

T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS
KİMYA ANABİLİM DALI
ANALİTİK KİMYA BİLİM DALI

BAZI SÖĞÜT VE KAVAK AĞAÇLARINDA SALİSİLİK ASİT
EKSTRAKSİYONU VE TAYİNİ

Yasemin GÜMÜŞ

Danışman
Prof. Dr. Kenan DOST



MANİSA, 2021

TEZ ONAYI

Yasemin GÜMÜŞ tarafından hazırlanan “Bazı Söğüt ve Kavak Ağaçlarında Salisilik Asit Ekstraksiyonu ve Tayini” adlı tez çalışması 25/01/2021 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri önünde Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted] Üniversitesi

Jüri Üyesi

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted] Üniversitesi

Jüri Üyesi

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted] Üniversitesi

TAAHHÜTNAME

Bu tezin Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde, akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Yasemin GÜMÜŞ



İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
TABLO DİZİNİ	IX
TEŞEKKÜR.....	XII
ÖZET.....	XIII
ABSTRACT.....	XIV
1 GİRİŞ.....	1
2 GENEL BİLGİLER	3
2.1 Salisilik Asit	3
2.2 Aspirin	5
2.2.1 Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	5
2.2.2 Aspirin Sentezi	6
2.3 Söğüt Ağacı	6
2.3.1 Söğüt Ağacı Özellikleri ve Kullanım Alanları.....	7
2.3.2 Söğüt Ağacı Türleri.....	8
2.4 Kavak Ağacı	10
2.4.1 Kavak Ağacı Özellikleri ve Kullanım Alanları.....	11
2.4.2 Kavak Ağacı Türleri.....	11
2.4.3 Kavak Ağacı Faydaları.....	13
3 UV/VIS SPEKTROFOTOMETRESİ.....	14
4 YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ	16
4.1 Hareketli Faz Hazneleri ve Çözücü Muamele Sistemleri.....	17
4.2 Pompalama Sistemleri	17
4.3 Numune Enjeksiyon Sistemleri	18
4.4 Sıvı Kromatografi Kolonları.....	19
4.4.1 Analitik Kolonlar	19

4.4.2	Emniyet Kolonları.....	20
4.5	Kolon Dolgu Maddelerinin Tipleri.....	20
4.6	DETEKTÖRLER	21
5	MATERYAL VE METOT	22
5.1	Cihazlar	22
5.2	Kullanılan Materyaller	23
5.3	Çözeltilerin Hazırlanması.....	23
5.4	Salisilik Asit ve Asetil salisilik Asitin UV-VIS ile Tayinleri	23
5.5	Salisilik Asit ve Asetil salisilik Asitin HPLC-UV ile Tayinleri.....	24
5.6	Örneklerin Ekstraksiyonu.....	25
6	SONUÇLAR VE TARTIŞMA	26
6.1	Salisilik Asit ve Asetil Salisilik Asitin UV-Vis Metoduyla Tayini.....	26
6.1.1	Salisilik Asit ve Asetil Salisilik Asit Çözeltilerinin UV-VIS Spektrofotometresi ile Dalga Boyu Taraması.....	26
6.1.2	Salisilik Asitin UV-Vis Spektrofotometresi ile Tayini	28
6.1.3	SA-Fe(III) kompleksinin Stokiyometrik Tayini.....	30
6.2	SALİSİLİK ASİT VE ASETİL SALİSİLİK ASİT MADDELERİNİN HPLC-UV Metoduyla Tayini	31
6.2.1	HPLC-UV Sisteminin Optimizasyonu.....	31
6.2.2	Salisilik Asit Tayinleri için HPLC-UV Sisteminin Doğrusallığı.....	32
6.2.3	HPLC-UV Sisteminin Tekrarlanabilirliği	34
6.2.4	HPLC-UV Sisteminin Doğruluğu	36
6.2.5	HPLC-UV Sisteminin LOD ve LOQ Değerleri.....	37
6.2.6	HPLC-UV Sisteminde Standart Ekleme Yöntemi	38
6.3	Ekstraksiyon Yöntemi	39
6.3.1	Ekstraktların DCM ile Temizlenmesindeki Verimi	42
6.3.2	Ekstraksiyon ve Ekstraktların Temizleme Prosedürünün Uygulanması	

6.4	Örneklerin Analizi	49
7	SONUÇ	59
	KAYNAKLAR	60
	ÖZGEÇMİŞ	63



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABA	Absisik asit
ACN	Asetonitril
ASA	Asetil salisilik asit
DCM	Diklorometan
dak	Dakika
FeCl ₃	Demir(III)klorür
FT-IR	Fouirer Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
g	Gram
HCl	Hidroklorik asit
hPa	Hektopascal
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HPLC-UV	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ve Ultraviyole Spektrometresi
IUPAC	Uluslararası Teorik ve Uygulamalı Kimya Birliği
L	Litre
LOD	En düşük belirleme sınırı
LOQ	En düşük tayin sınırı
M	Molarite
MeOH	Metanol
mg	Miligram
mL	Mililitre
µL	Mikrolitre
NaCl	Sodyum hidroksit
nm	Nanometre
NSAID	Steroid yapıda olmayan anti inflamatuvar ilaçlar
ODS	Okta dekilsilan
psi	İnç kareye pound cinsinden uygulanan kuvvet
PTFE	Politetrafloroetilen (polimer)
RSD	Bağlı standart sapma
R ²	Korelasyon katsayısı
SA	Salisilik asit

SD	Standart sapma
TFA	Trifloroasetik asit
UV-Vis	Ultraviyole – Görünür Bölge Spektroskopisi



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Salisilik asitin moleküler yapısı.....	3
Şekil 2.2. Asetil salisilik asidin moleküler yapısı.....	5
Şekil 2.3. Salisilik asitten aspirin sentezi [21].	6
Şekil 4.1. HPLC cihazının şematik gösterimi [28].	16
Şekil 5.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan HPLC-UV cihazı.....	22
Şekil 5.2 Deneysel çalışmalarda kullanılan UV-VIS cihazı	22
Şekil 5.3 SA-Fe(III) kompleksinin reaksiyonu [29]	24
Şekil 6.1. Salisilik asitin UV-Vis spektrofotometresi ile 200-400 nm arası dalgaboyu taraması.	26
Şekil 6.2. Asetil salisilik asitin UV-Vis spektrofotometresi ile 200-400 nm arası dalgaboyu taraması.....	27
Şekil 6.3. Salisilik asit ve asetil salisilik asitin 200-400 nm'deki spektrumlarının karşılaştırılmış durumları.	27
Şekil 6.4. SA-Fe(III) kompleksinin Vis bölge spektrumu.	28
Şekil 6.5. Salisilik asitin 10-100 mg/L değişen konsantrasyonlarında oluşan SA-Fe(III) kompleksinin üst üste karşılaştırılmış absorpsiyon spektrumu.	29
Şekil 6.6. SA-Fe(III) kompleksine ait kalibrasyon grafiği.....	30
Şekil 6.7. SA-Fe(III) kompleksinin stokiyometrik tayinine ait grafik.	31
Şekil 6.8. Optimum şartlarda salisilik asit ve asetil salisilik asite ait HPLC-UV kromatogramı.	32
Şekil 6.9. HPLC-UV yönteminin salisilik asit standartlarına ait kalibrasyon grafiği	33
Şekil 6.10. HPLC-UV yönteminin asetil salisilik asit standartlarına ait kalibrasyon grafiği	34
Şekil 6.11. DCM ile temizlenmiş salisilik asit ve asetil salisilik asit standart çözeltileri ile elde edilen spiked örneklere ait kromatogram.	41
Şekil 6.12. Etil asetat ile temizlenmiş salisilik asit ve asetil salisilik asit standart çözeltileri ile elde edilen spiked örneklere ait kromatogram.	41
Şekil 6.13. Salisilik asit (75 mg/L) asetil salisilik asit (375 mg/L) standartlarına ait kromatogram.	43
Şekil 6.14. Salisilik asit (75 mg/L) ve asetil salisilik asit (375 mg/L) standartlarının DCM ile temizlenmesi sonrasında ait kromatogram.....	44
Şekil 6.15. Aspirin örneğine ait kromatogram.....	47

Şekil 6.16. Aspirine asetil salisilik asit standardı (375 mg/L) eklenmiş kromatogram	47
Şekil 6.17. Coraspine örneğine ait kromatogram.....	48
Şekil 6.18. Coraspine asetil salisilik asit standardı (375 mg/L) eklenmiş kromatogram	48
Şekil 6.19. Ak kavak ağacı örneğine ait HPLC-UV kromatogramı.....	52
Şekil 6.20. Ak kavak ağacı örneğine 500 mg/L salisilik asit standardı eklenmiş HPLC-UV kromatogramı.....	53
Şekil 6.21. Kara kavak ağacı örneğine ait HPLC-UV kromatogramı.....	53
Şekil 6.22. Kara kavak ağacı örneğine 500 mg/L salisilik asit standardı eklenmiş HPLC-UV kromatogramı.....	54
Şekil 6.23. Ak söğüt ağacı örneğine ait HPLC-UV kromatogramı.....	54
Şekil 6.24. Ak söğüt ağacı örneğine 500 mg/L salisilik asit standardı eklenmiş HPLC-UV kromatogramı.....	55
Şekil 6.25. Kara söğüt ağacı örneğine ait HPLC-UV kromatogramı.....	55
Şekil 6.26. Kara söğüt ağacı örneğine 500 mg/L salisilik asit standardı eklenmesine ait HPLC-UV kromatogramı.....	56
Şekil 6.27. Klasik kavak ağacı örneğine ait HPLC-UV kromatogramı.	56
Şekil 6.28. Klasik kavak ağacı örneğine 500 mg/L salisilik asit standardı eklenmesine ait HPLC-UV kromatogramı.....	57
Şekil 6.29. Kanada kavağı ağacı örneğine ait HPLC-UV kromatogramı.	57
Şekil 6.30. Kanada kavağı ağacı örneğine 500 mg/L salisilik asit standardı eklenmesine ait HPLC-UV kromatogramı.....	58

TABLO DİZİNİ

Tablo 2.1 Asetil salisilik asidin kimyasal özellikleri [20].....	5
Tablo 2.2. Türkiye’de doğal olarak yetişen bazı söğüt ağacı çeşitleri [25]	8
Tablo 3.1. Absorpsiyon ölçümlerinde kullanılan önemli terimler ve semboller.....	15
Tablo 4.1. HPLC detektörlerin bazı performans özellikleri.....	21
Tablo 6.1. SA-Fe(III) kompleksine ait kalibrasyon grafiğinin oluşturulması için kullanılan çözeltilerin hazırlanışı.	29
Tablo 6.2. SA-Fe(III) kompleksinin stokiometrik tayinine ait veriler.	30
Tablo 6.3. Salisilik asit ve asetil salisilik asit standartları için ortalama pik alanlarına ait veriler (n = 3)	33
Tablo 6.4. Salisilik asit için pik alanları bakımından tekrarlanabilirlik verileri	34
Tablo 6.5. Asetil salisilik asit için pik alanları bakımından tekrarlanabilirlik verileri	35
Tablo 6.6. Salisilik asit için alıkonma zamanları bakımından tekrarlanabilirlik verileri	35
Tablo 6.7. Asetil salisilik asit için alıkonma zamanları bakımından tekrarlanabilirlik verileri.	36
Tablo 6.8. Salisilik asit ve asetil salisilik asit tayinleri için HPLC-UV metodunun doğruluğuna ait veriler	36
Tablo 6.9. Salisilik asit ve asetil salisilik asit için LOD ve LOQ değerleri ve bu değerlerin hesaplanmasında kullanılan deneysel veriler.	37
Tablo 6.10. HPLC-UV metodun da salisilik asit için standart ekleme yönteminin doğruluğuna ait veriler	39
Tablo 6.11. HPLC-UV metodun da asetil salisilik asit için standart ekleme yönteminin doğruluğuna ait veriler	39
Tablo 6.12. Sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemiyle ekstraktların etil asetat çözücüsü ile temizlenmesine ait veriler (n = 3).	40
Tablo 6.13. Sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemiyle ekstraktların DCM çözücüsü ile temizlenmesine ait veriler (n = 3).	40
Tablo 6.14. MeOH ekstraktlarının sitrik asitli tampon içerisinde DCM ile temizlenme prosedürüne ait ekstraksiyon verimi verileri (n = 3).	43
Tablo 6.15. Aspirin ve Coraspine tabletlerinde asetil salisilik asit için elde edilen verileri (n = 3).	46

Tablo 6.16. Ağaç örneklerinin ekstraksiyonu sonucu elde edilen salisilik asitin miktarları	50
Tablo 6.17. Örneklerin 1 gram'ındaki salisilik asit miktarları.....	51



RESİM DİZİNİ

Resim 2.1. Ak söğüt (Salix Alba)	9
Resim 2.2. Kara söğüt (Salix Nigra)	10
Resim 2.3. Ak kavak (Populus alba)	12
Resim 2.4. Kara kavak (Populus nigra)	12



TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında bana destek olan, bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren, tecrübesi ile lisansüstü öğrenim hayatımın tüm zorlu aşamalarında maddi manevi her yönden yardımcı olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Kenan DOST'a, tecrübeleri ile beni aydınlatan ve desteğini hiç eksik etmeyen, kendisini tanımaktan büyük onur duyduğum sevgili hocam Sayın Araş. Gör. Mertcan ÖKSÜZ'e, çalışmalarım sırasında manevi desteklerini her zaman hissettiğim arkadaşlarıma, öğrenim hayatım boyunca beni maddi ve manevi olarak destekleyen ve hep yanımda olan aileme yürekten teşekkür ederim.

Yasemin GÜMÜŞ

Manisa, 2021

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Bazı Söğüt ve Kavak Ağaçlarında Salisilik Asit Ekstraksiyonu ve Tayini

Yasemin GÜMÜŞ

Manisa Celal Bayar Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Kenan DOST

Bu çalışmada, söğüt ve kavak ağaçlarında doğal olarak bulunan salisilik asitin etkin bir şekilde ekstraksiyonunun gerçekleştirilmesi için optimum şartları oluşturmak ve bunu takiben salisilik asit ve asetil salisilik asitin yan yana tayinleri için HPLC-UV yöntemi geliştirmek amaçlanmıştır. Geliştirilen bu yöntemle söğüt ve kavak ağaçlarından elde edilen ekstraktların analizleri yapılarak salisilik asit miktarlarının tayinleri gerçekleştirilmiştir.

Ağaç örneklerinde salisilik asit ilk olarak metanol ile ekstrakt edildi ve olası apolar yapıların uzaklaştırılması için ekstraktlar n-hekzan ile yıkandı. Ekstrakt içerisindeki salisilik asit sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi ile diklorometan çözücüsü içine çekildi ve çözücü rotary evaporatörü yardımı ile uzaklaştırıldı. Elde edilen kalıntı 1 mL asetonitril içerisinde çözülerek HPLC-UV sistemine enjekte edildi. Ekstraksiyon verimi spiked örneklerle gerçekleştirilmiş olup, salisilik asit için %97.69 ve asetil salisilik asit için ise % 98.72 olarak bulunmuştur.

Salisilik asit ve asetil salisilik asit HPLC-UV yöntemi ile 9 dakika gibi bir alıkonma zamanı içerisinde birbirinden ayrılmış ve her bir madde için keskin ve dar pikler elde edilmiştir. Yöntemin alıkonma zamanları bakımından tekrarlanabilirliği 0.10 dak standart sapmadan ve %2 bağıl standart sapmadan, pik alanları bakımından %5 bağıl standart sapmadan düşük olup doğruluk %0.37-5.08 bağıl hata aralığında değişmektedir. Yöntemin LOD ve LOQ değerleri sırasıyla salisilik asit için 0.10 ve 0.33 mg/L ve asetil salisilik asit için ise 0.2 ve 0.67 mg/L'dir. Optimizasyon çalışmalarından sonra metot ağaç örneklerine başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Söğüt ve kavak ağaçlarındaki salisilik asit miktarları 1.75-8.00 mg/g arasında değişmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kavak ağacı, Söğüt ağacı, Salisilik asit, Asetil salisilik asit, HPLC-UV.

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

Salicylic Acid Extraction and Determination in Some Willow and Poplar Trees

Yasemin GÜMÜŞ

**Manisa Celal Bayar University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Chemistry**

Supervisor: Prof. Dr. Kenan DOST

In this study, it was aimed to create an optimum condition for the effective extraction of salicylic acid found naturally in willow and poplar trees and to develop a HPLC-UV method for the determination of salicylic acid and acetyl salicylic acid. The amount of the salicylic acid in willow and poplar trees extracts were determined with this developed method.

Salicylic acid was first extracted with methanol in tree samples, and all extracts were washed with n-hexane to remove possible apolar compounds. Salicylic acid was drawn into dichloromethane solvent by liquid-liquid extraction method and the solvent was removed by using a rotary evaporator. The residue was dissolved in 1 mL acetonitrile and injected into the HPLC-UV system. The extraction efficiency was carried out with spiked samples, and it was 97.69% for salicylic acid and 98.72% for acetyl salicylic acid.

Salicylic acid and acetyl salicylic acid were separated in a retention time of 9 minutes with the HPLC-UV method, and sharp and narrow peaks were obtained for each compound. The repeatability of the method in terms of retention time is lower than 0.10 min in standard deviation and 2% in relative standard deviation, in terms of peak areas is lower than 5% in relative standard deviation. The accuracy varies between 0.37% and 5.08% in relative error. The LOD and LOQ values of the method were 0.10 and 0.33 mg/L for salicylic acid and 0.2 and 0.67 mg/L for acetyl salicylic acid, respectively. After the optimization studies, the method has been successfully applied to tree samples. The amount of salicylic acid in willow and poplar trees samples varies between 1.75-8.00 mg/g.

Keywords: Poplar tree, Willow tree, Salicylic acid, Acetyl salicylic acid, HPLC-UV.

1 GİRİŞ

Asetil salisilik asidin etken maddesi olan salisilik asit, Sümerler tarafından 4000 yıl önce söğüt ağacından elde edilmesiyle tıptaki kullanımını başlamış olup, ilk sentetik formu olan aspirin kimyager Felix Hoffmann'ın salisilik asiti asetilleyip saf asetil salisilik asit (ASA) üretmesiyle ortaya çıkmıştır. 1897 yılında Bayer AG'de işçi olarak çalışan Felix Hoffman, rheumatoid arthritis hastası olan babasına bu ilacı vermesi ile ilacın terapötik kullanımını başlamıştır [1]. İlk olarak 1853 yılında keşfedilmesine rağmen klinik kullanımına 1899 yılında başlanmıştır. Asetil salisilik asit, 1899 yılında Bayer AG Leverkusen, Almanya'da "Aspirin" adıyla ticari olarak markalanmıştır [1]. Aynı yıl Berlin'deki Imperial Patent Ofisi'ne aspirin ismiyle kimyasal formülü resmi olarak kayıt ettirilerek toz halinde endüstriyel üretimine başlanmıştır. Aspirin veya diğer adı ile asetil salisilik asit su ile temas edince hemen hidrolize olur ve salisilik asit (SA)'ya dönüşür. Günümüzde salisilik asidin birçok bitkide bulunduğu ve önemli bir gelişme maddesi olduğu bazı bilim adamları tarafından kabul edilmiştir [1, 2].

Son yıllarda bitkilerde salisilik asidin biyolojisi ile ilgili yapılan çalışmaların sonucunda, salisilik asidin diğer birçok fenolik bileşik gibi, bitki büyümesinin düzenlenmesi, gelişimi ve diğer organizmalarla etkileşiminde temel rol oynadığı görüşü ortaya çıkmıştır [3]. Bilindiği üzere, triptofan, tirozin ve fenilalanin gibi temel amino asitlerin oluşumuna yol açan metabolik çatlama, bitkilerde farklı etkilere sahip fitohormonların biyosentezinde de önemli rol oynamaktadır [4].

Serbest salisilik asit aktif olarak taşınmadıkça ve metabolize olmadıkça, ilk sentezlendiği noktadan uzaktaki dokulara hızlı bir şekilde taşınmaktadır. Tarımsal açıdan önemli bitki türlerinin salisilik asit düzeyleri üzerinde yapılmış çalışmalar, bitkilerde bu bileşiğin her zaman ve her yerde dağılmış olabileceğini ortaya çıkarmıştır. En yüksek salisilik asit seviyesi pirinç bitkisinin yapraklarında saptanmıştır [5]. Ayrıca, termojenik (ısı üreten) bitkilerin infloresensinde ve nekroz oluşturan patojenlerle enfekte edilmiş bitkilerde de oldukça yüksek düzeylerde salisilik asit olduğu belirlenmiştir. Bitkilerde salisilik asit (orto-hidroksi benzoik asit) oluşumu için iki metabolik yolun bulunduğu ileri sürülmektedir. Bu yollarda, salisilik asidin β -oksidasyon ve orto-hidroksilasyon reaksiyonlarının oluşum sıralarının birbirinden farklı olduğu saptanmıştır [6].

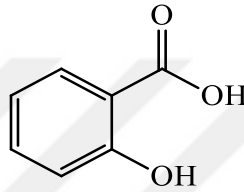
Salisilik asidin bitkilerde taşınımı hakkında kesin bir bilgi olmamakla beraber, fiziksel özellikleri bozulmadan floemde taşınabildiği hakkında güçlü kaynaklar bulunmaktadır. Özellikle biyotik (hastalık ve zararlı) ve abiyotik (sıcak, soğuk, ışık, kuraklık, tuzluluk gibi) stres etkenleri ile karşılaştığında bitkiler hızlı bir şekilde salisilik asit üretmekte ve salisilik asit bitkilerin savunma mekanizmalarında önemli görevler yapmaktadır. Ayrıca salisilik asidin olumsuz şartlarda bitkilerde çiçeklenmeyi uyarıcı etkilerinin olduğu da tespit edilmiştir [3, 7, 8].



2 GENEL BİLGİLER

2.1 SALİSİLİK ASİT

Salisilik asit, genellikle bir hidroksil grubu ya da onun fonksiyonel türevini taşıyan, aromatik bir halkaya sahip bitki fenoliklerinin bir grubudur [3]. Kimyasal formülü $C_7H_6O_3$ olup, renksiz kristal yapıda bir organik asittir. Alkolde çözünür ama suda çok az çözünmektedir. Molekül ağırlığı 138.122 g/mol, kaynama noktası 211 °C (1013 hPa), yoğunluğu 1.443 g/cm³ (20°C), parlama noktası 157 °C, ateşleme sıcaklığı 500 °C, pH değeri 2.4 (H₂O) (doymuş çözelti), buhar basıncı < 1 hPa (100 °C), yığın yoğunluğu 400-500 kg/m³, sudaki çözünürlüğü 2.8 g/L dir [9].



Şekil 2.1. Salisilik asitin moleküler yapısı.

Aspirin yapımında kullanılan salisilik asit, 159 °C de erir. Özellikle ilaç sanayinde, kozmetik ürünlerde ve parfümeri alanında kullanılan bir maddedir. Bu asidin metalik tuzları salisilat olarak tanımlanır. Bunlar önemli kimyasallardır. Sodyum salisilat tıp alanında, ağrı kesici, romatizma tedavisi, antiseptik olarak kullanılmakta, sanayi sektöründe boya üretimi ve koruyucu olarak kullanılmaktadır. Keklik üzümü içinde fazla miktarda bulunan metil salisilat, ilaç ve tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır. Fenil salisilat ise, güneş yağı kremlerinin yapımında ve bağırsakta çözünen ilaçların üretiminde kullanılmaktadır [10].

