



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ELLAJİK ASİDİN
İNCE TABAKA KROMATOĞRAFİSİ İLE
SAFLAŞTIRILMASI**

BERNA İŞYAPAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Güler YALÇIN

İSTANBUL-2011

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Programın seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ()

Anabilim Dalı : Analitik Kimya

Tez Sahibi : Berna İŞYAPAN

Tez Başlığı : Ellajik Asidin İnce Tabaka Kromatografisi ile Saflaştırılması

Sınav Yeri : Analitik Kimya Anabilim Dalı

Sınav Tarihi : 21.06.2011

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman:

Prof. Dr. Güler YALÇIN

Kurumu

Marmara Üniversitesi

Sınav Jüri Üyeleri:

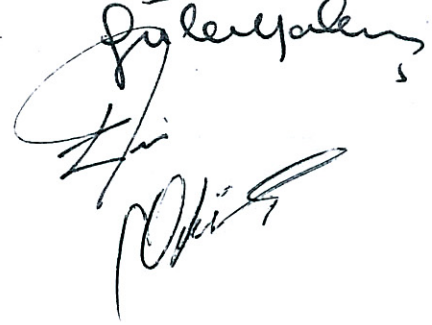
Prof. Dr. Emre DÖLEN

Marmara Üniversitesi

Prof. Dr. Güniz KÜÇÜKGÜZEL

Marmara Üniversitesi

İmza



Yukarıdaki jüri kararı Enstitü yönetim Kurulu'nun 30/06/2011 tarih ve 13 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Gülden Z. OMURTAG

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

25.05.2011

Berna İŞYAPAN



ÖNSÖZ

Bu çalışmanın tüm aşamasında büyük yardım ve desteğini gördüğüm danışmanım Sayın Prof. Dr. Güler Yalçın' a teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Huzurlu ve rahat bir çalışma ortamı sağladıkları için başta Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Ana Bilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Emre Dölen' e ve tüm Öğretim görevlilerine teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışma ortamı için Nuray Yüktaş'a ayrıca teşekkür ederim.

Tez çalışmamda ve hayatım boyunca attığım her adımda beni hiç yalnız bırakmayan, başta dedem Cafer İşyapan olmak üzere babam Yalçın İşyapan, annem Müberrah İşyapan ve sevgili ablam Banu İşyapan'a çok teşekkür ederim.

Ayrıca bu süreçte sabırla yanımda olan arkadaşlarım başta Umut Sivri olmak üzere, Serkan Sevinir, Hasan Gültekin ve Mustafa Yazıcı'ya teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından C/SAG-C-YLP-040310-0035 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA</u>
BEYAN.....	i
ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ÖZET.....	v
SUMMARY.....	vi
SEMBOLLER.....	vii
KISALTMALAR.....	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
RESİM LİSTESİ.....	xiii
TABLO LİSTESİ.....	xiv
BÖLÜM I. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
I.1. GİRİŞ.....	1
I.2. AMAÇ.....	3
BÖLÜM II. GENEL BİLGİLER.....	4
II.1. KESTANE.....	4
II.1.1. Kestane Genel Özellikleri.....	4
II.2. POLİFENOLLER.....	7
II.2.1. Ellajik Asit ve Özellikleri.....	7
II.2.2. Gallik Asit ve Özellikleri.....	10
II.3. HIZLANDIRILMIŞ ÇÖZÜCÜ EKSTRAKSİYONU (ASE)10	
II.4. KROMATOĞRAFI.....	13
II.4.1. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK).....	14
BÖLÜM III. TEZ ÇALIŞMALARI.....	17
III.1. GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
III.1.1. Kimyasal Maddeler.....	17
III.1.2. Cihaz ve Analitik Koşullar.....	18
III.1.3. Çözeltiler.....	18

III.1.4. Örnek Hazırlama.....	19
III.1.5. Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu (ASE) ile yapılan çalışmalar.....	19
III.1.6. Kromatografik Koşullar.....	20
III.2.BULGULAR.....	20
III.2.1. Referans Sistem ile Yapılan Kromatografik Çalışmalar	
III.2.1.1. Polaritesi Yüksek Hareketli Faz ile Yapılan Çalışmalar.....	21
III.2.1.2. Polaritesi Düşük Hareketli Faz ile Yapılan Çalışmalar.....	23
III.2.1.3. Etilasetat İçermeyen Hareketli Faz ile Yapılan Çalışmalar.....	25
III.2.1.4. Etilasetat yerine Aseton Kullanılarak Yapılan Çalışmalar.....	26
III.2.1.5. Etilasetat Yerine Tetrahidrofuran (THF) Kullanılarak Yapılan Çalışmalar.....	27
III.2.1.6. Etilasetat Yerine Tetrahidrofuran (THF) ve Aseton Kullanılarak Yapılan Çalışmalar.....	28
III.2.1.7. Etilasetat Yerine Dioksan Kullanılarak Yapılan Çalışmalar.....	29
III.2.1.8. Etilasetat Yerine n-Bütanol Kullanılarak Yapılan Çalışmalar.....	30
III.2.1.9. Çift Yönlü Yürütme ile Stabilité Kontrolü.....	32
III.2.1.10. Çift Yönlü Yürütme ile Yapılan Çalışma.....	39
III.2.2.Kestane Örnekleri ile Yapılan Kromatografik Çalışmalar.....	42
BÖLÜM IV. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	47
KAYNAKLAR.....	52
ÖZGEÇMİŞ.....	63

ÖZET

Kestane (*Castanea*), Fagaceae (kayıngiller) familyasındandır. Kestane ağaçları, güzellik, barınak ve yakacak için dünyada 6000 yıldan beri yetiştirilmektedir. Verimliliği, hasat kolaylığı, yeme için hazırlığının basit olması ve gelir sağlaması insanları kestane yetiştirmeye sevk etmiştir. Türkiye’de de geniş bir alanda yetiştirilmektedir. Kestanenin sinir sistemi ve kalp kaslarının çalışması üzerinde etkili olduğu, vücudu yaşlanmaya, sigara ve alkolün zararlarına karşı koruduğu belirtilmekte ve beslenme diyetlerinde dikkate alınmaktadır.

Ellajik asit polifenolik bir bileşik olup sağlık üzerine olumlu etkileri vardır. Kolon, gırtlak, karaciğer, akciğer, dil ve deri kanseri oluşumlarını önemli ölçüde engellediği ortaya konulmuştur.

Bu çalışmada kestane ağaç ve meyvesinden alınan dört farklı örneğin Hızlandırılmış Çözücü Ekstaksiyonu (ASE) ile ekstraksiyonu yapıldı. Bu ekstraktelerde bulunan fenolik bileşiklerden ellajik asit ve gallik asidi İnce Tabaka Kromatografisi ile ayırmak için uygun çözücü sistemi geliştirildi.

Anahtar kelimeler: Ellajik asit, gallik asit, kestane, İnce Tabaka Kromatografisi (İTK), Hızlandırılmış Çözücü Ekstaksiyonu (ASE).

SUMMARY

PURIFICATION OF ELLAGIC ACID WITH THIN LAYER CHROMATOGRAPHY

Chestnut (*Castanea*) belongs to the Fagaceae family. Chestnut trees are grown for 6000 years because of their beauty and use for shelter or fuel. Efficiency, ease of harvest, simple of the preparation has led people to grow chestnuts. Chestnut is cultivated in a large area in Turkey. Chestnut has effects on the nervous system and heart muscle function, body aging. It protects against the damage of smoking and alcohol, so these are taken into account on nutritional diets.

Ellagic acid is a polyphenolic compound which has positive effects on health. Ellagic acid inhibits the formation of skin, colon, larynx, liver, lung, tongue cancer. That have been determined.

In this study, four different sample of the chestnut tree and its fruit's extraction was performed with Accelerated Solvent Extraction (ASE). Phenolic compounds ellagic acid and gallic acid separated from these extracts with Thin Layer Chromatography. Solvent system was developed.

Key Words: Ellagic acid, gallic acid, chestnut, Thin Layer Chromatography (TLC), Accelerated Solvent Extraction (ASE).

SEMBOLLER

$^{\circ}\text{C}$: Santigrad derece

L : Litre

mL : Mililitre

μL : Mikrolitre

mm : Milimetre

μm : Mikrometre

nm : Nanometre

psi : Basınç

bar : Basınç

mg : Miligram

g : Gram

% : Yüzde

Rf : Örneğin aldığı yol/ Çözücünün aldığı yol

mol.L^{-1} : Konsantrasyon

dak : Dakika

s : Saniye

g.mol⁻¹ : Mol kütlesi

KISALTMALAR

İTK : İnce Tabaka Kromatografisi

ASE : Hızlandırılmış Çözücü Ekstraksiyonu

UV : Ultraviyole

Ellajik asit: EA

Gallik asit : GA

Tetrahidrofur: THF

Amonyak: NH₃

Kestane Meyvesi : KME

Kestane Meyvesinin Kabuğu : KMK

Kestane Ağaç Gövdesi iç kısım : KAG

Kestane Ağaç Kabuğu : KAK

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil II.1. Ellajik asitin yapısı ($C_{14}H_6O_8$).....	7
Şekil II.2. Ellajitanenlerin hidrolizi ile ellajik asit oluşumu.....	8
Şekil II.3. Ellajik asit serbest hali (sol üst), hekzahidroksidifenikasit formu şeker ile birlikte (sağda), ellajik asit glikoziti (sol alt).....	9
Şekil II.4. Gallik asitin yapısı($C_7H_6O_5$).....	10
Şekil II.5. Hızlandırılmış Çözücü Ekstraksiyon Cihazı (ASE) çalışma şeması.....	12
Şekil II.6. İnce Tabaka Kromatografisi Uygulaması.....	15
Şekil II.7. Plaka üzerinde Rf değeri hesaplanması.....	16
Şekil III.1. Mobil Faz: Toluen: Etil Asetat: Formik asit: Metanol (30:30:8:2) sisteminde standartların kromatogramı	21
Şekil III.2. Mobil Faz: Toluen: Etilasetat: Formik asit: Metanol (20:40:8:2) sisteminde standartların kromatogramı.....	22
Şekil III.3. Mobil Faz: Toluen: Etilasetat: Formik asit: Metanol (12:48:8:2) sisteminde standartların kromatogramı	23
Şekil III.4. Mobil Faz: Toluen: Etilasetat: Formik asit: Metanol (40:20:8:2) sisteminde standartların kromatogramı.....	24
Şekil III.5. Mobil Faz: Toluen: Etilasetat: Formik asit: Metanol (48:12:8:2) sisteminde standartların kromatogramı.....	24
Şekil III.6. Mobil Faz: Toluen: Etilasetat: Formik asit: Metanol (56:4:8:2) sisteminde standartların kromatogramı.....	25
Şekil III.7. Mobil Faz: Toluen: Metanol: Formik asit (30:32:8) sisteminde standartların kromatogramı.....	26
Şekil III.8. Mobil Faz: Toluen: Aseton: Formik asit: Metanol (30:30:8:2) sisteminde standartların kromatogramı.....	27
Şekil III.9. Mobil Faz: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (30:30:8:2) sisteminde standartların kromatogramı.....	28
Şekil III.10. Mobil Faz: Toluen: Aseton: THF: Formik asit (20:10:30:8) sisteminde standartların kromatogramı.....	29
Şekil III.11. Mobil Faz: Toluen: Dioksan: Formik asit: Metanol (30:30:8:2) sisteminde standartların kromatogramı.....	30

Şekil III.12. Mobil Faz: Toluen: n-Bütanol: Formik asit: Metanol (40:20:8:2) sisteminde standartların kromatogramı.....	31
Şekil III.13. Mobil Faz: Toluen: n-Bütanol: Formik asit (40:22:8). sisteminde standartların kromatogramı.....	31
Şekil III.14. Birinci yön: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (30:30:8:2), İkinci yön: Toluen: THF: NH ₃ : Metanol (30:30:2:8) EA kromatogramı.....	32
Şekil III.15. Birinci yön: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (30:30:8:2), İkinci yön: Toluen: THF: NH ₃ : Metanol (30:30:2:8) GA (1.gün) kromatogramı.....	33
Şekil III.16. Birinci yön: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (30:30:8:2) İkinci yön: Toluen: THF: NH ₃ : Metanol (30:30:2:8) EA12 (1.gün) kromatogramı.....	33
Şekil III.17. Birinci yön: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (30:30:8:2) İkinci yön: Toluen: THF: NH ₃ : Metanol (30:30:2:8) EA2 (1.gün) kromatogramı.....	33
Şekil III.18. Birinci yön: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (30:30:8:2) İkinci yön: Toluen: THF: NH ₃ : Metanol (30:30:2:8) GA(6.gün) kromatogramı	34
Şekil III.19. Birinci yön: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (30:30:8:2) İkinci yön: Toluen: THF: NH ₃ : Metanol (30:30:2:8) EA12 (6.gün) kromatogramı.....	34
Şekil III.20. Birinci yön: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (30:30:8:2) İkinci yön: Toluen: THF: NH ₃ : Metanol (30:30:2:8). EA2 (6.gün) kromatogramı.....	34
Şekil III.21. Birinci yön: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (30:30:8:2) İkinci yön: Toluen: THF: NH ₃ : Metanol (30:30:2:8) GA (13.gün) kromatogramı.....	35
Şekil III.22. Birinci yön: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (30:30:8:2) İkinci yön: Toluen: THF: NH ₃ : Metanol (30:30:2:8) EA12 (13.gün) kromatogramı.....	35
Şekil III.23. Birinci yön: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (30:30:8:2)	

