tampon Akış hızı :1ml/dk T:22⁰C dalgaboyu:270 nm enjeksiyon hacmi:10 μ l



d) pH:6.11 10 mmol İzokratik elüsyon %20 ACN/Fosfat tampon Akış hızı :1ml/dk T:22⁰C dalgaboyu:270 nm enjeksiyon hacmi:10 μ l



e) pH:8.09 10 mmol İzokratik elüsyon %20 ACN/fosfat tampon akış hızı :1ml/dk T:22⁰C dalgaboyu:270 nm enjeksiyon hacmi:10 μ l

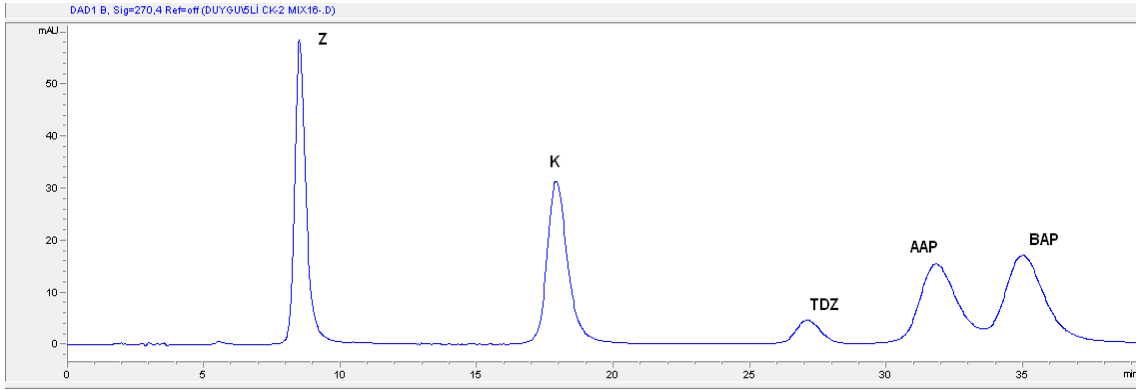
Şekil 4.1 Sitokinlerin Ayrılmasında Farklı pH kullanılarak Yapılan Ayırma ve Etkisi

4.2 Sitokinlerin Ayrılmasında Çözücü Optimizasyonu

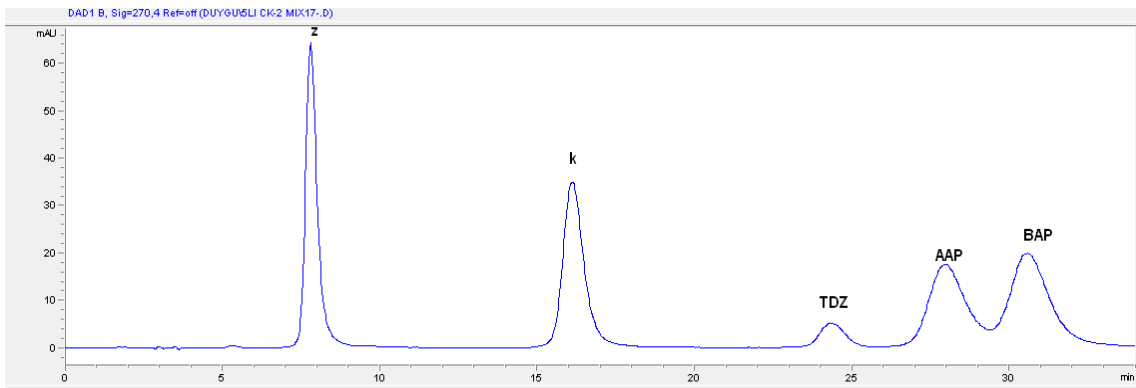
Bu çalışmada yapılan ayırmaların tamamında ACN/tampon karışımı mobil faz olarak kullanılmıştır. Analitlerin daha iyi ayrılmasını sağlamak amacıyla farklı şartlarda, mobil fazdaki ACN oranı , tampon çözelti derişimi ve kullanılan tamponun cinsi değiştirilmiş ve sitokinlerin alıkonma karakteri üzerindeki etkisi yorumlanmaya çalışılmıştır.

4.2.1. ACN Oranı Değişimi

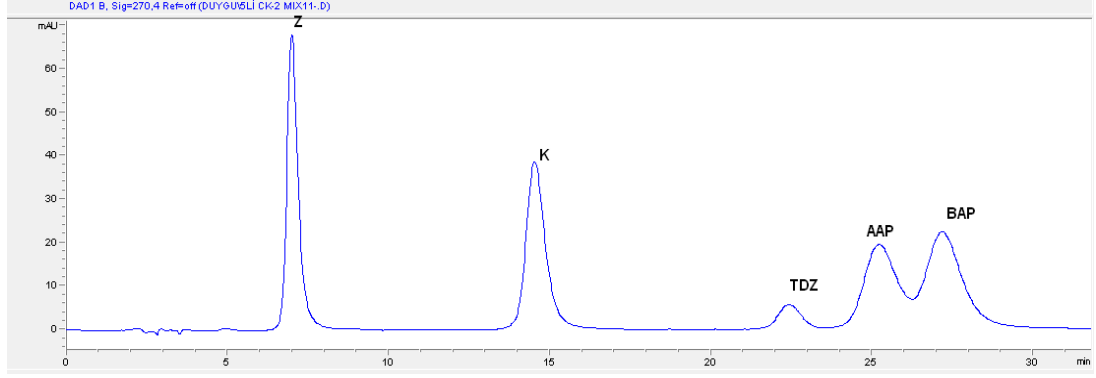
Çalışmada , ACN oranları değiştirilerek sitokininlerin ayrılmasına etkisi farklı şartlarda izokratik ve gradiyent elüsyon çalışılarak gözlemlenmiştir. Hareketli fazda ACN oranı azaldıkça elüsyon süresinin uzadığı gözlemlenmiştir. ACN oranı azaldıkça AAP ve BAP piklerinin birbirinden daha iyi ayrıldığı da görülmektedir. Oysa gradiyent elüsyon şartlarına bakıldığında ACN oranı azaldıkça sondaki üç analitin piklerinin iç içe geçmiş olduğu görülmektedir. Mobil fazda ACN oranını azalttıkça hareketli faz polaritesinin arttığını ve alıkonmanın da arttığı ve pik çıkış sürelerinin de uzadığı gözlenmektedir.



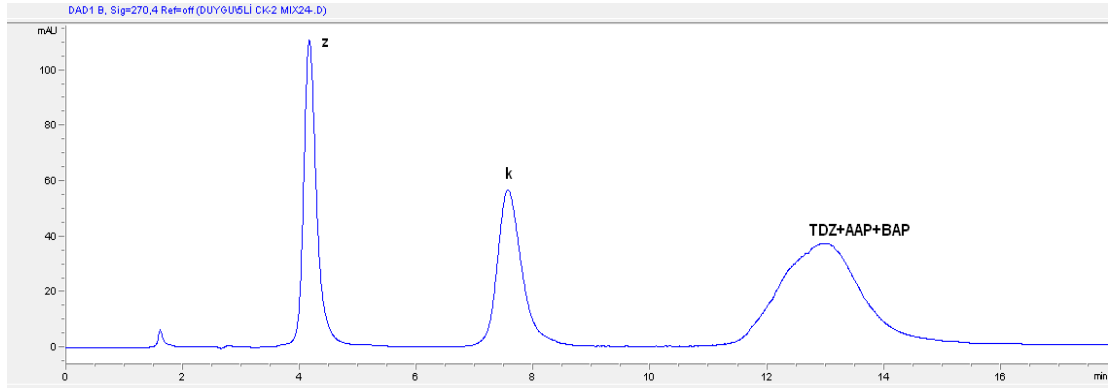
- a) pH:5.48 10mmol İzokratik elüsyon Akış hızı:1ml/dk %18 ACN/ Fosfat tamponu T:22⁰C dalga boyu:270nm enjeksiyon hacmi:10 μ l



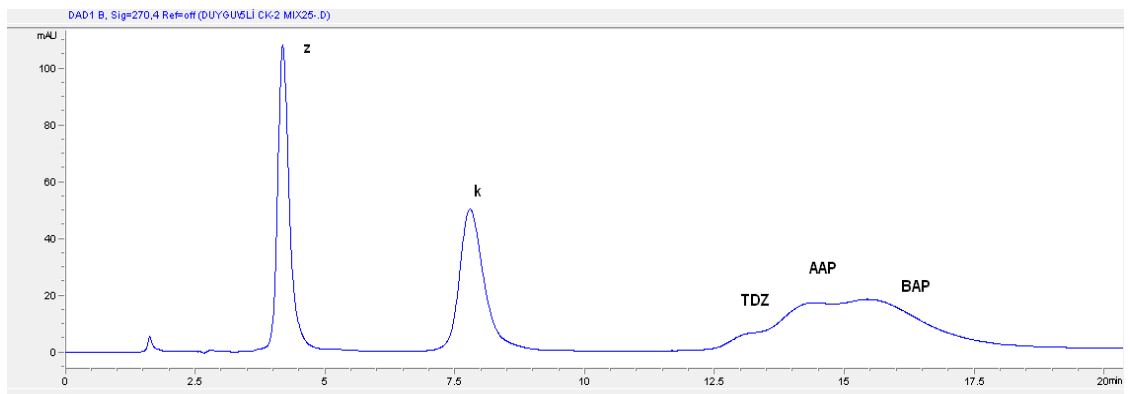
- b) pH:5.48 10mmol İzokratik elüsyon Akış hızı:1ml/dk %19 ACN/ Fosfat tamponu T:22⁰C dalga boyu:270nm enjeksiyon hacmi:10 μ l



- c) pH:5.48 10mmol İzokratik elüsyon Akış hızı:1ml/dk %20 ACN/ Fosfat tamponu T:22⁰C dalga boyu:270nm enjeksiyon hacmi:10 μ l



- d) pH:5.48 10mmol Gradyent elüsyon Akış hızı:1ml/dk 0-30 dk %30 -%10 ACN/Fosfat tamponu T:22⁰C dalga boyu:270nm enjeksiyon hacmi:10 μ l

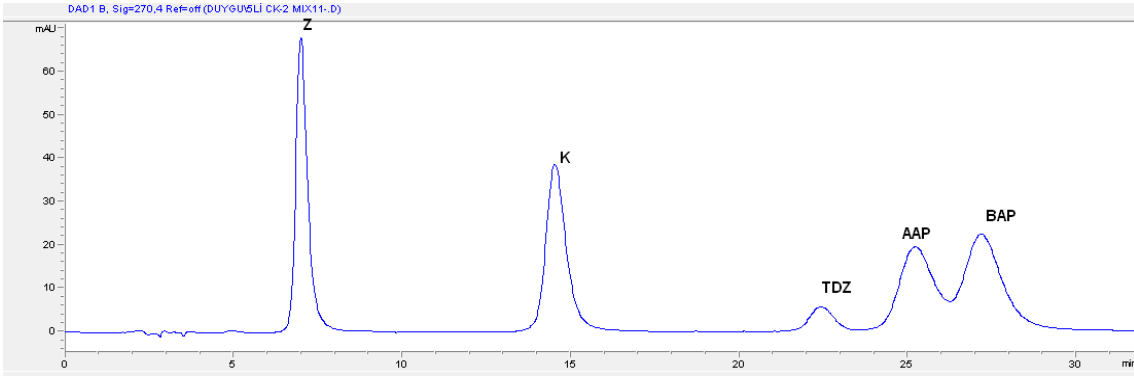


- e) pH:5.48 10mmol Gradyent elüsyon Akış hızı:1ml/dk 0-20 dk %30 -%10 ACN/Fosfat tamponu T:22⁰C dalga boyu:270nm enjeksiyon hacmi:10 μ l

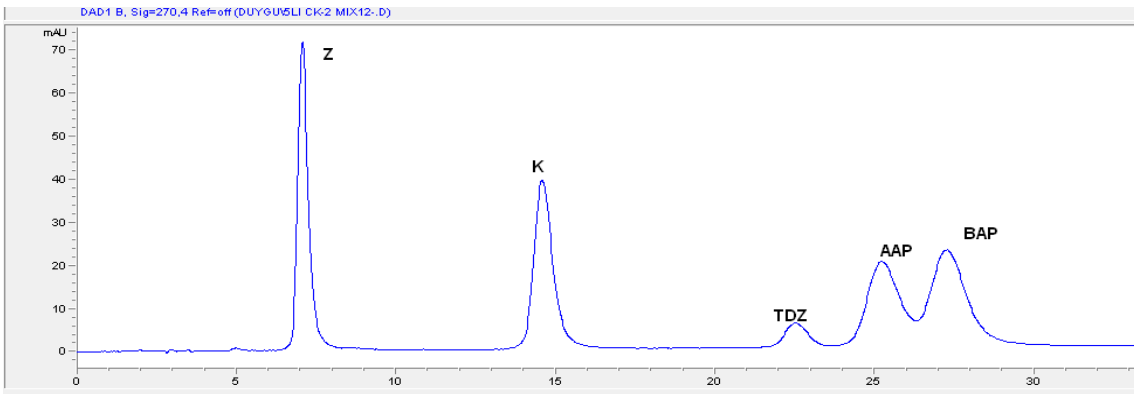
Şekil 4.2 Sitokininlerin Ayrılmasında ACN Oranı Değişimi ve Etkisi