Vasküler bitkilerde yaygın olarak bulunan salisilik asit bitki büyüme ve gelişiminin düzenlenmesinde ve bitkilerin çevresel streslere cevabında önemli bir rol oynamaktadır [11]. Salisilik asit etilen sentezini geciktirir, membran depolarizasyonunu etkiler, fotosentezi, protein sentezini uyarır ve klorofil içeriğini artırır [12, 13]. Dıştan salisilik asit uygulamasının verimi artırabildiği bildirilmiştir [14]. Ayrıca salisilik asidin ağır metal, herbisist, düşük sıcaklık ve tuzluluk gibi bazı abiyotik strese karşı bazı alışma cevaplarına aracılık ettiği rapor edilmiştir [15, 16].

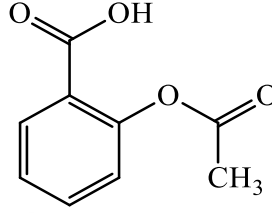
Örneğin, bitkilerde salisilik asit seviyesinin düzenlenmesi, bitki koruma alanında çok sayıda biyoteknolojik çalışmanın gerçekleştirilmesine yol açmaktadır. İçsel salisilik asitteki artışlar, salisilik asit metabolizmasına katılan genlerin ekspresyonunu engelleyerek veya salisilik asidin biyosentez genlerinin kopyalanması ve taşınımı ile ortaya çıkmaktadır. Böylece, salisilik asit seviyesinin artırılmasıyla, transgenik bitki araştırmalarında, önemli patojenlere karşı dayanıklılığı artırılmış bitkilerin ortaya çıkması sağlanmaktadır [17].

Salisilik asidin bitkiler üzerindeki diğer düzenleyici etkileri aşağıdaki gibidir:

- Etilen biyosentezi ve tohum çimlenmesini engellemek,
- Yaralanma tepkilerini engellemek,
- Köklerde absorpsiyon ve membran taşıma mekanizmasını engellemek,
- Nastik yaprak hareketlerini uyarmak,
- Yapraklarda ve epidermiste transpirasyonu azaltmak,
- Absisik asit (ABA) uyarımlı stoma kapanmasını tersine çevirmek,
- Büyümeyi engellemek,
- Baklagillerde simbiyotik azot fiksasyonunda etkili olan kök nodül oluşumunu arttırmak,
- İn vivo'da nitrat redüktazın aktivitesini arttırmak,
- Fasulyelerde verimi ve tohum zarfı sayısını arttırmak,
- Vegetatif gelişmeyi hızlandırmaktır [17].

2.2 ASPIRİN

Aspirin yüzyılı aşkın süredir keşfi yapılmasına rağmen kullanım alanı her gün genişleyen, hakkında yeni bilgiler edinilen ve hala en sık kullanılan analjeziklerin başında gelmektedir. Ana bileşiği sodyum salisilat olan bu organik asit; toksisitesi düşük, genellikle oral kullanımı olan ucuz nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar (NSAID) grubundan bir ilaçtır [18].



Şekil 2.2. Asetil salisilik asidin moleküler yapısı.

2.2.1 Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Fenolik bir bileşik olarak salisilik asit, uygun bir asetilleyici reaktif ile reaksiyona sokulduğunda çok yaygın bir analjezik olan aspirin adıyla bilinen asetil salisilik asit elde edilir [19].

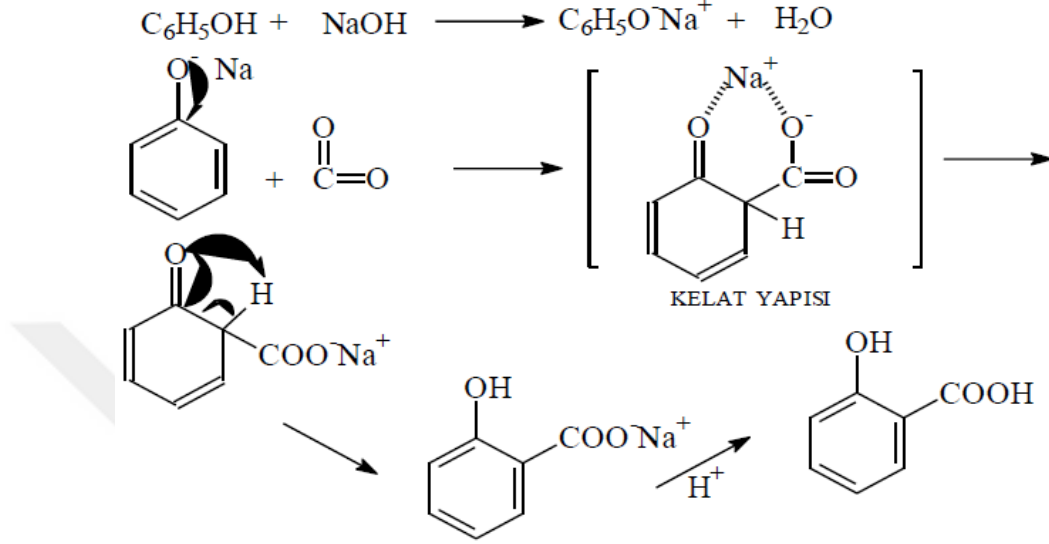
Asetil salisilik asit, düz ya da çivi şeklindeki kristal halinin yanı sıra beyaz toz halinde de bulunabilir. Hafif olarak sirke asiti gibi kokar. pKs değeri 3,5 civarında olup yaklaşık olarak 136 °C de erir ve 140 °C'nin üstündeki sıcaklıklarda yapısı bozulur. Asetil salisilik asit etil alkol ve alkali bazlarında iyi çözülmesine rağmen, benzolde ya da soğuk suda iyi çözünmez. Sıcaklığın yükseltilmesiyle çözünürlük derecesi de doğru oranda artmaktadır. [19].

Tablo 2.1 Asetil salisilik asidin kimyasal özellikleri [20]

Kimyasal adı (IUPAC)	Asetil salisilik asit (2-Asetoksibenzoik asit)
Kimyasal Formülü	C ₉ H ₈ O ₄
Molekül ağırlığı	180.1598 g/mol
Erime noktası	136 °C
Kaynama noktası	140 °C
Yoğunluğu	1,40 g/cm ³

2.2.2 Aspirin Sentezi

Salisilik asidin karboksil grubuna göre orto konumunda bulunan fenolik hidroksi grubu asetik anhidridle tepkimeye girer. Bu tepkimeye asetilasyon denir. Bu tepkime de hidroksi grubuna ait hidrojen atomu asetil grubuyla değiştirilir.



Şekil 2.3. Salisilik asitten aspirin sentezi [21].

Bunun yanında Kolbe-Schmitt tepkimesi adı verilen yöntemin yardımıyla endüstriyel olarak üretilmektedir. Bu yöntemde salisilik asit ile protonasyonlu asetik anhidrit ve fenolik hidroksi grubuyla esterleşerek salisilik asit sentezi gerçekleşmiş olur. Diğer bir alternatif yöntem ise Kolbe-Schmitt tepkimesinin ürünü olan sodyum salisilat direkt olarak asetik anhidrit ile asetilasyon tepkimesine sokulur, böylelikle salisilik asit sentezlenmiş ve bunun yanında ortamda bulunan miktar kadar da sodyum asetat sentezlenmiş olur [21].

2.3 SÖĞÜT AĞACI

Söğüt (*Salix*), söğütgiller (*Salicaceae*) familyasından *Salix* cinsini oluşturan boylu ağaç veya bodur çalı halinde uzun yapraklı, kısa saplı çoğunluğu kışın yaprak dökken, ender olarak da her mevsim yeşil kalan ve 250 kadar türü olan odunsu bir orman ağacı türüdür. Söğüt, genellikle nemli topraklarda, dere ve su kenarlarında büyürler. Tomurcuklarını iç yanı yünsü tek bir pulla kaplıdır. Birey eşli ve sapsız olan çiçekleri tırtılsı başaklar halinde topludur. Erkek çiçeklerde serbest ya da

birbirine kaynamış 2 ila 5 erkek organ vardır; dişi çiçekler üstünde iki tepeciği bulunan bir yumurtalık durumundadır. Meyvesi iki çene halinde açılan bir kapçıktır; küçük tohumları birçok ipeksi tüy taşır [22].

Türkiye’de en fazla rastlanan söğüt türü ak söğüttür (*salix alba*). Ak söğüt söğütlüklerde veya dere boylarında yetiştirilir. Boyları 25-30 metreye ulaşabilen ve 100 yıl kadar yaşayabilen bir ağaçtır. Ak söğütten başka türleri de bulunur: Yaygın bir süs ağacı olan ve 8-10 metreye ulaşan, sarkık dallı salkım söğüt (*S. Babylonica* ya da *S. pendula*); çoğunlukla Doğu ve Kuzeydoğu Anadolu’da görülen ve dalların esnekliğinden ötürü sepetçiliğe çok elverişli olan sorgun ya da sepetçi söğüdü (*S. viminalis*) dır. Sepetçi söğüdü, ak söğüt ile birlikte dar yapraklı söğüt ya da sorgun söğüdü diye de adlandırılır.

Sorgun söğüdü, Anadolu’nun çeşitli yörelerinde özellikle Kastamonu, Daday, Kızılcahamam’da yetişen gevrek söğüt (*S. fragilis*) türüdür. Belgrad ormanlarında, Sapanca Zonguldak, Bolu yörelerinde yetişen söğütlere boz söğüt (*S. cinerea*) adı verilmiştir.

Hemen hemen tüm orman bölgelerinde yetişen, hızla gelişen fakat 50 yıldan fazla yaşayamayan, odunundan kazık, herek, sırım yapımında yararlanılan söğüt türüne keçi söğüdü (*S. caprea*) adı verilmiştir. Ankara, Kızılcahamam, Malatya dolaylarında yetişen söğüt türüne erguvani söğüdü (*S. purpurea*) adı verilmiştir.

Bursa, Gümüşhane, Çoruh ve Erzurum yörelerinde yetişen söğüt türüne badem yapraklı söğüt (*S. amygdalina*) adı verilir. Bolu, Düzce, Ilgaz dağı bölgesinde yetişen söğüde iğde yapraklı söğüt (*S. Alargnos*) adı verilmiştir [23].

2.3.1 Söğüt Ağacı Özellikleri ve Kullanım Alanları

En eski arkeolojik kalıntıları Anadolu neolitik çağ yerleşimlerinde bulunmuştur. Anadolu'nun ilk yazılı metinlerinin sahibi olan Hititler, Şişiyamma adını verdikleri söğüt ağacından ilaç elde etmişlerdir. Eski Sümer ve Mısır kayıtlarında söğüt ağacı kabuğunun ağrı ve ateş tedavisinde kullanıldığı ile ilgili bilgiler yer almaktadır. M.Ö. 5.YY'da Yunanlı Doktor Hipokrat söğütün ilaç olarak

kullanımından bahsetmiştir. Amerika yerlilerinin de söğüdü tedavi amacıyla sık sık kullandığı bilinmektedir [24].

Söğüt ağacı kabuğundaki ilaç için kullanılan aktif madde salisindir. Kristal formu ilk olarak 1828'de Fransız eczacı Henri Leroux tarafından ayrıştırılmıştır. Saf formu İtalyan kimyager Raffaale Piria tarafından elde edilmiştir. Suda çözündüğü zaman asit özelliği gösterdiğinden (pH= 2.4) salisilik asit olarak adlandırılmıştır. 1897'de Felix Hoffmann sentetik olarak salisin maddesinin değiştirilmiş bir formunu elde etmeyi başardı. Yeni bileşik salisilik asitten daha az mide problemlerine yol açıyordu. Bu yeni ilaç, yani asetil salisilik asit Hoffman'ın işvereni olan Bayer firması tarafından Aspirin olarak adlandırıldı ve dünyanın en çok kullanılan ilacı haline geldi [24].

Bazı söğüt türlerinin kabukları kurutulularak halk hekimliğinde halen kullanılmaktadır. Kokusuz ve acımsı lezzettedirler. Tanen (%15) ve etkili madde olarak bir glikozit (salisin) içerir. Toz halinde yatıştırıcı, güçlendirici ve romatizma ağrılarını giderici olarak kullanılır. Yaprakları ve kökleri de aynı amaçla verilebilir [22].

2.3.2 Söğüt Ağacı Türleri

Türkiye'de doğal olarak yetişen 27 söğüt türü bulunur ve bu türler Tablo 2.2.'de verilmiştir.

Tablo 2.2. Türkiye'de doğal olarak yetişen bazı söğüt ağacı çeşitleri [25]

Ak söğüt (<i>Salix Alba</i>)	Misk söğüdü
Acem söğüdü	Salkım söğüt
Badem yapraklı söğüt	Sepetçi söğüdü
Boylu söğüt	<i>Salix apoda</i>
Boz söğüt	<i>Salix armenorossica</i>
Defne yapraklı söğüt	<i>Salix elbursensis</i>
Gevrek söğüt	<i>Salix pedicellata</i>
İğde yapraklı söğüt	<i>Salix pentandroides</i>
Karşılıklı yapraklı söğüt	<i>Salix pseudododepressa</i>

Tablo 2.2'nin devamı

Keçi söğüdü	Salix pseudomedewii
Kafkas söğüdü	Salix wilhelmsiana
Mersin yapraklı söğüt	

2.3.2.1 Ak Söğüt (Salix alba)

Yurdumuzda özellikle çay ve dere kenarlarında doğal olarak yaşar. Kuzey yarım kürede geniş bir yayılım gösterir. Düzgün bir gövdeye sahiptir ve yazın yeşil, 20–30 metre boylanabilmektedir. Kabuğu boz renkli dalları sarımtırak ve uzunlamasına yarıklıdır. Yaprakları 6–10 cm uzunlukta, dar ve uzun mızrak biçiminde, kısa saplı, kenarları ince dişlidir. Erkek ve dişi çiçekler başak biçimindedir. Nisan–Mayıs arasında çiçeklenir [23].



Resim 2.1. Ak söğüt (Salix Alba)

2.3.2.2 Kara Söğüt

Siyah söğüt (Salix nigra) en büyük ve Kuzey Amerika'ya özgü yaklaşık 90 türün sadece ticari açıdan en önemlisidir. Kara söğüt ağaçları çok büyük ve söğüt ağaçları içinde en farklı olan ağaçtır. Bazen kullanılan diğer isimler söğüt, siyah söğüt, Dudley söğüt ve bataklık söğüttür. Siyah söğüt yoğun kök sistemi ile toprakları stabilize etmek, ahşap ürün yapımı ve ağaç çeşitliliği için kullanılır.

Hızlı büyüyen ağaç (10-60 ft.), birkaç sandıklı, tek kökünden dışarı doğru büyüyen genellikle açık taç yapraklıdır. Yaprakları 5 inç., ince, dar ve uzun sivri

şeklindedir. Parlak sarı-yeşil dalları vardır. Dere boyunca, gölet ve göller kenarındaki ıslak toprakta bulunur. Mart ve Nisan aylarında görülen uzun kümeler halinde düzenlenmiş göze çarpmayan çiçeklere sahiptir.

Ülke çapında en geniş aralıkları olan, en büyük ve en önemlisi Yeni Dünya söğüdüdür. Büyük ağaçlar toprak bağlayıcı, toprak erozyonu ve sel hasarı önlemede oldukça değerlidir. Kara söğüdün gövdesinden ve dallarından yapılan direkler nehir ve setlerin korunmasını sağlar [26].



Resim 2.2. Kara söğüt (Salix Nigra)

2.4 KAVAK AĞACI

Söğütgiller (Salicaceae) ailesine ait odunsu bir bitki olan kavak ağacının en önemli özelliği çabuk büyümesidir. Sürgün verme özelliğine sahip olan bu ağacın en iyi yetişme alanları dolma araziler ve akarsu kenarlarıdır. Rutubetli ve nemli yerlerde rahatlıkla yetiştirilir. Ağır topraklarda ve durgun su olan yerlerde ne yazık ki kavak ağacı gelişemez.

Ülkemizin hemen her yerinde kavak ağacı yetiştiriciliği yapılmaktadır ancak bölgelere göre kavakların türleri değişim gösterir. Buradaki en temel etken iklim. Türkiye'nin en büyük kavak ormanı Samsun'un Terme ilçesinde yer almaktadır. Kavak yetiştiriciliği bu bölgede yaşayan halk için önemli bir geçim kaynağıdır.

Ormanda yetişen kavaklar ülke içine satıldığı gibi, yabancı ülkelere de ihraç edilmektedir [27].

2.4.1 Kavak Ağacı Özellikleri ve Kullanım Alanları

Boyları 10 ila 20 metre arasında değişen kavak ağaçları Mart-Nisan aylarında çiçek açmaya başlar. İki evcikli ağaç türleri arasında bulunan kavak ağacında tozlaşma rüzgar aracılığıyla meydana gelir. Siyahımsı bir renge sahip olan gövde kısımları derin ve çatlaklı bir yapıdadır. Geniş ve yaygın dalları vardır. Yapraklarının üst kısımları yeşil, alt kısımları kül renginde olsa da kavağın türüne göre yaprak renkleri farklılık göstermektedir.

Örneğin; bazı türlerde üçgen yapraklı bazı türlerde ise oval biçiminde yapraklar görülmektedir. Genellemenin yaprak gerekirse kavakların büyük çoğunluğu üçgen şeklinde yapraklara sahiptir. Yaprakların kenarları dişli ve tüysüzdür. Yapraklarındaki pullar reçine benzeri bir maddeyle birbirine yapışmıştır. Kavak ağacının tohumu tüylü bir yapıdadır. Yaprak sapları, yaprak ayasında dikey pozisyonda yassılanmış şekildedir. Erkek çiçekler genel olarak sarkık bir görünüme sahiptir. Kavak ağacı, reçine, salisin, populin, tanen ve uçucu yağ içerir.

Kavak ağaçları, özellikle rüzgar kesme özelliği ile bahçe ve parklara veya tarla kenarlarına dikilir. Bu ağaçtan elde edilen odunlar genellikle mobilya, kibrit ve ahşap ev yapımı ile kağıt üretiminde kullanılır. Odunlarından ayrıca odun kömürü elde edilir. Dolayısıyla yakacak olarak da kullanılmaktadır [27].

2.4.2 Kavak Ağacı Türleri

Ülkemizde kara kavak, servi kavağı (ehrami kavak), ak (beyaz) kavak, boz kavak, Fırat kavağı ve titrek kavak olmak üzere 6 kavak türü yetişmektedir. Bunlar arasından boz kavak melez bir türdür. Ülkemizde en çok görülen kavak türleri ise titrek ve servi (ehrami) kavağıdır. Bu 6 türün dışında telli kavak, konak kavak, piramit kavağı, Hollanda kavağı ve Kanada kavağı gibi kavak çeşitleri de bulunmaktadır [27].

2.4.2.1 Ak Kavak (*Populus alba*)

Bu türdeki kavak ağaçlarının yapraklarının alt kısmı beyazdır. 30-40 metreye kadar büyüme gösteren bu türün gövdesinin üzerinde bulunan parlak beyaz kabuklar, çatlamadan uzun yıllar kalır. Ak kavak türünün yapraklarının şekilleri dallarına göre farklılık gösterir [27].



Resim 2.3. Ak kavak (*Populus alba*)

2.4.2.2 Kara kavak (*Populus nigra*)

Kara kavak türünün anavatanı Avrupa, Güneybatı ve Orta Asya ile Türkiye'dir. 30 metreye kadar büyüme gösteren bu türün sürgünleri tüysüz ve sarımsı-kahverengi renkte, düz ve yuvarlaktır. Kara kavak ağacının çiçekleri Nisan ayında açar, Haziran ayında tohumları olgunlaşır. Bu tür, nemli topraklarda iyi yetişir [27].



Resim 2.4. Kara kavak (*Populus nigra*)

2.4.3 Kavak Ağacı Faydaları

Ülkemizdeki pek çok ağaçta olduğu gibi, kavak ağacından da ilaç yapımında faydalanılmaktadır. Kavak ağacı açmadan önce toplanan yaprak ve çiçek tomurcuklarından ilaçlar elde edilmektedir. Bu ilaçlar aşağıda verilen rahatsızlıklara karşı etkili olduğu bilinmektedir [27].

- Kavak ağacı tomurcuklardan yapılan merhemler basur tedavisi ve romatizma ağrılarına iyi gelmektedir. Romatizma ağrıları için kavağın dal kabuklarının kullanılması gerekir.
- Mide ve bağırsak rahatsızlıklarını gidermeye yardımcıdır.
- Kavak yaprağı safra kesesi kumunun dökülmesinde etkilidir.
- Çay olarak tüketildiğinde ateş düşürücü etkisi yaratır.
- Yaprakları ve kabukları ağrı gidericidir.
- Kabukları çay olarak tüketildiğinde kabızlığa karşı etkilidir.
- Kara kavak odununun yakılmasıyla kömür elde edilir. Bu kömürden yapılan diş tozları dişlerin temizlenmesinde kullanılmaktadır.
- Kavak ağacı yıllarca kırık ve çıkıkların düzeltilmesinde kullanılmıştır.
- Kuru kavak dallarının yakarak elde edilen yağ, diş ağrılarının giderilmesinde etkilidir [27].

3 UV/VIS SPEKTROFOTOMETRESİ

Elektromanyetik ışın ile madde etkileşimini inceleyen bilim dalına spektroskopi, elektromanyetik ışının 200 ile 800 nm dalga boyuna sahip ışınlarla molekül etkileşimini inceleyen spektroskopi dalına da ultraviyole-görünür bölge (UV/Vis) spektroskopisi denir. UV-Vis spektroskopisi, analiz edilecek madde tarafından absorplanan monokromatik ışının ölçülmesi esasına dayanır. Ultraviyole ve görünür ışınların absorpsiyon ölçümleri çok sayıda inorganik ve organik bileşiğin kalitatif ve kantitatif analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Moleküler absorpsiyon spektroskopisi b cm ışın yoluna sahip ışık geçirgen bir kapta bulunan bir çözeltinin geçirgenliğinin (T) veya absorbansının (A) ölçümüne dayanır. Normal olarak absorbans, absorpsiyon yapan analitin derişimi ile doğrusal olarak değişir:

Absorpsiyon olayında madde tarafından absorplanan ışının gücü direk olarak hesaplanamaz. Dolayısı ile absorplanan ışın gücü, gelen ve ortamı terk eden ışınların gücü ile ilişkilendirilmelidir. Çünkü P_0 ve P deneysel olarak ölçülebilir. Ortam tarafından geçirilen ışının şiddetinin, gelen ışının şiddetinin oranına geçirgenlik denir (T).

$$T = \frac{P}{P_0}$$

Absorbans, geçirgenliğin eksi (- log) logaritmasıdır ve absorbans ile geçirgenlik arasındaki ilişki aşağıdaki gibidir;

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

Bu eşitlikteki bütün değişkenler Tablo 3.1.'de tanımlanmıştır. Bu eşitlik Beer yasasının matematiksel bir ifadesidir.