İkinci yön: Toluen: THF: NH ₃ : Metanol (30:30:2:8) EA2 (13.gün)	
kromatogramı.....	35
Şekil III.24. Birinci yön: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (30:30:8:2)	
İkinci yön: Toluen: THF: NH ₃ : Metanol (30:30:2:8) GA (20.gün)	
kromatogramı.....	36
Şekil III.25. Birinci yön: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (30:30:8:2)	
İkinci yön: Toluen: THF: NH ₃ : Metanol (30:30:2:8) EA12 (20.gün)	
kromatogramı.....	36
Şekil III.26. Birinci yön: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (30:30:8:2)	
İkinci yön: Toluen: THF: NH ₃ : Metanol (30:30:2:8) EA2 (20.gün)	
kromatogramı.....	36
Şekil III.27. Birinci yön: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (30:30:8:2)	
İkinci yön: Toluen: THF: NH ₃ : Metanol (30:30:2:8) GA (25.gün)	
kromatogramı.....	37
Şekil III.28. Birinci yön: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (30:30:8:2)	
İkinci yön: Toluen: THF: NH ₃ : Metanol (30:30:2:8) EA12 (25.gün)	
kromatogramı.....	37
Şekil III.29. Birinci yön: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (30:30:8:2)	
İkinci yön: Toluen: THF: NH ₃ : Metanol (30:30:2:8)EA2 (25.gün)	
kromatogramı.....	37
Şekil III.30. Birinci yön: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (30:30:8:2)	
İkinci yön: Toluen: THF: NH ₃ : Metanol (30:30:2:8) GA (32.gün)	
kromatogramı.....	38
Şekil III.31. Birinci yön: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (30:30:8:2)	
İkinci yön: Toluen: THF: NH ₃ : Metanol (30:30:2:8) EA12 (32.gün)	
kromatogramı.....	38
Şekil III.32. Birinci yön: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (30:30:8:2)	
İkinci yön: Toluen: THF: NH ₃ : Metanol (30:30:2:8). EA2 (32.gün)	
kromatogramı.....	38
Şekil III.33. Birinci yön: n-Hekzan: Etilasetat: Asetik asit (31:14:5)	
İkinci yön: Kloroform: Metanol: Formikasit (44:3.5:2.5)	
GA kromatogramı.....	39

Şekil III.34. Birinci yön: n-Hekzan: Etilasetat: Asetik asit (31:14:5) İkinci yön: Kloroform: Metanol: Formikasit (44:3.5:2.5) EA12 kromatogramı.....	40
Şekil III.35. Birinci yön: n-Hekzan: Etilasetat: Asetik asit (31:14:5) İkinci yön: Kloroform: Metanol: Formikasit (44:3.5:2.5) EA2 kromatogramı.....	40
Şekil III.36. Mobil Faz: Toluen: Etil Asetat: Formik asit: Metanol (30:30:8:2) Kestane meyve kabuğu (KMK) kromatogramı.....	43
Şekil III.37. Mobil Faz: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (30:30:8:2) Kestane meyve kabuğu (KMK) kromatogramı.....	43
Şekil III.38. Mobil Faz: Toluen: Etil Asetat: Formik asit: Metanol (30:30:8:2) Kestane meyvesi (KME) kromatogramı.....	44
Şekil III.39. Mobil Faz: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (30:30:8:2) Kestane meyvesi (KME) kromatogramı.....	44
Şekil III.40. Mobil Faz: Toluen: Etil Asetat: Formik asit: Metanol (30:30:8:2) Kestane ağaç gövdesi iç kısım (KAG) kromatogramı.....	45
Şekil III.41. Mobil Faz: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (30:30:8:2) Kestane ağaç gövdesi iç kısım (KAG) kromatogramı.....	45
Şekil III.42. Mobil Faz: Toluen: Etil Asetat: Formik asit: Metanol (30:30:8:2) Kestane ağaç kabuğu (KAK) kromatogramı.....	46
Şekil III.43. Mobil Faz: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (30:30:8:2) Kestane ağaç kabuğu (KAK) kromatogramı.....	46

RESİM LİSTESİ

Resim II.1.Kestane (Castanea).....	4
Resim II.2. Kestane ağaç gövdesi.....	5
Resim II.3. Kestane şekeri.....	7
Resim II.4. Kestane püresi.....	7
Resim II.5. Hızlandırılmış Çözücü Ekstraksiyon Cihazı (ASE).....	11
Resim III.1. Kestane meyve kabuğu (KMK).....	19
Resim III.2. Kestane meyvesi (KME).....	19
Resim III.3. Kestane ağaç gövdesi iç kısım (KAG)	19
Resim III.4. Kestane ağaç kabuğu (KAK)	19

TABLO LİSTESİ

Tablo II.1. Besin maddelerinde Ellajik asit içeriği.....	8
Tablo II.2. Ekstraksiyon türlerinin kıyaslanması.....	11
Tablo III.1. Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu (ASE) çalışma koşulları.....	20
Tablo III.2. Kullanılan organik çözücüler ve polariteleri	22
Tablo III.3. Kullanılan çözücü sistemlerindeki Ellajik asit Rf değerleri	40
Tablo III.4. Kullanılan çözücü sistemlerindeki Gallik asit Rf değerleri.....	41
Tablo IV.1. Kestane meyve ve ağaç örneklerinin seçilen iki sistemdeki Rf değerleri	49

BÖLÜM I.

GİRİŞ VE AMAÇ

I.1. GİRİŞ

Polifenoller acılık, renklilik gibi duyuşal özelliklere sahip olup, sağlık üzerine olası etkilerinden dolayı önemli kimyasal bileşiklerdir (1). Genel olarak polifenollere çay, kırmızı şarap, çeşitli meyveler ve bazı tıbbi bitkilerde rastlanır (2-6).

Polifenolik bileşiklerden olan ellajitanenler, bir veya daha fazla sayıdaki heksahidroksidifenol grubu taşıyan bir molekül ile şeker molekülünün (genellikle glukoz) esterleşmesiyle oluşun ve hidrolize olabilen bileşiklerdir (7). Ellajitanenler, asit veya bazlarla hidrolize uğradığında ester bağları hidrolize olarak heksahidroksidifenik asit ve glukoz ara ürünlerini verir, heksahidroksidifenik asit kendiliğinden laktonize olarak suda az çözünen ellajik aside dönüşür (8-11). Ellajik asit, aynı zamanda gallik asidin kondanese dimeridir (1, 12-19).

Zayıf bir asit olan ellajik asit, doğada birçok bitkide (çilek, ahududu, böğürtlen, nar, yaban mersini, ananas gibi meyvelerde ve ceviz, kestane, gibi sert kabuklu yiyeceklerde) serbest halde bulunabildiği gibi, glikozitleri halinde, ya da heksahidroksidifenik asit olarak da bulunur (1, 8, 16, 20-24). Hidrofilik kısmı temsil eden dört fenolik ve iki lakton grubu ve lipofilik alanı temsil eden dört halka ile termodinamik olarak oldukça kararlı bir moleküldür. Lipofilik üstünlük gösteren molekülün dört halkası nedeniyle ısıya oldukça dayanıklıdır (20, 25). Suda az çözünür; metanol, etanol ve dimetil sülfoksitte iyi çözünür (20, 26).

Ellajik asidin 1960'lı yıllarda kan pıhtılaşması ve cilt beyazlatma etkileri, hemostatik aktivitesi üzerinde çalışılmıştır. İlerleyen yıllarda kanser oluşumu; daha sonraki yıllarda ise olası antimutajenik, antiviral ve antikanserojenik etkileri nedeniyle ellajik

aside olan ilgi artmıştır. Özellikle laboratuvar hayvanlarında çalışılmıştır. Buna karşın literatürde insanlarda yapılan çalışmalara daha az rastlanmaktadır (8, 17, 27-42). Ayrıca, ellajik asidin oldukça düşük toksitesi ve bitkilerde yaygın olarak bulunan bir ellajitanen olması nedeniyle, kansere karşı kimyasal koruma olarak kullanılmasına yönelik araştırmalar yapılmıştır. Yutak, akciğer, dil, kolon ve cilt kanserinde engelleyici olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (30, 41, 43-46).

Sentetik antioksidanların kanserojen özelliklerinden dolayı kullanımlarına kısıtlamalar getirilirken, gıda ve ilaç endüstrisinde doğal bitkilere, antioksidan olarak kullanımlarına, kansere karşı koruyucu özelliklerine olan ilgi artmıştır (47). Yapılan araştırmalarla, ellajik asitin kansere, kalp hastalıklarına ve diğer tıbbi problemlere yararlı etkileri göz önünde bulundurulmuştur. Besin takviyesi olarak pazarlanmasına başlanmıştır (48, 49). Bu nedenle de ellajik asit gibi doğada bulunan ve başta antioksidan olmak üzere birçok özelliğe sahip bileşiklerin hangi gıdalarda ne kadar bulunduğu, elde edilmeleri ve saflaştırılmaları önem kazanmıştır. (25).

Ellajik asit bir çok bitki ve meyvede tayin edilmiş, bu amaçla kromatografik (22, 50-52) spektroskopik (53) , elektroforetik (54, 61) ve polarografik (55) tekniklerle ve son olarak ellajik asidin redüksiyonuna bağlı voltametik teknikle çalışılmıştır (25). Buna karşın, yapılan saflaştırma çalışmaları az sayıdadır. Demokratik Kongo Cumhuriyeti'nin belirli bir bölgesinden toplanmış *Anisophyllea dichostyla R.Br.* kök kabukları örneklerinde NMR, HPLC-ESI-MS ve nano-ESI-MS-MS yöntemleri kullanılarak bir çalışma yapılmıştır (56). Bu çalışmada, ellajik asit türevleri, kateşinler ve prosiyanidinlerin kalitatif ve kantitatif analizlerine ilişkin sonuçlar rapor edilmiş olup ellajik asidin 8 türevi tanımlanmıştır. Diğer bir çalışmada, yeni bir yaklaşımla otomatik yeniden kristallendirme yöntemi ile tekrarlanan saflaştırmalar yapılarak mutlak safsızlık belirlenmiştir. Ticari ellajik asit örnekleri 4 kez yeniden kristallenerek safsızlık yüzdeleri bulunmuştur (57). Hindistan'da yetişen *Triphala Churanam* formülasyonunda Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (HPTLC) yöntemi ile ellajik asit ve gallik asit miktarları tayin edilmiştir (58). Genellikle çalışılan kromatografik yöntem Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

(HPLC) olup, İnce Tabaka Kromatografisi ile ilgili saflaştırma, ayırma çalışmalarına pek rastlanmamıştır.

Vasconcelos'un çalışmasında kestanenin farklı dokularında polifenol içeriğine bakılmış, düşük molekül ağırlıklı ellajik asit ve gallik asit bulunduğunu belirlemiştir (59). Gonçalves çalışmasında kavrulmuş, haşlanmış ve ham kestane örnekleri ile çalışmış haşlanmış kestane örneklerinin daha yüksek ellajik asit ve gallik asit içeriğine sahip olduğunu saptamıştır (60).

Bu çalışmada kestane ağaç ve meyvesinden alınan dört farklı örneğin Hızlandırılmış Çözücü Ekstraksiyonu (ASE) ile ekstraksiyonu yapılmıştır. Bu ekstrakterde bulunan fenolik bileşiklerden ellajik asit ve gallik asidi İnce Tabaka Kromatografisi ile ayırmak için uygun sistem geliştirilmiştir.

I.2. AMAÇ

Bu çalışmada kestane ağaç ve meyveden alınan dört farklı örneğin uygun koşullarda ekstraksiyonu yapıldı. İnce Tabaka Kromatografisi ile saflaştırma işlemi için uygun olan çözücü sistemi saptandı. Elde edilmiş ekstrakter belirlenen sistemde işleme tabii tutularak, ellajik asit ve gallik asit ayrıldı.

BÖLÜM II.