4.2.2. Tampon Çözelti Derişimi Değişimi

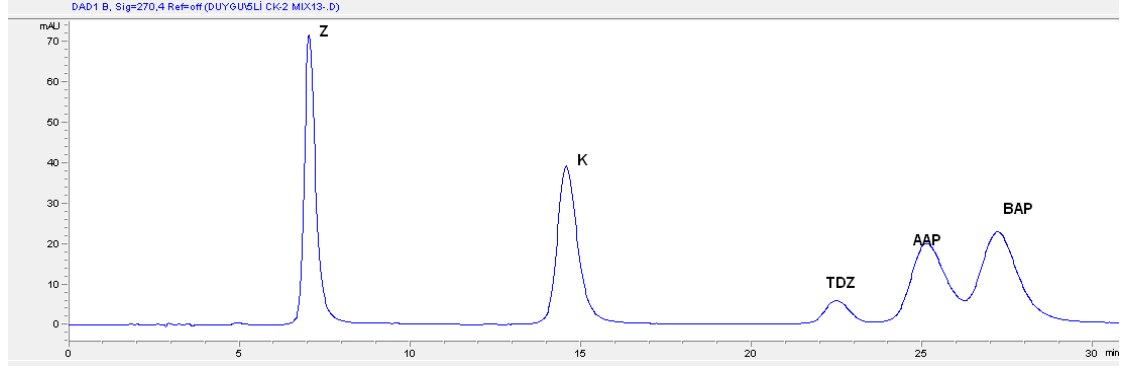
Tampon konsantrasyonunun ayırma ve alıkonmaya olan etkisi pH:5.48 de hazırlanan 10mmol , 20 mmol , 30 mmol ve 40 mmol derişimdeki $\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{K}_2\text{HPO}_4$ tamponuyla elde edildi. Ayırmaya ve alıkonmaya baktığımızda analitlerin çok da fazla etkilenmediği gözlemlenmiştir. 4 derişimde de alıkonma süreleri ve pik şekilleri aynı şekilde kalmıştır. Ayırma etkisi tüm analitler için değişmemiştir.



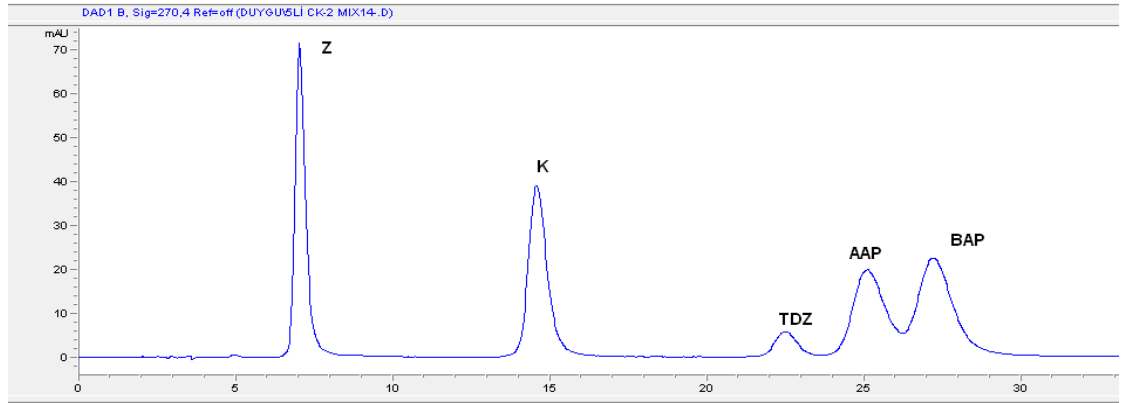
- a) pH:5.48 10 mmol İzokratik elüsyon Akış hızı:1ml/min %20 ACN/Fosfat tamponu dalga boyu:270nm T:22°C enjeksiyon hacmi:10µl



- b) pH:5.48 20 mmol İzokratik elüsyon Akış hızı:1ml/min %20 ACN/Fosfat tamponu dalga boyu:270nm T:22°C enjeksiyon hacmi:10µl



c) pH:5.48 30 mmol İzokratik elüsyon Akış hızı:1ml/min %20 ACN/Fosfat tamponu dalga boyu:270nm T:22⁰C enjeksiyon hacmi:10 μ l



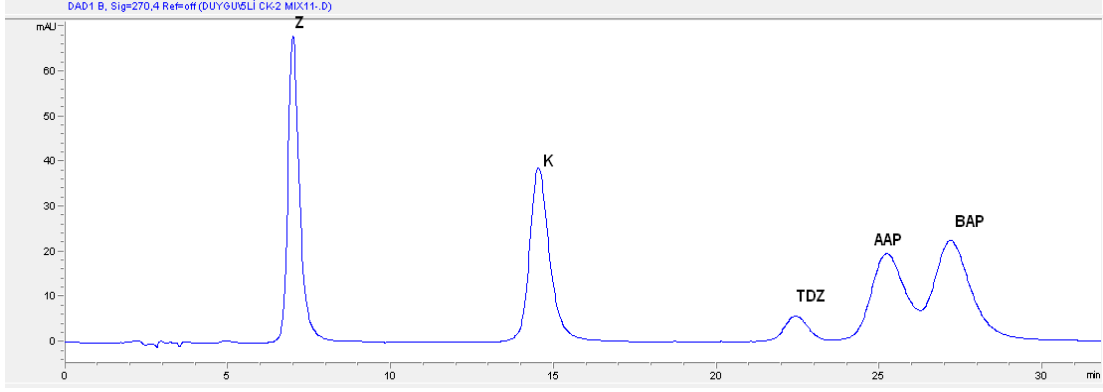
d) pH:5.48 40 mmol İzokratik elüsyon Akış hızı:1ml/min %20 ACN/Fosfat tamponu dalga boyu:270nm T:22⁰C enjeksiyon hacmi:10 μ l

Şekil 4.3 Sitokininlerin Ayrılmasında Tampon Derişimi Değişimi ve Etkisi

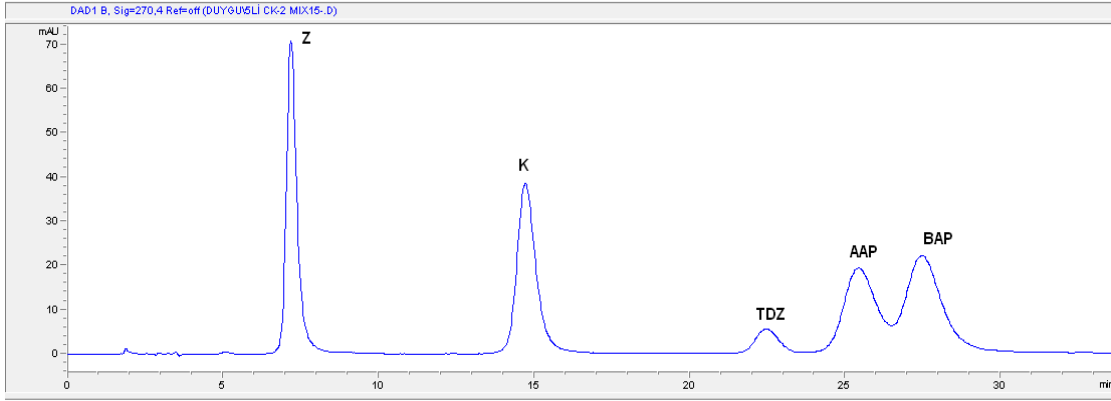
4.2.3. Tampon Çözelti Cinsi Değişimi

Bu çalışmada , optimum şart olarak seçilen pH:5.48 değerinde hem KH_2PO_4 ve K_2HPO_4 hem de CH_3COOH ve CH_3COONa kullanılarak tampon çözelti hazırlanmıştır. Elimizdeki sonuçlara baktığımızda , analitlerin alıkonmasında ve seçiciliğinde çok fark gözlenmemiş aynı zamanlarda pik oluşumu izlenmiştir. $\text{CH}_3\text{COONa}/ \text{CH}_3\text{COOH}$ tamponu kullanıldığında ACN çözeltisi içerisinde metal tuzu oluşma riski de söz konusu olduğunda organik kaynaklı tuz olduğunda daha elverişli bir tampon elde edebiliriz.

4.BULGULAR VE TARTIŞMA



- a) pH:5.48 10 mmol İzokratik elüsyon Akış hızı:1ml/min %20 ACN/Fosfat tamponu dalga boyu:270nm T:22⁰C enjeksiyon hacmi:10 μ l

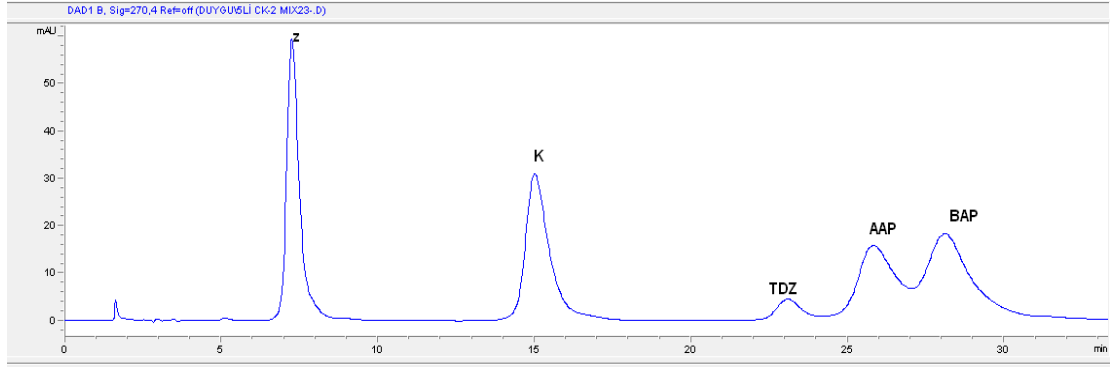


- b) pH:5.48 10 mmol İzokratik elüsyon Akış hızı:1ml/min %20 ACN/Asetat tamponu dalga boyu:270nm T:22⁰C enjeksiyon hacmi:10 μ l

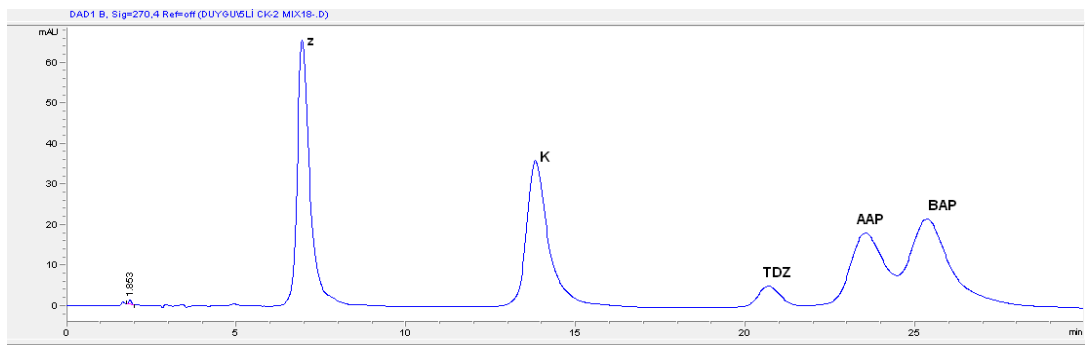
Şekil 4.4 Sitokinlerin Ayrılmasında Tampon Cinsi Değişimi ve Etkisi

4.3. Sitokinlerin Ayrılmasında Sıcaklık Optimizasyonu

. Kolon sıcaklığı analitlerin kolonda kalma sürelerini etkileyen bir nicelik olarak bilinmektedir. Bu çalışmada optimum ayırma şartları kullanılarak değişik sıcaklık değerlerinin ayırma üzerindeki etkisi gözlenmiştir. Kolon sıcaklığını arttırdığımızda analitlerin alıkonma süresi azalmıştır. Sıcaklık artışı 20⁰C'den 60⁰C'ye kadar arttırılmış ve bu aşamalar süresince piklerin birbiriyle iç içe geçtiği gözlemlenmiştir. AAP ve BAP pikleri optimum şartlarda da (T:22⁰C) oldukça yakın pikler gösterirken sıcaklık artışı ile aşamalı olarak birbiri içerisinde tek pik oluşumuna sebep olmuştur. Z, K ve TDZ 'da ayırma etkisi değişmemiş ancak alıkonma süreleri kısalmıştır.