Tablo 3.1. Absorpsiyon ölçümlerinde kullanılan önemli terimler ve semboller.

Terim ve Sembol	Tanımı	Diğer İsmi ve Sembolü
Işın gücü P, P_o	Dedektörün 1 cm^2 'lik alanına bir saniyede düşen ışının enerjisi (erg)	Işın şiddeti I, I_o
Absorbans A	$\text{Log} \frac{P_o}{P}$	Optik yoğunluk D; ektinksiyon E
Geçirgenlik T	$\frac{P}{P_o}$	Transmittans T
Işın yolu b (cm)	-	I, d
Absorptivite a ($\text{L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	$\frac{A}{bc}$	Ekstinksiyon katsayısı *
Molar absorptivite ϵ ($\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	$\frac{A}{bc}$	Molar ekstinksiyon katsayısı**

*c : g/L veya diğer derişim birimleri cinsinden verilebilir; b cm veya diğer uzunluk birimleri cinsinden verilebilir.

**c : mol/L cinsinden verilir, b cm cinsinden verilir.

UV/Vis spektroskopisinde kullanılan alete UV/Vis spektrofotometresi denir ve dizaynı bakımından spektrofotometreler iki türdür.

1. Tek ışın yollu spektrofotometreler
2. Çift ışın yollu spektrofotometreler

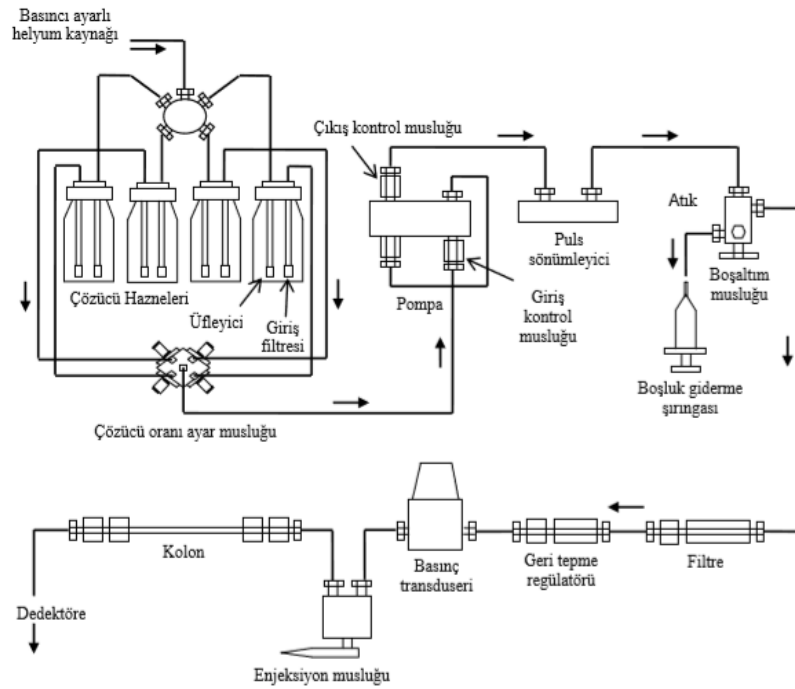
Cihazlar dizayn bakımından farklılık göstermesine rağmen kullanılan parçalar temel olarak aynı olup her iki cihazda da aşağıdaki parçalar mevcuttur [28].

1. Işın kaynağı
2. Monokromatör
3. Numune kapları
4. Dedektör
5. Yazıcı ekran

4 YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOGRAFİSİ

Dolgulu kolonlarla yüksek basınç altında bir sıvının kolon içerisinden geçirilmesiyle yapılan kromatografi türlerine yüksek performanslı sıvı kromatografisi denir. Yüksek performans sıvı kromatografisi, bütün analitik ayırma metotları arasında en çok kullanılanıdır. Bunun nedeni, bu metodun: (1) hassas olması, (2) sıcaklığa hassas olan maddelere uygulanabilmesi, (3) uçuculuğu düşük olan bileşiklerin kolaylıkla analizlenebilmesi, (4) doğruluk dereceleri ve kesinlikleri yüksek kantitatif analitik sonuçlar vermesidir. Metodun uygulandığı başlıca alanlar; nükleik asitler, terpenoitler, pestisitler antibiyotikler, steroidler, proteinler, amino asitler, hidrokarbonlar, karbonhidratlar, metal organik bileşikleri ve bazı inorganik maddelerdir.

Modern sıvı kromatografi sistemlerinde genel olarak kullanılan ve tanecik boyutu 3 ile 10 μm arasında olan dolgu maddeleri ile uygun sıvı akış hızları elde edebilmek için, yüzlerce atm'lik pompa basınçlarına gerek vardır. Bu yüksek basınçların bir sonucu olarak HPLC için gerekli donanım, diğer tip kromatografi sistemleri dikkate alındığında, daha karmaşık ve sonuçta daha pahalıdır. Şekil 4.1. tipik bir yüksek performanslı sıvı kromatografisinin önemli parçalarını şematik olarak göstermektedir [28].



Şekil 4.1. HPLC cihazının şematik gösterimi [28].

4.1 HAREKETLİ FAZ HAZNELERİ VE ÇÖZÜCÜ MUAMELE SİSTEMLERİ

Modern bir HPLC cihazı, bir veya daha fazla, her biri 200-1000 mL çözücü içeren camdan veya çelikten yapılmış hazne içermektedir. Bu hazneler çoğu zaman, kolonda ve detektör sisteminde gaz oluşturarak bozucu etkilere sebep olan çözünmüş gazların (genellikle oksijen ve azot) giderilmesi için bir cihazla donatılmıştır. Bu gaz kabarcıkları bant genişlemesine; ayrıca, çoğu zaman detektörün performansında bozucu etkilere sebep olurlar. Gaz giderme düzeneği, vakum pompası sistemi, damıtma sistemi ve çözücüü ısıtıp karıştıran bir parçadan oluşabileceği düşük çözünürlükteki inert bir gazın küçük kabarcıkları yardımıyla, çözünmüş gazları sürükleyen basit bir üfleyici de olabilir.

Çoğunlukla bu sistemler, çözücü içinde bulunabilecek toz ve partikül halindeki maddelerin pompaya ve enjeksiyon sistemine zarar vermemesi veya kolonu tıkamaması için, toz ve partikül maddeleri süzmeye yarayan bir süzme düzeneği de içerirler.

Sabit bileşimdeki tek bir çözücü kullanılarak yapılan ayırma izokritik elüsyon olarak adlandırılır. Sıklıkla, ayırma etkinliği gradient elüsyonu ile büyük ölçüde artırılır. Burada polariteleri önemli derecede birbirinden farklı, iki veya üç çözücü sistemi kullanılır. Elüsyon başladıktan sonra, belli bir programa göre, bazen sürekli olarak ve bazen de bir seri basamaklar halinde, çözücülerin oranı değiştirilir [28].

4.2 POMPALAMA SİSTEMLERİ

Bir HPLC pompalama sistemi için gerekli şartlar oldukça sıkıdır ve şunları içermektedir: (1) 0-1200 atm'e arası basınç üretimi, (2) puls içermeyen basınç çıkışı, (3) 0.1-10 mL/dakika aralığında akış hızları, (4) % 0.5 veya daha iyi bir bağıl tekrarlanabilirlikle akış kontrolü, (5) korozyona dayanıklı parçalar (paslanmaz çelik veya teflondan yapılmış sızdırmazlık). Her birinin kendine göre üstünlük ve sakıncaları bulunan üç tip pompa vardır. Bunlar; pistonlu pompalar, şırınga veya sürgülü pompalar ve pnömatik veya sabit basınç pompalarıdır. Modern HPLC cihazlarının hemen hepsinde pistonlu pompalar kullanılmaktadır [28].

Pistonlu pompalar, genellikle motor kontrollü bir pistonun ileri ve geri hareketiyle çözücünün pompalandığı küçük bir silindirden meydana gelmiştir. Piston çözücünün çekildiği ve pompalandığı bir hücreye bağlıdır. Bu hücrenin bir ucundan pistonun geriye doğru hareketi ile çözücü emilir, diğer ucundan ise pistonun ileriye doğru hareketi ile çözücü hücre dışına itilir. Hücrenin çözücü emilen ve basılan uçlarından iki tane çek valf sistemi bulunur. Bunlar sayesinde her iki yönde de sızıntı olmadan çözücünün bir yönde emilmesi ve basılması sağlanır. Pistonlu pompaların üstünlüğü, küçük iç hacimleri (35-400 µL), yüksek çıkış basıncı (10000 psi), gradient ayırma uyarlamaya hazır oluşları ve kolon geri basıncından ve çözücü viskozitesinden büyük ölçüde bağımsız olan sabit hareketli faz akış hızlarının elde edilmesidir. Klasik HPLC sistemi ile 6000-10000 psi, son geliştirilen ultra performanslı sıvı kromatografisi (UHPLC) cihazları ile 18000 psi basınca ulaşmak mümkündür.

4.3 NUMUNE ENJEKSİYON SİSTEMLERİ

HPLC’de numune enjeksiyonu düşük basınçta yapılır. Numunenin rahat yüklenmesi ve hareketli faz akışının enjeksiyondan etkilenmemesi için numune altı portlu enjektör sistemi kanalına uygun hacimli bir şırınga ile verilir. Vananın pozisyonu değiştirilerek, enjekte edilen numune, yüksek basınçta hareket eden hareketli faza karışır ve kolona hareketli fazda çözünmüş halde ulaşır. Ulaşma çok küçük bir hacim içinde olur. Böylece numune fazla seyrelmeden kolona ulaşır. Bu çok önemli bir husustur. Numune seyrelirse, detektörden yayvan pikler elde edilir. Bu da hiç istenmeyen bir husustur.

HPLC metodunun kesinliğini azaltan en önemli faktör, numunenin kolona enjeksiyonunda yapılan hatalardır. Sıvı kromatografide numune vermek için en yaygın kullanılan yöntem numune giriş sarımlarının kullanılması esasına dayanmaktadır. Birçok sıvı kromatografi cihazının ayrılmaz bir parçası olan bu sarımlar, değiştirilebilir nitelikte olup 5 µL’den 500 µL’ye kadar değişen hacimlerde numune hacmi seçimine olanak tanımaktadır. Bu tipteki numune alma sarımları, 18000 psi basınca kadar, binde birkaç bağıl hata verecek kesinlikle numunenin kolona uygulanabilmesini sağlamaktadır. Hacmi 0.5-5 µL arasında olan sarmalların bulunan mikro numune enjeksiyon sistemlerin de mevcuttur [28].

4.4 SIVI KROMATOĞRAFİ KOLONLARI

Sıvı kromatografi kolonları normal olarak düzgün iç çaplı paslanmaz çelik borulardan yapılır. Çeşitli üreticilerden, boyutları ve dolgu maddesi farklı, yüzlerce dolgulu kolon temin etmek mümkündür.

4.4.1 Analitik Kolonlar

Modern HPLC cihazının en önemli kısmı olan kolon, karmaşık örneklerde maddelerin birbirinden iyi çözünürlükle ayırımından sorumlu sabit fazdır. Kolon imalatında yapı materyali olarak 316 paslanmaz çelik, TEFLON, cam veya PEEK en sık tercih edilenlerdir. Cam boruların çalışma basıncı yaklaşık olarak 600 psi ile sınırlı iken çelik borular ile 18000 psi 'ya kadar çıkılabilir. Analitik kolonların ayırım gücü ve performansı yapıldığı materyalden ziyade, kolon dolgu malzemenin kimyasal ve fiziksel özelliklerine bağlıdır. Temel olarak dolgu malzemesi silanol gruplarını ihtiva eden ana kemik yapı üzerine bağlanabilen çeşitli fonksiyonel grupların varlığından dolayı, HPLC'de farklı polariteye sahip çok çeşitli analitik kolon kullanmak mümkündür. Seçilecek analitik kolon, kullanılacak hareketli fazın ve uygulanacak HPLC metodunun özelliklerine ve en önemlisi analizi yapılacak maddelerin bilinen fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre seçilmelidir. HPLC'de kullanılan kolonların büyük çoğunluğu boyu 3-30 cm arasında değişmektedir.

Analitik kolonların iç çapları ise çoğu zaman 1.8-10 mm olup, kolon dolgu maddesinin tanecik büyüklüğü 2-5 µm arasında değişebilmektedir. Günümüzde klasik HPLC'de en çok kullanılan kolon, 250 mm uzunluğunda, 4,6 mm iç çapında ve 5 µm tanecik büyüklüğüne sahip dolgu maddesi doldurulmuş kolonlardır. Bu tip kolonlar 40000-60000 teorik plaka/metre içerirler. Analitik kolon boyutları ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi kullanımında daha kısa, dar ve küçük tanecik boyutlarına sahiptirler. Bu gibi kolonlar 100000 teorik plaka//metre içerirler ve hız ve minimum çözücü sarfiyatı avantajları vardır. Son özellik oldukça önemlidir, çünkü sıvı kromatografi için gerekli olan yüksek saflıktaki çözücüler, temin edilmesi ve daha sonra atılması oldukça pahalıya mal olan çözücülerdir. Analizler genellikle oda sıcaklığında gerçekleştirilir, fakat oda sıcaklığının düzensiz olduğu durumlarda ve bileşenlerin ayrımları üzerine sıcaklığı etkili olduğu durumlarda kolon sıcaklığını sabit tutmak için kolon fırını kullanımı oldukça

yaygındır. Blok ısıtıcılı, fanlı ve peltier kolon fırınları mevcuttur. Peltier sistemler çabuk ısıtılıp soğutulabildiği ve daha sabit sıcaklık sağladığı için tercih edilir [28].

4.4.2 Emniyet Kolonları

Analitik kolonun ömrünü artırmak amacıyla, analitik kolondan önce genellikle kısa bir kolon yerleştirilir. Bu kolonun görevi, sadece partikül haldeki maddeleri ve çözücü içindeki yabancı maddeleri tutmak değil, aynı zamanda numune içinde bulunan ve durgun faza tersinmez olarak bağlanan bileşenleri de tutmaktır. İlave olarak, sıvı kromatografide emniyet kolonları, hareketli fazı durgun faz ile doyurarak analitik kolondaki çözücü kaybının en aza indirilmesini sağlar. Emniyet kolonundaki dolgu maddesinin bileşimi, analitik kolonundakine çok benzer olmalıdır; bununla beraber, basınç düşüşünü en aza indirmek için tanecik boyutu genellikle daha büyüktür. [28].

4.5 KOLON DOLGU MADDELERİNİN TİPLERİ

Sıvı kromatografide temel olarak iki tip kolon dolgu maddesi kullanılmaktadır. Bunlar, film dolgular ve gözenekli dolgulardır. Bunlardan birincisi, küresel, gözeneksiz, çapları 30-40 µm olan cam veya polimer tanelerinde oluşur. Bu tanelerin yüzeyine, silis, alumina, polistiren-divinil benzen sentetik reçinesi veya bir iyon değiştirici reçineden oluşan ince bir gözenekli film kaplanmıştır. Bazı uygulamalar için, bu yüzeye, absorpsiyon ile yüzeye tutunan uygun bir sıvı, durgun bir faz olarak ilave bir katman halinde kaplanır. Alternatif olarak, organik bir yüzey katman oluşturmak üzere kimyasal işleme tabi tutulabilir.

Sıvı kromatografide kullanılan gözenekli partiküller, çapları 3-10 µm arasında olan gözenekli partiküllerdir. Belli boyutlardaki bir partikül için, partikül boyutu aralığını en aza indirmek için, her türlü gayret sarfedilmektedir. Partiküller, silis, alümina, polistiren-divinil benzen sentetik reçinesi veya bir iyon değiştirici reçineden meydana gelmiştir. Silis, sıvı kromatografide en yaygın olarak kullanılan bir dolgu maddesidir. Silis, partikülleri, mikron altı silis partiküllerini oldukça uniform yarıçapta daha büyük partiküller oluşturacak koşullarda bir araya toplanması ile hazırlanır. Elde edilen partiküller çoğu zaman, yüzeye kimyasal olarak veya fiziksel olarak bağlanan, ince bir organik film ile kaplanır [28].

4.6 DETEKTÖRLER

HPLC sistemlerinde en önemli bileşenlerden biri detektördür. Kromatografik yöntemle ayrılan herhangi bir maddeye ilişkin anlamlı bir sonuç üretebilmesi için kalitatif ve kantitatif yönden değerlendirilmesi gerekir. Bir detektörün işlevi örneğin derişimi ile orantılı olacak şekilde elektrik sinyali üretmektir. İdeal bir detektör, yaygın olarak kullanılan çözücüler için ya çok az ya da hiç sinyal üretmemelidir. Fakat uygulamalarda böyle bir detektörle karşılaşmak güçtür. Bu nedenle hareketli fazda ve kromatografik sınırlar içinde seçimlilik ve duyarlık açısından en iyi saptanabilen bölge seçilmelidir. Ekstra bant genişlemesini en aza indirmek için detektör hücresinin hacmi mümkün olduğu kadar küçük tutulur.

HPLC’de genel ve özel amaçlı olmak üzere iki tip detektör kullanılır. Genel amaçlı detektörler, hareketli fazın kırma indisini, dielektrik sabitini, yoğunluğunu ölçen detektörlerdir. Bu özellikler çözünenin konsantrasyonuna ve türüne bağlı olarak değişir. Buna karşılık özel amaçlı detektörler, bir maddenin UV absorpsiyonunu, floresansını, difüzyon akımını, kütlelerini ölçer. HPLC’de kullanılan detektörler Tablo 4.1.’de özellikleriyle beraber verilmiştir [28].

Tablo 4.1. HPLC detektörlerin bazı performans özellikleri.

LC detektör	Piyasada var mı ?	Kütle LOD (ticari dedektörler) ^a	Kütle LOD (bugünkü durum) ^b
Absorbans	Evet	100 pg ⁻¹ ng	10 pg
Floresans	Evet	1-10 pg	10 fg
Elektrokimyasal	Evet	10 pg ⁻¹ ng	100 fg
Kırılma indisi	Evet	500 pg ⁻¹ ng	10 ng
İletkenlik	Evet	100 pg ⁻¹ ng	500 pg
Kütle spektrometre	Evet	100 pg ⁻¹ ng	1 pg
FT-IR	Evet	1µg	100 ng
Işık saçma	Evet	10µg	500 ng

^a Kütle LOD, klasik enjeksiyonlarda 10 µL, mikrobor LC için 1µL enjeksiyon, mol kütleleri olarak 200 g/mol alınarak, σ gürültü sinyalinin beş katına eşit bir sinyale karşılık gelen enjekte edilmiş kütle için hesaplanır.

^b Yukarıdaki satırda a için verilen tanımla aynıdır, ancak enjeksiyon hacmi genellikle daha küçüktür.

5 MATERYAL VE METOT

5.1 CİHAZLAR

Kromatografik çalışmalar Perkin Elmer Series 200 marka HPLC-UV cihazı (Şekil 5.1) ile yapılmıştır. HPLC-UV cihazı; C₁₈ (oktadekilsilan 4,6 mm x 250 mm) kolon, Perkin Elmer Series 200 marka UV-Vis dedektör, Perkin Elmer Series 200 izokritik akış pompası, 7725i Rheodyne enjektör ve 50 µL'lik loop ile donanımlıdır. Spektrofotometrik çalışmalar ise Perkin Elmer Series Lambda 365 UV/Vis Spektrofotometre cihazında (Şekil 5.2) gerçekleştirilmiştir.



Şekil 5.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan HPLC-UV cihazı



Şekil 5.2 Deneysel çalışmalarda kullanılan UV-VIS cihazı

5.2 KULLANILAN MATERYALLER

Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler analitik saflıkta olup, Merck marka demir(III)klorür hekza hidrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), salisilik asit (2-Hidroksibenzoik asit, $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$), asetil salisilik asit (2-Asetiloksibenzoik asit, $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$), trifloroasetik asit (TFA), asetonitril, hekzan, diklorometan, sitrik asit, etil asetat, hidroklorik asit (HCl) ve sodyum klorür (NaCl) kullanılmıştır.

Deneylerde kullanılan ağaç örnekleri Samsun Terme Ormanında bulunan söğüt ve kavak ağaçları çeşitlerinden toplamda 12 örnekten oluşmaktadır. Söğüt ve kavak ağacı kabuk ve gövde kısımları analiz öncesi ve sonrasında serin ve kuru ortamda muhafaza edilmiştir.

5.3 ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI

Optimizasyon çalışmalarında kullanılan salisilik asit ve asetil salisilik asitin 1000 mg/L'lik ana stok çözeltileri asetonitril içerisinde hazırlanmış olup, çalışma çözeltileri bu ana stok çözeltisinden yola çıkılarak salisilik asit için 1.00-200 mg/L ve asetil salisilik asit için 5.00-1000 mg/L konsantrasyon aralığında asetonitril içerisinde hazırlandı.

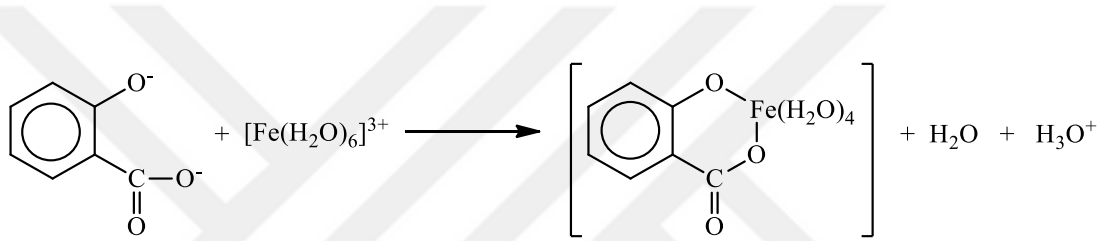
5.4 SALİSİLİK ASİT VE ASETİL SALİSİLİK ASİTİN UV-VIS İLE TAYİNLERİ

Bu çalışmada standart çözeltilerin hazırlanması ve dalga boyu taraması, kalibrasyon grafiğinin oluşturulması, stokiyometrik tayin ve salisilik asitin FeCl_3 ile tayini gibi çalışmalar yapıldı.

Salisilik asit ve asetil salisilik asitin UV bölgedeki maksimum absorpsiyon yaptıkları dalga boyunu bulmak için uygun konsantrasyonlardaki çözeltilerinin UV-Vis cihazında 200-800 nm aralığında taramaları yapıldı. Daha hassas veriler elde etmek için elde edilen spektrumlara göre tarama aralığı daraltılarak 200-400 nm arasında taramalar tekrardan yapıldı.

Her iki maddenin maksimum absorpsiyon yaptıkları dalga boylarının bulunmasından sonra, yöntemin doğrusallığını tespit etmek için her iki maddenin maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boylarında absorpsiyon değerleri 0.0100-1.5000 aralığına düşecek konsantrasyonlardaki bir seri çözelti ile absorpsiyonları ölçülerek kalibrasyon grafiği oluşturuldu.