GENEL BİLGİLER

II.1. KESTANE

II.1.1. Kestane Genel Özellikleri

Kestane (*Castanea*), Fagaceae (kayıngiller) familyasındandır (Resim II.1). Bu türlerin doğal yayılma alanları Doğu Asya (Çin, Kore, Japonya), Türkiye, Güney Avrupa ve Kuzey Amerika'dır (62, 63).



Resim II.1.Kestane (*Castanea*)

Kestane ağaçları, güzellik, barınak ve yakacak için dünyada 6000 yıldan beri yetiştirilmektedir (63). Yayılış merkezinin neresi olduğu kesin olarak bilinmemektedir. Anadolu'nun bu türün anavatanı olduğu ihtimali kuvvetlidir. Verimliliği, hasat kolaylığı, yeme için hazırlığının basit olması ve gelir sağlaması insanları kestane yetiştirmeye sevk etmiştir (62).

Kestanenin odunu düzgün yapılı ve çürümeye dayanıklıdır (Resim II.2). Kütüğünün sağlamlığı nedeniyle mobilya ve gemi sanayinde önemli bir yere sahiptir. Birçok

yapı işlerinde, elektrik direklerinde ve demiryolu raylarının döşenmesinde kullanılır. Kestane uzun ömürlü bir ağaç türü olarak 200-500 yıl kadar yaşayabilmektedir. Yaşlanan ve verimden düşmüş kestane ağaçlarının kereste olarak değerlendirme imkanı mevcuttur (62).



Resim II.2. Kestane ağaç gövdesi

Kestane üretiminin büyük bir kısmı Ege ve Karadeniz Bölgelerinde yoğunlaşmıştır. Toplam ağaç sayısı ve kestane üretimi olarak Aydın ili ilk sıradadır. Türkiye kestane üretimi yönünden kendine yeterli olup, kestane ithalatı söz konusu değildir. Kestane ihracatı yıllık 7-8,5 ton arasında değişmektedir (62, 63).

Kestanelerin kimyasal bileşimi genel olarak diğer sert kabuklu meyvelere göre sağlığa daha uygundur ve yağ oranı düşük kültür çeşitleri kızartma ve haşlama ile kolaylıkla hazmedilebilir. Bu nedenle birçok rejim reçetelerinde kestane bulunmaktadır (62). Kestanenin çok düşük miktarlarda yağ içermesi kalp ve damar hastalıklarını önlemede ileri yaşlarda ve şişmanlık sorunu olanlar için önem taşımaktadır (64).

Kestane meyvesi normal koşullarda % 40-45 su, % 35-40 karbonhidrat, %15-20 nişasta, % 5-10 şeker, % 3-6 protein, % 3-5 yağ ve kalsiyum, potasyum, magnezyum, fosfor, demir, sodyum gibi mineraller içerir (62, 63). Kestane içerdiği potasyum nedeniyle sinir sistemi ve kalp kaslarının çalışması üzerinde etkili olmaktadır. Fosfor ve kalsiyum varlığı ile kemik ve diş oluşumuna olumlu etki yapmakta iskelet

sisteminin yapısına girmektedir. Sodyum içermesi ile potasyum-sodyum dengesi sağlanmaktadır. Kestane sodyum miktarının azlığı nedeniyle ysek tansiyon hastaları tarafından tercih edilmektedir (65).

Ayrıca B ve C vitaminlerinin de olduğu kaydedilmektedir (66). Kestanenin içerdiği B1 vitamini enerji, büyüme, iştah, öğrenme kapasitesi üzerinde olumlu etkiler yaparken vücudu yaşlanmaya, sigara ve alkolün zararlarına karşı korumaktadır. Vitamin B2 vücutta antikor üretimi, büyüme ve kataraktın önlenmesi bakımından önemlidir. Nikotinic asit sağlıklı bir cilt için gereklidir. Pantotenic asit karbonhidratlar, yağ ve proteinin enerjiye dönüşmesi için gereklidir. Vücudu güçlendirici özelliği bulunmaktadır (65).

Kestanenin doku yapısını oluşturan lifler vücut tarafından sindirilememekte ancak bağırsak hareketini düzenlemekte ve hızlandırmaktadır. Yine bağırsak florasının gelişmesinde önemli rol oynadığı kaydedilmektedir. Zararlı maddelerin vücuttan atılmasında ve kandaki kolesterol düzeyinin düşürülmesinde etkili olduğu belirtilmektedir. Beslenme diyetlerinde kestanenin de dikkate alınması önem taşımaktadır (65).

Kestanelerin; meyve, şekerleme ve kereste olarak kullanımının yanı sıra meyve kabukları tanin üretiminde, yaprak ve çiçekleri ilaç ve kozmetik sanayinde kullanılmaktadır. (60, 62, 67).

Kestane tüketimi başlıca iki ana grupta toplanır. Bunlar taze (sofralık) tüketim ve işlendikten sonra tüketim (şekerleme, konserve, kestane hamuru, jöle vb.) Türkiye’de genel olarak sofralık ve şekerleme halinde tüketim yaygındır (Resim II.3, II.4) (62, 63).



Resim II.3. Kestane şekeri



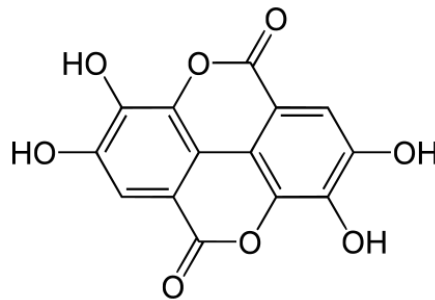
Resim II.4. Kestane püresi

II.2. POLİFENOLLER

Polifenoller her molekülde birden fazla fenol grubunun bulunduğu bileşiklerdir. Tüketilen birçok besin (çay, şarap, çilek, böğürtlen, elma, vişne, patates, soya vb.) çeşitli polifenoller içerir. Sağlık üzerine olumlu etkileri (antioksidan, antikanserojen) nedeniyle önemli bileşiklerdir. Polifenoller yapılarına göre çeşitli şekillerde sınıflandırılırlar. Taşıdıkları aromatik halka sayılarına, hidroksil gruplarına göre: fenolik asitler, flavonoidler olarak ayrılırlar. Gallik asit ve ellajik asit de fenolik asit grubuna dahil birer polifenoldür. (68).

II.2.1. Ellajik asit ve Özellikleri

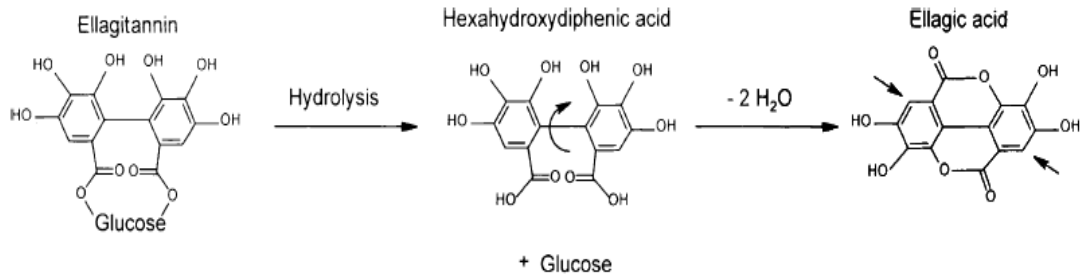
Ellajik asit (4,4',5,5',6,6'-Hekzahidroksidifenikasit 2,6,2',6'-dilakton) doğada birçok bitkide bulunan polifenolik bir bileşiktir (Şekil II.1).



Şekil II.1. Ellajik asitin yapısı ($C_{14}H_6O_8$) Molekül ağırlığı: $302.19g.mol^{-1}$

Polifenolik bileşiklerden olan ellajitanenler, bir veya daha fazla sayıdaki heksahidroksidifenol grubu taşıyan bir molekül ile şeker molekülünün (genellikle

glukoz) esterleşmesiyle oluşan ve hidrolize olabilen bileşiklerdir (7). Ellajitanenler, asit veya bazlarla hidrolize uğradığında ester bağları hidrolize olarak heksahidroksidifenik asit ve glukoz ara ürünlerini verir, heksahidroksidifenik asit kendiliğinden laktonize olarak suda az çözünen ellajik aside dönüşür (Şekil II.2), (8-11).



Şekil II.2. Ellajitanenlerin hidrolizi ile ellajik asit oluşumu (22).

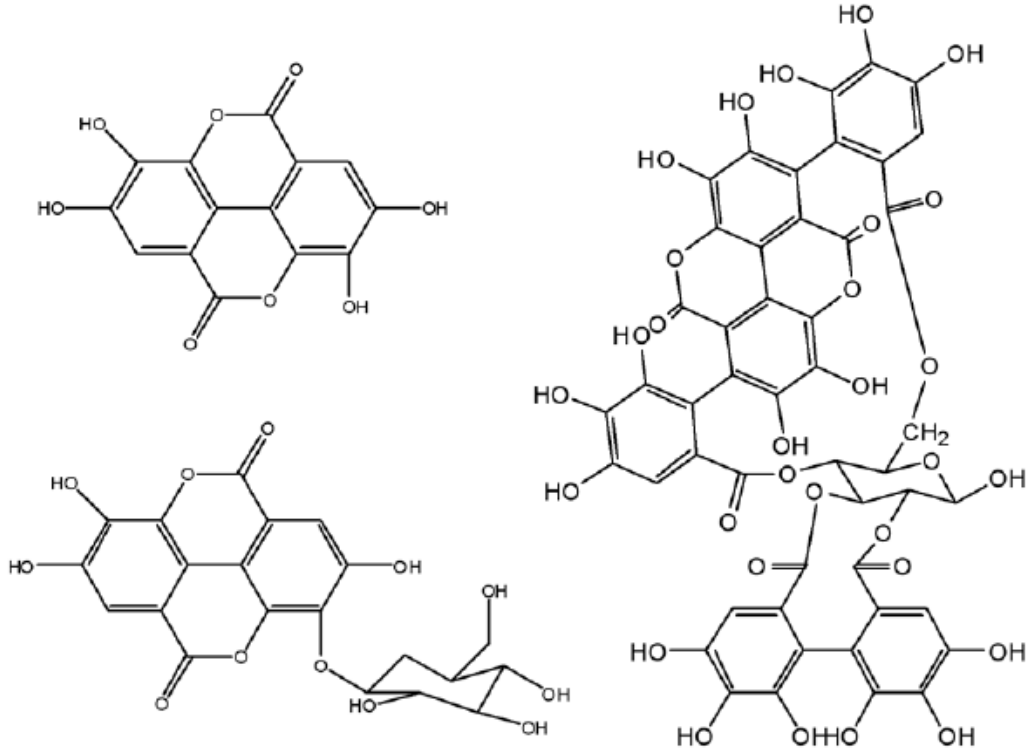
Ellajik asit zayıf bir asit olup yüksek erime noktası ile kararlı bir bileşiktir. Hidrofilik kısmı temsil eden dört fenolik ve iki lakton grubu ve lipofilik alanı temsil eden dört halka ile termodinamik olarak oldukça kararlı bir moleküldür. Lipofilik üstünlük gösteren molekülün dört halkası nedeniyle ısıya oldukça dayanıklıdır (20, 25). Suda az çözünür; metanol, etanol ve dimetil sülfoksitte iyi çözünür (20, 25, 69).

Ellajik asit birçok besin maddesinde bulunmaktadır. Ayrıca yapılan çalışmalarda meşe, ceviz gibi ağaç türlerinde de ellajik asit içeriğine rastlanmıştır (Tablo II.1) (21).

Tablo II.1. Besin maddelerinde Ellajik asit içeriği.

Besin maddesi	Ellajik asit içeriği
Böğürtlen (3)	87,66 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
Çilek (3)	17,66 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
Ahududu (3)	5,84 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
Nar (3)	17,31 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
Ceviz (Marlarossa)	16,00 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
Kestane (22)	0,71-21,6 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$

Ellajik asit çeşitli bitki ve meyvelerde üç farklı şekilde bulunabilir: Serbest halde, heksahidroksidifenikasit formu şeker ile birlikte veya ellajik asit glikoziti (Şekil II.3).

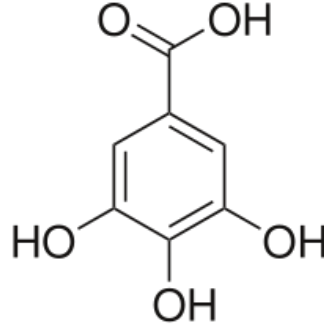


Şekil II.3. Ellajik asit serbest hali (sol üst), heksahidroksidifenikasit formu şeker ile birlikte (sağda), ellajik asit glikoziti (sol alt).