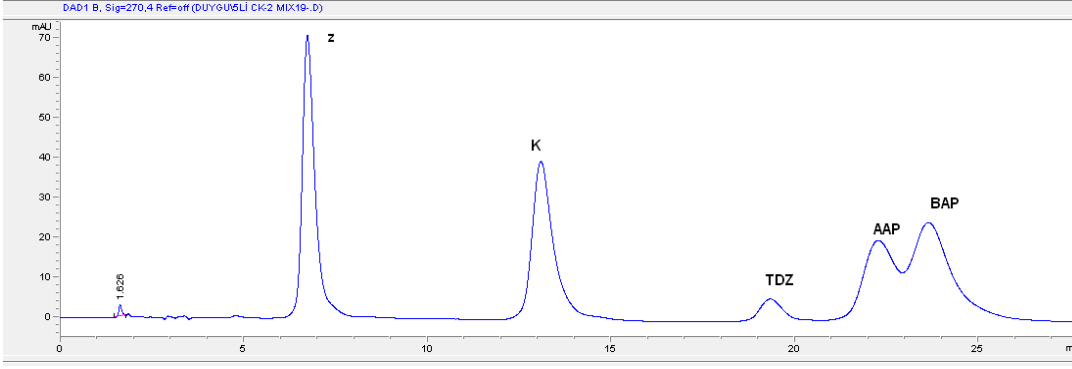


- a) pH:5.48 10 mmol İzokratik elüsyon akış hızı:1ml/dk %20 ACN/fosfat tamponu dalga boyu :270nm enjeksiyon hacmi:10µl T:20⁰C

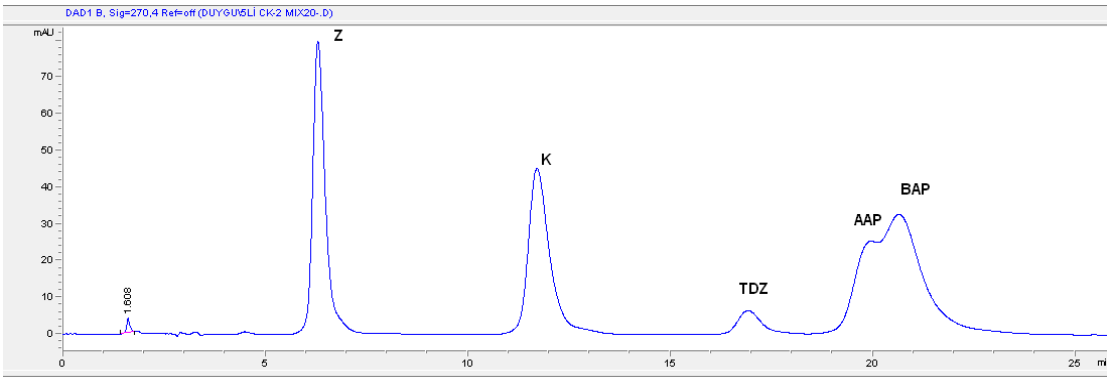


- b) pH:5.48 10 mmol İzokratik elüsyon akış hızı:1ml/dk %20 ACN/fosfat tamponu dalga boyu :270nm enjeksiyon hacmi:10µl T:25⁰C

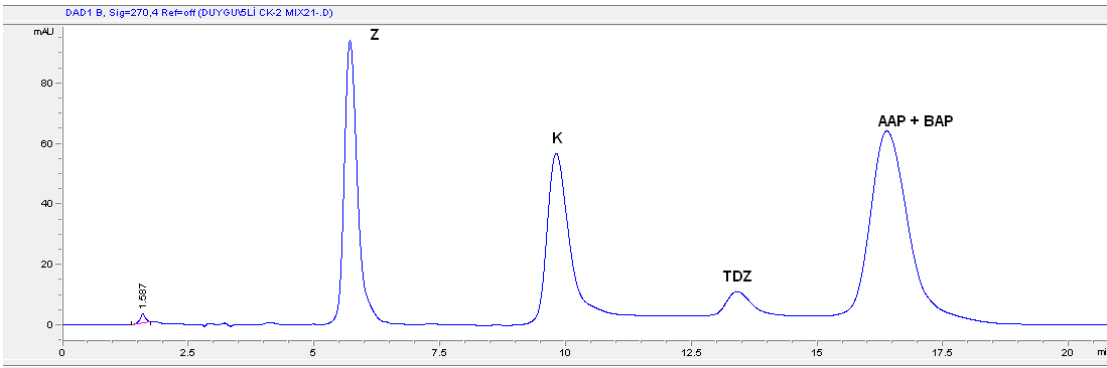
4.BULGULAR VE TARTIŞMA



- c) pH:5.48 10 mmol İzokratik elüsyon akış hızı:1ml/dk %20 ACN/fosfat tamponu dalga boyu :270nm enjeksiyon hacmi:10 μ l T:30 $^{\circ}$ C



- d) pH:5.48 10 mmol İzokratik elüsyon akış hızı:1ml/dk %20 ACN/fosfat tamponu dalga boyu :270nm enjeksiyon hacmi:10 μ l T:40 $^{\circ}$ C



- e) pH:5.48 10 mmol İzokratik elüsyon akış hızı:1ml/dk %20 ACN/fosfat tamponu dalga boyu :270nm enjeksiyon hacmi:10 μ l T:60 $^{\circ}$ C

Şekil 4.4 Sitokininlerin Ayrılmasında Sıcaklık Değişimi ve Etkisi

4.4 Sitokinlerin Kantitatif Tayini

Kantitatif kolon kromatografisi , analizi yapılan maddenin pik yüksekliğinin veya pik alanının bir veya birkaç standardın yükseklikleri veya pik alanlarıyla kıyaslanmasına bağlıdır. (Gündüz , 2011)

Yapmış olduğumuz çalışmada ayırmış olduğumuz sitokinlerin (K,Z,TDZ,AAP,BAP) bulunduğu 20mg/L lik bir standart stok çözeltisi hazırlanarak , analitlerin farklı derişimlerde çözeltileri hazırlanmış,derişime karşı pik uzunlukları kullanılarak kalibrasyon eğrileri her bir madde için elde edilmiştir. Bu sayede standart sapma , LOD ,LOQ ve tekrarlanabilirlik çalışmaları yapılmış ve elde edilen bulgular ile elimizdeki kolonun bu analitler için kantitatif tayin sınırları belirlenmiş ve mevcut bulunan bitki özütünde varlığı gözlemlenmeye çalışılarak geri kazanımı hesaplanmıştır. Geri kazanım hesaplamaları için elimizdeki bitki özü örneğine 50µl hacminde stok çözelti karışımı 4 defa verilerek standart ekleme yöntemi kullanılmış ve elde edilen veriler sayesinde % geri kazanımı hesaplanmıştır.

4.4.1. LOD ,LOQ , Tekrarlanabilirlik Hesaplamaları

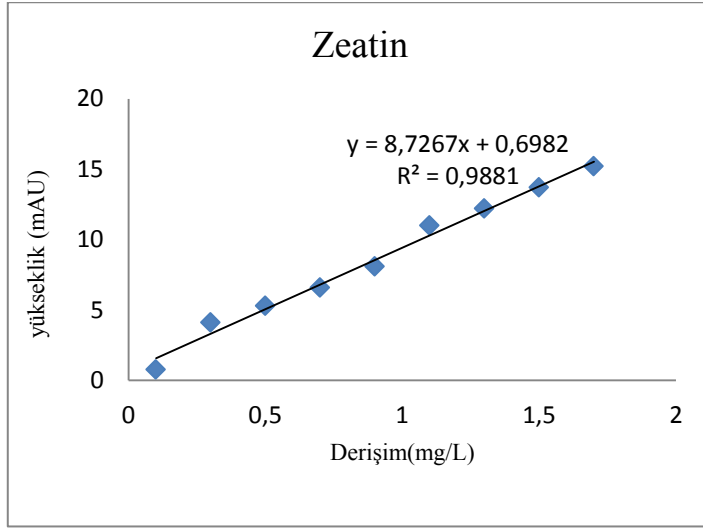
LOD numunede ölçülebilen ancak kesin olarak miktarı belirlenemeyen en düşük miktardır. LOQ ise kabul edilebilir doğrulukta ve kesinlik değerlerindeki en düşük konsantrasyon seviyesidir.(Kafalı,2008)(Anonim,2006b)

Yapmış olduğumuz çalışmada, seçmiş olduğumuz konsantrasyon aralığında, elimizde bulunan analitleri çalıştığımız optimum şartlarda ayırma işlemi yapıldı. Veri olarak elde ettiğimiz pik yükseklikleri ve derişim değerlerini her bir madde için kalibrasyon grafiği hazırlandı.

4.BULGULAR VE TARTIŞMA

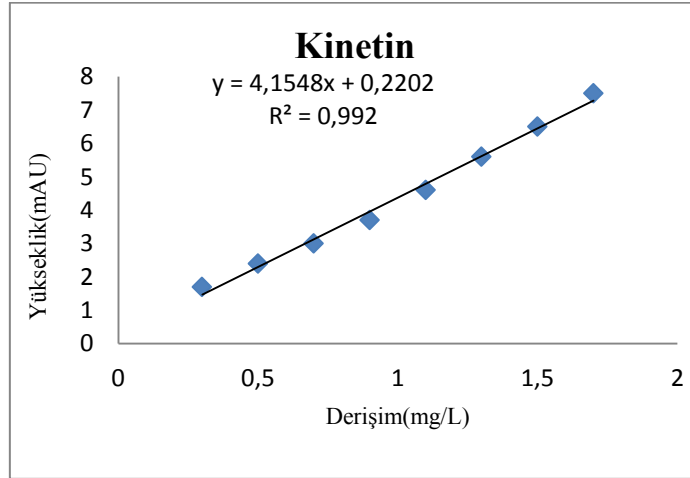
Çizelge 4.1. Zeatin için derişim ve pik yüksekliği değerleri ve kalibrasyon grafiği

Zeatin Derişim(mg/L)	Yükseklik (mAU)
0.1	0.77
0.3	4.10
0.5	5.30
0.7	6.60
0.9	8.10
1.1	11.0
1.3	12.2
1.5	13.7
1.7	15.2



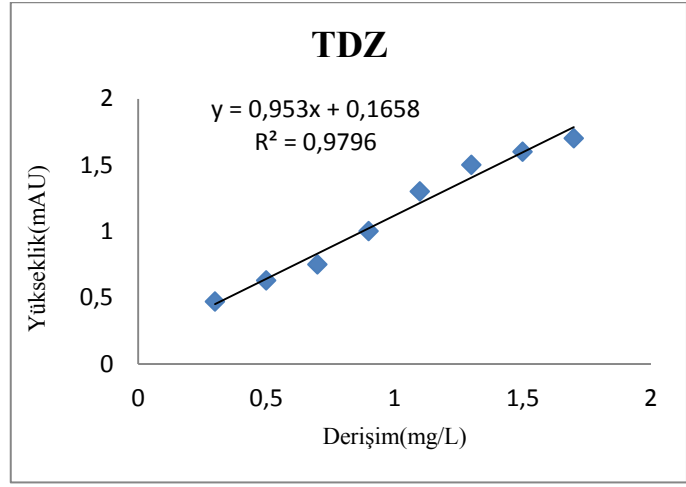
Çizelge 4.2 Kinetin için derişim ve pik yüksekliği değerleri ve kalibrasyon grafiği

Kinetin Derişim(mg/L)	Yükseklik (mAU)
0.3	1.7
0.5	2.4
0.7	3.0
0.9	3.7
1.1	4.6
1.3	5.6
1.5	6.5
1.7	7.5



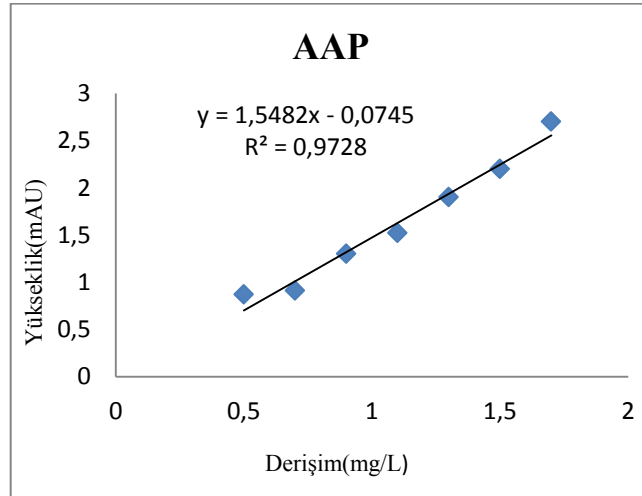
Çizelge 4.3 Thidiazuron için derişim ve pik yüksekliği değerleri ve kalibrasyon grafiği