Ekstraksiyonu yapılacak örneklerde sadece salisilik asit bulunduğundan salisilik asite daha spesifik olan ikinci bir spektroskopik yöntem denendi. Yöntem salisilik asitin Fe^{3+} iyonu ile asidik ortamda verdiği mor renkli SA-Fe(III) kompleksinin 535 nm'deki absorpsiyonunun ölçümüne dayanmaktadır.



Şekil 5.3 SA-Fe(III) kompleksinin reaksiyonu [29]

5.5 SALİSİLİK ASİT VE ASETİL SALİSİLİK ASİTİN HPLC-UV İLE TAYİNLERİ

Örneklerin analizinde kullanılan yöntem ters faz sıvı kromatografisi yöntemi olup, kromatografik ayrımlar asetonitril ve %0.2 TFA içeren 0.001 M sitrik asit tamponundan (pH 3.23) oluşan hareketli faz ile C_{18} kolonunda gerçekleştirilmiştir. HPLC-UV analizlerinde optimizasyon parametreleri olarak, hareketli fazın bileşimi ve akış hızı gibi parametreler optimize edilmiştir. Oluşturulan optimum şartlarda yöntemin doğrusallığı, doğruluğu ve tekrarlanabilirliği gibi istatistiksel çalışmalar yapılmıştır.

5.6 ÖRNEKLERİN EKSTRAKSİYONU

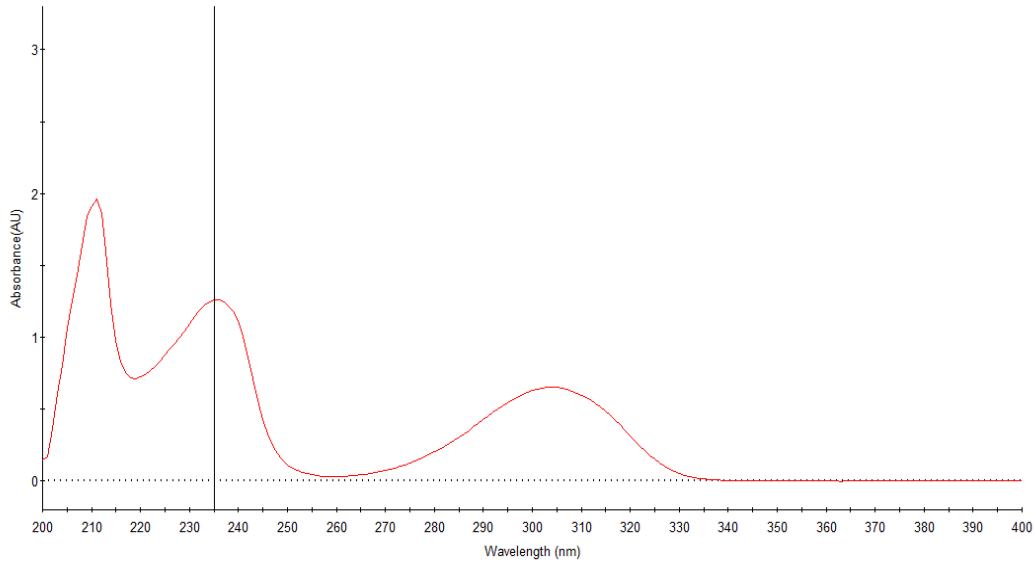
Deneyleerde; ağaç örnekleri için ilk olarak parçalara bölünerek boyutları küçültüldü ve daha sonra rondodan geçirilerek toz haline getirildi. Toz haline getirildikten sonra 0.5 g'lık 3 paralel örnekle çalışıldı. Bu örnekler 50 ml'lik bir beher içerisinde tartılıp, her bir örneğin üzerine 15 ml saf metanol (MeOH) ilave edilerek oda sıcaklığında 1 saat süre ile manyetik karıştırıcı ve manyetik bar kullanılarak ekstrakt edildi. Örnekler ayırma hunisine alındı, 3 kez 10 ml hekzan ile olası apolar yapıların uzaklaştırılması için yıkandı. Elde edilen metanol fazı üzerine 10 ml 0.010 M sitrik asit tamponu eklendi. Daha sonra faz ayırımını daha rahat görebilmek için ilk olarak 0.10 g NaCl tuzu eklendi, fakat ayırım iyi olmadığı için NaCl miktarı arttırıldı. Faz ayırımını en rahat şekilde görene kadar NaCl tuzu 0.10 g olarak kademeli şekilde arttırıldı ve en iyi ayırımın 0.50 g NaCl tuzunda olduğu görüldü. Bu eklemelerden sonra 3 kez 10 ml diklorometan (DCM) ile ekstrakte edildi ve DCM fazı balona toplandı. Ekstraksiyon çözeltilisinin çözücüsü rotary evaporatörü yardımı ile kuruluğa kadar uzaklaştırıldı. Elde edilen kalıntı 1 mL hareketli faz içinde çözüldü ve örnekler HPLC-UV cihazına enjekte edildi.

6 SONUÇLAR VE TARTIŞMA

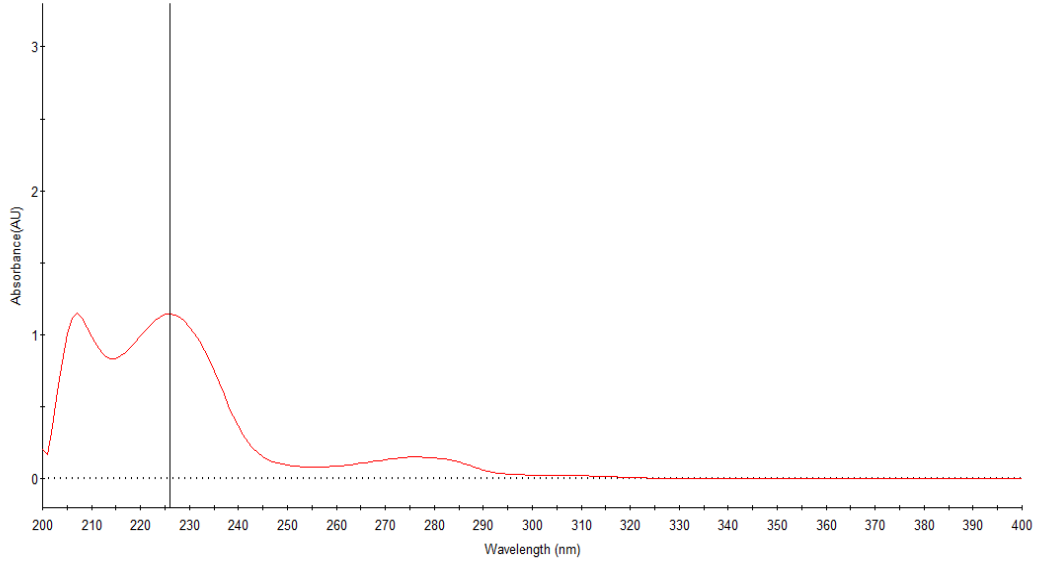
6.1 SALİSİLİK ASİT VE ASETİL SALİSİLİK ASİTİN UV-VİS METODUYLA TAYİNİ

6.1.1 Salisilik Asit ve Asetil Salisilik Asit Çözeltilerinin UV-VIS Spektrofotometresi ile Dalga Boyu Taraması

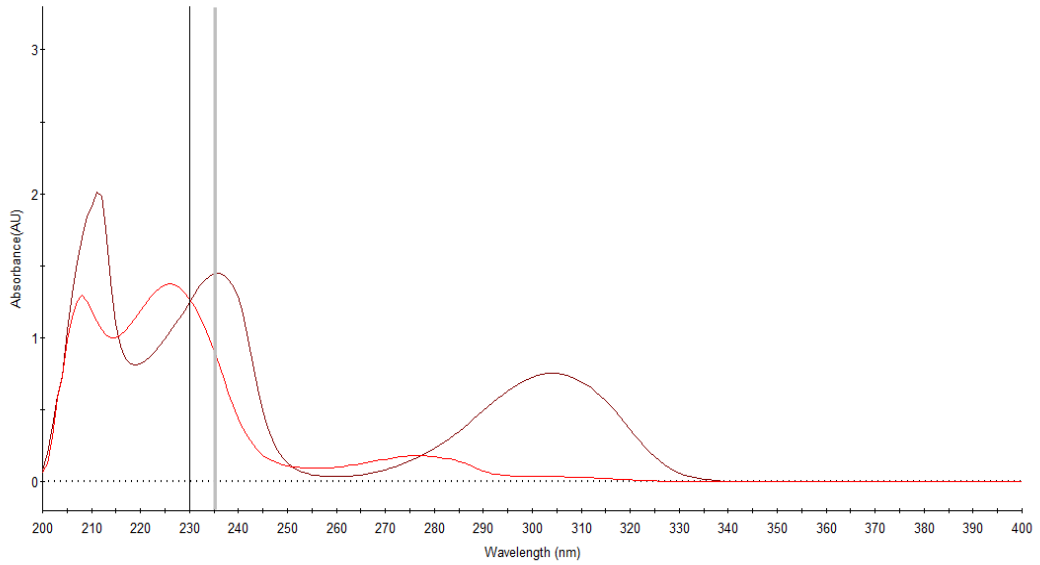
Bu çalışmada salisilik asit ve asetil salisilik asitin kalitatif ve kantitatif tayinleri Ultraviyole-Görünür bölge spektrofotometresi ile gerçekleştirildiğinden salisilik asit ve asetil salisilik asitin maksimum absorpsiyon yaptıkları dalga boylarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaç için, 1000 mg/L salisilik asit ve asetil salisilik asit 10 mL'lik balon jöjelere ayrı ayrı stok çözelti olarak hazırlandı. Daha sonra hazırlanan stok çözeltilerden 100 µL alınıp üzerine 2900 µL kör (metanol) ile tamamlanıp 3000 µL'lik kuvarz küvette 200-400 nm arasında UV bölgede dalga boyu taraması yapıldı. Şekil 6.1 salisilik asit, Şekil 6.2 asetil salisilik asit ve Şekil 6.3 ise bu iki türe ait spektrumların üst üste çakıştırılmış spektrumlarını göstermektedir. Bu spektrumlar yardımı ile salisilik asit ve asetil salisilik asitin çalışma yapılacak maksimum absorpsiyon dalga boyları belirlendi.



Şekil 6.1. Salisilik asitin UV-Vis spektrofotometresi ile 200-400 nm arası dalgaboyu taraması.



Şekil 6.2. Asetil salisilik asitin UV-Vis spektrofotometresi ile 200-400 nm arası dalgaboyu taraması.



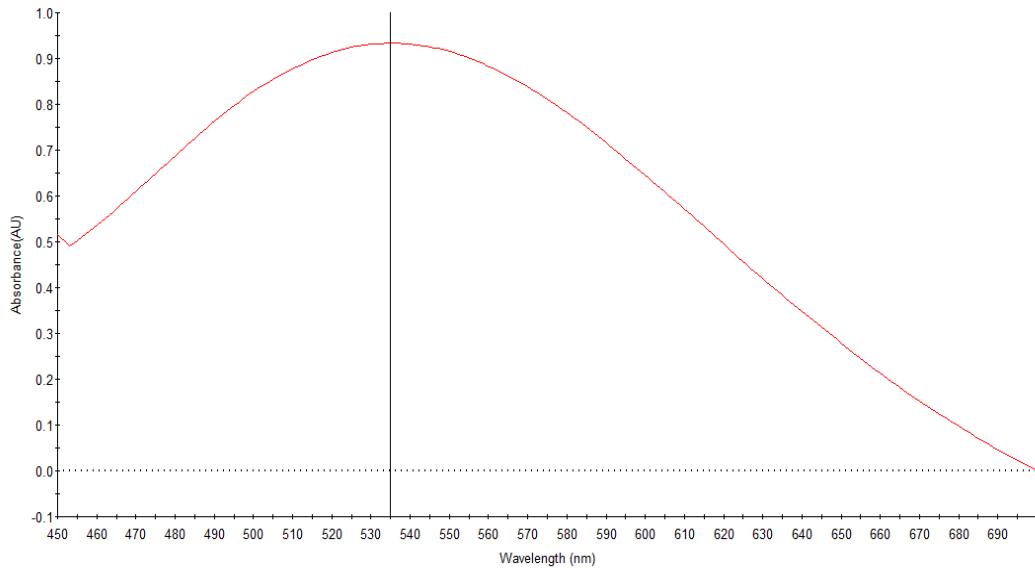
Şekil 6.3. Salisilik asit ve asetil salisilik asitin 200-400 nm'deki spektrumlarının çakıştırılmış durumları.

Şekillerde görüldüğü gibi salisilik asitin maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyu 235 nm buna karşılık asetil salisilik asitin 226 nm'dir. HPLC-UV sistemi analizlerinde tek dalga boyu kullanılacağından ve temel amacımız söğüt ve kavak ağaçlarında salisilik asit tayini olduğundan HPLC-UV sisteminde çalışma dalga boyu olarak salisilik asitin maksimum absorpsiyon yaptığı 235 nm çalışma dalga boyu

olarak seçilmiştir. Seçilen bu dalga boyunda asetil salisilik asitin de yeterince hassasiyete sahip olacak bir absorpsiyonda olduğu görülmektedir.

6.1.2 Salisilik Asitin UV-Vis Spektrofotometresi ile Tayini

Bu çalışmada 1000 mg/L salisilik asit (SA) ve 1000 mg/L FeCl₃ 100 mL'lik balon jodelerde hazırlandı. 1 mL saf su + 1 mL 1000 mg/L FeCl₃ + 1 mL 1000 mg/L salisilik asit çözeltileri karıştırıldı. Elde edilen karışım 400-800 nm dalga boyu arası tarama yapıldı. Bu yöntem ile salisilik asitin FeCl₃ ile reaksiyonunda oluşacak olan SA-Fe(III) kompleksinin maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyunun 535 nm olduğu bulundu (Şekil 6.4).

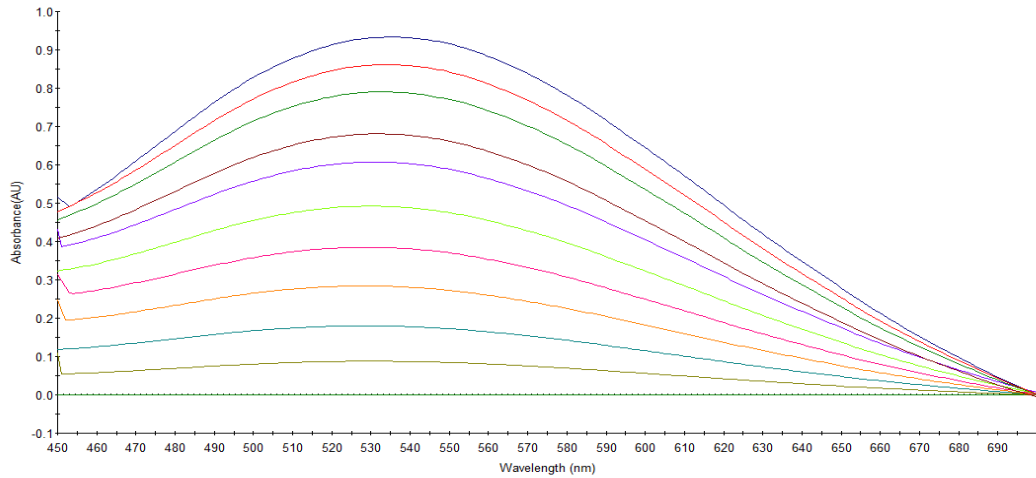


Şekil 6.4. SA-Fe(III) kompleksinin Vis bölge spektrumu.

SA-Fe(III) kompleksi absorpsiyonunun salisilik asit konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak değiştiğini test etmek için yani SA-Fe(III) kalibrasyon eğrisini oluşturmak amacıyla, 1000 µL'lik kuvars küvette 200 mg/L Fe(III) içeren çözeltiden sabit hacimde tutulup, 200 mg/L salisilik asit içeren çözeltiden ise 10 kez kademeli olarak hacim artırmak suretiyle oluşturulan SA-Fe(III) kompleksinin Vis bölgede spektrumları alınmıştır. Salisilik asit tayini için kullanılan kalibrasyon grafiğinin oluşturulması için hazırlanan çözeltilerin hacimleri ve konsantrasyonları Tablo 6.1'de, bu şekilde oluşturulan ve üst üste çakıştırılan spektrumlar ise Şekil 6.5'te verilmiştir.

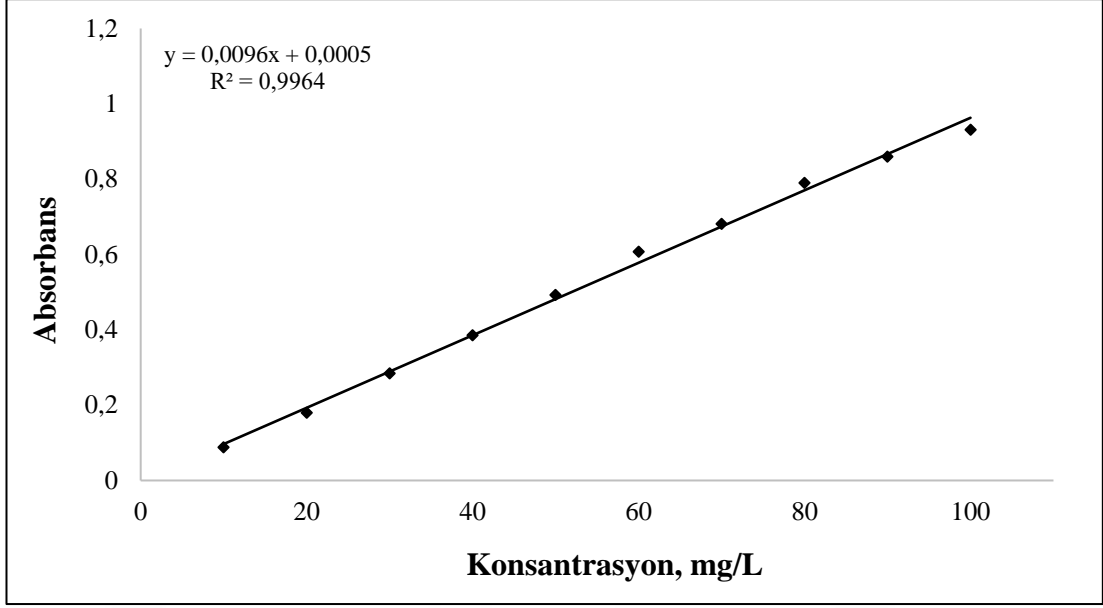
Tablo 6.1. SA-Fe(III) kompleksine ait kalibrasyon grafiğinin oluşturulması için kullanılan çözeltilerin hazırlanışı.

Hacim, μL (200 mg/L Fe(III))	Hacim, μL (200 mg/L SA)	Hacim, μL (Su)	Son Hacim, μL	Son Hacimdeki Konsantrasyonlar, mg/L		SA-Fe(III) Absorpsiyonu
				Fe(III)	SA	
500	0.000	500	1000	100	0	0.0000
500	050	450	1000	100	10	0.0878
500	100	400	1000	100	20	0.1799
500	150	350	1000	100	30	0.2841
500	200	300	1000	100	40	0.3850
500	250	250	1000	100	50	0.4925
500	300	200	1000	100	60	0.6069
500	350	150	1000	100	70	0.6808
500	400	100	1000	100	80	0.7900
500	450	050	1000	100	90	0.8599
500	500	000	1000	100	100	0.9309



Şekil 6.5. Salisilik asitin 10-100 mg/L değişen konsantrasyonlarında oluşan SA-Fe(III) kompleksinin üst üste çakıştırılmış absorpsiyon spektrumu.

Şekil 6.5'te verilen SA-Fe(III) kompleksine ait spektrumdaki her bir eğrinin kompleksin maksimum absorpsiyon yaptığı 535 nm'deki absorpsiyon değerleri kullanılarak SA tayinlerinde kullanılacak kalibrasyon eğrisi Şekil 6.6'da verilmiştir.



Şekil 6.6. SA-Fe(III) kompleksine ait kalibrasyon grafiği

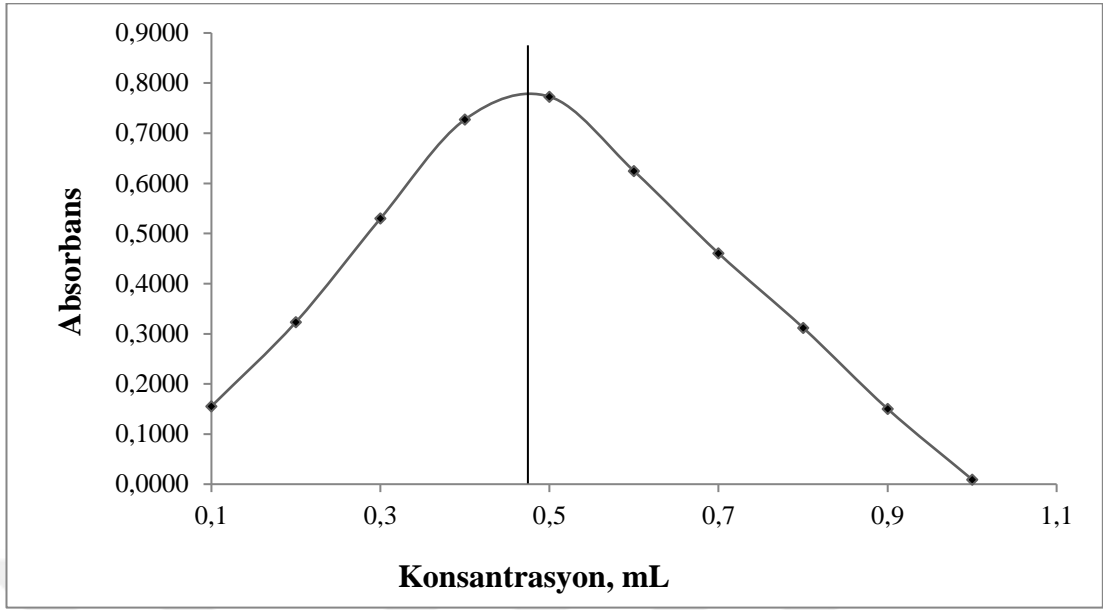
Şekil 6.6'da görüldüğü gibi kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı 0.9964 olup salisilik asitin kantitatif analizlerinde güvenilir bir şekilde kullanılabilir. Spektroskopik yöntemin görünen tek dezavantajı tayin sınırının yüksek olmasıdır.

6.1.3 SA-Fe(III) kompleksinin Stokiyometrik Tayini

Bu çalışma kullandığımız salisilik asit ve Fe(III) iyonunun hangi oranda reaksiyona girdiğini bulmak için yapılmıştır. Bunun için 0.001 M Fe³⁺ ve 0.001 M salisilik asit 100 mL'lik balon jodede ayrı olarak hazırlandı. SA-Fe(III) kompleksinin stokiyometrik tayinine ait veriler Tablo 6.2'de grafiği ise Şekil 6.7'de verilmiştir.

Tablo 6.2. SA-Fe(III) kompleksinin stokiyometrik tayinine ait veriler.