Denek hayvanları üzerinde ellajik asit ile yapılan çalışmalarda bu maddenin kolon, gırtlak, karaciğer, akciğer, dil ve deri kanseri oluşumlarını önemli ölçüde engellediği belirlenmiş ve ellajik asidin kanser tedavisinde kullanılabilecek potansiyel bir kemoterapi ajanı olabileceği ortaya konmuştur (8, 27-42, 70). Değişik mikroorganizmalar üzerinde gerçekleştirilen çalışmalarda da taninlerin önemli bir antimutajen madde olduğu bildirilmektedir. Ellajik asidin antikanserojenik ve antimutajenik etkileri sahip oldukları antioksidatif özelliklere bağlanmaktadır (71, 72). Tanenler içerisinde yer alan ellajik asit kan pıhtılaştırıcı olarak kullanılabilmektedir. Ayrıca ellajik asidin kan basıncını düşürücü yönde etkileri de mevcuttur (8, 17, 27-42, 73).

II.2.2. Gallik asit ve Özellikleri

Gallik asit (3,4,5-trihidroksibenzoik asit), bir çeşit fenolik asittir (Şekil II.4). Şarap, çay, kestane, ceviz , böğürtlen, ahududu gibi birçok meyvede bulunur (59, 74).



Şekil II.4. Gallik asitin yapısı ($C_7H_6O_5$). Molekül ağırlığı: $170.12 \text{ g.mol}^{-1}$

Gallik asit, farmasötik endüstride sentezlerde başlangıç maddesi olarak, ya da toplam fenol analizlerinde gallik asit eşdeğeri kavramıyla standart olarak kullanılır (75, 76). Gallik asit antioksidan görevi görür ve oksidatif hasara karşı insan hücrelerinin korunmasına yardımcı olur (77).

II.3. HIZLANDIRILMIŞ ÇÖZÜCÜ EKSTRAKSİYONU (ASE)

Örnek ekstraksiyon teknikleri: Sokslet, Otomatik sokslet, Sonikasyon, Mikrodalgalı ekstraksiyon, Süper kritik akışkanlı ekstraksiyon, Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonudur.

Son yıllarda analitik ekstraksiyonlarda kullanılan tehlikeli organik çözücü miktarını azaltma ihtiyacı, yeni ekstraksiyon tekniklerinin geliştirilmesine katkı sağlamıştır (78). Son otomatikleştirilmiş ekstraksiyon teknikleri daha az çözücü kullanır ve gelişmiş analitik kararlılık verir (79). Bu tekniklerden biri de Hızlandırılmış Çözücü Ekstraksiyonudur (ASE) (Resim II.5). Katı ve yarı katı örneklerden analitlerin tam ekstraksiyonunu kısa zamanda elde etmek için yüksek sıcaklık ve basınç altında, küçük hacimlerde çözücü kullanımına dayanır (80, 81).



Resim II.5. Hızlandırılmış Çözücü Ekstraksiyon Cihazı (ASE)

ASE sokslet ve ultrasonik ekstraksiyon gibi tekniklerden daha kısa ekstraksiyon zamanı ve daha az çözücü tüketimine sahip bir ekstraksiyon tekniğidir (Tablo II.2) (82). Sokslet ekstraksiyonu için kullanılan ekstraksiyon çözücüleri ASE içinde kullanılabilir. Bundan dolayı ASE klasik ekstraksiyon tekniklerinin yerine geçerek geliştirilmiştir (83).

Tablo II.2. Ekstraksiyon türlerinin kıyaslanması.

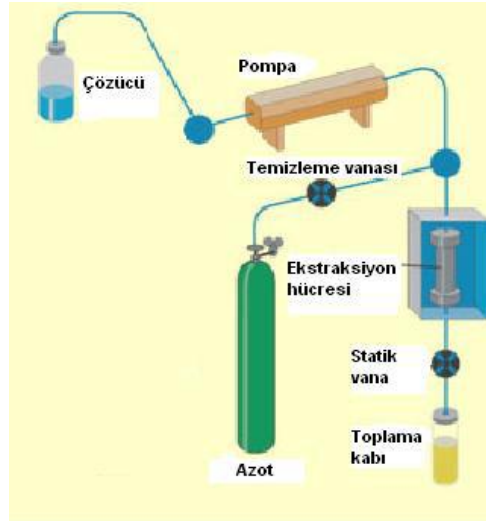
Teknik	Örnek Miktarı (g)	Çözücü Hacmi (mL)
Sokslet	10-30	300-500
Sonikasyon	30	300-400
Mikrodalgalı ekstraksiyon	5	30
Çalkalama	50	300
Otomatik sokslet	10	50
ASE	10-100	15-120

Son yıllarda, ASE katı atıklar, toprak, balık, yosun ve çam ağacı, hayvan yemi, yiyecek matrisleri ve tortu gibi farklı matrislerden organoklor pestisitlere, poliklorlu bifenillere, polisiklik aromatik hidrokarbonlara, poliklorlu dibenzodiyoksinlere ve furanlara, polibromlu bifenil eterlere ekstraksiyon uygulamıştır (85-91). Diğer

tarafından Richter ve ark. (92), PCBs (poliklorlu bifeniller) ve PAHs (polisiklik aromatik hidrokarbonlar) gibi çevresel atıkların basınçlı çözücülerle 100° C' nin üzerinde etkili ve hızlı ekstraksiyon gerçekleştirdiğini rapor etmiştir (79).

Genel olarak ASE' nin ekstraksiyon verimi, ASE' nin ekstraksiyon parametreleri olan ekstraksiyon basınç ve sıcaklığından etkilenir (93). Ek olarak örnek matrisi ekstraksiyon verimini etkiler. Bundan dolayı ASE' nin ekstraksiyon davranışı sade değildir ve işletme koşullarının optimizasyonu yorucudur (83).

ASE' de, çelik bir kap içerisine yerleştirilen katı yada yarı-katı örneğin çözücü ile bir fırın içerisinde 50-200 °C arasında değişen sıcaklıklarda ısıtılması ile başlar ve ısıtma sırasında fırına 500-3000 psi değerleri arasında basınç uygulanır (Şekil II.5). Ekstraksiyonun 5-10. dakikalarında ortama yeni çözücü pompalanarak örneğin ve kabın yıkanması sağlanmaktadır. Sistem içerisindeki bütün çözücü genellikle nitrojen gazı kullanılarak bir şişe içerisinde toplanmaktadır (94).



Şekil II.5. Hızlandırılmış Çözücü Ekstraksiyon Cihazı (ASE) çalışma şeması

ASE' nin özelliklerine bakıldığında:

- 1) Yüksek sıcaklık ve basınç kullanılarak çözücü tüketimi ve ekstraksiyon zamanını azaltır.
- 2) Örnek ekstraktı (1-50 g) için 15-150 mL çözücü kullanır.

- 3) Ekstraktlar otomatik filtrelendir ve doğrudan enjeksiyon için yada son temizlik için hazırlanır.
- 4) Kolay kullanılan toplama kapları mevcuttur.
- 5) Kullanım kolaylığı için uygun çoklu yöntem hafızası vardır.
- 6) Uygun ön panel işlemi otomatik yöntemi çalıştırır.

ASE katı ve yarı katı örneklerin sıvı çözücülerle ekstraksiyonu için bir tekniktir. Yüksek sıcaklık ve basınçta ekstraksiyon işlemlerinin verimini yükselterek uygun sıvı çözücüler kullanır. Yüksek basınç çözücüyü kaynama noktasının altında tutarken artmış sıcaklık ekstraksiyon kinetiğini hızlandırır, böylece hızlı ekstraksiyon gerçekleştirilir. Yüksek basınç, çözücünün, deney materyalinin iç kısımlarına kadar nüfuz etmesine imkân sağlamaktadır.

ASE ve sokslet ekstraksiyonu arasındaki önemli fark ekstraksiyon sıcaklığıdır. ASE’de ekstraksiyon sıcaklığı çözücünün normal kaynama noktası üzerinde kullanılır. Aksine sokslet ekstraksiyonunda ekstraksiyon sıcaklığı kullanılan çözücünün kaynama noktası ile sınırlıdır. Yüksek sıcaklıklarda, polimer partiküllerinin içinden bileşenlerinin difüzyonu yüzeylerinde artırılmıştır. Ayrıca ekstraksiyon çözücüsü içinde partiküllerin yüzeyden transferi daha hızlı olacaktır. Buna ek olarak ekstraksiyon sıvısındaki bileşenlerin çözünürlüğü yüksek sıcaklıkta çalışıldığı zaman yükseltilebilecektir. Bundan dolayı yüksek sıcaklıktaki ekstraksiyon değeri anlamlı ölçüde yüksek olacaktır (95).

II.4. KROMATOĞRAFI

Saflaştırma işlemlerinde oldukça yaygın olarak kullanılan yöntemdir. Az miktardaki ve özellikleri birbirine yakın maddeleri ayırmak için rahatlıkla uygulanabilir. Kromatografide genellikle ayrılacak maddelerin üzerinde tutunduğu sabit faz (yürütücü) bulunmaktadır. Ayrılma işlemi, ayrılacak maddelerin sabit fazda adsorplanması ya da sabit faz ile yürütücü arasında dağılmasına dayanır. Maddelerin sabit faz üzerinde adsorplanma derecelerinin ve hareketli fazdaki çözünürlüklerinin farklı olması ayrılmayı sağlar (96,97).

Çeşitli kromatografi türleri vardır:

a) Ayrılma mekanizmalarına göre:

- 1) Adsorpsiyon kromatografisi
- 2) Partisyon (dağılma) kromatografisi
- 3) İyon değiştirme kromatografisi
- 4) Jel filtrasyon (Moleküler eleme) kromatografisi
- 5) İyon çifti kromatografisi
- 6) Afinite kromatografisi

b) Uygulama biçimine göre

- 1) Düzlemsel kromatografi
 - Kağıt kromatografisi
 - İnce tabaka kromatografisi (İTK)
- 2) Kolon kromatografisi
 - Gaz kromatografisi (GC)
 - Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)

c) Faz tipine göre:

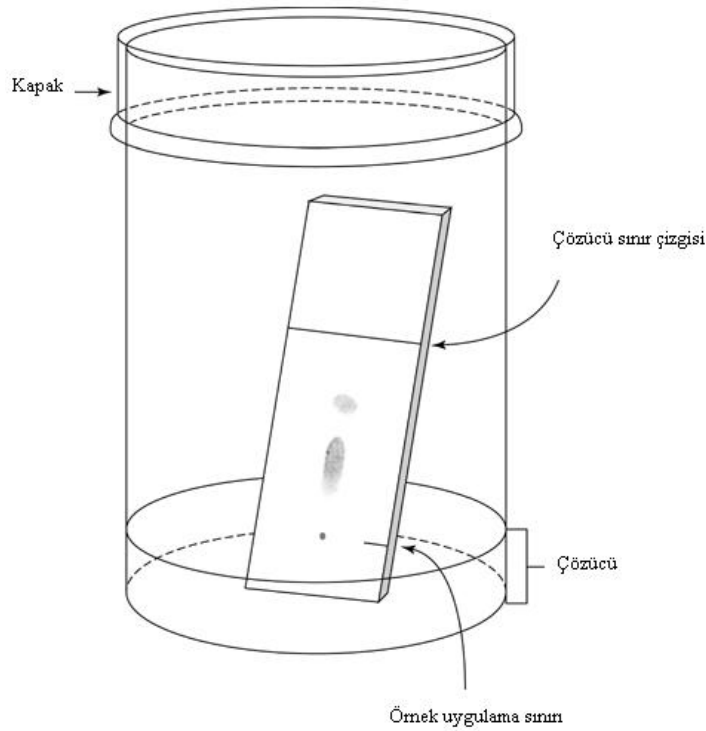
- 1) Sıvı kromatografisi
 - Sıvı-Katı kromatografisi
 - Sıvı-Sıvı kromatografisi
- 2) Gaz kromatografisi
 - Gaz-Katı kromatografisi
 - Gaz-Sıvı kromatografisi

Bu kromatografi türleri arasında en çok kolon kromatografisi ve ince tabaka kromatografisi kullanılmaktadır (96,97).

II.4.1. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)

İnce tabaka kromatografisi basit, ucuz, hızlı olması açısından oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Genellikle bir maddedeki mevcut bileşenleri belirlemek, ayırmak ve maddenin saflığını belirlemek üzere kullanılır. Tıbbi bitkilerin bileşenlerinin analizi, ilaç analizleri, su ve yiyecek analizleri gibi analiz türleriyle gıda, ilaç, adli tıp, boya gibi geniş bir alanda etkindir (97).