TDZ Derişim(mg/L)	Yükseklik (mAU)
0.3	0.47
0.5	0.63
0.7	0.75
0.9	1.00
1.1	1.30
1.3	1.50
1.5	1.60
1.7	1.70

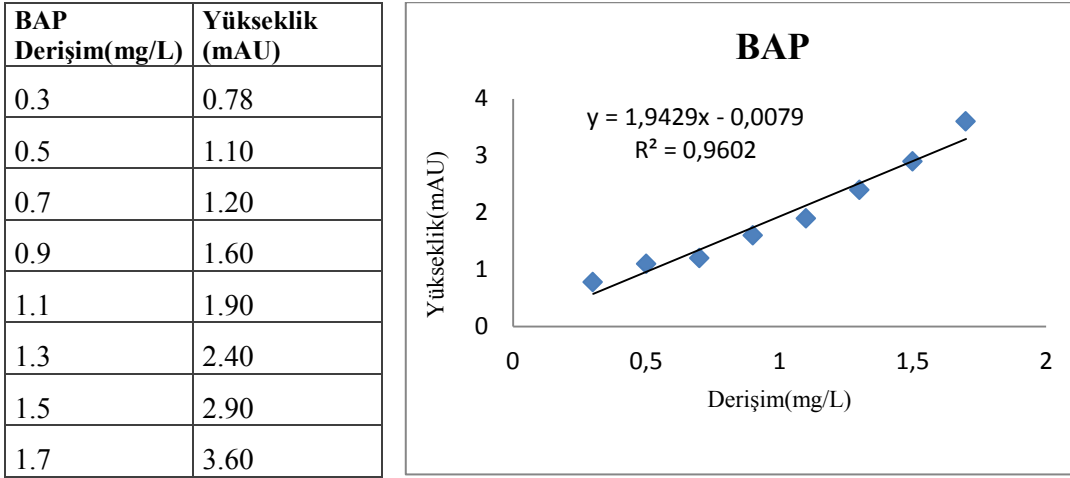


Çizelge 4.4 6-(Y-Y)dimetilallilaminopürin için derişim ve pik yüksekliği değerleri ve kalibrasyon grafiği

AAP Derişim(mg/L)	Yükseklik (mAU)
0.3	0.59
0.5	0.87
0.7	0.91
0.9	1.30
1.1	1.52
1.3	1.90
1.5	2.20
1.7	2.70



Çizelge 4.5 Benzilaminopürin için derişim ve pik yüksekliği değerleri ve kalibrasyon grafiği



Tekrarlanabilirlik bir ölçümün kesinliğinin ölçülerinden biri olarak gösterilebilir. Yapmış olduğumuz çalışmada seçmiş olduğumuz bir konsantrasyonda (0.9 mg/L) analitlerin aynı şartlarda 8 kez tekrar ölçümü gerçekleştirildi.(Levent ve Şentürk,2009)(Riley ve Rosanske,1996)(Schwartz ve Krull,1997) Elde ettiğimiz sonuçlar birbirine oldukça yakın bulundu.

Çizelge 4.6 Sitokinin örneklerinin 0.9 mg/L derişimde tekrarlanabilirlik sonuçları

Tekrar Sayısı	Z Yükseklik (mAU),	K Yükseklik(mAU)	TDZ Yükseklik(mAU)	AAP Yükseklik(mAU)	BAP Yükseklik (mAU)
1	8.00	3.60	0.90	1.10	1.50
2	8.00	3.60	0.90	1.20	1.50
3	8.00	3.60	0.92	1.20	1.50
4	8.00	3.60	0.94	1.20	1.50
5	8.20	3.60	0.90	1.20	1.40
6	8.10	3.70	0.93	1.20	1.50
7	8.20	3.70	0.96	1.20	1.50
8	8.10	3.80	0.94	1.10	1.50

Yapmış olduğumuz ölçümlerden standart sapma hesabı elde edilmiştir. Standart sapma bir metodun kesinliğini belirtmeye yarayan göstergeler arasındadır. Standart sapmanın küçük olması metodun iyi , analizcinin tecrübeli ve numunenin homojen olduğunun bir işaretidir.(Gündüz , 2011)

$$S = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

Bu formülde S standart sapmayı, X_i ölçülen özelliğin değerlerini (ölçme sonuçlarını), \bar{X} ölçme sonuçlarının aritmetik ortalamasını, n de veri sayısını göstermektedir.

Elde ettiğimiz hesaplanmış standart sapma sonuçları aşağıda gösterilmiştir.

Zeatin için SS= 0.08 , Kinetin için SS = 0.07 , TDZ için SS = 0.02 ,

AAP için SS = 0.04 , BAP için SS = 0.03 olarak elde edilmiştir.

LOD = SS x 3.3 / grafik eğimi , LOQ = SS x 10 / grafik eğimi

formülleri kullanılarak maddelerin LOD ve LOQ değerleri bulunmuştur.

Çizelge 4.7 Maddelerin hesaplanan standart sapma , LOD ve LOQ değerleri

MADDE	STANDART SAPMA	LOD	LOQ
ZEATİN	0.08	0.03	0.10
KİNETİN	0.07	0.06	0.18
TDZ	0.02	0.07	0.23
AAP	0.04	0.10	0.26
BAP	0.03	0.06	0.18

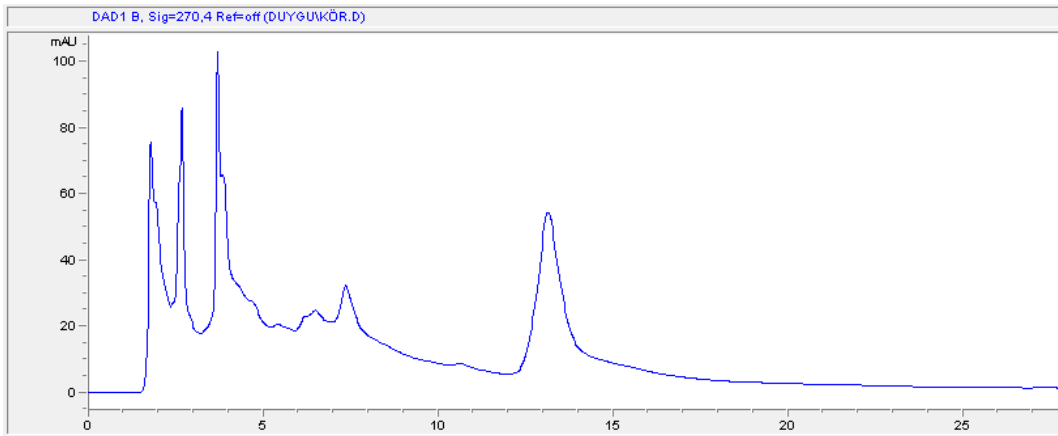
4.4.2. Standart Ekleme Yöntemi ve Geri Kazanım Hesaplamaları

Ortam (matriks) etkisinin olduğu karmaşık numunelerdeki matriks hatalarını azaltmak için tercih edilen bir yöntemdir. Aynı miktarda ayrı kaplara alınan numunelere, analitin artan derişimlerde standart çözeltisi ilave edilir. İlk numune çözeltilisine ilave yapılmaz. Bu çözeltilerin sinyalleri cihazla ölçülür. Numune çözeltisi hepsinde bulunduğundan ortam yaklaşık olarak aynıdır. Cihazdan alınan sinyal eklenen standart hacmine (veya seyrelme dikkate alınarak derişime) karşı grafiğe geçirilir.

Doğrunun X eksenini kesim noktasından numunedeki analit derişimi hesaplanır.(Say ve ark. , 2009)

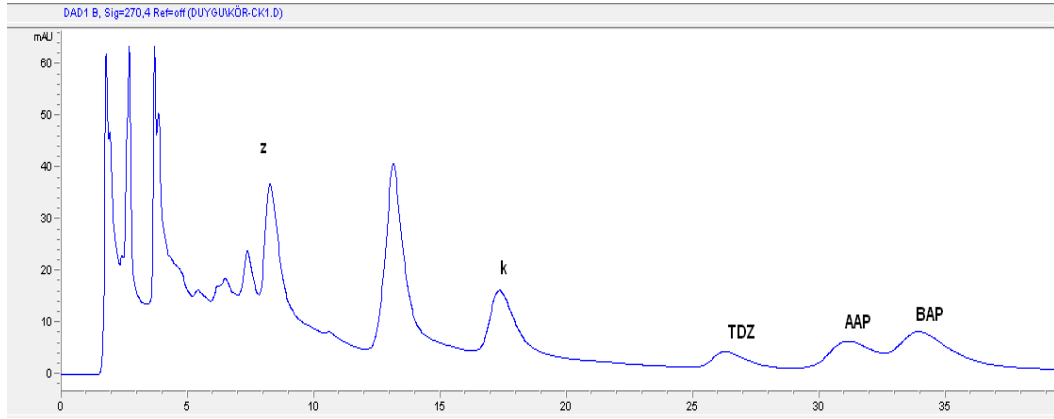
Kromatogramlar bazı maddelerin varlığını kesin olarak göstermeseler bile , bunların yokluğunu kesin olarak gösterirler. Buna göre , aranan bir madde aynı şartlarda standardının gösterdiği alıkonma zamanında bir pik vermiyorsa , bu madde numunede yok veya konsantrasyonu kromatografik tayin sınırının altında demektir.(Gündüz , 2011)

Bu bilgiler ışığında elimizde mevcut bulunan bitki özünde ayırma yapmış olduğumuz sitokinin hormonlarından olup olmadığını inceledik. Bitki özünü optimum şartlarda analiz yaptığımızda , kromatogramda elimizde bulunan sitokinlere ait bir pike rastlayamadık. Şekil 4.5'e baktığımızda kromatogramda analitlerin alıkonma zamanlarına ait pik bulunmadığından bitki özü örneğinde bulunmadığına karar verildi.

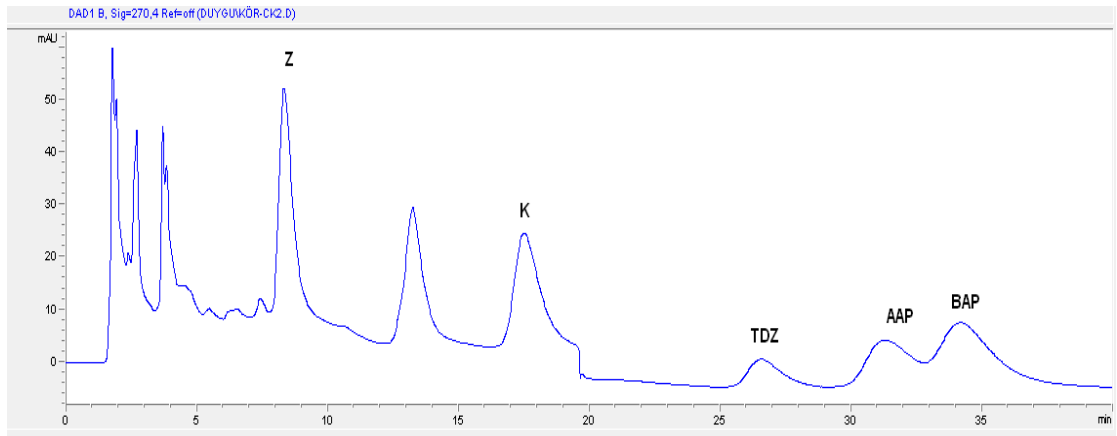


Şekil 4.5 Bitki özü numunesinin optimum şartlarda ayrılması.

Daha sonra önceden hazırlamış olduğumuz 20 mg/L'lik stok çözeltisinden sırasıyla 50µl'lik hacimlerde 4 kez ekleyerek ve her eklemede ölçüm yaparak sitokininlerin bu numunede geri kazanımını hesapladık. Her 50µl ekleden sonra optimum ayırma şartı olarak kabul ettiğimiz pH:5.48 10 mmol %20ACN/fosfat tamponu ile sıcaklığın 22⁰C olduğu durumda 50µl enjeksiyon hacmi ile ayırmalarımızı gerçekleştirdik. Her standart eklendiğinde çıkan piklerin yüksekliği eklenen madde konsantrasyonunun artışıyla doğru orantılı olarak arttı ve netleşti. Şekil 4.6 sırasıyla eklenen hacimlerin etkisi ve pikler görülmektedir.