Konsantrasyon SA (mL)	Konsantrasyon Fe ³⁺ (mL)	Absorpsiyon	Ort. Absorpsiyon
0	1	0,0095; 0,0094; 0,0094	0,0094
0,1	0,9	0,1503; 0,1503; 0,1504	0,1503
0,2	0,8	0,3116; 0,3128; 0,3120	0,3121
0,3	0,7	0,4603; 0,4607; 0,4606	0,4605
0,4	0,6	0,6245; 0,6246; 0,6246	0,6246
0,5	0,5	0,7725; 0,7736; 0,7727	0,7729
0,6	0,4	0,7269; 0,7275; 0,7277	0,7274
0,7	0,3	0,5239; 0,5330; 0,5331	0,5300
0,8	0,2	0,3234; 0,3233; 0,3233	0,3233
0,9	0,1	0,1556; 0,1554; 0,1552	0,1554



Şekil 6.7. SA-Fe(III) kompleksinin stokiyometrik tayinine ait grafik.

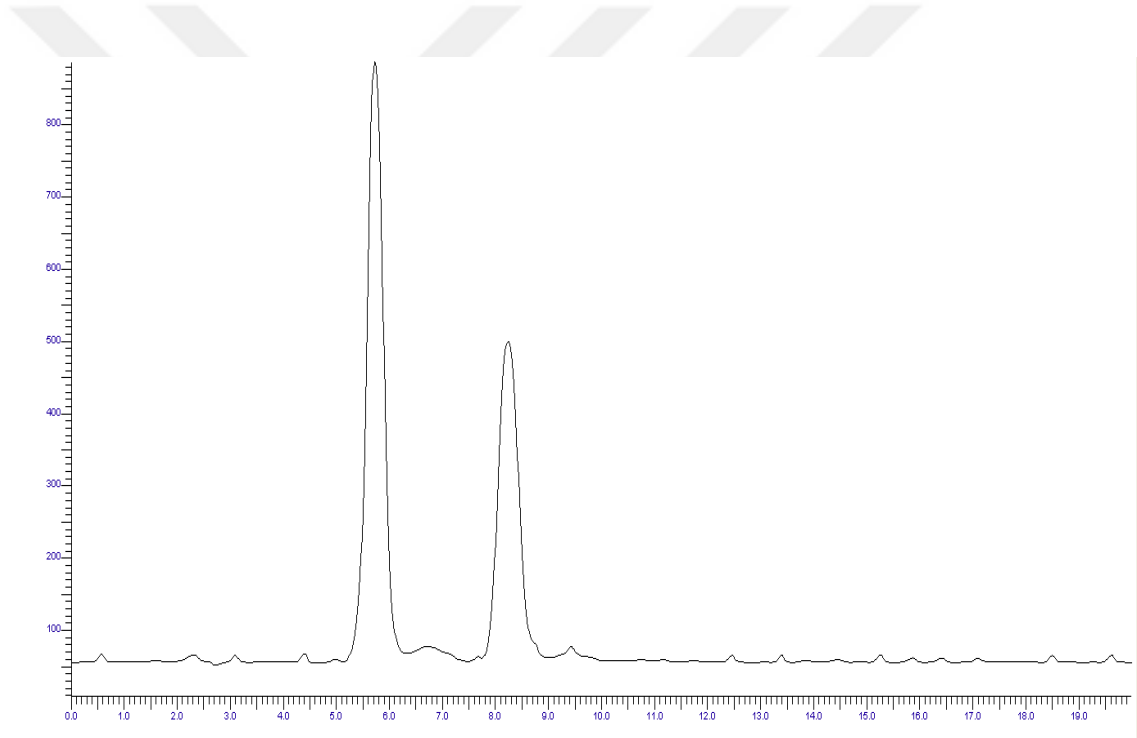
Grafikte de görüldüğü gibi SA-Fe(III) kompleksi bire bir oranda reaksiyona girmektedir.

6.2 SALİSİLİK ASİT VE ASETİL SALİSİLİK ASİT MADDELERİNİN HPLC-UV METODUYLA TAYİNİ

6.2.1 HPLC-UV Sisteminin Optimizasyonu

HPLC-UV tayinlerinde optimizasyon parametreleri olarak, hareketli faz bileşimi ve akış hızı gibi parametreler optimize edilmiştir. Bunun için ilk olarak %50 asetonitril ve %50 su içeren hareketli faz ile ayırım gerçekleştirildi. Fakat bu hareketli faz bileşiminde herhangi bir ayırım elde edilemedi. Salisilik asit ve asetil salisilik asitin dışı karşı nötr olacağı tespit edilen pH 3.20 elde etmek için 0.01 M'lık sitrik asit tamponu hazırlandı. İkinci deneme olarak yine %50 asetonitril ve %50 sitrik asit tamponu (pH 3.20 ve 0.01 M) içeren hareketli faz ile ayırım yapılmaya çalışıldı. İki maddenin tepe noktaları birbirinden ayrılmış olsa da taban kısımları birbiri üzerinde çakışmış olarak pikler elde edildi. Daha sonra hareketli faz bileşimi %10 asetonitril ve %90 sitrik asit tamponu içerecek şekilde başlanarak bileşim her defasında %10'luk ters artış olacak şekilde ayarlanıp denemeler gerçekleştirildi. Elde edilen tüm kromatogramlar kontrol edildi ve en iyi ayırımın %40 asetonitril ve %60 sitrik

asit tamponu ile elde edilmiştir. Bu nedenle bundan sonraki tüm çalışmalar bu hareketli faz bileşimde gerçekleştirildi. Diğer bir parametre olarak akış hızı ise 0.8 mL/dak, 1.0 mL/dak ve 1.5 mL/dak olarak üç farklı şekilde denendi. En iyi ayırım ve alıkonma zamanı 1.0 mL/dak elde edildi. Bu denemeler sonucunda HPLC-UV sistemi ile salisilik asit ve asetil salisilik asitin tayini için optimum şartların, C₁₈ kolon ve 1.0 mL/dak akış hızında ve %40 asetonitril ve %60 sitrik asit tamponu (pH 3.20 ve 0.01 M ve % 0.2 TFA içeren) hareketli faz bileşiminde olup pik okumaları 235 nm dalga boyunda yapılmıştır. Burada kullanılan TFA (trifloroasetik asit) piklerin keskin ve omuz yapmadan istenilen şekilde olması için kullanıldı. Bu şartlarda salisilik asit ve asetil salisilik asit için alıkonma zamanları 5.70-8.30 dakika arasında değişmektedir (Şekil 6.8).



Şekil 6.8. Optimum şartlarda salisilik asit ve asetil salisilik asite ait HPLC-UV kromatogramı.

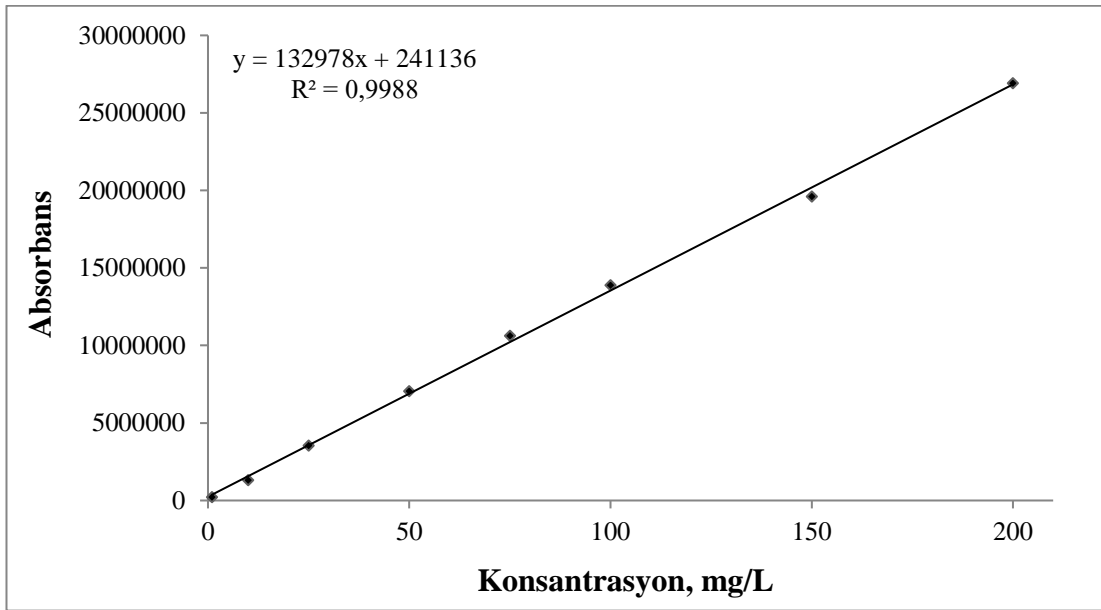
6.2.2 Salisilik Asit Tayinleri için HPLC-UV Sisteminin Doğrusallığı

Oluşturulan optimum şartlarda sistemin doğrusallığının tayini için salisilik asit standardının konsantrasyon aralığı 1.0-200 mg/L aralığında asetil salisilik asitin ise 5-750 mg/L aralığında olacak şekilde her bir standarttan sekiz farklı konsantrasyon içeren standart çözeltiler hazırlandı. Bu konsantrasyon aralığında hazırlanan standart çözeltiler HPLC-UV sistemine enjekte edildi ve elde edilen pik

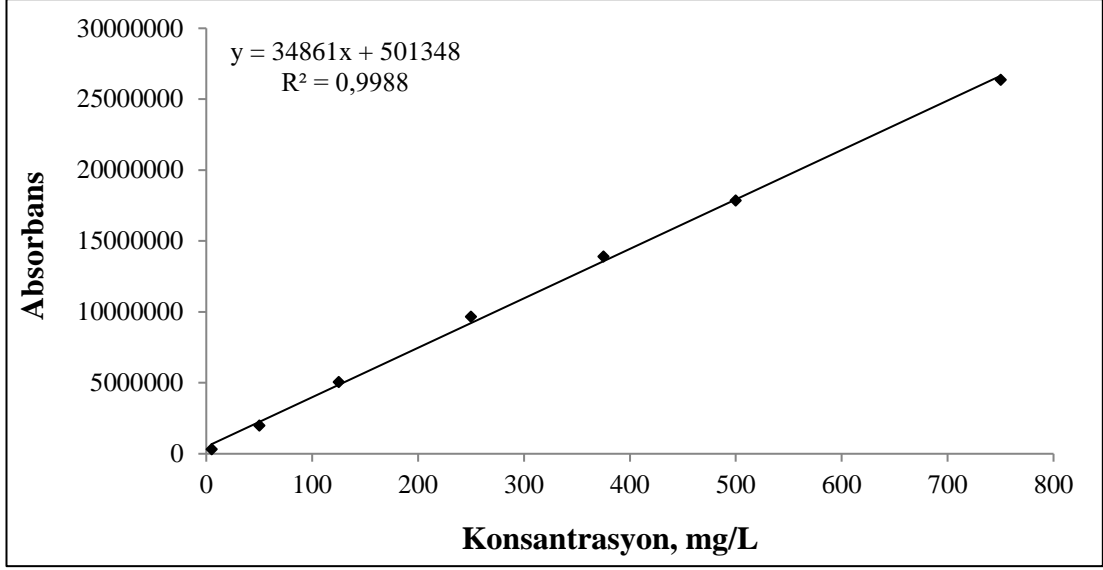
alanları konsantrasyonun bir fonksiyonu olarak grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafiği oluşturuldu (Şekil 6.9 ve 6.10). Çalışılan konsantrasyon aralığında HPLC-UV sisteminin doğrusallığının oldukça yüksek olduğu grafiklerden ve grafiklere ait korelasyon katsayıları (R^2) değerlerinden anlaşılmaktadır.

Tablo 6.3. Salisilik asit ve asetil salisilik asit standartları için ortalama pik alanlarına ait veriler (n = 3)

Salisilik Asit Standart Çözeltisi, mg/L	Salisilik asit Ortalama Pik Alan	Asetil salisilik Asit Standart Çözeltisi, mg/L	Asetil salisilik asit Ortalama Pik Alan
1.0	228648	5	312381
10	1313070	50	1996329
25	3540572	125	5049876
50	7061635	250	9658076
75	10618454	375	13900894
100	13887893	500	17857843
150	19611791	750	26372449
200	26916784		



Şekil 6.9. HPLC-UV yönteminin salisilik asit standartlarına ait kalibrasyon grafiği



Şekil 6.10. HPLC-UV yönteminin asetil salisilik asit standartlarına ait kalibrasyon grafiği

6.2.3 HPLC-UV Sisteminin Tekrarlanabilirliği

HPLC-UV yönteminin tekrarlanabilirliği için salisilik asit standardını içeren 10, 75 ve 150 mg/L, asetil salisilik asit standardını içeren 50, 375 ve 750 mg/L konsantrasyonlarındaki çözeltiler 5 kez sisteme enjekte edilmiş ve sistemin tekrarlanabilirliği, maddelerin alıkonma zamanı ve her bir madde için elde edilen pik alanlarına göre hesaplanmıştır. Her iki durumda da verilerin değerlendirilmesi tekrarlanabilirliğin ölçüsü olan SD ve RSD değerlerine göre yapılmıştır. Pik alanları bakımından HPLC-UV yönteminin tekrarlanabilirliği genel olarak yüksek olup bağıl standart sapma her bir durum için %5'den düşük çıkmıştır. (Tablo 6.4 ve 6.5).

Tablo 6.4. Salisilik asit için pik alanları bakımından tekrarlanabilirlik verileri

Salisilik asit konsantrasyonu, mg/L	Pik Alanı	Ortalama Pik Alanı	Standart Sapma	Bağıl Standart Sapma (%)
10	1231070; 1103770; 1217270; 1191661; 1157084	1180171	51160	4,33
75	10668423; 10067656; 10406052; 10574721; 10517245	10446819	232300	2,22
150	21266888; 20911503; 18961341; 18922816; 20231299	19858769	879627	4,43

Tablo 6.5. Asetil salisilik asit için pik alanları bakımından tekrarlanabilirlik verileri

Asetil salisilik asit konsantrasyonu, mg/L	Pik Alanı	Ortalama Pik Alanı	Standart Sapma	Bağlı Standart Sapma (%)
50	2030692; 1983152; 1948366; 1902832; 1875900	1948188	61871	3,18
375	13529219; 13456623; 13666335; 13842554; 13939187	13686784	203832	1,49
750	26715037; 26392168; 25892865; 25862632; 26564142	26285369	389391	1,48

Alıkonma zamanları bakımından HPLC-UV yönteminin optimum şartlarda tekrarlanabilirliği ile ilgili veriler Tablo 6.6 ve 6.7’de verilmiştir. Standart sapma (SD) ve bağlı standart sapma (RSD) değerlerine bakıldığında bu değerlerin sırasıyla 0.10 dak ve %1.75’den düşük olduğu görülmektedir. Bu sayısal değerler HPLC-UV yönteminin alıkonma zamanları bakımından tekrarlanabilirliğinin çok iyi olduğunu göstermektedir.

Tablo 6.6. Salisilik asit için alıkonma zamanları bakımından tekrarlanabilirlik verileri

Salisilik asit konsantrasyonu, mg/L	Alıkonma zamanı, (dak.)	Ort. Alıkonma zamanı, t _R (dak.)	Standart Sapma, (dak.)	Bağlı Standart Sapma (%)
10	5,87; 5,91; 5,70; 5,83; 5,85	5,83	0,08	1,36
75	5,76; 5,86; 5,86; 5,73; 5,78	5,80	0,06	1,02
150	5,68; 5,86; 5,95; 5,85; 5,89	5,85	0,10	1,72

Tablo 6.7. Asetil salisilik asit için alıkonma zamanları bakımından tekrarlanabilirlik verileri.

Asetil salisilik asit konsantrasyonu, mg/L	Alıkonma zamanı, (dak.)	Ort. Alıkonma zamanı, t _R (dak.)	Standart Sapma, (dak.)	Bağlı Standart Sapma (%)
50	4,57; 4,59; 4,48; 4,51; 4,59	4,55	0,05	1,10
375	4,50; 4,60; 4,56; 4,48; 4,46	4,52	0,06	1,29
750	4,47; 4,55; 4,59; 4,56; 4,54	4,54	0,04	0,98

6.2.4 HPLC-UV Sisteminin Doğruluğu

HPLC-UV sisteminin doğruluğu 10, 75 ve 150 mg/L salisilik asit standardını içeren ve 50, 375 ve 750 mg/L asetil salisilik asit standardını içeren düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlara sahip standart çözeltilerin 5 kez sisteme enjekte edilmesiyle elde edilen pik alanlarının, kalibrasyon eğrilerinden elde edilen denklemlerde yerlerine konulmasıyla hesaplanmıştır. Her bir standart için hesaplanan bağıl hata değerleri Tablo 6.8 de verilmiştir. Bu değerler HPLC-UV sisteminin çözelti veya numune içerisindeki salisilik asit ve asetil salisilik asitlerin tayinleri için doğruluğunun oldukça iyi olduğunu göstermektedir.

Tablo 6.8. Salisilik asit ve asetil salisilik asit tayinleri için HPLC-UV metodunun doğruluğuna ait veriler

Standartlar	Gerçek konsantrasyon, (mg/L)	Hesaplanan konsantrasyon, (mg/L)	Bağıl hata, (%)
Salisilik asit	10	9,96	0,45
	50	47,46	5,08
	150	145,54	2,98
Asetil salisilik asit	50	47,57	4,85
	250	260,41	4,16
	750	752,78	0,37

6.2.5 HPLC-UV Sisteminin LOD ve LOQ Değerleri

HPLC-UV yönteminin LOD ve LOQ değerleri, kalibrasyon grafiklerinin oluşturulmasında kullanılan en düşük konsantrasyonların (salisilik asit için 1 mg/L ve asetil salisilik asit için 5 mg/L) HPLC-UV sistemine her bir konsantrasyon için 10 tekrar enjeksiyonu sonucu elde edilen standart sapmaların kalibrasyon grafiğinin eğimine oranlanmasından hesaplanmıştır. LOD değerlerinin hesaplanmasında bu oranın 3 katı, LOQ değerleri için ise 10 katı alınmıştır. Salisilik asit için LOD ve LOQ değerleri 0.10 mg/L ve 0.33 mg/L iken asetil salisilik asit için 0.20 mg/L ve 0.67 mg/L olarak hesaplanmıştır (Tablo 6.9).

Tablo 6.9. Salisilik asit ve asetil salisilik asit için LOD ve LOQ değerleri ve bu değerlerin hesaplanmasında kullanılan deneysel veriler.

Standartlar	Pik Alanı	Standart Sapma	Eğim	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
Salisilik asit	205348; 198622; 195128; 191936; 198831; 201651; 199369; 204070; 203242; 205341	4449	132978 (Şekil 6.9)	0.10	0.33
Asetil salisilik asit	291855; 292078; 293746; 294322; 294809; 295766; 296198; 297019; 297611; 299007	2331	34861 (Şekil 6.10)	0.20	0.67

Örnek olması amacıyla salisilik asit için LOD ve LOQ değerlerinin hesaplanması aşağıda verilmiştir.

LOD

$$c_{SA} = 3 \times \frac{SD_{En \text{ düşük konsantrasyon için}}}{Eğim} = 3 \times \frac{4449}{132978} = 0.10 \text{ mg/L}$$

LOQ

$$c_{SA} = 10 \times \frac{SD_{En \text{ düşük konsantrasyon için}}}{Eğim} = 10 \times \frac{4449}{132978} = 0.33 \text{ mg/L}$$

LOD ve LOQ değerleri salisilik asit ve asetil salisilik asitlerin ağaç, ilaç preparatlarında ve benzeri örneklerde tayinlerine imkan sağlayacak hassasiyette olduğu düşünölmektedir.

6.2.6 HPLC-UV Sisteminde Standart Ekleme Yöntemi

HPLC-UV analizlerinde örnekler içerisindeki madde miktarları standart ekleme yöntemine göre hesaplanmıştır. Bu nedenle ilk olarak HPLC-UV analizlerinde standart ekleme yönteminin doğruluğu düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlarda standart çözeltiler kullanarak test edildi. Örnek olması amacıyla düşük konsantrasyondaki salisilik asit için yapılan çalışmada, numune olarak kabul edilen 10 mg/L'lik standart çözeltiden ve standart ekleme olarak kullanılan 150 mg/L standart çözeltiden eşit hacimlerde alınır. Bu şekilde hazırlanan ve HPLC-UV sistemine enjekte edilecek çözelti 5 mg/L konsantrasyona sahip numune ve 75 mg/L standart içermiş olacaktır. Hazırlanan bu temsili çözelti sisteme 3 kez enjekte edilmiş ve pik alanları kayıt edilmiştir. Bu çözeltinin enjeksiyonundan sonra salisilik asitin 75 mg/L standart çözeltisi de enjekte edilmiş ve pik alanı kayıt edilmiştir.

Standart eklenmiş temsili numune ve standart çözeltileri için elde edilen pik alanları ve aşağıda oluşturulan denklem kullanılarak numune içerisindeki madde miktarı hesaplanmıştır. Bu çalışmaya ait tüm veriler Tablo 6.10 ve 6.11' de verilmiştir.

$$c_N = c_{std} \times \frac{A_{std+N} - A_{std}}{A_{std}}$$

$$c_N = 75 \times \frac{9996752 - 9400205}{9400205} = 4.76 \text{ mg/L}$$

Tablo 6.10. HPLC-UV metodun da salisilik asit için standart ekleme yönteminin doğruluğuna ait veriler

Gerçek konsantrasyon, (mg/L)	Hesaplanan konsantrasyon, (mg/L \pm SD)	Bağlı hata, (%)
5	4.76 \pm 1.47	- 4.81
25	24.11 \pm 1.67	- 3.55
50	48.47 \pm 1.00	- 3.06

Tablo 6.11. HPLC-UV metodun da asetil salisilik asit için standart ekleme yönteminin doğruluğuna ait veriler

Gerçek konsantrasyon, (mg/L)	Hesaplanan konsantrasyon, (mg/L \pm SD)	Bağlı hata, (%)
25	23.94 \pm 6.51	- 4.25
125	123.69 \pm 1.43	- 1.05
250	242.44 \pm 4.14	- 3.02

Tablo 6.10 ve 6.11'deki bağlı hata değerleri düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlar için %5'den düşük bağlı hataya sahiptir. Bu durum standart ekleme yönteminin örnekler içerisinde salisilik asit ve asetil salisilik asitin tayinlerinde kullanılabilceğini göstermektedir.

6.3 EKSTRAKSİYON YÖNTEMİ

Söğüt ve kavak ağacı örneklerinden ekstraksiyon işlemi katı-sıvı ekstraksiyonu yöntemine göre yapılmıştır. Ekstraksiyonlarda kullanılacak çözücü seçimi, salisilik asit ve asetil salisilik asit katılarının su ve organik çözücülerdeki çözünürlükleri ve sonrasında örnek temizleme basamağında uygulanacak sıvı-sıvı ekstraksiyonunda da kullanılmaya uygun olması göz önünde bulundurularak yapılmıştır. Bu amaç için, su, 0.100 ve 1.00 molar HCl çözeltisi, metanol, asetonitril, kloroform ve diklorometan kullanılmıştır. Sonuçta salisilik asit ve asetil salisilik asiti en iyi miktarda çözen metanol ekstraksiyon çözücüsü olarak seçilmiştir. Ekstraksiyon esnasında analitlerle birlikte ekstrakt edilen apolar türleri temizlemek için ekstraksiyon çözeltisi 3 kez 10 mL hekzan çözeltisi ile yıkanmıştır. Elde edilen MeOH fazı üzerine salisilik asit ve asetil salisilik asitin pKa değerlerine bakılarak

nötral olacakları pH ortamını sağlamak için 0.010 M sitrik asit tamponu ve fazların birbirinden net olarak ayrılması için 0.50 g NaCl tuzu eklenmiştir.