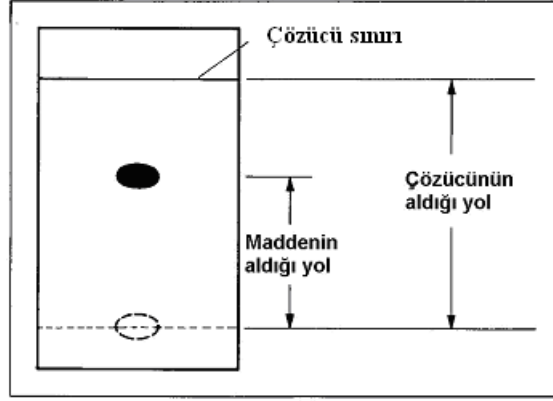
İnce tabaka kromatografisinde sabit faz olan adsorban, cam, alüminyum ya da plastik plaklara ince bir tabaka halinde (genellikle 0.1-5 mm kalınlığında) kaplanmış olarak kullanılır. Adsorban madde olarak silika jel, poliamid, sellüloz kullanılabilir. İnce tabaka kromatografisinin uygulamasında az miktardaki madde karışımı adsorban tabakanın bir ucuna damlatılır, plaka kapalı bir geliştirme tankına daldırılır, kapiler etkisiyle yürütücü çözücünün tabakanın yukarısına kadar ilerlemesi beklenir (Şekil II.6), uygun bir şekilde görünür hale getirilen spotlar değerlendirilir.



Şekil II.6. İnce Tabaka Kromatografisi Uygulaması

İnce tabaka kromatografi plakaları, firmalar tarafından cam, plastik ya da alüminyum plakalara hazır kaplanmış olarak satılabildikleri gibi laboratuarda da kaplanabilmektedirler. Hazır kaplanmış plakalar genellikle 0.1 mm kalınlığında adsorban içerirler. Plastik ve alüminyum plakalar makasla istenen boyutlara rahatlıkla kesilebilmektedirler. Daha kalın kaplanmış ve büyük olan plakalar preparatif ince tabaka kromatografisinde 50-1000 mg madde karışımlarının birbirinden ayrılması için kullanılır.

Yürüme hızı, R_f değeri ile ifade edilir ve bileşenlerin yürüme mesafesinin, çözücünün yürüme mesafesine oranından hesaplanır (Şekil II.7). R_f değeri 0 ile 1 arasında bulunur ve doğal olarak hızlı yürüyen bileşenler için alınan mesafe büyük olacağından R_f değeri büyük, yavaş yürüyenler için daha küçüktür (97).



$$R_f = \frac{\text{Bileşğin uygulama noktasından itibaren aldığı yol}}{\text{Çözücünün orijinden itibaren aldığı yol}}$$

Şekil II.7. Plaka üzerinde R_f değeri hesaplanması

BÖLÜM III

TEZ ÇALIŞMALARI

III.1. GEREÇ VE YÖNTEM

III.1.1. Kimyasal Maddeler

Kestane meyve örnekleri Bursa'dan, Kestane ağaç örnekleri İstanbul'dan temin edilmiştir.

<u>Kimyasalın adı:</u>	<u>Firma:</u>
Ellajik asit $\geq 95\%$ powder, from tree bark	Sigma E2250
Gallik asit	Sigma
Metanol (Gradient Grade)	Merck
Etilasetat (Extra pure)	Merck
Formik Asit %98-100	Merck
Toluen (Extra pure)	Merck
Asetikasit %100	Merck
Tetrahidrofur (for liquid Chr.)	Merck
Aseton (for liquid Chr.)	Merck
Dioksan (Extra pure)	Merck
n-Bütanol (for liquid Chr.)	Merck
n-Hekzan (Extra pure)	Merck
Kloroform (for liquid Chr.)	Merck

III.1.2. Cihaz ve Analitik Koşullar

- 1) DIONEX ASE 100 hızlandırılmış çözücü ekstraktörü
- 2) Memmert UM 400 etüv
- 3) Millipore Milli Q RG deiyonize su cihazı
- 4) Adam d=0,0001 g dijital terazi
- 5) Heidolph VV 2000 döner vakumlu evaporatör
- 6) Falc instruments manyetik karıştırıcı
- 7) Retsch elek
- 8) Arzum Mulino /AR 151 kahve öğütücü
- 9) UV lamba (254/366nm)
- 10) Silika jel TLC Alümina Plaka 60F254 Merck

III.1.3. Çözeltiler

THF çözücüsü ile hazırlanan standart çözeltiler:

EA6	: 4.9x10 ⁻³	mol.L ⁻¹
EA8	: 5.8x10 ⁻³	mol.L ⁻¹
EA10	: 8.3x10 ⁻³	mol.L ⁻¹
GA	: 1.5x10 ⁻²	mol.L ⁻¹
GA6	: 8.6x10 ⁻³	mol.L ⁻¹
EA12	: 2.4x10 ⁻³	mol.L ⁻¹
EA2	: 7.6x10 ⁻³	mol.L ⁻¹

THF-Metanol çözücü karışımı ile hazırlanan standart çözeltiler:

EA9	: 6.0x10 ⁻³	mol.L ⁻¹ (THF:MeOH v:v 10:4)
EA11	: 8.7x10 ⁻³	mol.L ⁻¹ (THF:MeOH v:v 15:4)
GA7	: 5.6x10 ⁻³	mol.L ⁻¹ (THF:MeOH v:v 4:10)

III.1.4. Örnek Hazırlama

Kestane ağacı gövdesi ve kestane meyvesi olmak üzere iki örnekle çalışıldı. Bu örnekler farklı işlemlerden geçirildi. Kestane ağacı gövdesi, kabuk ve iç kısım olarak iki kısma ayrıldı. Bu kısımlar marangozda ayrı ayrı rende haline getirildi. Kestane meyvesi kesildi. Kabuk ve meyve olarak iki kısma ayrıldı. Bu şekilde elde edilen dört farklı örnek, kestane meyvesinin kabuğu (KMK) (Resim III.1), kestane meyvesi (KME) (Resim III.2), kestane ağaç gövdesi iç kısım (KAG) (Resim III.3), kestane ağaç kabuğu (KAK) (Resim III.4) öğütücüden geçirildi. Bu dört örnek 30 mesh (0,60 mm) büyüklüğündeki elekten geçirildi. Etüvde kurutulularak sabit tartıma getirildi.



Resim III.1. Kestane meyve kabuğu (KMK)



Resim III.2. Kestane meyvesi (KME)



Resim III.3. Kestane ağaç gövdesi iç kısım (KAG)



Resim III.4. Kestane ağaç kabuğu (KAK)

III.1.5. Hızlandırılmış Çözücü Ekstraksiyonu (ASE) ile Yapılan Çalışmalar

Her bir örnek için aynı koşullarda 3 tartım alınarak paralel çalışma yapıldı. Her bir örnekte elekten geçen ince kısım ve kalan kalın kısım ayrı ayrı filtre kağıdında $0,4000 \text{ g} \pm 0,5 \text{ mg}$ tartıldı. İnce ve kalın kısımlar üzerine ayrı ayrı $0,4000 \text{ g} \pm 0,5 \text{ mg}$ diatom toprak ilave edildi. Her iki örnek homojen şekilde karıştırıldı. İnce ve kalın örnekler üst üste konularak filtre kağıtları katlandı. Ekstraksiyon hücreesine yerleştirildi. %100 lük Metanol çözücüsü ile ekstraksiyon gerçekleştirildi (Tablo.III.1).

Tablo III.1. Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu (ASE) çalışma koşulları.

Sıcaklık	100°C
Statik Zaman	10 dak
Temizleme Hacmi	% 60
Yıkama Zamanı	90 s
Statik Devir	3

Ekstraktlar, evaporatörde 60°C de kuruluğa kadar uçuruldu. Kalıntılar 5 mL metanolde çözüldü. Kestane ağaç gövdesi iç kısım (KAG) kalıntısı çözünürlük problemi nedeniyle 10 mL metanolde çözüldü. Örnekler -20°C de saklandı.

III.1.6. Kromatografik Koşullar

Çözücü karışımı Toluen: Etil Asetat: Formik asit: Metanol (v:v) (30:30:8:2) sistemi esas alındı (58). Çözücü tankı olarak 8x13 cm büyüklüğünde silindirik cam kap ve 10x14x14 cm büyüklüğünde dikdörtgen cam kap kullanıldı. Çözücü tankının içerisine kenar yüzeyini kaplayacak büyüklükte süzgeç kağıdı kesildi, yerleştirildi. Çözücü tankı cam kapak ile kapatılıp vazelinlendi. Bir gün süreyle doygunluk için bekletildi.

TLC silika jel 60F254 alüminyum plakalar, ilk denemelerde 5x10, sonraki denemelerde 10x10 büyüklüğünde kesildi. Plakaların kenarlarından ve alt kısmından birer cm boşluk bırakıldı. Örnekleme kapiler ile 5 er spot şeklinde yapıldı. Her spotta fön ile kurutma yapıldı. Plaka çözücü tankının içine tabandan itibaren 0,5 cm çözücü karışımı içerisinde kalacak şekilde eğik olarak yerleştirildi. Yürütme işlemi yaklaşık 15 dak sürdü. Plakalar oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

III.2. BULGULAR

III.2.1. Referans Sistem ile Yapılan Kromatografik Çalışmalar

Jeganathan N.S. ve Kannan K.'nin çalışmalarında kullandığı sistem koşulları oluşturuldu (58). Toluen: Etil Asetat: Formik asit: Metanol (30:30:8:2).

Ellajik asit standartları,

EA6: $4.9 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$

EA8: $5.8 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$

EA9: $6.0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$

EA10: $8.3 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$

EA11: $8.7 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ konsantrasyonlarında hazırlandı. Denemeler, 8x13 cm büyüklüğünde silindir cam kapta yapıldı. 5x10 büyüklüğünde plakalar hazırlandı. Örneklem kapiler ile tek spot olarak yapıldı. Yürütme işlemi sonunda plakalar oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Ellajik asitin bu beş örneğe ilişkin Rf değeri aynı olup 0,49 hesaplandı. Başlangıç noktasında bir miktar örneğin kaldığı gözlemlendi (Şekil III.1). Daha sonraki çalışmalara EA8, EA9, EA10, EA11 örnekleri ile devam edildi.



Şekil III.1. Mobil Faz: Toluen: Etil Asetat: Formik asit: Metanol (30:30:8:2). Örnek konsantrasyonları: EA6: $4.9 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ EA8: $5.8 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ EA9: $6.0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ EA10: $8.3 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ EA11: $8.7 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$.

III.2.1.1. Polaritesi Yüksek Hareketli Faz ile Yapılan Çalışmalar

Jeganathan N.S. ve Kannan K.'nin (58) çalışmalarında kullandığı sistemde polaritesi yüksek olan etilasetatın miktarı artırıldı (Tablo III.2). Toluen miktarı azaltıldı. Toplam hacim sabit tutuldu. Toluen: Etilasetat: Formik asit: Metanol (v/v) (20:40:8:2). Denemeler, 8x13 cm büyüklüğünde silindir cam kapta yapıldı. 5x10 büyüklüğünde plakalar hazırlandı. EA8: $5.8 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ EA9: $6.0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ EA10: $8.3 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ EA11: $8.7 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ konsantrasyonlarındaki örnekler kullanıldı. Örneklem kapiler ile tek spot olarak yapıldı. Yürütme işlemi sonunda

plakalar oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Bu durumda Rf değeri 0,59 hesaplandı (Şekil III.2). Kuyruklu yürüme gözlemlendi. Başlangıç noktasında bir miktar örneğin kaldığı gözlemlendi.

Tablo III.2. Kullanılan organik çözücüler ve polariteleri .

Organik Çözücü	Polarite
Toluen	2.4
Etilasetat	4.4
Metanol	5.1
Aseton	5.1
THF	4.0
Dioksan	4.8
n-Bütanol	4.0
n-Hekzan	0.0
Asetikasit	6.2
Kloroform	4.1



Şekil III.2. Mobil Faz: Toluen: Etilasetat: Formik asit: Metanol (20:40:8:2). Örnek konsantrasyonları: EA8: 5.8×10^{-3} mol.L⁻¹ EA9: 6.0×10^{-3} mol.L⁻¹ EA10: 8.3×10^{-3} mol.L⁻¹ EA11: 8.7×10^{-3} mol.L⁻¹.

Jeganathan N.S. ve Kannan K.'nin (58) çalışmalarında kullandığı sistemde polaritesi yüksek olan etilasetatın miktarı biraz daha arttırıldı. Toluen miktarı azaltıldı. Toplam

hacim sabit tutuldu. Toluen: Etilasetat: Formik asit: Metanol (v/v) (12:48:8:2). EA8: 5.8×10^{-3} mol.L⁻¹ EA9: 6.0×10^{-3} mol.L⁻¹ EA10: 8.3×10^{-3} mol.L⁻¹ EA11: 8.7×10^{-3} mol.L⁻¹ konsantrasyonlarındaki örnekler kullanıldı. Bu durumda Rf değeri 0,64 hesaplandı (Şekil III.3).Etil asetat miktarı arttığında Rf değerinde artış gözlemlendi. Her üç çalışmada da kuyruklu yürüme gözlemlendi. Başlangıç noktasında yine bir miktar örneğin kaldığı gözlemlendi.