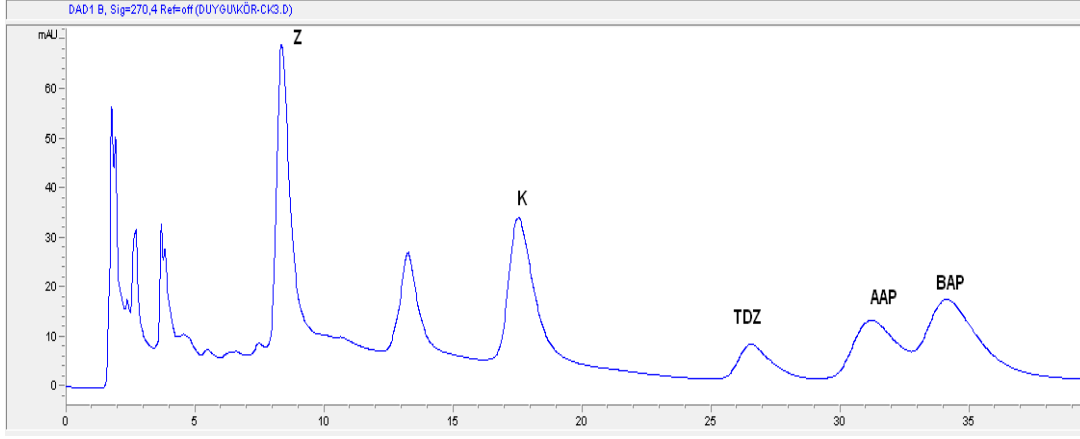


a) Bitki numunesine 1.kez 50µl eklenen CK çözeltisiyle oluşan kromatogram

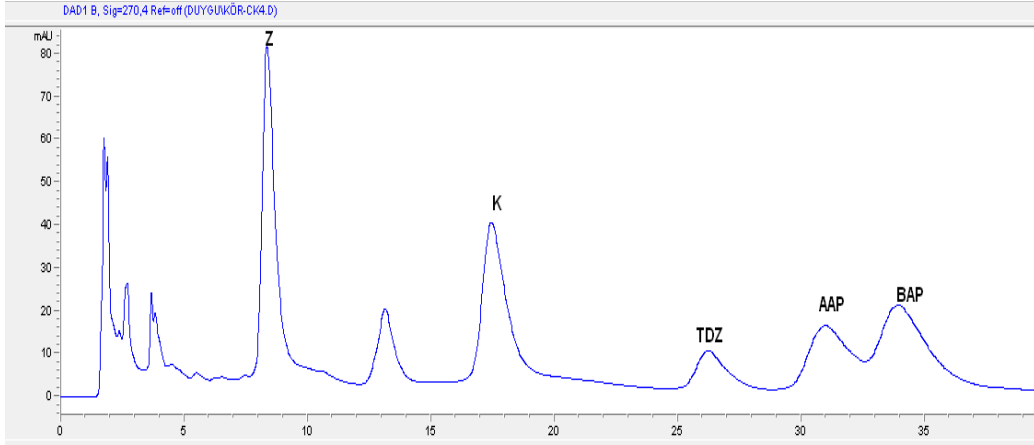


b) Bitki numunesine 2.kez 50µl eklenen CK çözeltisiyle oluşan kromatogram

4.BULGULAR VE TARTIŞMA



c) Bitki numunesine 3.kez 50µl eklenen CK çözeltisiyle oluşan kromatogram



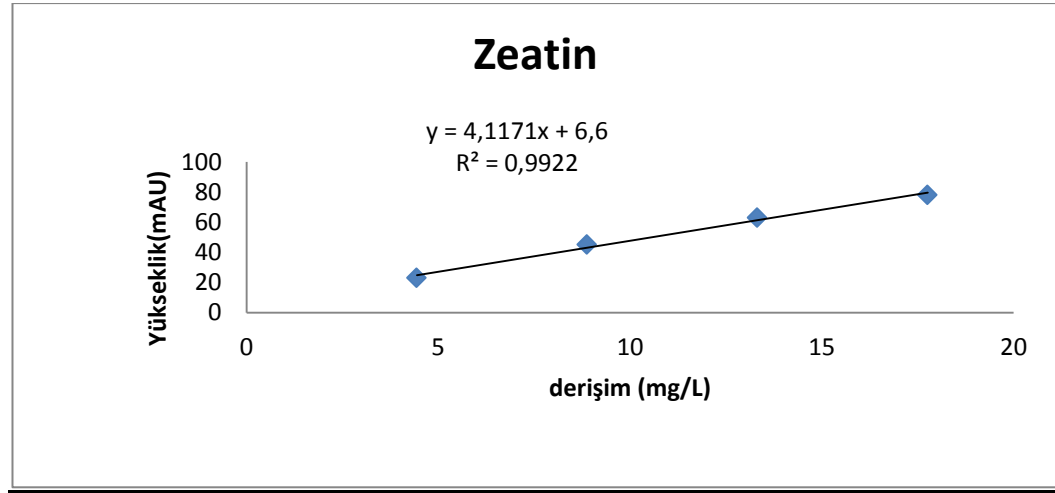
d) Bitki numunesine 4.kez 50µl eklenen CK çözeltisiyle oluşan kromatogram

Şekil 4.6 Optimum şartlarda 4 defa aşamalı olarak eklenen CK çözeltisinin bitki özü örneğinde oluşan etkisi.

Yukarıda analitlerin bulunduğu çözelti eklendiğinde görüldüğü gibi sitokininler kendilerine özgü spesifik alıkonma zamanlarında pik vermişlerdir. Derişim arttıkça pik boyları artmıştır. Yeniden pik boylarının derişim ile olan kalibrasyon grafiğı çizilmiş ve geri kazanım hesaplanmıştır.yapılan ölçümlerle her bir analite ait 4 ekleme ile oluşan konsantrasyon ve pik uzunluğu verileri elde edilmiş böylece grafik eğiminden gerçek derişim elde edilmiştir. Bilinen derişimin hesaplanana olan % oranıyla maddelerin % geri kazanımı hesaplanmış olacaktır.

Zeatin için;**Çizelge 4.8** İlave edilen CK çözeltisiyle numunedeki zeatin piki ve derişimi değişimi

İlave hacim (µL)	Derişim(mg/L)	Yükseklik(mAU)
50	4.44	23
100	8.88	45.2
150	13.32	63
200	17.76	78

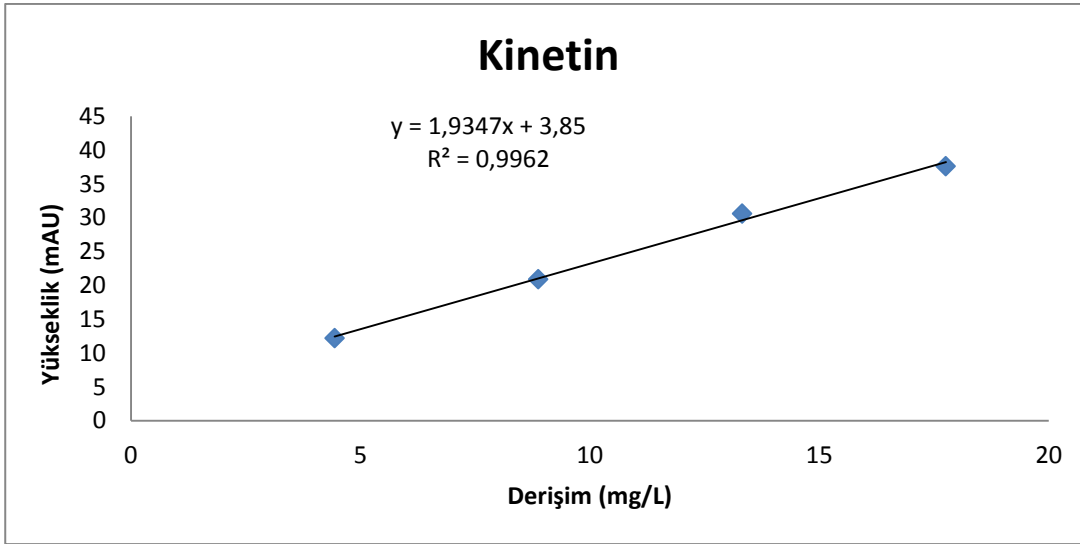
**Şekil 4.7** Zeatinin eklene çözelti ilavesiyle değişen derişimine karşılık pik yüksekliği kalibrasyon grafiği

Zeatin için verilen grafik denklemini; $y = 4.1171x + 6.6$ ise elimizdeki denkleminde y yerine pik yüksekliğini eşitlediğimizde bulacağımız x değeri bize konsantrasyonu verecektir.

Kinetin için;

Çizelge 4.9 İlave edilen CK çözeltisiyle numunedeki kinetin piki ve derişimi değişimi

İlave hacim (µL)	Derişim(mg/L)	Yükseklik(mAU)
50	4.44	12.2
100	8.88	20.9
150	13.32	30.6
200	17.76	37.6

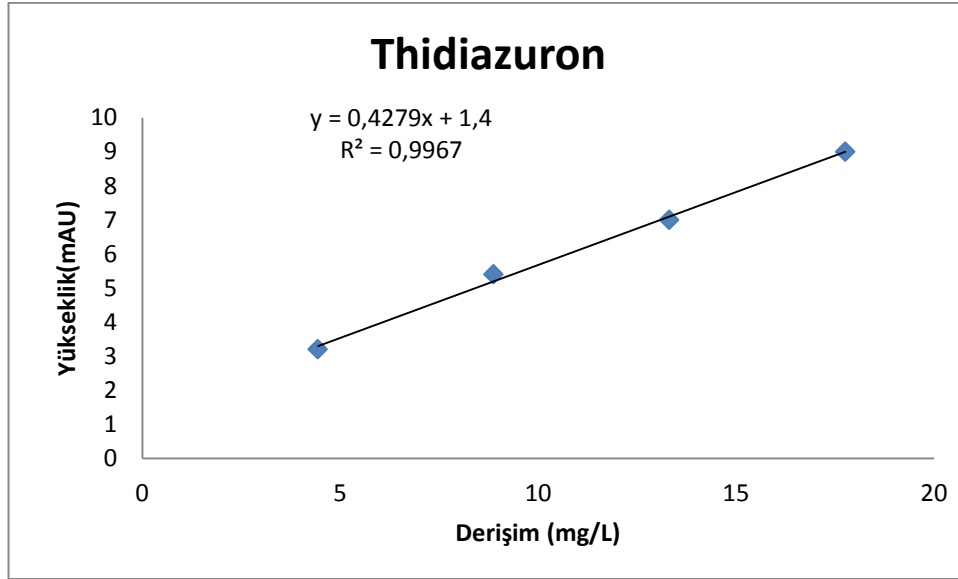


Şekil 4.8 Kinetinin eklenen çözelti ilavesiyle değişen derişimine karşılık pik yüksekliği kalibrasyon grafiği

Kinetinin kalibrasyon grafiği denklemi $y = 1.9347x + 3.85$ 'tir.

Thidiazuron için;**Çizelge 4.10** İlave edilen CK çözeltisiyle numunedeki thidiazuron piki ve derişimi değişimi

İlave hacim (µL)	Derişim(mg/L)	Yükseklik(mAU)
50	4.44	3.2
100	8.88	5.4
150	13.32	7
200	17.76	9

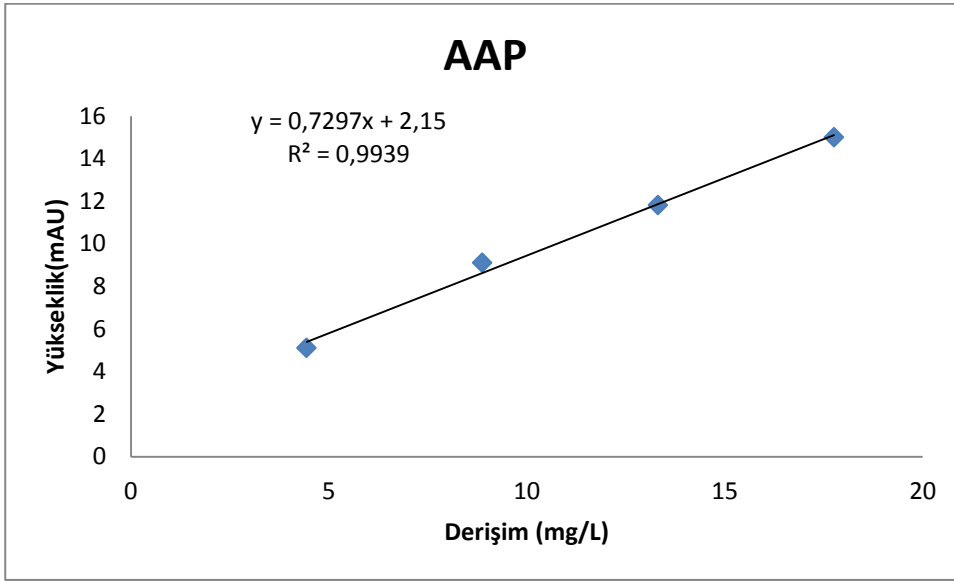
**Şekil 4.9** Thidiazuron eklenen çözelti ilavesiyle değişen derişimine karşılık pik yüksekliği kalibrasyon grafiği

Thidiazuron kalibrasyon grafiği denklemi $y = 0.4279x + 1.4$ 'tür

6-(X-Y) Dimetil allilaminopürin için;