MeOH ve sitrik asit içerisindeki salisilik asit ve asetil salisilik asitleri ekstraksiyon ortamından uzaklaştırmak için bir organik faz içerisine çekilmeleri gerekmektedir. Bu amaç için su ile karışmayan ve salisilik asit ve asetil salisilik asiti çözen etil asetat ve DCM çözücüleri kullanılmıştır.

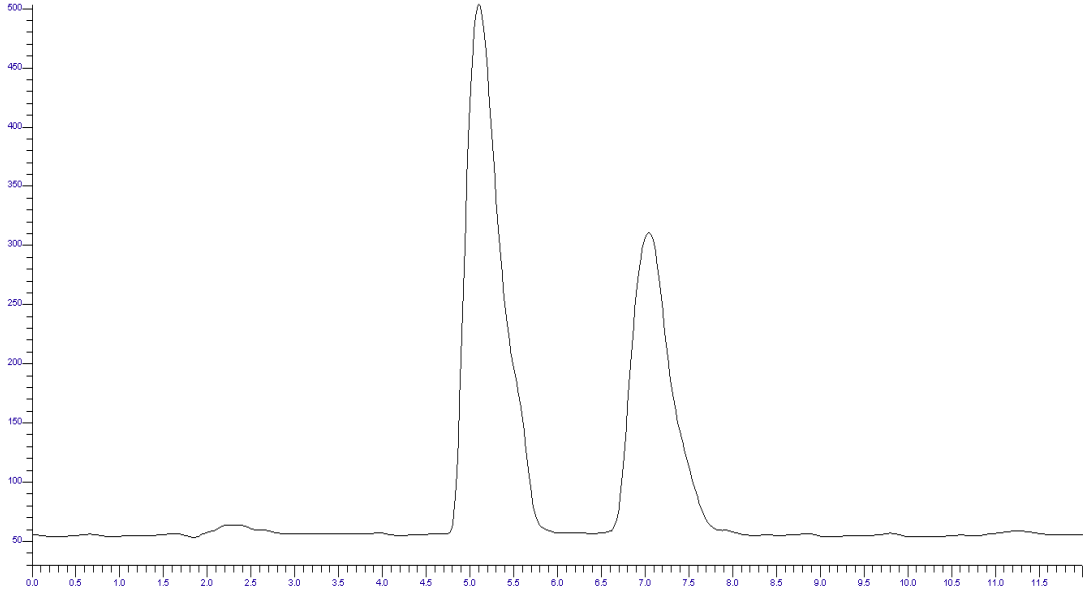
Sıvı-sıvı ekstraksiyon yönteminde etil asetat ve DCM çözücülerinden hangisinin daha etkin olduğunu bulmak için bilinen konsantrasyondaki salisilik asit ve asetil salisilik asit standartları eklenerek spiked numune hazırlandı. Elde edilen spiked numune 3 kez DCM ve etil asetat ile ekstrakt edildi. Elde edilen ekstraktlar rotary evaporatörü ile kuruluğa kadar uçuruldu ve kalıntı 1 mL ACN eklenerek HPLC-UV cihazına enjekte edildi. Elde edilen sonuçlar Tablo 6.12 ve Tablo 6.13'te verilmiştir. Etil asetat ve DCM ile temizlenen ekstraktların HPLC-UV kromatogramları Şekil 6.11 ve 6.12'de verilmiştir.

Tablo 6.12. Sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemiyle ekstraktların etil asetat çözücüsü ile temizlenmesine ait veriler (n = 3).

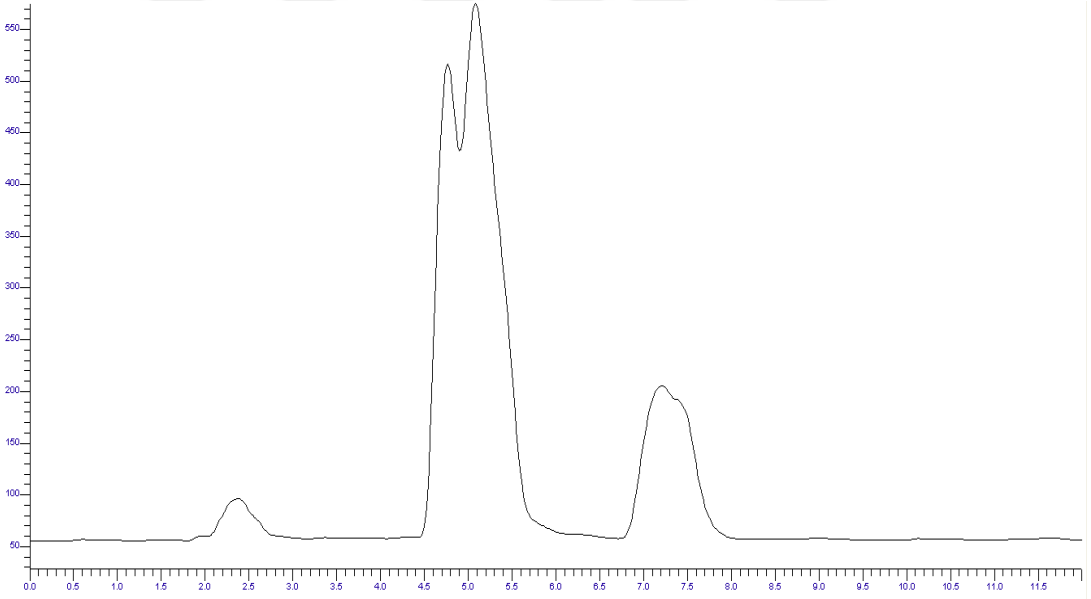
	Eklenen Konsantrasyon, (mg/L)	Hesaplanan Konsantrasyon, (mg/L)	Hata (%)	Ekst. Verimi (%)
Salisilik asit	75	47.51	36.65	63.35
Asetil salisilik asit	375	622.00	65.87	165.87

Tablo 6.13. Sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemiyle ekstraktların DCM çözücüsü ile temizlenmesine ait veriler (n = 3).

	Eklenen Konsantrasyon, (mg/L)	Hesaplanan Konsantrasyon, (mg/L)	Hata (%)	Ekst. Verimi (%)
Salisilik asit	75	71.67	4.44	95.56
Asetil salisilik asit	375	364.04	2.92	97.08



Şekil 6.11. DCM ile temizlenmiş salisilik asit ve asetil salisilik asit standart çözeltileri ile elde edilen spiked örneklere ait kromatogram.



Şekil 6.12. Etil asetat ile temizlenmiş salisilik asit ve asetil salisilik asit standart çözeltileri ile elde edilen spiked örneklere ait kromatogram.

Sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemini kullanarak ekstraktların DCM ile temizlenmesinde ki bağıl hata değerleri %5'den düşük olması ve ekstraksiyon veriminin %95'den büyük olması ve kromatogramlardan elde edilen maddelere ait piklerin net bir şekilde bir birlerinden ayrılmaları ve pik şekillerinin kabul edilebilir

yapıda olmasından dolayı sonraki çalışmalarda salisilik asit ve asetil salisilik asiti içeren ekstraktların MeOH + sitrik asit tamponu içerisinde sıvı-sıvı ekstraksiyon ile temizlenme işlemleri DCM ile yapılmıştır.

Sonuç olarak, deneysel çalışmalarda kullanılacak ekstraksiyon prosedürü ve ekstraktların temizleme işlemleri aşağıdaki basamakları içermektedir. Uygun miktardaki alınan örnek üzerine 15 ml saf metanol (MeOH) ilave edilerek oda sıcaklığında 1 saat süre ile manyetik karıştırıcı ve bar kullanılarak karıştırıldı, ekstraktlar süzülerek katı maddelerden ayrıldı, ekstrakt çözeltileri ayırma hunisine alındı. Ekstraktlar, içerilerinde ki birlikte ekstrakt edilen olası apolar türlerinde temizlenmesi için 3 kez 10 ml hekzan ile yıkandılar. Elde edilen MeOH üzerine pH'sı uygun değere çekmek için 10 ml 0.010 M sitrik asit tamponu ve 0.50 g NaCl tuzu eklendi. Bu eklemelerden sonra salisilik asit ve asetil salisilik asiti organik faza çekmek için 3 kez 10 ml DCM ile ekstrakte edildi. Son olarak DCM fazı rotary evaporatörü yardımı ile kuruluğa kadar uzaklaştırıldı. Elde edilen kalıntı 1 mL hareketli faz içinde çözülerek HPLC-UV sistemine enjekte edilmek üzere hazır duruma getirildi.

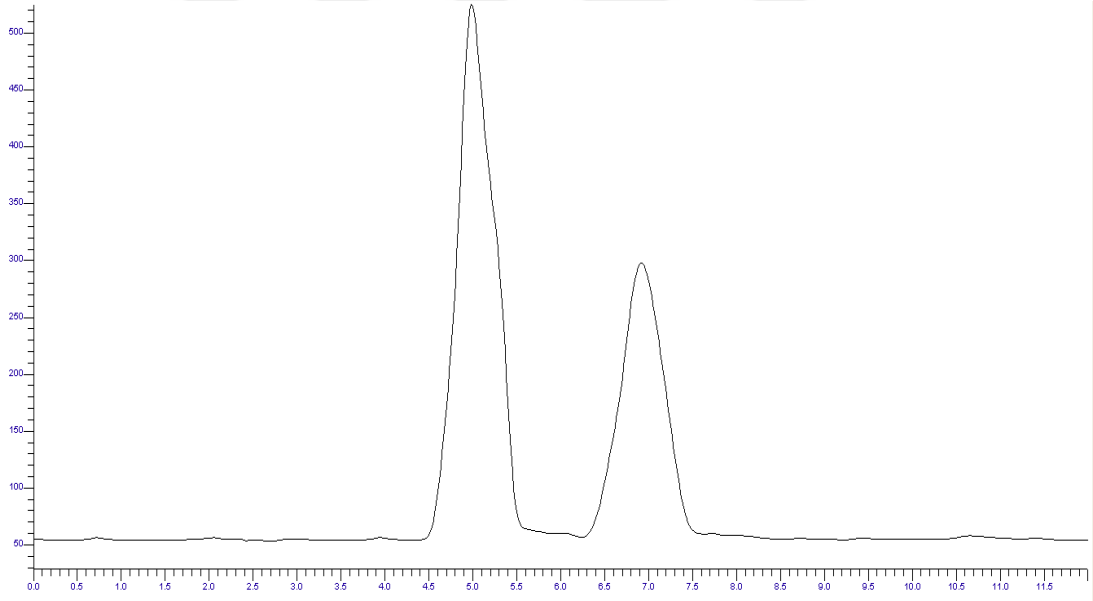
6.3.1 Ekstraktların DCM ile Temizlenmesindeki Verimi

Ağaç örneklerinin ekstraksiyonundan elde edilen MeOH ekstraktlarının sitrik asitli tampon içerisinde DCM ile temizlenmesinde ki verim hesaplaması, 3 paralel olarak hazırlanan 1 mL 75 mg/L SA ve 375 mg/L ASA standartları ile çalışıldı. Her bir 1 mL'lik standart üzerine 15 mL saf metanol ilave edildi. Örnek ekstraktlarının temizlenmesi için oluşturulan prosedürde olduğu gibi 1 mL 75 mg/L salisilik asit içeren MeOH çözeltisi 3 kez 10 mL hekzan ile yıkandı. Metanol fazı üzerine 10 ml 0.01 M sitrik asit tamponu ve 0.50 g NaCl tuzu eklendi. Bu eklemelerden sonra 3 kez 10 ml DCM ile ekstrakte edildi ve DCM fazı uygun hacimdeki bir balonda toplandı. Ekstraksiyon çözeltilisinin çözücüsü rotary evaporatörü yardımı ile kuruluğa kadar uzaklaştırıldı. Elde edilen kalıntı 1 mL hareketli faz içinde çözüldü. Çözülme işleminden sonra HPLC-UV sistemine enjekte edildi ve sonuçlar Tablo 6.14'te verilmiştir.

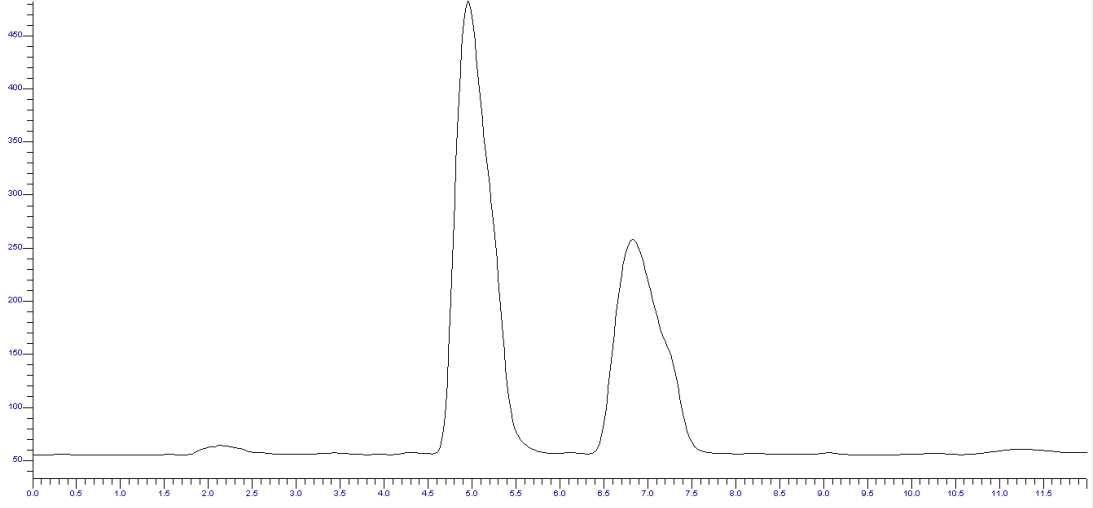
Tablo 6.14. MeOH ekstraktlarının sitrik asitli tampon içerisinde DCM ile temizlenme prosedürüne ait ekstraksiyon verimi verileri (n = 3).

Standart Maddeler	Eklenen konsantrasyon, (mg/L)	Hesaplanan konsantrasyon, Ortalama (mg/L \pm SD)	Bağıl hata, (%)	Ekstraksiyon Verimi (%)
Salisilik asit	75	72.67 \pm 0.27	3.11	96.89
Asetil salisilik asit	375	363.95 \pm 2.75	2.95	97.05

Temizleme prosedüründen sonra elde edilecek kromatogramlarda herhangi bir değişiklik olup olmadığını anlamak için 75 mg/L SA ve 375 mg/L ASA içeren standart çözeltinin ve yine aynı konsantrasyonları içeren çözeltinin DCM ile temizlenmesinden sonra elde edilen çözeltinin HPLC-UV kromatogramları Şekil 6.13 ve Şekil 6.14'te verilmiştir.



Şekil 6.13. Salisilik asit (75 mg/L) asetil salisilik asit (375 mg/L) standartlarına ait kromatogram.



Şekil 6.14. Salisilik asit (75 mg/L) ve asetil salisilik asit (375 mg/L) standartlarının DCM ile temizlenmesi sonrasında ait kromatogram.

Tablo 6.14'te görüldüğü gibi ağaç örneklerinin ekstraksiyonundan elde edilen MeOH ekstraktlarının sitrik asitli tampon içerisinde DCM ile temizlenmesinde uygulana prosedürünün ekstraksiyon verimi salisilik asit ve asetil salisilik asit için %96'dan yüksektir. Ayrıca 6.13 ve Şekil 6.14'te verilmiş kromatogramlar arasında da herhangi bir farklılık görülmemektedir. Bu durumda MeOH ekstraktlarının DCM ile temizlenmesi güvenilir bir şekilde uygulanabilir.

6.3.2 Ekstraksiyon ve Ekstraktların Temizleme Prosedürünün Uygulanması

Ekstraksiyon yönteminin ve ekstraktların temizleme prosedürünün deneysel uygulanması için ve standart ekleme yöntemin doğruluğunu test etmek için Aspirin ve Coraspine ilaçlarından alınan $0,1000 \pm 0,010$ g'lık kısımlar 50 ml'lik beher içerisinde tartılır ve beher üzerine 20 ml saf metanol ilave edilerek ilaç örnekleri oda sıcaklığında 1 saat manyetik karıştırıcı ve manyetik bar ile karıştırılarak katı-sıvı ekstraksiyon işlemi tamamlandı. İlaç örnekleri katı partiküllerden temizlemek için karışım süzüldü ve temizleme prosedürünü uygulamak için ayırma hunisine alındı. Elde edilen ekstrakt 3 kez 10 ml hekzan ile ekstrakte edildi. Metanol fazı üzerine 10 ml 0.01 M sitrik asit tamponu ve 0.5 g NaCl tuzu eklendi. Bu eklemelerden sonra 3 kez 10 ml DCM ile ekstrakte edildi ve DCM fazı uygun hacimdeki balonda toplandı ve DCM rotary evaporatör yardımı ile kuruluğa kadar uzaklaştırıldı. Elde edilen kalıntı 1 mL hareketli faz içinde çözüldü. HPLC-UV sistemine enjekte edilmeden önce numuneler 100 kat seyreltildi. Seyrelme işleminden sonra her bir örnekten

0.200 mL alınıp üzerine 0.800 mL ASA standardı eklendi ve 3 kez HPLC-UV sistemine enjekte edildi. Hesaplamalar standart ekleme yöntemi ile gerçekleştirildi.

$$c_N = c_{std} \times \frac{A_{std+N} - A_{std}}{A_{std}}$$

Burada;

c_N : Numune konsantrasyonu,

c_{std} : Standart konsantrasyonu,

A_{std+N} : Numune ve standarda ait pik alanı,

A_{std} : Standarda ait pik alanı,

göstermektedir.

Standart ekleme yöntemi formülü kullanılarak yapılan hesaplamalar aşağıda gösterilmiştir.

Aspirin tabletinin 0.1 g'ı örnek olarak alınmıştır.

$$c_{N(\text{aspirin})} = 400 \text{ mg/L} \times \frac{12938746 - 9243808}{9243808}$$

$$c_{N(\text{aspirin})} = 159,89 \text{ mg/L}$$

Her bir tablet yaklaşık 0.6000 g olduğundan HPLC-UV'den elde edilen konsantrasyon değeri tablet içerisinde mg cinsinden verilmesi daha uygun olacaktır.

Bu nedenle,

0,5995 gram aspirin içerisindeki madde mik.

$$= 159,89 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{10 \text{ mL}}{1000 \text{ m}} \times 100 \times \frac{1}{0,2} \times \frac{0,6}{0,1}$$

$$c_{N(\text{aspirin})} = 479,66 \text{ mg/0,6 g}$$

$$C_{N(\text{coraspine})} = 80 \text{ mg/L} \times \frac{16233581 - 11590214}{11590214}$$

Coraspine tabletinin tamamı örnek olarak alınmıştır.

$$C_{N(\text{coraspine})} = 32,05 \text{ mg/L}$$

0,1365 gram coraspine içerisindeki madde miktarı

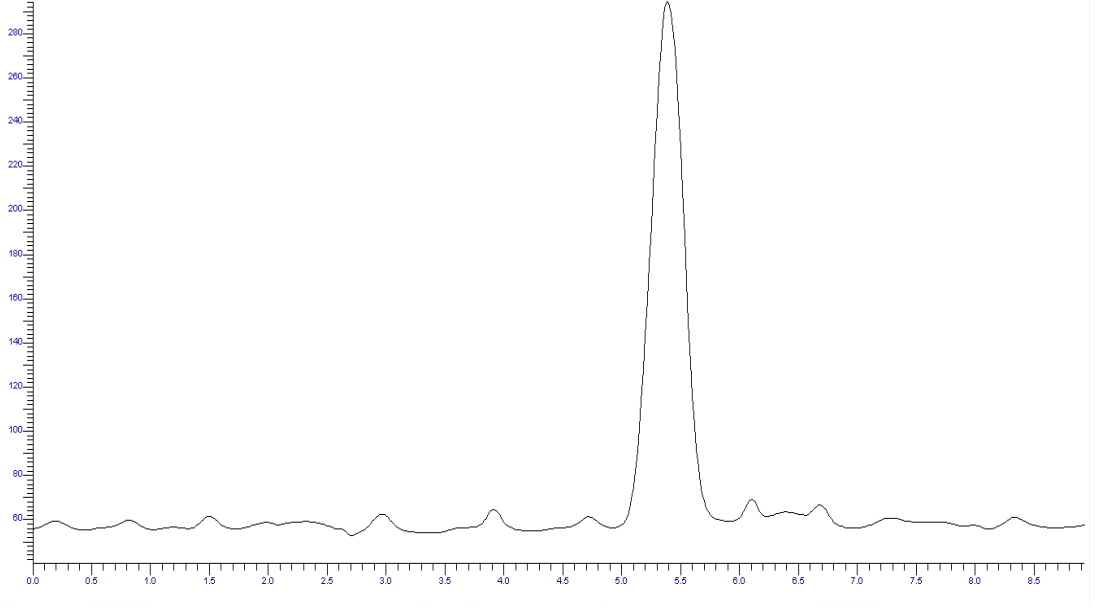
$$= 32,05 \text{ mg/L} \times \frac{10 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} \times 100 \times \frac{1}{0,2} \times \frac{0,1365}{0,1365}$$

$$C_{N(\text{coraspine})} = 96,15 \text{ mg}/0,1365 \text{ g}$$

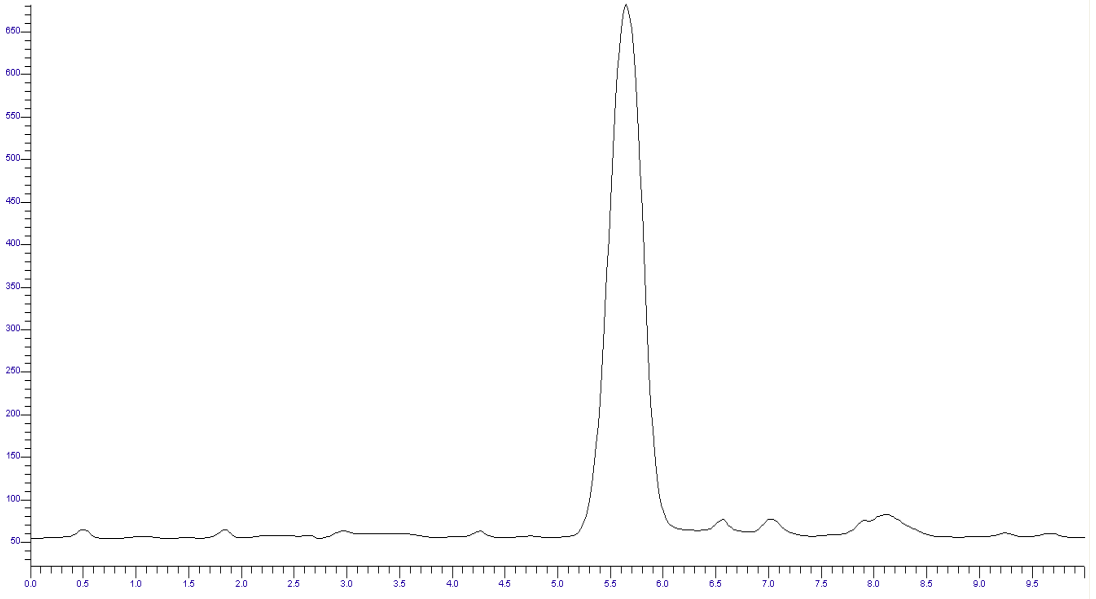
Aspirin ve Coraspine'nin ekstraksiyonu ve temizleme prosedürüne ait yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar Tablo 6.15'te ve bu çalışmalardan sonra elde edilen kromatogramlar ise Şekil 6.15-6.18'de verilmiştir.