Şekil III.3. Mobil Faz: Toluen: Etilasetat: Formik asit: Metanol (12:48:8:2). Örnek konsantrasyonları: EA8: 5.8×10^{-3} mol.L⁻¹ EA9: 6.0×10^{-3} mol.L⁻¹ EA10: 8.3×10^{-3} mol.L⁻¹ EA11: 8.7×10^{-3} mol.L⁻¹.

III.2.1.2. Polaritesi Düşük Hareketli Faz ile Yapılan Çalışmalar

Jeganathan N.S. ve Kannan K.'nin (58) çalışmalarında kullandığı sistemde polaritesi düşük olan Toluen miktarı artırıldı. Etilasetat miktarı azaltıldı. Toplam hacim korundu. Toluen: Etilasetat: Formik asit: Metanol (v/v) (40:20:8:2). Denemeler, 8x13 cm büyüklüğünde silindir cam kaptayla yapıldı. 5x10 büyüklüğünde plakalar hazırlandı. EA8: 5.8×10^{-3} mol.L⁻¹ EA9: 6.0×10^{-3} mol.L⁻¹ EA10: 8.3×10^{-3} mol.L⁻¹ EA11: 8.7×10^{-3} mol.L⁻¹ konsantrasyonlarındaki örnekler kullanıldı. Örnekleme kapiller ile tek spot olarak yapıldı. Yürütme işlemi sonunda plakalar oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Bu durumda Rf değeri 0,33 hesaplandı (Şekil III.4). Başlangıç noktasında yine bir miktar örneğin kaldığı ve kuyruklu yürümenin olduğu gözlemlendi. Spotlar belirginleşti.



Şekil III.4. Mobil Faz: Toluen: Etilasetat: Formik asit: Metanol (40:20:8:2). Örnek konsantrasyonları: EA8: 5.8×10^{-3} mol.L⁻¹ EA9: 6.0×10^{-3} mol.L⁻¹ EA10: 8.3×10^{-3} mol.L⁻¹ EA11: 8.7×10^{-3} mol.L⁻¹.

Jeganathan N.S. ve Kannan K.'nin (58) çalışmalarında kullandığı sistemde polaritesi düşük olan Toluen miktarı biraz daha arttırıldı. Etilasetat miktarı azaltıldı. Toplam hacim korundu. Toluen: Etilasetat: Formik asit: Metanol (v/v) (48:12:8:2). EA8: 5.8×10^{-3} mol.L⁻¹ EA9: 6.0×10^{-3} mol.L⁻¹ EA10: 8.3×10^{-3} mol.L⁻¹ EA11: 8.7×10^{-3} mol.L⁻¹ konsantrasyonlarındaki örnekler kullanıldı. Bu durumda Rf değeri 0,17 hesaplandı (Şekil III.5).



Şekil III.5. Mobil Faz: Toluen: Etilasetat: Formik asit: Metanol (48:12:8:2). Örnek konsantrasyonları: EA8: 5.8×10^{-3} mol.L⁻¹ EA9: 6.0×10^{-3} mol.L⁻¹ EA10: 8.3×10^{-3} mol.L⁻¹ EA11: 8.7×10^{-3} mol.L⁻¹.

Jeganathan N.S. ve Kannan K.'nin (58) çalışmalarında kullandığı sistemde polaritesi düşük olan toluen miktarı biraz daha artırıldı. Etilasetat miktarı azaltıldı. Toplam hacim korundu. Toluene: Etilasetat: Formik asit: Metanol (v/v) (56:4:8:2). EA8: 5.8×10^{-3} mol.L⁻¹ EA9: 6.0×10^{-3} mol.L⁻¹ EA10: 8.3×10^{-3} mol.L⁻¹ EA11: 8.7×10^{-3} mol.L⁻¹ konsantrasyonlarındaki örnekler kullanıldı. Bu durumda yürüme gözlenmedi (Şekil III.6).



Şekil III.6. Mobil Faz: Toluene: Etilasetat: Formik asit: Metanol (56:4:8:2). Örnek konsantrasyonları: EA8: 5.8×10^{-3} mol.L⁻¹ EA9: 6.0×10^{-3} mol.L⁻¹ EA10: 8.3×10^{-3} mol.L⁻¹ EA11: 8.7×10^{-3} mol.L⁻¹.

III.2.1.3. Etilasetat İçermeyen Hareketli Faz ile Yapılan Çalışmalar

Etilasetat içermeyen hareketli faz ile yapılan çalışmalara başlamadan önce Jeganathan N.S. ve Kannan K.'nin (58) çalışmaları Toluene: Etilasetat: Formik asit: Metanol (v/v) (30:30:8:2) modifiye edildi. Bu amaçla etilasetat içermeyen hareketli faz ile çalışıldı. Toluene: Metanol: Formikasit (v/v) (30:32:8). Denemeler, 8x13 cm büyüklüğünde silindir cam kaptayla yapıldı. 5x10 büyüklüğünde plakalar hazırlandı. EA6: 4.9×10^{-3} mol.L⁻¹ EA8: 5.8×10^{-3} mol.L⁻¹ EA9: 6.0×10^{-3} mol.L⁻¹ EA10: 8.3×10^{-3} mol.L⁻¹ EA11: 8.7×10^{-3} mol.L⁻¹ konsantrasyonlarındaki örnekler kullanıldı. Örneklemeler kapiler ile tek spot olarak yapıldı. Yürütme işlemi sonunda plakalar oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Bu durumda sistemde düzgün bir yürüme gözlenmedi. Örnekler mobil fazda dağıldı (Şekil III.7).



Şekil III.7. Mobil Faz: Toluen: Metanol: Formik asit (30:32:8). Örnek konsantrasyonları: EA6: 4.9×10^{-3} mol.L⁻¹ EA8: 5.8×10^{-3} mol.L⁻¹ EA9: 6.0×10^{-3} mol.L⁻¹ EA10: 8.3×10^{-3} mol.L⁻¹ EA11: 8.7×10^{-3} mol.L⁻¹.

III.2.1.4. Etilasetat yerine Aseton Kullanılarak Yapılan Çalışmalar

Jeganathan N.S. ve Kannan K.'nin (58) çalışmaları Toluen: Etilasetat: Formik asit: Metanol (v/v) (30:30:8:2) modifiye edildi. Bu amaçla sistemde etilasetat yerine polaritesi daha yüksek olan aseton kullanıldı. Çözücü oranları değiştirilmedi. Toluen: Aseton: Formik asit: Metanol (v/v) (30:30:8:2). Denemeler, 8x13 cm büyüklüğünde silindirik cam kaptaki yapıldı. 5x10 büyüklüğünde plakalar hazırlandı. EA6: 4.9×10^{-3} mol.L⁻¹ EA8: 5.8×10^{-3} mol.L⁻¹ EA9: 6.0×10^{-3} mol.L⁻¹ EA10: 8.3×10^{-3} mol.L⁻¹ EA11: 8.7×10^{-3} mol.L⁻¹ konsantrasyonlarındaki örnekler kullanıldı. Örnekleme kapiler ile tek spot olarak yapıldı. Yürütme işlemi sonunda plakalar oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Bu durumda R_f değeri 0,67 hesaplandı. Başlangıç noktasında kalan madde ve kuyruklu yürüme gözlemlendi (Şekil III.8).



Şekil III.8. Mobil Faz: Toluen: Aseton: Formik asit: Metanol (30:30:8:2). Örnek konsantrasyonları: EA6: 4.9×10^{-3} mol.L⁻¹ EA8: 5.8×10^{-3} mol.L⁻¹ EA9: 6.0×10^{-3} mol.L⁻¹ EA10: 8.3×10^{-3} mol.L⁻¹ EA11: 8.7×10^{-3} mol.L⁻¹.

III.2.1.5. Etilasetat Yerine Tetrahidrofuran (THF) Kullanılarak Yapılan Çalışmalar

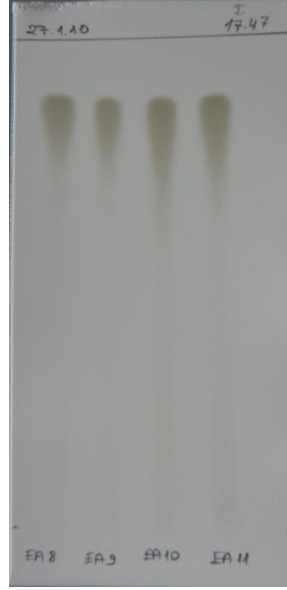
Jeganathan N.S. ve Kannan K.'nin (58) çalışmaları Toluen: Etilasetat: Formik asit: Metanol (v/v) (30:30:8:2) modifiye edildi. Bu amaçla sistemde etilasetat yerine polaritesi etil asetata yakın olan THF kullanıldı. Çözücü oranları değiştirilmedi. Toluen: THF: Formik asit: Metanol (v/v) (30:30:8:2). Denemeler, 8x13 cm büyüklüğünde silindir cam kapta yapıldı. 5x10 büyüklüğünde plakalar hazırlandı. EA8: 5.8×10^{-3} mol.L⁻¹ EA9: 6.0×10^{-3} mol.L⁻¹ EA10: 8.3×10^{-3} mol.L⁻¹ EA11: 8.7×10^{-3} mol.L⁻¹ konsantrasyonlarındaki örnekler kullanıldı. Örnekleme kapiler ile tek spot olarak yapıldı. Yürütme işlemi sonunda plakalar oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Bu durumda Rf değeri 0,77 hesaplandı. Kuyruklanmanın diğer sistemlere göre daha az olduğu gözlemlendi. Başlangıç noktasında kalan madde miktarında azalma olduğu gözlemlendi (Şekil III.9).



Şekil III.9. Mobil Faz: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (30:30:8:2). Örnek konsantrasyonları: EA8: 5.8×10^{-3} mol.L⁻¹ EA9: 6.0×10^{-3} mol.L⁻¹ EA10: 8.3×10^{-3} mol.L⁻¹ EA11: 8.7×10^{-3} mol.L⁻¹.

III.2.1.6. Etilasetat Yerine Tetrahidrofuran (THF) ve Aseton Kullanılarak Yapılan Çalışmalar

Jeganathan N.S. ve Kannan K.'nin (58) çalışmaları Toluen: Etilasetat: Formik asit: Metanol (v/v) (30:30:8:2) modifiye edildi. Bu amaçla sistemde etilasetat yerine THF ve aseton birlikte kullanıldı. Toplam hacim korundu. Toluen: Aseton: THF: Formik asit (20:10:30:8). Denemeler, 8x13 cm büyüklüğünde silindir cam kaptta yapıldı. 5x10 büyüklüğünde plakalar hazırlandı. EA8: 5.8×10^{-3} mol.L⁻¹ EA9: 6.0×10^{-3} mol.L⁻¹ EA10: 8.3×10^{-3} mol.L⁻¹ EA11: 8.7×10^{-3} mol.L⁻¹ konsantrasyonlarındaki örnekler kullanıldı. Örnekleme kapiler ile tek spot olarak yapıldı. Yürütme işlemi sonunda plakalar oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Bu durumda Rf değeri 0,88 hesaplandı. Kuyruklu yürümenin etil asetatlı sistemlere göre daha az olduğu gözlemlendi. Başlangıç noktasında kalan madde miktarında da azalma gözlemlendi (Şekil III.10).



Şekil III.10. Mobil Faz: Toluen: Aseton: THF: Formik asit (20:10:30:8). Örnek konsantrasyonları: EA8: 5.8×10^{-3} mol.L⁻¹ EA9: 6.0×10^{-3} mol.L⁻¹ EA10: 8.3×10^{-3} mol.L⁻¹ EA11: 8.7×10^{-3} mol.L⁻¹.