Çizelge 4.11 İlave edilen CK çözeltisiyle numunedeki AAP piki ve derişimi değişimi

İlave hacim (µL)	Derişim(mg/L)	Yükseklik(mAU)
50	4.44	5.1
100	8.88	9.1
150	13.32	11.8
200	17.76	15

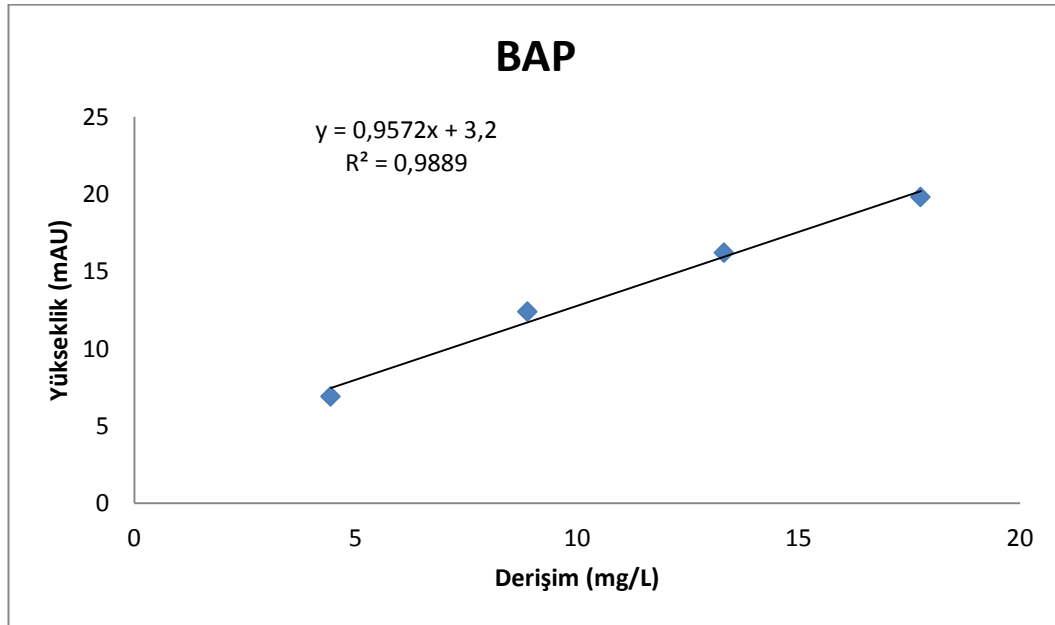


Şekil 4.10 AAP eklenen çözelti ilavesiyle değişen derişimine karşılık pik yüksekliği kalibrasyon grafiği

AAP için kalibrasyon grafiği denklemi $y = 0.7297x + 2.15$

Benzilaminopürin için;**Çizelge 4.12** İlave edilen CK çözeltisiyle numunedeki BAP piki ve derişimi değişimi

İlave hacim (µL)	Derişim(mg/L)	Yükseklik(mAU)
50	4.44	6.9
100	8.88	12.4
150	13.32	16.2
200	17.76	19.8

**Şekil 4.11** BAP eklenen çözelti ilavesiyle değişen derişimine karşılık pik yüksekliği kalibrasyon grafiği

BAP için kalibrasyon grafiği denkleminin $y = 0.9572x + 3.2$

Tüm analitler için kalibrasyon grafikleri denklemleri kullanılarak grafik denklemleri bulunmuş ve % geri kazanım = hesaplanan derişim/ bilinen derişim x % formülünden hesaplanmıştır. Her bir madde için ayrı ayrı çizelge oluşturduğumuzda aşağıdaki sonuçlar şu şekilde elde edilir.

Zeatin için;

Çizelge 4.13 Zeatin için elde edilen derişim değerleri ve % geri kazanım sonuçları

İLAVE HACİM(µL)	BİLİNEN DERİŞİM (mg/L)	HESAPLANAN DERİŞİM (mg/L) ± %RSD*	%GERİ KAZANIM
50	4.44	3.92 ± 0.78	88.2
100	8.88	9.34 ± 0.79	105.1
150	13.32	13.64 ± 1.04	102.4
200	17.76	17.34 ± 0.66	97.6

*Elde edilen sonuçlar birbirinden bağımsız üç analizin sonucudur

Kinetin için;

Çizelge 4.14 Kinetin için elde edilen derişim değerleri ve % geri kazanım sonuçları

İLAVE HACİM(µL)	BİLİNEN DERİŞİM (mg/L)	HESAPLANAN DERİŞİM (mg/L)±%RSD*	% GERİ KAZANIM
50	4.44	4.31 ± 0.93	97
100	8.88	8.82 ± 0.80	99.3
150	13.32	13.84 ± 0.69	103.9
200	17.76	17.42 ± 0.61	98.1

*Elde edilen sonuçlar birbirinden bağımsız üç analizin sonucudur

Thidiazuron için;**Çizelge 4.15** TDZ için elde edilen derişim değerleri ve % geri kazanım sonuçları

İLAVE HACİM(μL)	BİLİLEN DERİŞİM (mg/L)	HESAPLANAN DERİŞİM(mg/L)±%RSD*	% GERİ KAZANIM
50	4.44	4.25 ± 1.18	95.7
100	8.88	9.38 ± 0.43	105.6
150	13.32	13.17 ± 0.65	98.8
200	17.76	17.82 ± 0.40	100.3

*Elde edilen sonuçlar birbirinden bağımsız üç analizin sonucudur

6-(X-X) Dimetil allilaminopürin için;**Çizelge 4.16** AAP için elde edilen derişim değerleri ve % geri kazanım sonuçları

İLAVE HACİM(μL)	BİLİLEN DERİŞİM (mg/L)	HESAPLANAN DERİŞİM (mg/L)±RSD*	% GERİ KAZANIM
50	4.44	4.05 ±0.89	91.2
100	8.88	9.52 ±0.58	107.2
150	13.32	13.28 ±0.43	99.7
200	17.76	17.62 ±0.55	99.2

*Elde edilen sonuçlar birbirinden bağımsız üç analizin sonucudur

Benzilaminopürin için;

Çizelge 4.17 BAP için elde edilen derişim değerleri ve % geri kazanım sonuçları

İLAVE HACİM(µL)	BİLİLEN DERİŞİM (mg/L)	HESAPLANAN DERİŞİM (mg/L)±RSD*	% GERİ KAZANIM
50	4.44	3.86 ± 0.91	86.9
100	8.88	9.60 ± 0.84	108.1
150	13.32	13.60 ± 1.07	102,1
200	17.76	17.38 ± 0.72	97.8

*Elde edilen sonuçlar birbirinden bağımsız üç analizin sonucudur

5.SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada , apolar yapıdaki alifatik siklohegzil ve aromatik fenil gruplarını içeren ve bunun yanında polar amid ve amin grubu ihtiva eden polar gömülü yapıdaki dolgu maddesi olan SP1 dolgu maddesi kullanılarak (Aral,2013) sitokinlerin örnekleri ayrılmış ve kantitatif tayinleri gerçekleştirilmiştir. Ayırma çalışmalarında pH, çözücü ve sıcaklık parametreleri değiştirilerek optimizasyon çalışması yapılmıştır.

Çalışmanın ilk aşamasında optimum bir pH aralığında çalışabilmek için pH optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Hareketli fazın pH'ını arttırdığımızda TDZ alıkonma süresinin azaldığını , diğer analitlerin ise ayırma sürelerinde pek değişiklik olmadığı görülmüştür. Aynı grup içerisinde , polar olmayan analitlerin kolonu daha geç terk ettiğini söyleyebiliriz. En geç çıkan BAP pikidir. BAP yapısına bakıldığında , yapıdaki benzen halkası ona apolarite kazandırmıştır. Aynı şekilde AAP yapısında bulundurduğu iki metil grubuyla apolar karakterde denilebilir. Bu nedenle iki analit birbirine çok yakın pik vermişlerdir. İlk çıkan pik olan zeatin ise yapısındaki –OH ile polarlığını arttırmış ve hareketli fazda iyon dipol ve hidrojen bağı etkileşimi ile kolonu en erken terk eden analit olmuştur. Buradan sitokinlerin kolonu terk etme sırasının genel olarak polaritelerine bağlı olduğunu söyleyebiliriz.

Sonrasında yapmış olduğumuz çözücü optimizasyonunda öncelikle asetonitril yüzdelere değiştirilerek izokratik ve gradiyent elüsyon çalışmaları yapılmıştır. Asetonitril oranı arttırdığımızda analitlerin alıkonma süreleri azalmıştır. ACN gibi organik bir çözücünün hareketli fazın polaritesini etkiler. Analitlerin pik çıkış sırası aynı kalırken pikler arasındaki mesafe artmış ve pikler daha belirgin hale gelmişlerdir. Su oranının artırılması kolonda güçlü bir şekilde tutunmuş örnek maddelerinin ayrılmasına yardım edebilir. Gradiyent çalışmalarda da, bu durum kanıtlanmıştır. Yüksek ACN oranı piklerin iç içe geçmesine ve çok kısa sürede pik vermelerine sebep olmuştur. Analiz süresini kısalttığımızda ise ACN oranı daha kısa sürede düştüğünden pikler bir miktar daha ayrı gözükabilmektedir. Hareketli fazın polaritesi azaldıkça alıkonmayı artırır. Uygun bir dolgu fazı seçmenin yanı sıra hareketli fazdaki organik çözücünün yüzdesi de ayırmayı etkileyen temel faktördür. (Aral,2013)

Çözücü optimizasyonunun ikinci basamağı tampon derişimindeki artışla yapılmıştır. 10,20,30 ve 40 mmol derişimde hazırlanan optimum şarttaki tampon çözeltileri ile sırasıyla analizde kullanılmış ve ayırmada bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Aynı şekilde tampon çeşidini değiştirdiğimizde de ayrılma sonuçlarının çok farklı olmadığını görmekteyiz. Ayırma etkisi her iki durumda da tüm analitler için aynı kalmıştır.pH değişmediği için gözlemlenen pik şekillerinin alıkonma süreleri ve şiddetleri aynıdır.

Sıcaklık değişimlerine geldiğimizde oldukça farklı kromatogramlar göze çarpmaktadır. Kolon sıcaklığı analitlerin alıkonmasını etkileyen önemli bir parametredir. Çoğu zaman, kolon sıcaklığındaki artış analiz süresini kısaltır. Çünkü sıcaklığın artmasıyla analitlerin mobil fazdaki çözünürlüğü artar ve dolgu fazı etkileşimi azalır bundan dolayı alıkonma süresi azalır(Li ve Carr , 1997)(Aral,2013). Bizim çalışmamızda da bu paralellikte bir davranış gözlenmiş alıkonma süresi oldukça azalmış ve pikler iç içe pik vermişlerdir. Z, K ve TDZ 'da ayırma etkisi değişmemiş ancak alıkonma süreleri kısalmıştır.

Kantitatif tayin kısmında ise LOD , LOQ ve tekrar edilebilirlik çalışmaları yapılmıştır. Tayin sınırları oldukça düşük değerlerde hesaplanmıştır. Yapılan işlemlerde standart sapma hesaplanmış ve kalibrasyon grafikleri de kullanılarak LOD,LOQ değerleri belirlenmiştir. Çalışmış olduğumuz kolon ilk kez bir kantitatif tayinde kullanılmaktadır ve oldukça düşük konsantrasyon değerlerinde çalışılabilmektedir. Kolonun kantitatif çalışmada verimli olduğunu söyleyebiliriz. Aynı şekilde elimizdeki bitki özü örneğinde, deneyde tayin edilmiş sitokinin örneklerinden bulunmadığını kendilerine özgü spesifik pik yerlerinden yola çıkılarak bulundu. Daha sonra standart ekleme yöntemi kullanılarak analit karışımı çözeltilisinden eklendi ve her eklemede daha konsantrasyonla doğru orantılı olarak pikler daha keskin ve net biçimde elde edildi. Böylece bu şekilde yapılan ölçümlerle ortalama geri kazanım ve RSD değerleri elde edildi. Bu şekilde metod validasyonu başarıyla tamamlanmış oldu. Herhangi bir SRM kullanmadan standart ekleme yöntemiyle SRM kullanmış gibi metodun doğruluğunu çıkan değerlerle kanıtladık. Yapılan bağımsız ölçümlerle elde edilen düşük ve kabul edilebilir RSD değerleri de yöntemin doğruluğunu başka bir açıdan kanıtlamaktadır diyebiliriz.