Tablo 6.15. Aspirin ve Coraspine tabletlerinde asetil salisilik asit için elde edilen verileri (n = 3).

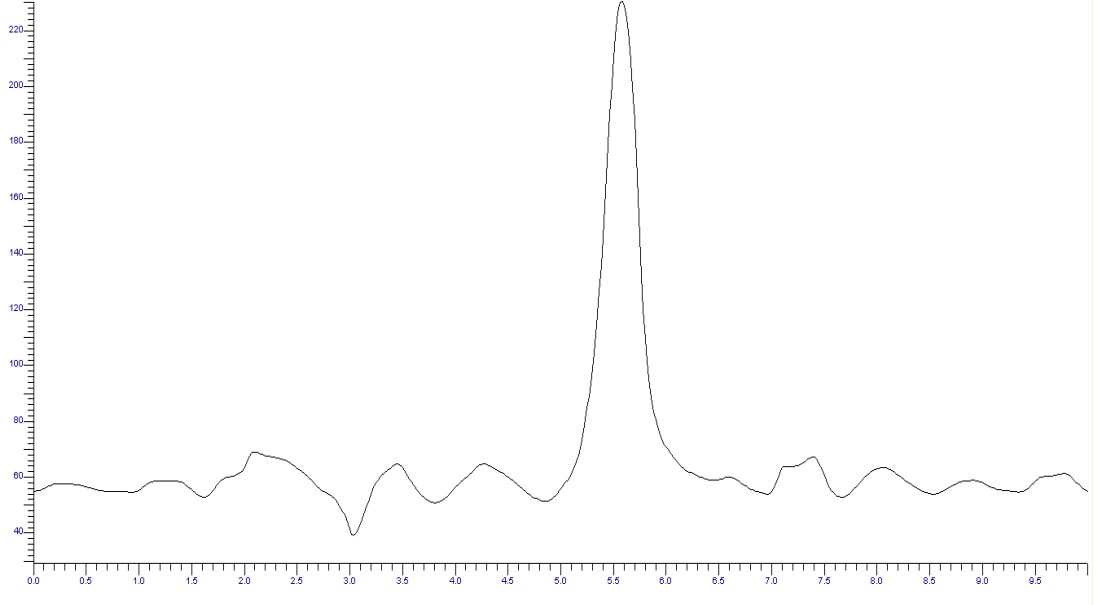
	Tabletteki konsantrasyon, mg/L	Hesaplanan konsantrasyon, mg/L ± SD	Bağıl hata, (%)	Ekstraksiyon Verimi (%)
Aspirin	500	479.66 ± 8.84	4.07	95.93
Coraspine	100	96.15 ± 5.01	3.85	96.15



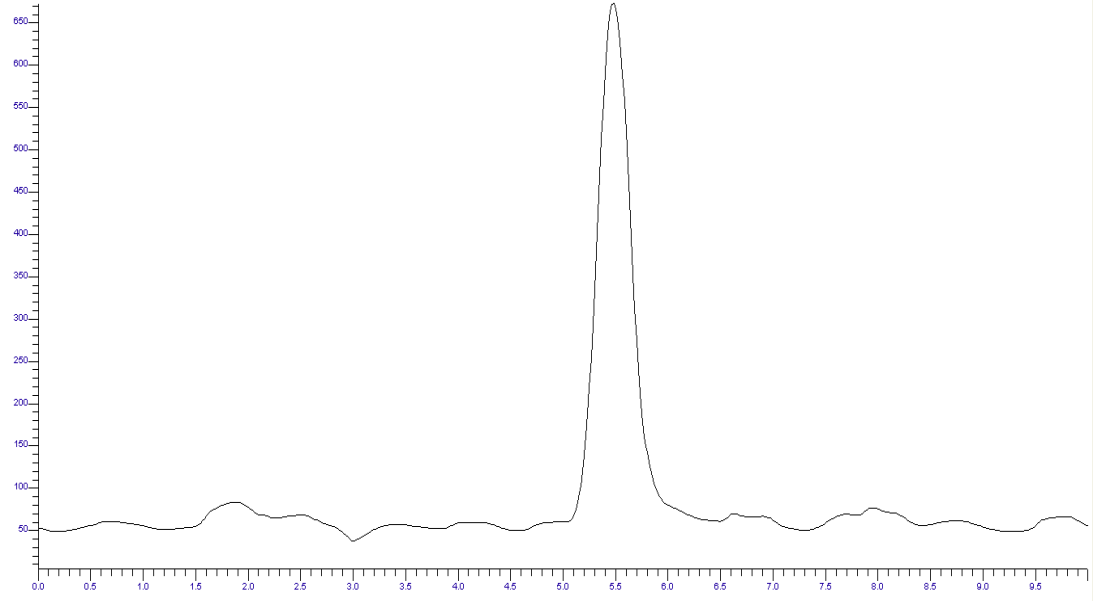
Şekil 6.15. Aspirin örneğine ait kromatogram



Şekil 6.16. Aspirine asetil salisilik asit standardı (375 mg/L) eklenmiş kromatogram



Şekil 6.17. Coraspine örneğine ait kromatogram



Şekil 6.18. Coraspine asetil salisilik asit standardı (375 mg/L) eklenmiş kromatogram

6.4 ÖRNEKLERİN ANALİZİ

Ağaç örneklerinde salisilik asit tayini için basit olarak düşünülen ve istatistik çalışmaları yukarıda verilen ve ekstraksiyonların temizlenmesi prosedüründen sonra elde edilen ve 1 mL hareketli faz içerisinde çözülen kalıntı içerisinde gözle görülebilen partiküllerin olması ekstraksiyon verimini önemli derecede etkilemektedir. Bu nedenle tüm örnekler HPLC-UV sistemine enjekte edilmeden önce 0.45-µm Politetrafloroetilen (PTFE) filtreden geçirilmiştir.

Ağaç örneklerinde salisilik asit tayini yukarıda bahsedildiği gibi standart ekleme yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Standart ekleme yönteminde, standart eklenmiş numunenin ve standardın pik alanları kullanılarak üretilen formül ile hesaplanmıştır.

Standart ekleme yöntemi için oluşturulan formülün bir uygulaması aşağıda verilmiştir. Diğer tüm hesaplamalar bu şekilde yapılmıştır.

$$c_N = c_{std} \times \frac{A_{std+N} - A_{std}}{A_{std}}$$

Burada;

c_N : Numune konsantrasyonu ,

c_{std} : Standart konsantrasyonu ,

A_{std+N} : Numune ve standarda ait pik alanı ,

A_{std} : Standarda ait pik alanı,

göstermektedir.

$$c_{N1} = 250 \text{ mg/l} \times \frac{36933048 - 26819607}{26819607}$$

$$c_{N1} = 94,27 \text{ mg/L}$$

Tablo 6.16'da verilen değerler HPLC-UV sistemine enjekte edilen ekstraksiyon çözeltileri içerisindeki salisilik asitin mg/L cinsinden konsantrasyonlarıdır.

Tablo 6.16. Ağaç örneklerinin ekstraksiyonu sonucu elde edilen salisilik asitin miktarları

Ağaç Türleri	Konsantrasyon (mg/L)		Ortalama	Standart sapma
	En Düşük	En Yüksek		
Ak Kavak (gövde)	71.30	98.19	84.79	13.10
Ak Kavak (kabuk)	55.27	63.46	59.23	2.99
Kara Kavak (gövde)	111.20	124.79	117.47	5.74
Kara Kavak (kabuk)	102.94	111.94	108.62	4.62
Ak Söğüt (gövde)	68.19	80.52	74.40	4.31
Ak Söğüt (kabuk)	29.09	34.33	30.66	2.02
Kara Söğüt (gövde)	57.22	69.56	63.36	4.60
Kara Söğüt (kabuk)	51.78	60.08	56.10	2.96
Klasik Kavak (gövde)	82.33	97.72	90.75	6.70
Klasik Kavak (kabuk)	65.97	87.36	74.53	8.41
Kanada Kavağı (gövde)	107.02	133.27	119.48	12.65
Kanada Kavağı (kabuk)	56.42	69.33	61.41	5.01

Genel olarak numunedeki analit miktarları 1 g numune içerisinde analit cinsinden verilmektedir. Tablo 6.17’de verilen söğüt ve kavak ağaçlarındaki salisilik asit miktarları 1 g ağaç örnekleri içerisindeki analit miktarlarına aşağıdaki şekilde geçilmiştir.

1 g örnekteki madde miktarı

$$= \text{bulunan değer} \left(\frac{\text{mg}}{1000 \text{ mL}} \right) \times \text{seyrelme fakt.} \times \text{numune hacmi (mL)}$$

$$\times \frac{1 \text{ g}}{\text{örnek ağırlığı (g)}}$$

Ak kavak (gövde) için;

$$= 84,79 \frac{\text{mg}}{1000 \text{ mL}} \times 2 \times 15 \text{ mL} \times \frac{1 \text{ g}}{0,5 \text{ g}}$$

$$= 5,09 \text{ mg/1g}$$

Söğüt ve kavak ağaçlarındaki salisilik asit miktarlarının 1 gram örnek içerisindeki değerleri Tablo 6.17’de verilmiştir.

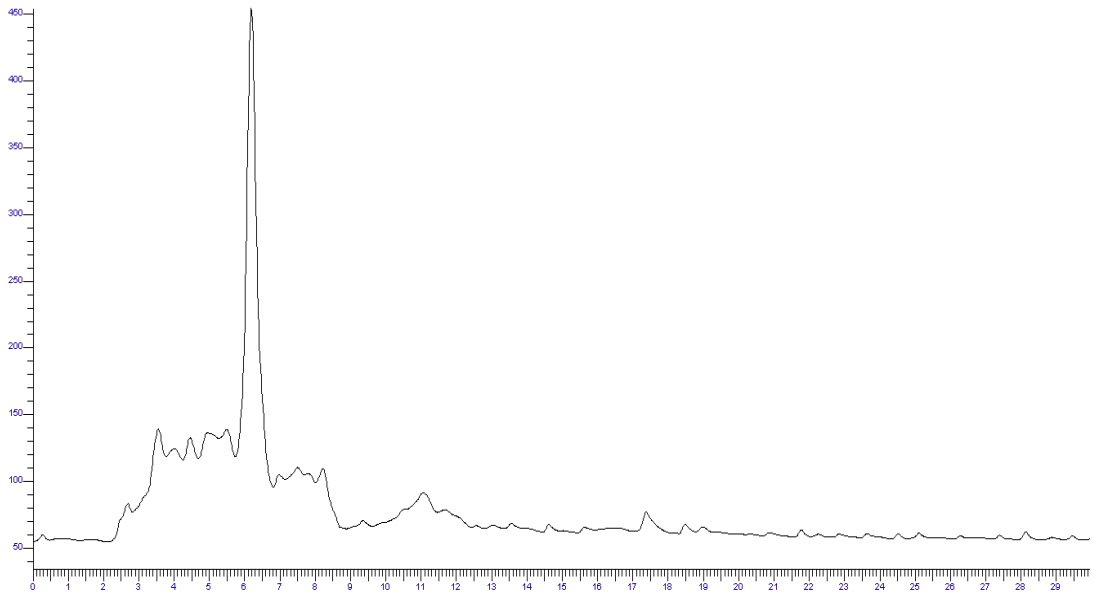
Tablo 6.17. Örneklerin 1 gram’ındaki salisilik asit miktarları

Ağaç Türleri	Konsantrasyon (mg/g)		Ortalama	Standart sapma
	En Düşük	En Yüksek		
Ak Kavak (gövde)	4.28	5.89	5.09	0.79
Ak Kavak (kabuk)	3.32	3.81	3.55	0.18
Kara Kavak (gövde)	6.67	7.49	7.05	0.34
Kara Kavak (kabuk)	6.18	6.88	6.52	0.28
Ak Söğüt (gövde)	4.09	4.83	4.46	0.26
Ak Söğüt (kabuk)	1.75	2.06	1.84	0.12
Kara Söğüt (gövde)	3.43	4.17	3.80	0.28

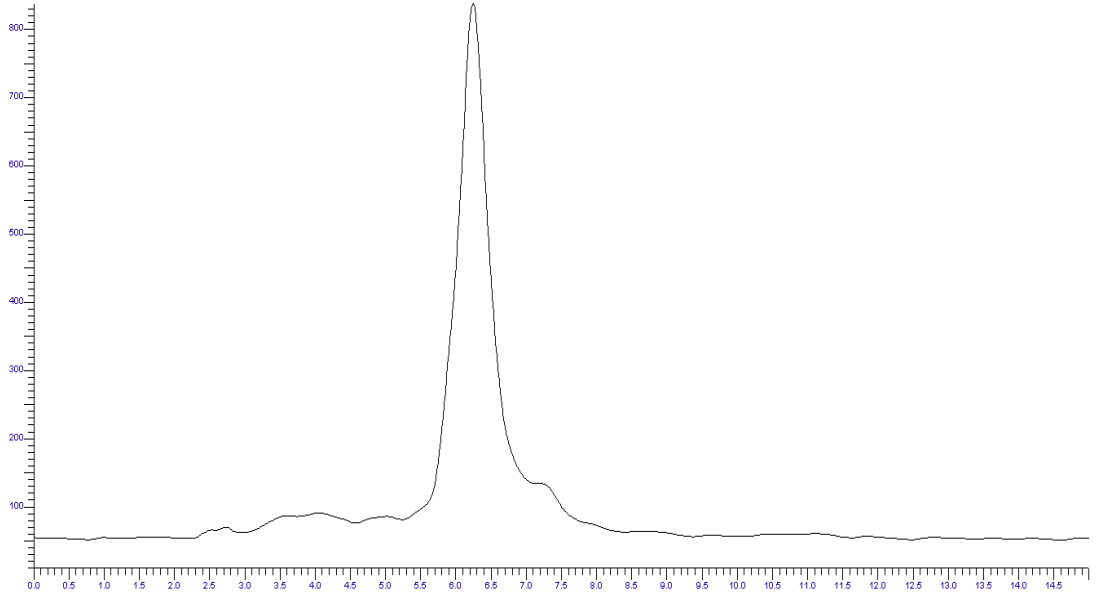
Tablo 6.17'nin devamı

Kara Söğüt (kabuk)	3.11	3.60	3.37	0.18
Klasik Kavak (gövde)	4.94	5.86	5.45	0.40
Klasik Kavak (kabuk)	3.96	5.24	4.47	0.50
Kanada Kavağı (gövde)	6.42	8.00	7.17	0.76
Kanada Kavağı (kabuk)	3.39	4.16	3.68	0.30

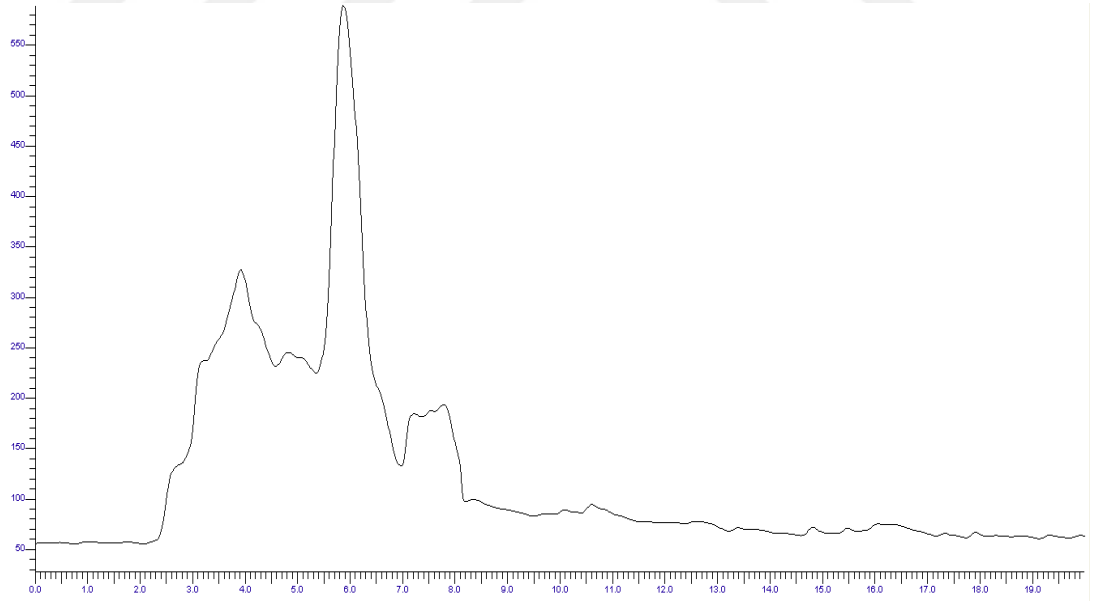
Söğüt ve kavak ağacının gövde ve kabuklarındaki salisilik asit miktarlarına ait kromatogramlar ve bu örneklere 500 mg/L salisilik asit standardı eklenmiş kromatogramları aşağıdaki Şekil 6.19-6.30'da verilmiştir.



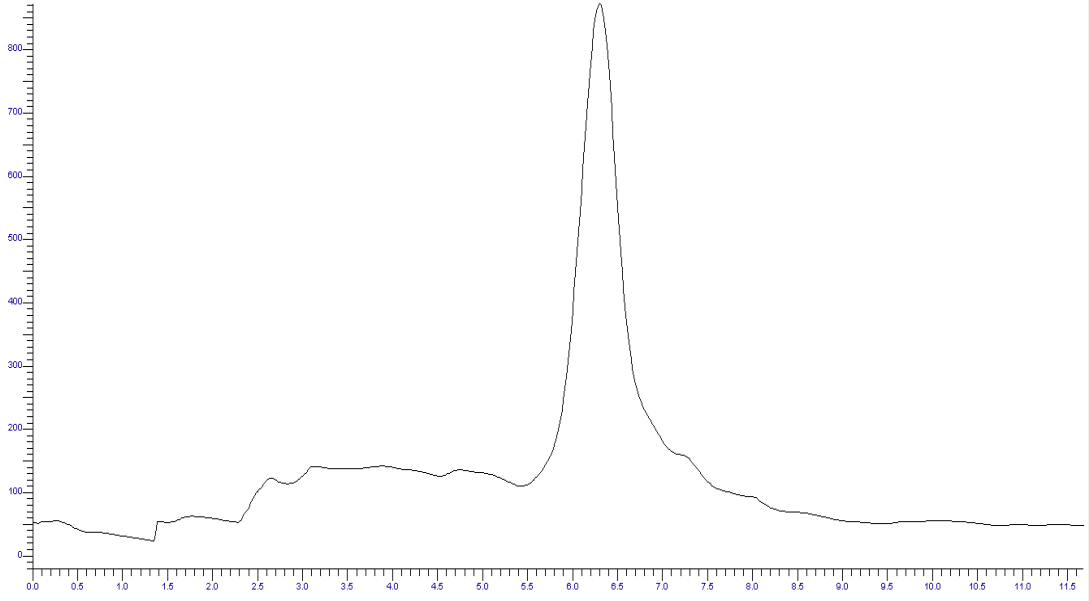
Şekil 6.19. Ak kavak ağacı örneğine ait HPLC-UV kromatogramı.



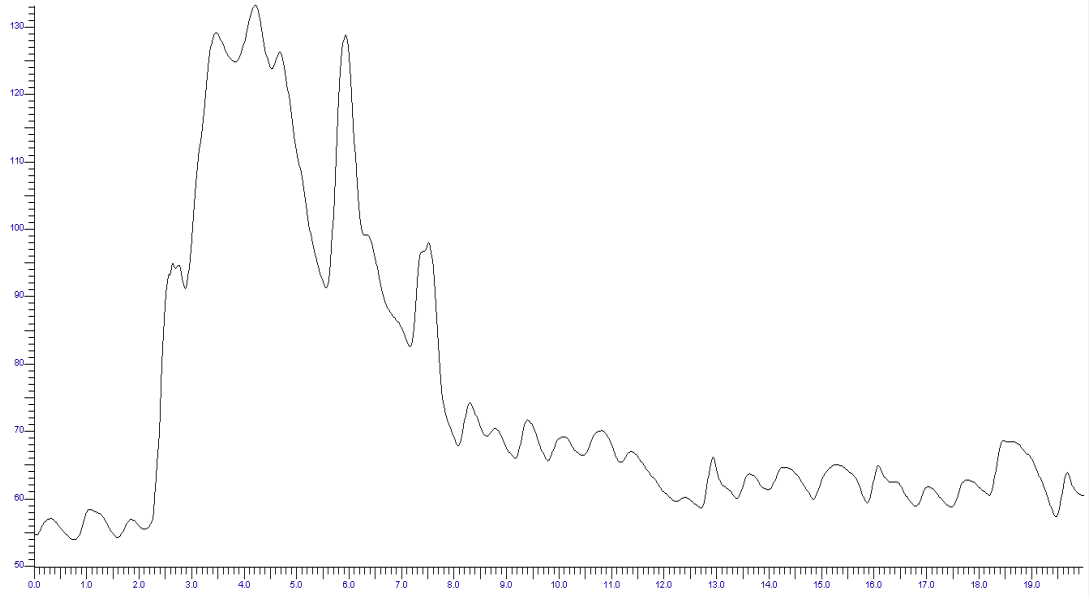
Şekil 6.20. Ak kavak ağacı örneğine 500 mg/L salisilik asit standardı eklenmiş HPLC-UV kromatogramı.