III.2.1.7. Etilasetat Yerine Dioksan Kullanılarak Yapılan Çalışmalar

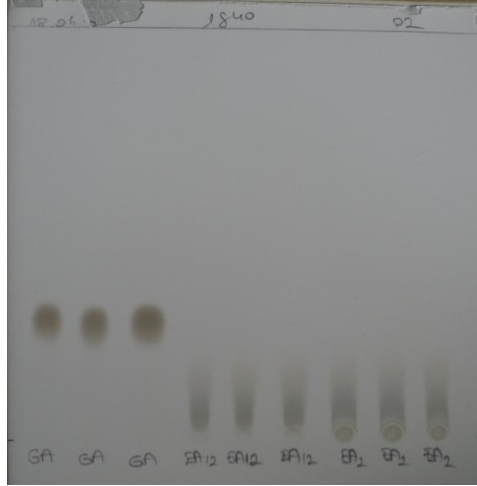
Jeganathan N.S. ve Kannan K.'nin (58) çalışmaları Toluen: Etilasetat: Formik asit: Metanol (v/v) (30:30:8:2) ve Glensk M. ve arkadaşlarının çalışmaları Toluen: Dioksan: Formik asit (v/v) (7:2:1) modifiye edildi. Bu amaçla sistemde etilasetat yerine dioksan kullanıldı. Toluen: Dioksan: Formik asit: Metanol (v/v) (30:30:8:2). Denemeler, 8x13 cm büyüklüğünde silindir cam kaptayla yapıldı. 5x10 büyüklüğünde plakalar hazırlandı. Bu çalışma kuyruklanmayı düşük ve yüksek konsantrasyonlarda gözlemek üzere ellajik asidin daha önceki konsantrasyonlarına göre daha düşük (EA12: 2.4×10^{-3} mol.L⁻¹) ve önceki konsantrasyonlara yakın olan (EA2: 7.6×10^{-3} mol.L⁻¹) iki farklı konsantrasyonunda gerçekleştirildi. Ayrıca kestane örneklerinde gallik asidin de bulunabileceği (1, 22, 58) göz önüne alınarak iki farklı konsantrasyonda gallik asit örneği (GA6: 8.6×10^{-3} mol.L⁻¹ GA7: 5.6×10^{-3} mol.L⁻¹) ile çalışıldı. Örnekleme kapiler ile tek spot olarak yapıldı. Yürütme işlemi sonunda plakalar oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Rf değerleri gallik asit (GA) örnekleri için de ellajik asit (EA) örnekleri için de 0.55 hesaplandı. Gallik asitte kuyruklu yürüme gözlenmezken, ellajik asitte kuyruklu yürüme gözlemlendi. Konsantrasyonu daha büyük olan EA2 de daha fazla kuyruklanma gözlemlendi (Şekil III.11).



Şekil III.11. Mobil Faz: Toluen: Dioksan: Formik asit: Metanol (30:30:8:2). Örnek konsantrasyonları: GA6: 8.6×10^{-3} mol.L⁻¹ GA7: 5.6×10^{-3} mol.L⁻¹ EA12: 2.4×10^{-3} mol.L⁻¹ EA2: 7.6×10^{-3} mol.L⁻¹.

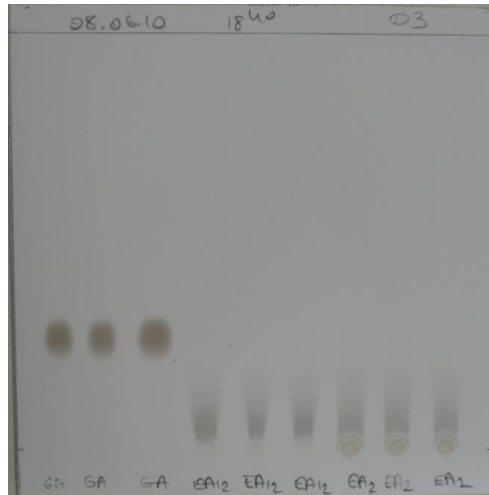
III.2.1.8. Etilasetat Yerine n-Bütanol Kullanılarak Yapılan Çalışmalar

Jeganathan N.S. ve Kannan K.'nin (58) çalışmaları Toluen: Etilasetat: Formik asit: Metanol (v/v) (30:30:8:2) modifiye edildi. Bu amaçla sistemde etilasetat yerine polaritesi etil asetata yakın fakat düşük olan n-Bütanol kullanıldı. Toluen: n-Bütanol: Formik asit: Metanol (v/v) (40:20:8:2). Denemeler, 10x14x14 cm büyüklüğünde cam kapta yapıldı. 10x10 büyüklüğünde plakalar hazırlandı. GA: 1.5×10^{-2} mol.L⁻¹ EA12: 2.4×10^{-3} mol.L⁻¹ EA2: 7.6×10^{-3} mol.L⁻¹ konsantrasyonlarındaki örnekler kullanıldı. Örneklem kapiler ile tek spot olarak yapıldı. Her örnek için üç ayrı spot yapıldı. Yürütme işlemi sonunda plakalar oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Rf değerleri GA için 0.32, EA12 ve EA2 için 0.19 olarak hesaplandı (Şekil III.12). Konsantrasyonu büyük olan GA da yoğun bir spot gözlenirken, EA örneklerinde kuyruklu yürüme gözlemlendi.



Şekil III.12. Mobil Faz: Toluen: n-Bütanol: Formik asit: Metanol (40:20:8:2). Örnek konsantrasyonları: GA: 1.5×10^{-2} mol.L⁻¹ EA12: 2.4×10^{-3} mol.L⁻¹ EA2: 7.6×10^{-3} mol.L⁻¹.

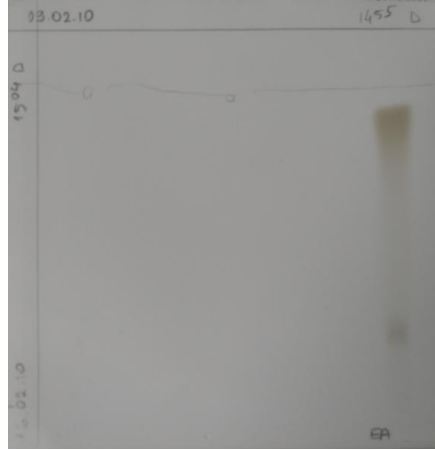
Jeganathan N.S. ve Kannan K.'nin (58) çalışmaları Toluen: Etilasetat: Formik asit: Metanol (v/v) (30:30:8:2) modifiye edildi. Bu amaçla sistemde etilasetat yerine polaritesi etil asetata yakın fakat düşük olan n-bütanol kullanılırken, metanol kullanılmadı. Toplam hacim korundu. Toluen: n-Bütanol: Formik asit (v/v) (40:22:8). Kullanılan örneklerin konsantrasyonları GA: 1.5×10^{-2} mol.L⁻¹ EA12: 2.4×10^{-3} mol.L⁻¹ EA2: 7.6×10^{-3} mol.L⁻¹ dir. Bu durumda Rf değerleri GA için 0.32, EA12 ve EA2 için ise 0.19 olarak hesaplandı (Şekil III.13) Konsantrasyonu büyük olan GA da yoğun bir spot gözlenirken, EA örneklerinde kuyruklu yürüme gözlemlendi.



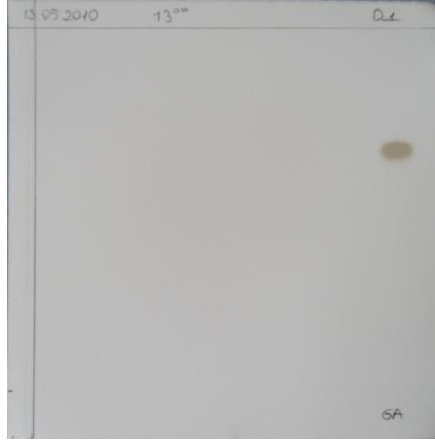
Şekil III.13. Mobil Faz: Toluen: n-Bütanol: Formik asit (40:22:8). Örnek konsantrasyonları: GA: 1.5×10^{-2} mol.L⁻¹ EA12: 2.4×10^{-3} mol.L⁻¹ EA2: 7.6×10^{-3} mol.L⁻¹.

III.2.1.9. Çift Yönlü Yürütme ile Stabilite Kontrolü

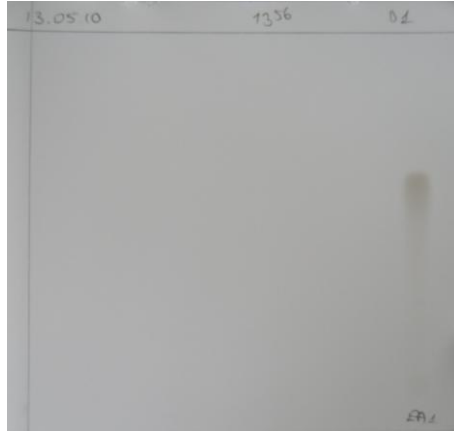
Jeganathan N.S. ve Kannan K.'nin (58) çalışmalarında kullandığı sistem Toluen: Etilasetat: Formik asit: Metanol (v/v) (30:30:8:2) modifiye edildi. Kullanılan sistem: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (v/v) (30:30:8:2) olarak belirlendi. Çift yönlü yürütmede kullanılmak üzere diğer sistem Toluen: THF: NH₃: Metanol (v/v) (30:30:2:8) olarak belirlendi. 10x10 plakalar hazırlandı. Çözücü tankının üç tarafı süzgeç kağıdıyla kaplandı. Çözücü karışımının doygunluğa ulaşabilmesi için bir gün süreyle bekletildi. Örnekleme için ellajik asitin EA12: 2.4x10⁻³ mol.L⁻¹ EA2: 7.6x10⁻³ mol.L⁻¹ konsantrasyonları ve gallik asitin GA: 1.5x10⁻² mol.L⁻¹ konsantrasyonu kullanıldı. EA2 örneğinde bir kereye mahsus ayrılma gözlemlendi (Şekil III.14). Bu nedenle, örneklemede kullanılan ellajik asit ve gallik asit çözeltileri taze hazırlandıktan sonra, çözeltilerin 1-6-13-20-25-32. günlerinde denemeler gerçekleştirildi. Üç paralel şekilde çalışıldı. İlk yürütme yapıldıktan sonra plakalar oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Daha sonra plaka 90° döndürülerek çözücü tankına yerleştirildi. Çift yönlü yürütme gerçekleştirildi. Farklı zamanlarda yapılan denemelerde bir değişiklik gözlenmedi.



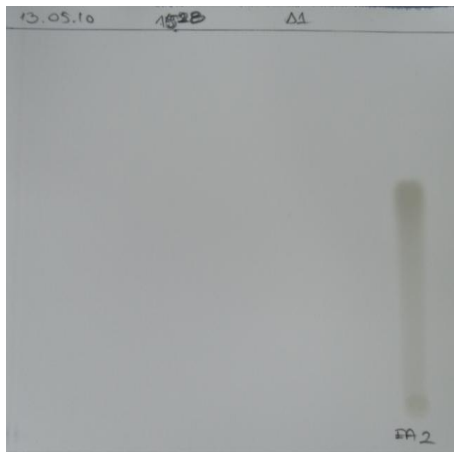
Şekil.III.14. Birinci yön: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (30:30:8:2), İkinci yön: Toluen: THF: NH₃: Metanol (30:30:2:8). Örnek konsantrasyonu: EA: 7.6x10⁻³ mol.L⁻¹



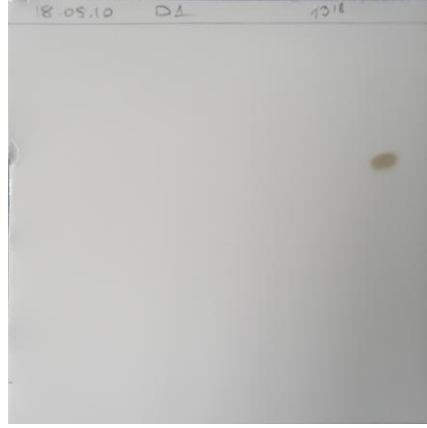
Şekil III.15. Birinci yön: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (30:30:8:2), İkinci yön: Toluen: THF: NH₃: Metanol (30:30:2:8). Örnek konsantrasyonu: GA: 1.5×10^{-2} mol.L⁻¹ (1.gün).



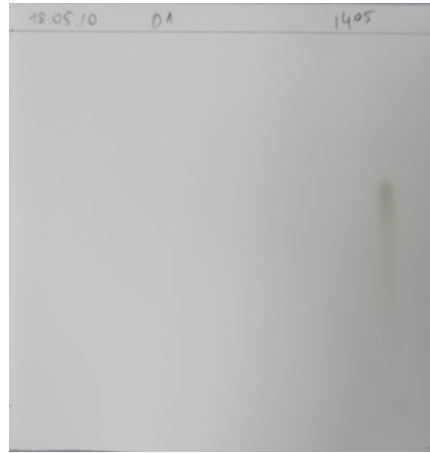
Şekil III.16. Birinci yön: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (30:30:8:2), İkinci yön: Toluen: THF: NH₃: Metanol (30:30:2:8). Örnek konsantrasyonu: EA12: 2.4×10^{-3} mol.L⁻¹ (1.gün).



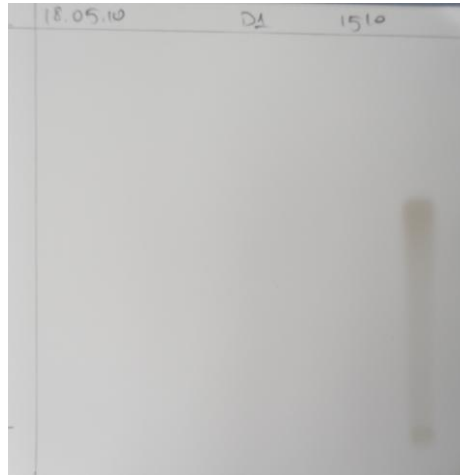
Şekil III.17. Birinci yön: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (30:30:8:2), İkinci yön: Toluen: THF: NH₃: Metanol (30:30:2:8). Örnek konsantrasyonu: EA2: 7.6×10^{-3} mol.L⁻¹ (1.gün).