Çalışmış olduğumuz kolon dolgu maddesi sitokinlerin hem kalitatif hem de kantitatif tayinine farklı ve özgün bir bakış açısı kazandıracaktır. Yapılan çalışmalara baktığımızda oldukça kalabalık aygıt grupları kullanılarak hızlı ölçümler elde edilmeye çalışılmıştır. (Tarkowska ve ark.,2003)(Ge ve ark.,2005).Bizim sahip olduğumuz kolon polar embedded karakteri sayesinde bu alanda kullanılan ilk kolon diyebiliriz. Bu nedenle çalışma hem özgün hem de ayırma ve kantitatif tayin için o kadar fazla aygıt kullanmadığımızdan ötürü ekonomiktir. Kromatografik ayırmalarda analizin kısa olması net olması kadar ekonomik şekilde yapılması da önemlidir. Yapmış olduğumuz çalışma aynı zamanda hız açısından da oldukça verimli denilebilir.kolonun kullanımını sayesinde yapılan analiz hem pratik hale gelmiştir hem de kısa sürede ve tek basamakta yapılabildiği için kullanışlıdır. Herhangi bir aygıt eklenilmeden analiz süresi ortalama 25 – 30 dakika arasında tamamlanmaktadır. Genel olarak literatürde yapılmış olan ayırmalara baktığımızda da alıkonma süreleri 10 ile 20 dakika civarında denilebilir (Novak ve ark.,2003)(Liu ve ark.,2003)(Diopan ve ark.,2009). Ayrıca çok fazla metot ve aygıtın bir arada bulunduğu halde 60 dakika analiz süresine sahip çalışma da mevcuttur.(Chen ve ark.,2010)

Sonuç olarak kolon dolgu maddesi hem kalitatif hem de kantitatif çalışmalarda geçerli ve başarılı sonuçlar elde etmiş ve ilk kez sitokinlerin polar gömülü (embedded) faz kullanılarak analizinin yapılması, hem polar gömülü (embedded) fazların çalışmalarına hem de sitokinin analiz çalışmalarına farklı bir bakış açısı , farklı bir yorum kazandırmıştır.

6.KAYNAKLAR

Akman, Y. ve Darıcı, C. 1998. Bitki Fizyolojisi (Beslenme ve Gelişme Fizyolojisi) Ankara

Anonim , 2006b. 26 Nisan 1996 tarih ve 96/23/EC sayılı AB direktifi, 23.

Aral, H. 2013. Farklı Polaritelere Sahip Amid – Silika Kolon Dolgu Materyallerinin Sentezi ve HPLC İle Çeşitli Polar Bileşiklerin Ayrılmasında Kullanımı.Doktora Tezi , Dicle Üniversitesi , Fen Bilimleri Enstitüsü ,Kimya Ana Bilim Dalı

Ascah, T. , Feibush, B. 1990. Novel, highly deactivated reversed – phase for basic compounds J.Chromatogr.A, 506:357

Astot, C. , Dolezal, K., Moritz, T., Sandberg, G., 1998 Precolumn derivatization and capillary liquid chromatographic /frit fast atom bombardment mass spectrometric analysis of cytokinins in *Arabidopsis Thaliana*. J.Mass Spectrom., 33:892-902

Beres, T.,Zatloukal, M.,Voller, J.; Niemann, P.,Gahsche, M.C.,Tarkowski, P.,Novak, O., Hanus, J.,Strnad. M.,Dolezal, K. 2010. Tandem mass spectrometry identification and LC-MS quantification of interact cytokinin nucleotides in K-562 human leukemia cells. Anal.Bioanal.Chem., 398:2071-2080

Björkman, P.O.,Tillberg, E. 1996. Acetylation of cytokinins and modified adenine compounds : a simple and non – destructive derivatization method for gas chromatography mass spectrometric analysis Phytochem.Anal.,7(2):57-68

Carnes, M.G., Anderson, C.R., Brenner, M.L. 1974. The use of high pressure liquid chromatography for the isolation and identification of plant hormones. Plant Physiol., 53:S-332

Chen, W-S. 1991. Changes in cytokinins before and during early flower bud differentiation in lychee (*litche chinensis* Sonn.). Plant Physiol., 96: 1203-1206

Chen, W., Gai, Y., Liu, S., Wang, R., Jiang, X. 2010. Quantitative analysis of cytokinins in plants by high performance liquid chromatography : electrospray ionization ion trap mass spectrometry. Journal of Integrative Plant Biology , 52(10):925-932

Chromotography, 1995. Catalog 350, Alltech Associates, IL, ABD.

Czajkowska, T.,Jaroniec, M. 1997. Selectivity of alkylamide bonded phase with respect to organic acids under reversed- phase conditions. J.Chromatogr.A., 762:147-158

Diopan, V., Adam, V., Havel, L., Kizek, R., 2009. Phytohormones as important biologically active molecules – their simple simultaneous detection. Molecules , 14:1825-1839

Dobrev, P.I., Kaminek, M. 2002. Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed – mode solid phase extraction. *J.Chromatogr.A.* , 950:21-29

Dolezal, K., Popa, I., Hauserova, E., Spichal, L., Chakrabarty, K., Novak, O., Krystof, V., Voller, J., Holub, J., Strnad, M. 2007. Preparation, biological activity and endogenous occurrence of N6-benzyladenosines *Bioorg.Med.Chem.*, 15:3737-3747

Dorsey, J.G., Cooper, W.T. 1994. Retention mechanisms of bonded Phase liquid chromatography. *Anal.Chem.*, 66:857A-866A

Du, F., Ruan, G., Liang, S., Xie, F., Liu, H. 2012. Monolithic molecularly imprinted solid-phase extraction for the selective determination of trace cytokinins in plant samples with liquid chromatography – electrospray tandem mass spectrometry. *Anal.Bioanal.Chem.*, 404:489-501

Euerby, M.R. , Petersson, P. 2005. Chromatographic classification and comparison of commercially available reversed- phase liquid chromatographic columns containing polar embedded groups / amino endcappings using principal component analysis. *J.Chromatogr.A.* , 1088:1-15

Euerby, M.R. , Petersson, P., Campbell, W., Roe, W. 2007. Chromatographic classification and comparison of commercially available reversed- phase liquid chromatographic columns containing pheny moieties using principal component analysis *J.Chromatogr.A.*, 1154:138-151

Fernandez, B., Centeno, M., Feito, I., Sanchez-Thames, R., Rodriguez, A. 1995. Simultaneous analysis of cytokinins ,auxins and abscisic acid by combined immunoaffinity chromatography, high performance liquid chromatography and immunoassay. *Phytochem.Anal.*, 6:49-54

Fletcher, A.T., Mader, J.C. 2007. Hormone profiling by LC-QtoF – MS/MS in dormant *Macadamia integrifolia*:Correlations with abnormal vertical growth. *J.Plant Growth Regul.*, 26:351

Ge, L., Yong, J.W.H., Tan, S.N., Yang, X.H.,Ong,E.S. 2004. Analysis of some cytokinins in coconut (*cocos nucifera L.*) water by micellar electrokinetic capillary chromatography after solid phase extraction. *J.Chromatogr.A.*, 1048:119

Ge, L., Yong, J.W.H.,Goh, N.K., Chia, L.S., Tan, S.N., Ong,E.S. 2005. Identification of kinetin and kinetin riboside in coconut (*cocos nucifera L.*) water using a combined approach of liquid chromatography – tandem mass spectrometry , high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J.Chromatogr.B.*, 829:26-34

- Genkov, T., Ivanov, I., Ivanova, I. 1996. Analysis of cytokinins by immunoassay and high performance liquid chromatography of *in vitro* cultivated *Dianthus Caryophyllus*. Bulg. J. Plant Physiol., 22(3-4): 95-104
- Grayling, A., Hanke, D.E. 1992. Cytokinins in exudates from leaves and roots of red Perilla. Phytochemistry, 31:1863-1868
- Hockart, C.H., Wong, O.C., Letham, D.S., Tay, S.A.B., MacLeod, J.K., Mass spectrometry and chromatography of t-butyl dimethylsilyl derivatives of cytokinin bases. 1986. Anal. Biochem., 153:85
- Horgan, R., Scott, I.M. 1987. Principles and practice of plant hormone analysis (Eds. Rivier, L., Crozier, A.). Academic Press, London, 303
- Hosoya, K., Teramachi, M., Tanaka, N., Kobayashi, A., Kanda, T., Ohtsu, Y., 2001. Preparation strategy for uniformly sized, polymer-beads HPLC packing materials having practically acceptable column efficiency. 1. copolymerization technique, Anal. Chem., 73: 5852
- Hui, F., Ekbort-Ott, K.H., Armstrong, D.W. 2001. High-performance liquid chromatographic and capillary electrophoretic enantioseparation of plant growth regulators and related indole compounds using macrocyclic antibiotics as chiral selectors. J. Chromatogr. A., 906: 91 - 103
- Huntley, R.P., Jones, L.H., Hanke, D.E., 2002. Cytokinins and gibberellins in sap exudate of the oil palm. Phytochem., 60:117-127
- Kafalı H., 2008. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Kolon Sonrası Türevlendirme İle 7 Adet Sülfonamid Tespitinin Metot Validasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı
- Kayillo, S., Dennis, D.S., Shalliker, R.A., 2006. An assesment of the retention behaviour of polycyclic aromatic hydrocarbons on reversed phase stationary phases: Selectivity and retention on C₁₈ and phenyl – type surfaces. J. Chromatogr. A., 1126:283-297
- Kelen, M., Demiralay, E.Ç., Şen, S., Özkan, G. 2004. Separation of abscisic acid, indole – 3 – acetic acid, gibberellic acid in 99 R (*Vitis berlanderi* X *Vitis rupestris*) and rose oil (*rosa damascena* mill.) by reversed phase liquid chromatography. Turk Chem. J., 28:603-610
- Kirkland, J.J., Glajch, J.L., Farlee, R.D. 1989. Synthesis and characterization of highly stable bonded phases for high performance liquid column packings. Anal. Chem., 61:2-11

- Kirkland, J.J., Adams Jr. J.B., vanStraten, M.A. , Claessens, H.A. 1989. Bidentate silane stationary phases for reversed-phase high- performance liquid chromatography. *Anal.Chem.*, 70: 4344
- Kirkland, J.J., vanStraten, M.A. , Claessens, H.A 1995. High pH mobile phase effects on silica – based reversed – phase high performance liquid chromatographic columns. *J. Chromatogr. A.* 691:3-1
- Kirkland, J.J., Henderson, J.W., DeStefano, J.J. , vanStraten, M.A. , Claessens, H.A. 1997. Stability of silica based , end-capped columns with pH 7 and 11 mobile phases for reversed – phase high performance liquid chromatography. *J.Chromatogr. A.*, 762:97-112
- Kirkland, J.J., Truzkowshi, F.A., Ricker, R.D. 2002. Atypical silica – based column packings for high performance liquid chromatography. *J.Chromatogr. A.*, 965:25-34
- Kobayashi, S., Tanaka, I., Shiota, O., Kanda, T., Ohtsu, Y. 1998. Synthesis and characterization of a polymer – coated C₁₈ stationary phase with high carbon content for liquid chromatography. *J.Chromatogr. A.*, 828:75-81
- Kojima, M., Kamada – Nobusada, T., Komatsu, H., Takei, K.,Kuroha, T.,Mizutani, M. , Ashikari, M., Ueguchi- Tanaka, M., Matsuoka, M., Suzuki, K., Sakakibara, H., 2009. Highly sensitive and high- throughput analysis of plant hormones using MS – Probe modification and tandem mass spectrometry: an application for hormone profiling in *Oryza sativa*. *Plant Cell Physiol.*, 50(7):1204-1214
- Kumlay, A.M. , Eryiğit, T. 2011. Bitkilerde büyümeyi düzenleyici maddeler: bitki hormonları. *Iğdır Univ. J. Inst. Sci.& Tech.*, 1(2): 47-56
- Layne, J. 2002. Characterization and comparison of the chromatographic performance of conventional , polar embedded and polar – endcapped reversed phase liquid chromatography stationary phases. *J.Chromatogr.A.*, 957:149-164
- Letham, D. S. Plani, L. M. S. 1983. The biosynthesis and metabolism of cytokinins. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 34: 163–197.
- Levent , A.,Şentürk, Z. 2009. Development of an Ion-Pair HPLC Method for Determination of Acebutolol in Pharmaceuticals. *Analytical Letters*, 43: 9, 1448 -1456
- Li , J.W. , Carr, P.W. 1997. Evaluation of temperature effects on selectivity in RPLC separations using poly-butadiene – coated zirconia *Anal.Chem.*,69:2202-2206
- Liang, Y., Zhao, M.P., Liu, H.W. 2009. Research progress in cytokinin analysis. *Chin.J.Anal.Chem.*, 37:1232-1339