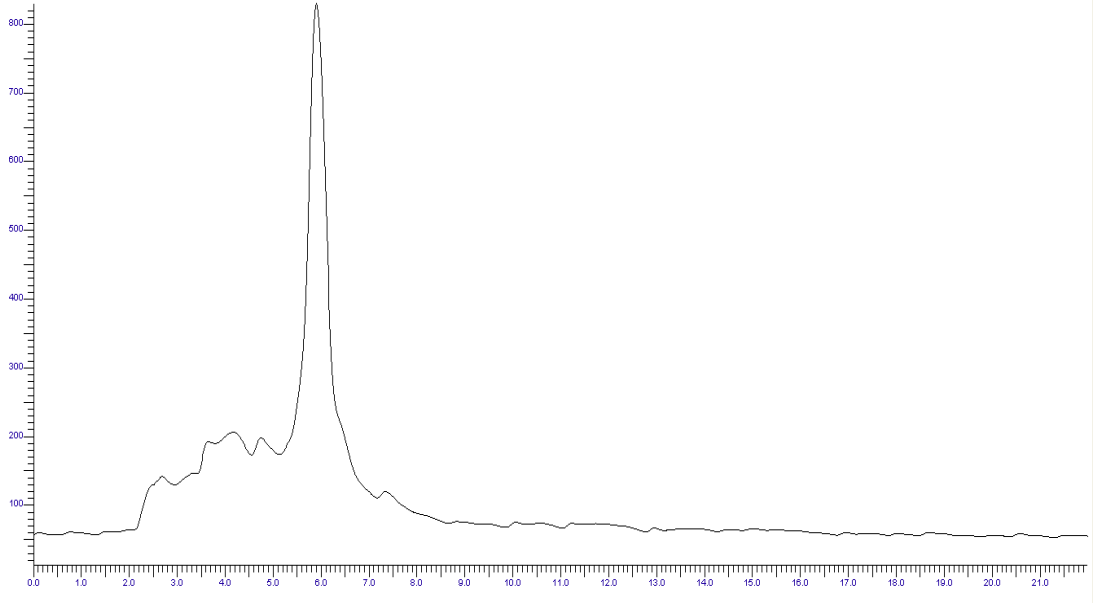
Şekil 6.21. Kara kavak ağacı örneğine ait HPLC-UV kromatogramı.



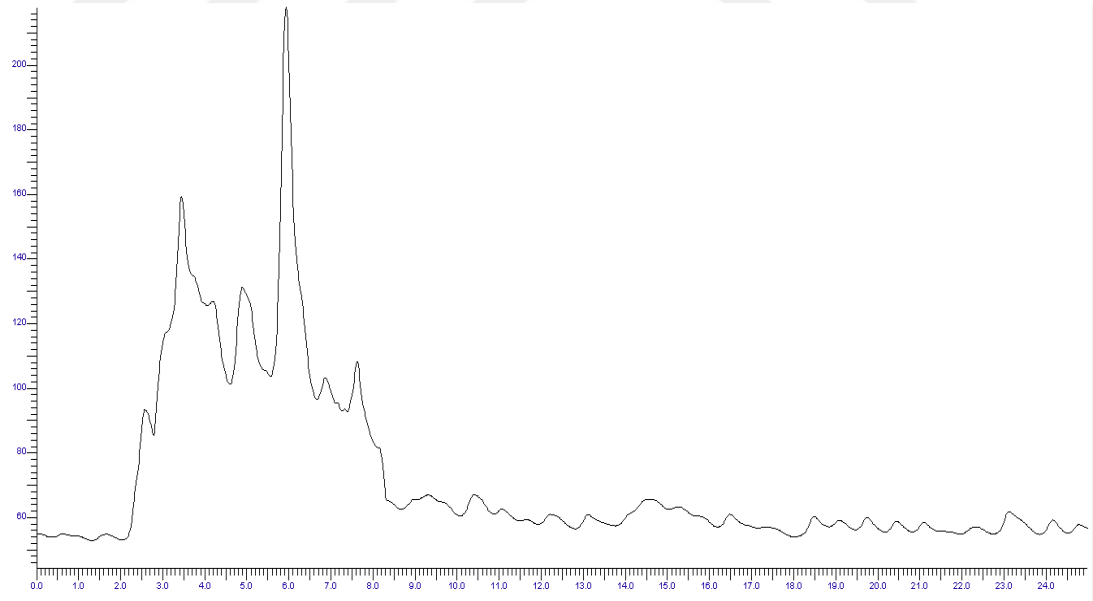
Şekil 6.22. Kara kavak ağacı örneğine 500 mg/L salisilik asit standardı eklenmiş HPLC-UV kromatogramı.



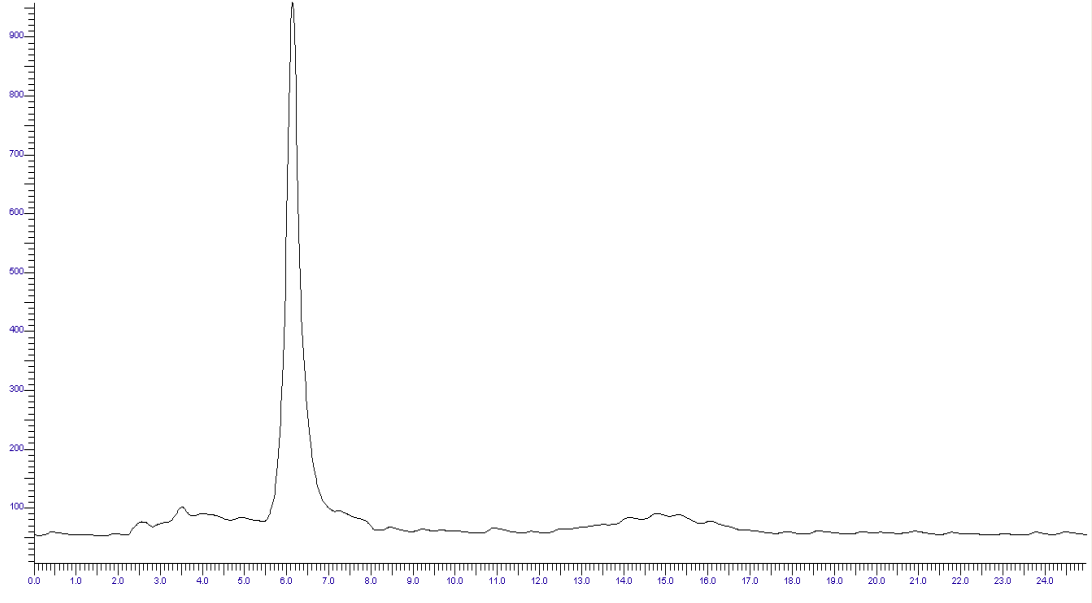
Şekil 6.23. Ak söğüt ağacı örneğine ait HPLC-UV kromatogramı



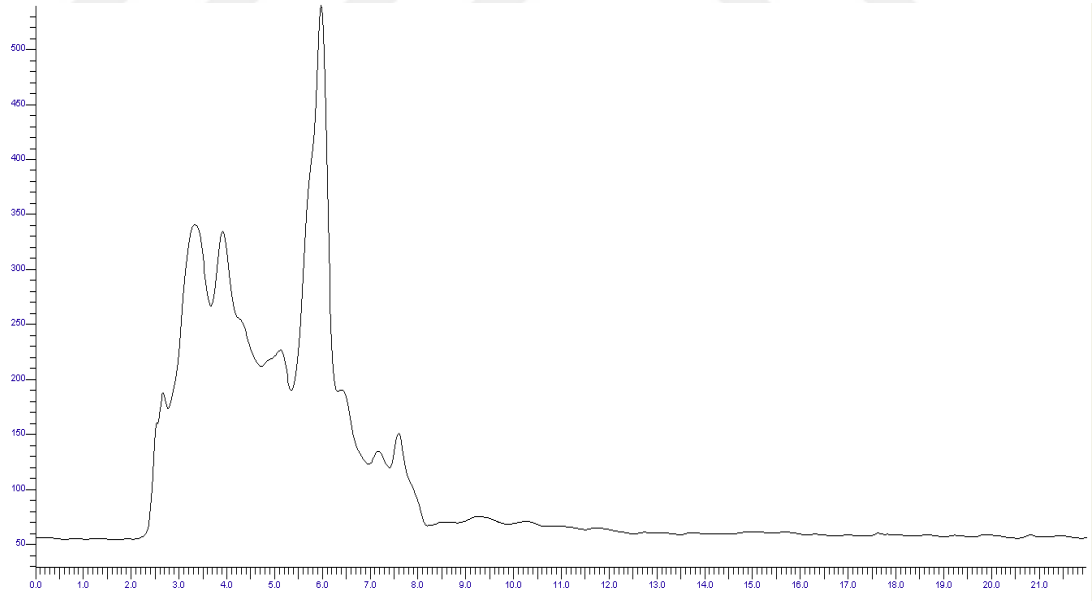
Şekil 6.24. Ak söğüt ağacı örneğine 500 mg/L salisilik asit standardı eklenmiş HPLC-UV kromatogramı.



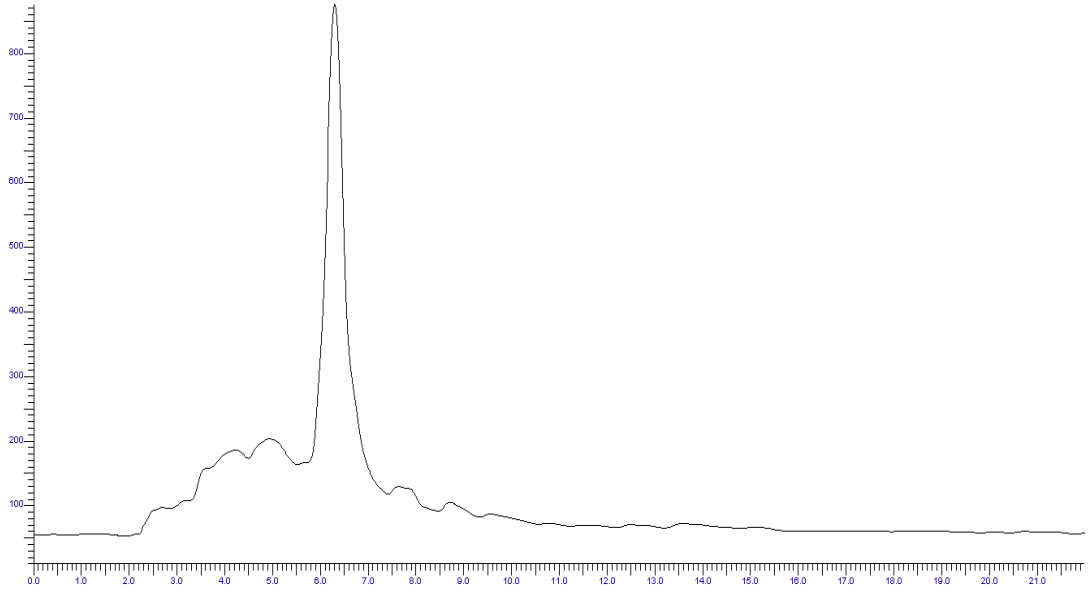
Şekil 6.25. Kara söğüt ağacı örneğine ait HPLC-UV kromatogramı.



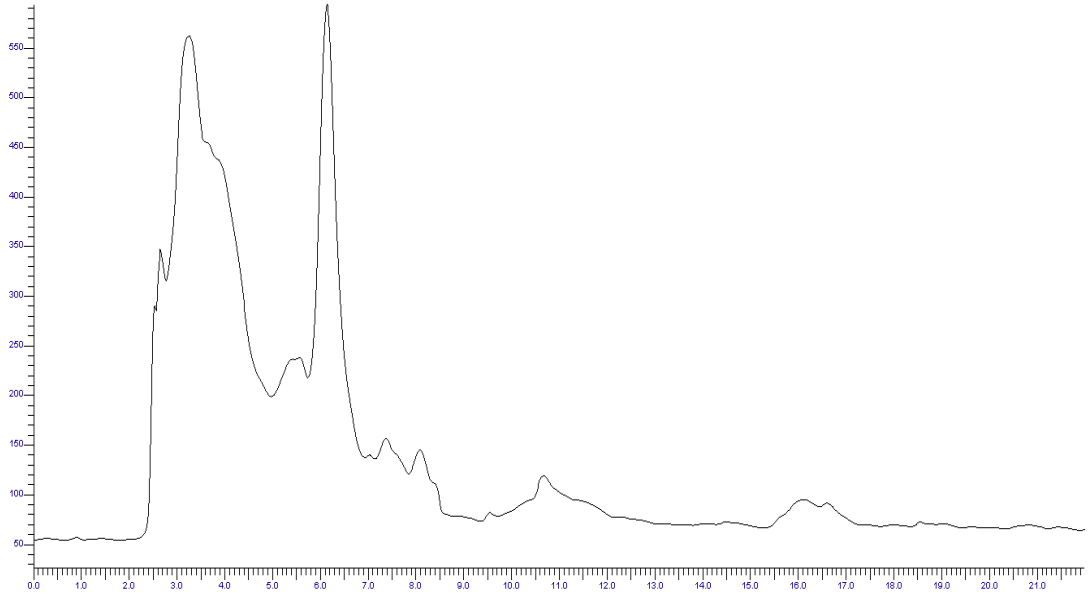
Şekil 6.26. Kara söğüt ağacı örneğine 500 mg/L salisilik asit standardı eklenmesine ait HPLC-UV kromatogramı.



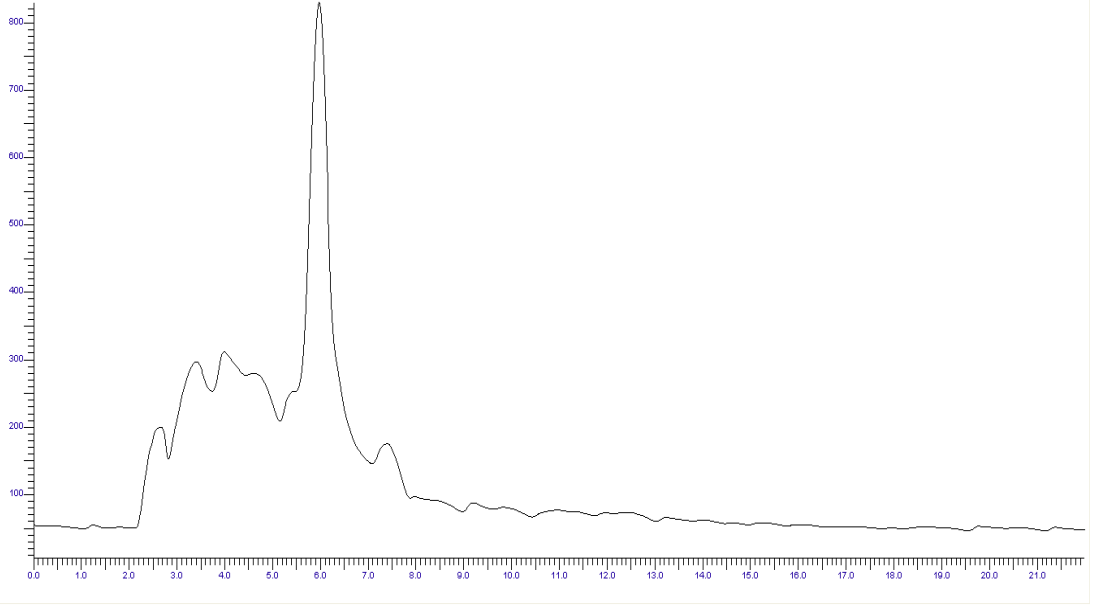
Şekil 6.27. Klasik kavak ağacı örneğine ait HPLC-UV kromatogramı.



Şekil 6.28. Klasik kavak ağacı örneğine 500 mg/L salisilik asit standardı eklenmesine ait HPLC-UV kromatogramı.



Şekil 6.29. Kanada kavağı ağacı örneğine ait HPLC-UV kromatogramı.



Şekil 6.30. Kanada kavağı ağacı örneğine 500 mg/L salisilik asit standardı eklenmesine ait HPLC-UV kromatogramı.

7 SONUÇ

Salisilik asit ve asetil salisilik asitin yan yana tayinleri için tez kapsamında HPLC-UV yöntemi, örneklerin etkili bir şekilde ekstraksiyonu ve ekstraktların temizlenmesi için ekstraksiyon prosedürü geliştirilmiştir.

Salisilik asitin ağaç örneklerinden ekstraksiyonu için basit olarak MeOH ile katı-sıvı ekstraksiyonu ve ekstraktların temizlenmesi için ise DCM ile sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemleri başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Sonuçlar sıvı-sıvı ekstraksiyon prosedürünün ağaç örnekleri için uygulanabilir olduğunu göstermiştir.

Çalışma kapsamında seçilen salisilik asit ve asetil salisilik asit 8 dakika gibi bir alıkonma zamanı içerisinde birbirlerinden ayrılmış ve her bir madde için keskin ve dar pikler elde edilmiştir. Yöntemin alıkonma zamanları bakımından tekrarlanabilirliği 0.10 dak standart sapma (SD) ve %2 bağıl standart sapma (RSD), pik alanları bakımından ise %5 bağıl standart sapmadan düşük hesaplanmıştır. Yöntem doğruluğu ise %0.37-5.08 bağıl hata aralığında değişmektedir. Yöntemin, kalibrasyon grafiklerinde kullanılan en düşük konsantrasyonları (salisilik asit için 1 mg/L ve asetil salisilik asit için 5 mg/L) kullanılarak hesaplanan LOD ve LOQ değerleri sırasıyla salisilik asit için 0.10 ve 0.33 mg/L ve asetil salisilik asit için ise 0.2 ve 0.67 mg/L'dir. Geliştirilen yöntem ve prosedür Aspirin ve Coraspine tabletlerinde yapılan asetil salisilik asit tayinlerinde %96'lık verimle başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Söğüt ve kavak ağaçlarındaki salisilik asit miktarları 1.75-8.00 mg/g arasında değişmektedir.

Sonuç, salisilik asit ve asetil salisilik asiti ilaç preparatlarında, ağaç örneklerinde vb. örneklerde yan yana veya tek olarak tayinleri için HPLC-UV metodu, salisilik asitin ağaç örneklerinden ekstraksiyonu ve ekstraktların temizlenmesi için temizleme prosedürü geliştirilmiş ve başarılı bir şekilde uygulanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Kauffman, J. M. Should you Take Aspirin to Prevent Heart Attack. *Journal of Scientific Exploration*. 2000, 14(4), 623-641.
2. Arteca, R. N. *Plant Growth substance principles and applications*. Chapman and Hall, New York, 1996, 332 s.
3. Harborne, J. B. Plant phenolics. In *Secondary Plant Products*. Ed.: E. A. Bell, B. V. Charlwood, Springer Verlag, Berlin, 1980, 329-402 s.
4. Kefeli, V. I. *Natural Plant Growth Inhibitors and Phytohormones*. Ed.: Dr. W. Junk B., V-Publishers, Boston, 1978, 277 s.
5. Raskin, I. Salicylic Acid. In *Plant Hormones, Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Ed.: Davies, Kluwer Academy Publishers, London, 1995, 188-205 s.
6. Davies, P. J. *Salicylic Acid, Plant Hormones, Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Kluwer Academy Publishers, London, 1995, 833 s.
7. Özeke, E. Salisilik asit ve bitkiler üzerindeki etkileri. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*. 2005, 42(1), 213-223.
8. Özdüven, F. F., Arın, L. Sebze yetiştiriciliğinde salisilik asidin önemi. 7. Sebze Tarımı Sempozyumu, 23-26 Haziran, 2010, Van (Bildiri Özetleri Kitabı, 423-429 s.
9. Salisilik asit kimyasal özellikleri. “https://tr.wikipedia.org/wiki/Salisilik_asit Erişim tarihi: 26.11.2020”
10. Salisilik asit özellikleri ve faydaları. “<https://www.asit.gen.tr/salisilik-asit.html> Erişim tarihi: 27.11.2020”
11. Senaratna, T., Touchell, D., Bunn, E., Dixon, K. Acetyl Salicylic Acid and Salicylic Acid Induce Multiple Stress Tolerance in Bean and Tomato Plants. *Plant Growth Regulation*. 2000, 30, 157-161.
12. Khan, W., Prithviraj, B., Smith, D. L. Photosynthetic Responses of Corn and Soybean to Foliar Application of Salicylates. *Journal of Plant Physiology*. 2003, 50, 1-8.
13. Shakirova, F. M., Sakhabutdinovam, A. R., Bezrukova, M. V., Fatkhutdinova, R. A., Fatkhutdinova, D. R. Changes in Hormonal Status of Wheat Seedlings Induced by Salicylic Acid and Salinity. *Journal of Plant Science*. 2003, 164, 317-322.

14. Raskin, I. Role of salicylic acid in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 1992, 43, 439-463.
15. Janda, T., Szalai, G., Tari, I., Paldi, E. Hydroponic Treatment with Salicylic Acid Decreases The Effects of Chilling Injury in Maize (*Zea mays* L.) plants. Journal of Planta. 1999, 208, 175-180.
16. Metwally, A., Finkermeier, I., Georgi, M., Dietz, K. J. Salicylic Acid Alleviates The Cadmium Toxicity in Barley Seedlings. Plant Physiology. 2003, 132, 272-281.
17. Aktaş, Y. L. *Vitis vinifera* L. cv. Sultani’de Salisilik Asit Uygulamasının Yaprak Proteinleri İçeriği Üzerine Etkileri. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir, 2001, 220 s. (Doktora Tezi).
18. Vane, J. R., Botting, R. M. The mechanism of action of aspirin. Thrombosis Research. 2003, 110, 255–258.
19. Asetil salisilik asit kimyasal özellikleri. “<https://tr.wikipedia.org/wiki/Aspirin> Erişim tarihi: 25.11.2020”
20. Asetil salisilik asitin kimyasal özellikleri. “http://pharmahost.org/support/index.php?title=Acetylsalicylic_Acid(accessed 14:25, Erişim tarihi: 23.11.2020”
21. Aspirin sentezi. “<https://tr.wikipedia.org/wiki/Aspirin> Erişim tarihi: 25.11.2020”
22. Söğüt ağacı. “<http://www.kariyerdersleri.com/nedir-1/sogut-agaci.aspx> Erişim tarihi : 25.11.2020”
23. Söğüt ağacı (salix-willow tree).”<https://ziraatyapma.blogspot.com/2013/07/sogut-agac-salix-willow-tree.html> Erişim tarihi : 24.11.2020”
24. Salkın söğüt ağacı. “<https://www.canlibahce.com/yaprakli-agac-turleri/salkim-sogut-agaci-810> Erişim tarihi: 27.11.2020”
25. Söğüt türleri. “<http://www.agaclar.net/forum/genis-yaprakli-agaclar/1628.htm> Erişim tarihi: 26.11.2020”
26. Black willow, siyah söğüt, (salix nigra). “<http://www.hazarahsap.com.tr/black-willowsiyah-sogut-salix-nigra/> Erişim tarihi: 24.11.2020”
27. Kutluay, Hakan. Kavak ağacının türleri ve özellikleri. “<https://www.makaleler.com/kavak-agacinin-turleri-ve-ozellikleri> Erişim tarihi: 26.11.2020”
28. Skoog, A. D., Holler, J., Nieman, T. A. Enstrümental Analiz İlkeleri. 7.Baskı. Ed.: E. Kılıç, F. Köseoğlu, H. Yılmaz, Bilim Yayınları, Ankara, 1997.

29. Haris, Daniel C. *Quantitative Chemical Analysis*. Ed.: W. H. Freeman, New York, 1987.



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Ad Soyad	Yasemin GÜMÜŞ
Uyruğu	T.C
Doğum Yeri	KASTAMONU
Doğum Tarihi	18.03.1993
Medeni Durumu	Bekar
Mail Adresi	yasemin.gumus@outlook.com yaseminn.gumuss35@gmail.com

EĞİTİM DURUMU

2007-2011	Vali Vecdi Gönül Anadolu Lisesi
2011-2015	Celal Bayar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü-Lisans
2017-2020	Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya-Yüksek Lisans