- Liu, B.F. , Zhong, X.H. , Lu, Y.T., 2002. Analysis of plant hormones in tobacco flowers by micellar electrokinetic capillary chromatography coupled with on-line large volume sample stacking. *J.Chromatogr.A.*, 945:257-265
- Liu, X., Bordunov, A.V., Tracy, M.L. , Slingsby, R.W., Avdalovic, N., Pohl, C.A., 2006. Development of a polar-embedded stationary phase with unique properties. *J.Chromatogr.A.*, 1119:120
- Liu, X., Bordunov, A.V. , Pohl, C.A. 2006. Preparation and evaluation of a hydrotically stable amide- embedded stationary phase. *J.Chromatogr.A.*, 1119:128-134
- Liu, Z., Cai, B.D. , Feng, Y.Q. 2012. Rapid determination of endogenous cytokinins in plant samples by combination of magnetic solid phase extraction with hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 891-892:27-35.
- Ludewig, M., Dörffling, K. , König, W.A. 1982. Electron-capture capillary gas chromatography and mass spectrometry of tfluoroacetylated cytokinins. *J. Chromatogr.*,243:93–98
- MacLeold, J.K. , Summons, R.E., Letham, D.S.1976. Mass spectrometry of cytokinin metabolites. Per (trimethylsilyl) and permethyl derivatives of glucosides of zeatin and 6-benzylaminopurine. *J.Org.Chem.*,41:3959-3967
- Majors, R.E. 2001. New Columns & Accessories for LC/MS, see Table IV: New high performance liquid chromatography specialty columns New Chromatography Columns and Accessories at the 2001 Pittsburgh Conference, Part I," *LC-GC* , 19:272
- Majors, R.E.2003. New Chromatography Columns and Accessories at the 2003 Pittsburgh Conference, Part I *LC-GC*. 21(3), 240–257 .
- Majors, R.E. , Przybyciel, M. 2002.Columns for Reversed-Phase LC separations in highly aqueous mobile phases. *LC-GC.*, 20:584-593
- Maldiney, R., Leroux, B., Sabbagh, I., Sotta, B., Sossountzov, L., Miginiac, E. 1986. A biotin-avidin based enzyme immunoassay to quantify three phytohormones : auxin, abscisic acid and zeatin riboside. *J.Immunol. Methods.*, 90:151-158
- Mc Calley, D.V. 1999. Comparison of the performance of the conventional C₁₈ phases with others of alternative functionality for the analysis of basic compounds by reversed phase high performance liquid chromatography. *J.Chromatogr.A*, 844:23-38
- Merchand, D.H., Croes, K., Dolan, J.W., Synder, L.R. 2005. Column selectivity in reversed – phase liquid chromatography:VII Cyanopropyl columns *J.Chromatogr.A.*, 1062: 57-64

- Mok, D.W., Mok, M.C. 2001. Cytokinin metabolism and action. *Annu.Rev. Plant Physiol.Plant Mol.Biol.* , 52:89-118
- Morris, R.O. , Jameson, P.E. , Laloue, M., Morris, J.W. 1991. Rapid identification of cytokinins by an immunological method. *Plant Physiol.*, 95:1156-1161
- Most, B.H., Williams, J.C., Parker, J. 1968. Gas chromatography of cytokinins. *J.Chromatogr.*, 38:136-138
- Nawrocki, J., Dunlap, C., McCormick, A., Carr, P.W. 2004. Part I Chromatography using ultra-stable metal oxide – based stationary phases for HPLC. *J.Chromatogr.A.*, 1028:1-30
- Neue, U.D., Cheng, Y.F. , Lu, Z., Alden, B.A., Iraneta, P.C. , Phoebe , C.H., Van Tran, K., 2001. Properties of reversed phase packings with an embedded polar grup. *Chromatographia*, 54:169
- Nordstorm, A. , Tarkowski, P. , Tarkowska, D. , Dolezal, K. , Astot, C. ,Sandberg, G., Moritz, T. 2004. Derivatization for LC – Electrospray ionization –MS : A tool for improving reversed – phase separation and ESI responses of bases , ribosides and intact nucleotides. *Anal.Chem.*, 76:2869-2877
- Novak, O. , Tarkowski, P. , Tarkowska, D. , Dolezal, K. ,Lenobel, R. , Strnad, M. 2003. Quantitative analysis of cytokinins in plants by liquid chromatography – single quadrupole mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 480: 207-218
- Novak, O., Hauserova, E. , Amarokova, P., Dolezal, K., Strnad, M. 2008. Cytokinin profiling in plant tissues using ultra- performance liquid chromatography – electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochem.*, 69:2214-2224
- O’Gara, J., Alden, B.,Walter, T., Petersen, J., Niederlander. C., Neue, U. 1995. Simple preparation of a C₈ HPLC stationary phase with an internal polar functional group. *Anal.Chem.*, 67:3809-3813
- Öktüren, F. , Sönmez, S. 2005. Bitki besin maddeleri ile bazı bitki büyüme düzenleyicileri(hormonlar) arasındaki ilişkiler. *Derim Dergisi*, Cilt:22 Sayı:22 20-32
- Özen, H.Ç. , Onay, A. , 1999 Bitki büyüme ve gelişme fizyolojisi Dicle Üniversitesi, Diyarbakır.
- Palni, L.M.S. , Summons, R.E. , Letham, D.S. 1983. Mass spectrometric analysis of cytokinins in plant tissues V. Identification of the cytokinin complex of *Datura Innoxia* crown gall tissue. *Plant Physiol.*, 72:858-863
- Pesek, J.J., Matyska, M.T., Yu, R.J. 2002. Synthesis and characterization of endcapped C₁₈ stationary phases using a silica hydride intermediate. *J.Chromatogr.A.*, 947:195-203

- Podlesakova, K. , 2012. Cytokinin metabolism and its regulation. Ph.D.Thesis Palacky University Olomouc , Faculty of Science , Department of Biochemistry., 28-29
- Przybyciel, M., Majors, R.E. 2002. Phase collapse in reversed-phase liquid chromatography LC-GC., 20:516-523
- Prinsen, E., Redig, P., Strnad, M., Galis, I., Van Dongen, W., Van Onckelen, H.A., 1995. Methods in Molecular Biology , Agrobacterium Protocols. (Eds.Gartland, K.M.A., Davey, M.) Humanae Press, New Jersey, USA., 245
- Prinsen, E., Van Dongen, W., Esmans, E.L., Van Onckelen, H.A., 1997 HPLC Linked Electrospray Tandem Mass Spectrometry: A Rapid and Reliable Method to Analyse Indole-3-Acetic Acid Metabolism in Bacteria. J. Mass. Spectrom. 32:12-22
- Qui, H., Liang, X., Sun, M., Jiang, S., 2011. Development of silica- based stationary phases for high performance liquid chromatography. Anal. Bioanal. Chem, 399:3307-3322
- Rattan, S.I.S. , Sodagam, I. 2005. Gerontomodulatory and youth-preserving effects of zeatin on human skin fibroblasts undergoing aging in vitro. Rejuvenation Res., 8:46-57
- Redig, P. , Schmülling, T. , Onckelen, H.V. 1996. Analysis of cytokinin metabolism in *ipt* transgenic tobacco by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. Plant Physiol., 112: 141 – 148
- Riley, C. M., and T. W. Rosanske. 1996. Development and Validation of Analytical Methods. New York: Elsevier.
- Rosher, P.H., Jones, H.G., Hedden, P. 1985. Validation of a radioimmunoassay for (+) abscisic acid in extracts of apple and sweet- pepper tissue using high pressure liquid chromatography and combined gas chromatography- mass spectrometry. Planta, 165:91-97
- Sakakibara, H. 2006. Cytokinins: activity , biosynthesis and translocation. Annu.Rev.Plant Biol., 57:431-449
- Sander, L.C., Wise, S.A. 1987. Effect of phase length on column selectivity for the separation of polycyclic aromatic hydrocarbons by reversed phase liquid chromatography. Anal.Chem. 59:2309-2313
- Say , R., Uysal, Ü.D., Şahin, M., Diltemiz, S.E., Özcan, A., Ersöz, A., Özcan, A.A., Şahin, Y. 2009 Analitik Kimya. Anadolu Üniversitesi Yayınları. Eskişehir. 38
- Schmülling, T. 2004. Cytokinin. In Encyclopedia of Biological Chemistry (Eds. Lennarz, W., Lane, M.D.) Academic Press/Elsevier Science, 1-2

Scott, I.M., Horgan, R. 1984. Mass – spectrometric quantification of cytokinin nucleotides and glycosides in tobacco crown- gall tissue. *Planta* , 161:345 – 354

Swartz, M. E., and I. S. Krull. 1997. *Analytical Method Development and Validation*. New York: Marcel Dekker.

Strnad, M., Veres, K., Hanus, J., Sieglerova V. 1992. *Physiology and Biochemistry of Cytokinins in Plants* (Eds. Kaminek, M., Mok, M.C.C., Zazimalova, E.) SPB Academic Publishers, The Hague, 437

Tarkowska, D., Dolezal, K., Tarkowski, P., Astot, C., Holub, J., Fuksova, K., Schmülling, T., Sandberg, G., Strnad, M. 2003. Identification of new aromatic cytokinins in *Arabidopsis thaliana* and *Populus x canadensis* leaves by LC-(+ ESI) – MS and capillary liquid chromatography / frit fast atom bombardment mass spectrometry. *Physiologia Plantarum*, 117: 579-590

Tarkowski, P., Vaclavikova, K., Novak, O. , Petry, I., Hanus, J. , Whenham, R., Vereecke, D., Sebela, M., Strnad, M. 2010. Analysis of 2- methylthio – derivatives of isoprenoid cytokinins by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* . , 680:86-91

Tarkowski, P., Ge, L., Yong, J.W.H., Tan, S.N. 2009. Analytical methods for cytokinins. *Trends in Analytical Chemistry* . , Vol:28 No:3 323-335

Te-chato, S., Hilae, A., In-peuy, K., 2008. Effects of cytokinin types and concentrations on growth and development of cell suspension culture of oil palm. *Journal of Agriculture Technology*, V. 4(2):157-163

Thomas, T.H. , Carroll, J.E. , Isenberg, F.M.R. , Pendergrass, A. , Howell, L. 1975. A simple inexpensive high pressure liquid chromatographic method for separating cytokinins in plants. *Plant Physiol.*, 56: 410-414

Tomruk, E. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi için hidrofilik destek materyali sentezi ve kromatografik karakterizasyonu. Yüksek lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalı. 10-21

Van Rhjin, J.A., Heskamp, H.H., Davelaar, E., Jordi, W., Leloux, M.S., Brinkman, U.A.T. 2001. Quantitative determination of glycosylated and aglycon isoprenoid cytokinins at sub-picomolar levels by microcolumn liquid chromatography combined with electrospray tandem mass spectrometry. *J.Chromatogr.A.*, 929:31 -42

Vermeulen, K., Strnad, M., Krystof, V., Havlicek, L., Van der Aa, A., Lenjou, M., Nijs, G., Rodrigus, I., Stockman, B., Van Onckelen, H., Van Bockstaele, D.R., Berneman, Z.N. 2002. Antiproliferative effect of plant cytokinin analogues with an inhibitory activity on cyclin-dependent kinases. *Leukemia.*, 16:299-305

Von Schwartzberg, K., Nunez, M.F., Blaschke, H., Dobrev, P.I., Novak, O., Motyka, V., Strnad, M. 2007. Cytokinins in the bryophyte *Physcomitrella patens*: analyses of activity, distribution and cytokinin oxidase / dehydrogenase overexpression reveal the role of extracellular cytokinins. *Plant Physiol.*, 145:786-800

Walter, T.H., Iraneta, P., Capparella, M. 2005. Mechanism of retention loss when C8 and C18 HPLC columns are used with highly aqueous mobile phases. *J.Chromatogr.A*, 1075:177-183

Wang, J., Letham, D.S., Taverner, E., Badenoch-Jones, J., Hocart, C.H. 1995. A procedure for quantification of cytokinins as free bases involving scintillation proximity immunoassay. *Physiol. Plant.*, 95:91-98

Yamaguchi, I., Nakagawa, R., Kuroguchi, S., Murofushi, N., Takahashi, N., Weiler, E.W. 1987. Radioimmunoassay of gibberellins A5 and A20. *Plant Cell. Physiol.*, 28:815-824

Zhou, L., Welch, C., Lee, C., Gong, X., Antonucci, V., Ge, Z., 2009. Development of LC chiral methods for neutral pharmaceutical related compounds using reversed phase and normal phase liquid chromatography with different types of polysaccharide stationary phases. *J.Pharm.Biomed. Anal.*, 49:964-969

Zhang, W., 2008. Fluorinated stationary phases for HPLC applications. *J.FluorineChem.*, 129:910-919

.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Duygu HAŞİMİ
Doğum Yeri : Çorlu/TEKİRDAĞ
Doğum Tarihi : 08/07/1983
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Çorlu Mehmet Akif Ersoy Anadolu Lisesi (1994-2001)
Lisans : Hacettepe Üniversitesi Kimya(İng.) Bölümü (2001-2006)
Yüksek lisans : Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya ABD (2010 -)