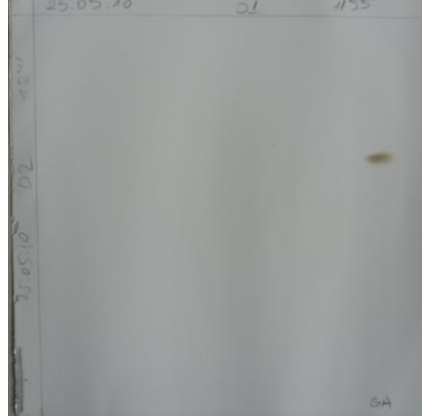
Şekil III.18. Birinci yön: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (30:30:8:2), İkinci yön: Toluen: THF: NH₃: Metanol (30:30:2:8). Örnek konsantrasyonu: GA: $1.5 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ (6.gün).



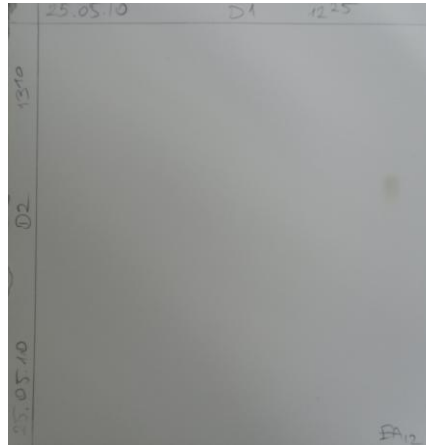
Şekil III.19. Birinci yön: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (30:30:8:2), İkinci yön: Toluen: THF: NH₃: Metanol (30:30:2:8). Örnek konsantrasyonu: EA12: $2.4 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ (6.gün).



Şekil III.20. Birinci yön: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (30:30:8:2), İkinci yön: Toluen: THF: NH₃: Metanol (30:30:2:8). Örnek konsantrasyonu: EA2: $7.6 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ (6.gün).



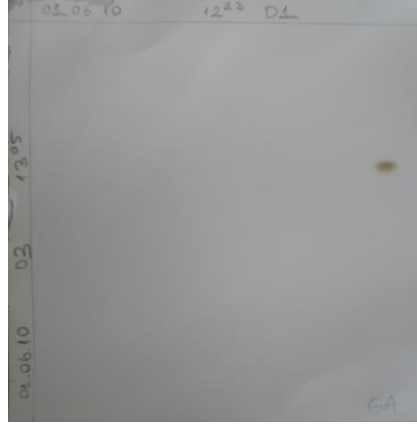
Şekil III.21. Birinci yön: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (30:30:8:2), İkinci yön: Toluen: THF: NH₃: Metanol (30:30:2:8). Örnek konsantrasyonu: GA: 1.5×10^{-2} mol.L⁻¹ (13.gün).



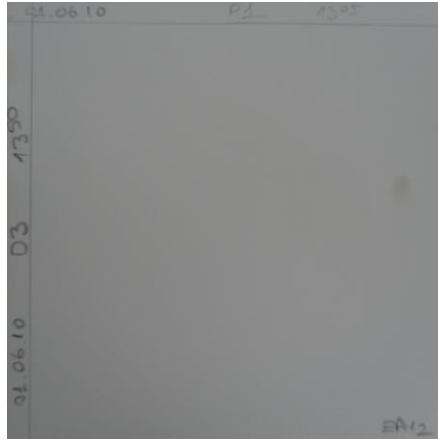
Şekil III.22. Birinci yön: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (30:30:8:2), İkinci yön: Toluen: THF: NH₃: Metanol (30:30:2:8). Örnek konsantrasyonu: EA12: 2.4×10^{-3} mol.L⁻¹ (13.gün).



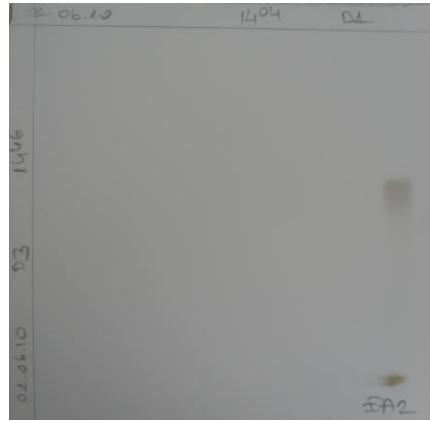
Şekil III.23. Birinci yön: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (30:30:8:2), İkinci yön: Toluen: THF: NH₃: Metanol (30:30:2:8). Örnek konsantrasyonu: EA2: 7.6×10^{-3} mol.L⁻¹ (13.gün).



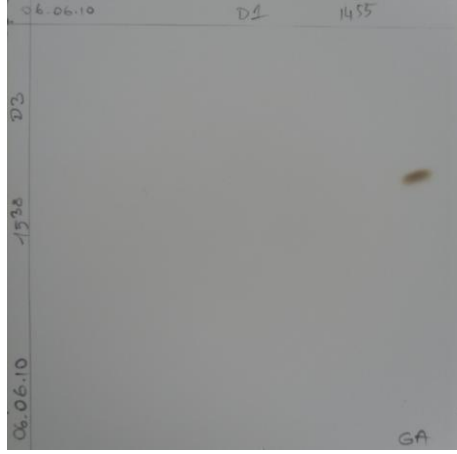
Şekil III.24. Birinci yön: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (30:30:8:2), İkinci yön: Toluen: THF: NH₃: Metanol (30:30:2:8). Örnek konsantrasyonu: GA: 1.5×10^{-2} mol.L⁻¹ (20.gün).



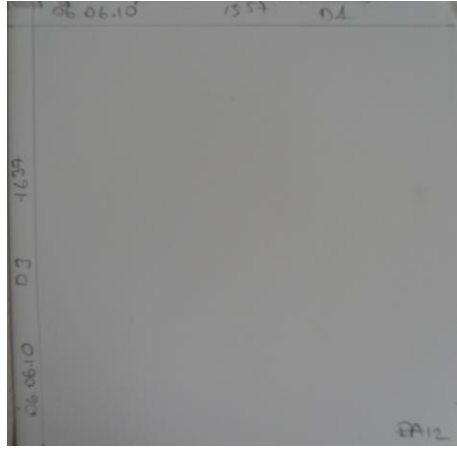
Şekil III.25. Birinci yön: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (30:30:8:2), İkinci yön: Toluen: THF: NH₃: Metanol (30:30:2:8). Örnek konsantrasyonu: EA12: 2.4×10^{-3} mol.L⁻¹ (20.gün).



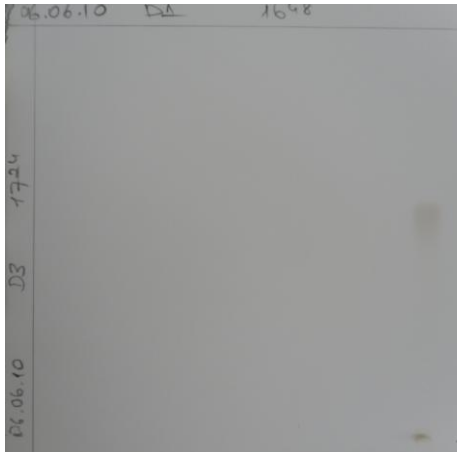
Şekil III.26. Birinci yön: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (30:30:8:2), İkinci yön: Toluen: THF: NH₃: Metanol (30:30:2:8). Örnek konsantrasyonu: EA2: 7.6×10^{-3} mol.L⁻¹ (20.gün).



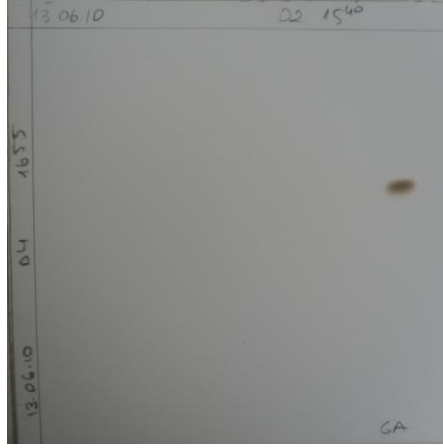
Şekil III.27. Birinci yön: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (30:30:8:2), İkinci yön: Toluen: THF: NH₃: Metanol (30:30:2:8). Örnek konsantrasyonu: GA: 1.5×10^{-2} mol.L⁻¹ (25.gün).



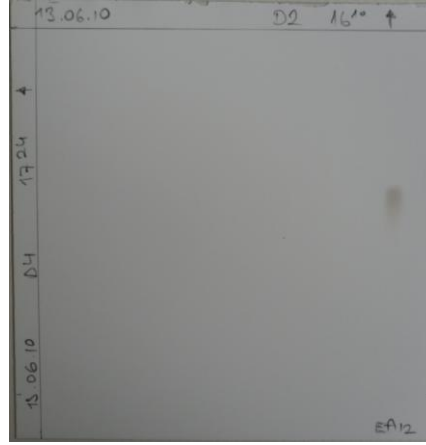
Şekil III.28. Birinci yön: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (30:30:8:2), İkinci yön: Toluen: THF: NH₃: Metanol (30:30:2:8). Örnek konsantrasyonu: EA12: 2.4×10^{-3} mol.L⁻¹ (25.gün).



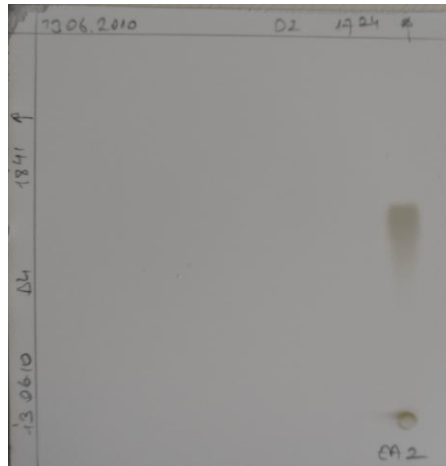
Şekil III.29. Birinci yön: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (30:30:8:2), İkinci yön: Toluen: THF: NH₃: Metanol (30:30:2:8). Örnek konsantrasyonu: EA2: 7.6×10^{-3} mol.L⁻¹ (25.gün).



Şekil III.30. Birinci yön: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (30:30:8:2), İkinci yön: Toluen: THF: NH₃: Metanol (30:30:2:8). Örnek konsantrasyonu: GA: 1.5×10^{-2} mol.L⁻¹ (32.gün).



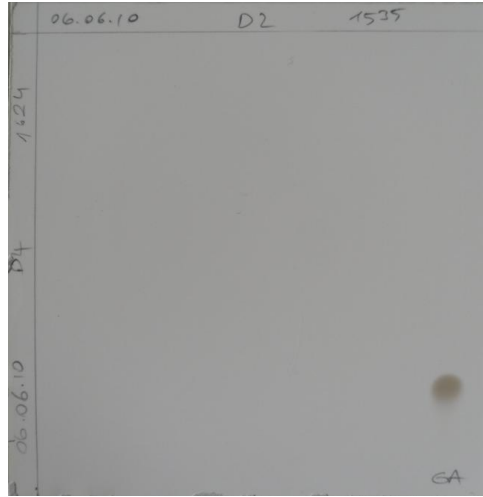
Şekil III.31. Birinci yön: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (30:30:8:2), İkinci yön: Toluen: THF: NH₃: Metanol (30:30:2:8). Örnek konsantrasyonu: EA12: 2.4×10^{-3} mol.L⁻¹ (32.gün).



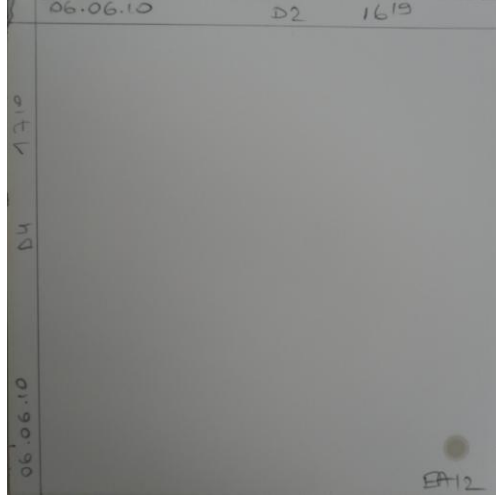
Şekil III.32. Birinci yön: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (30:30:8:2), İkinci yön: Toluen: THF: NH₃: Metanol (30:30:2:8). Örnek konsantrasyonu: EA2: 7.6×10^{-3} mol.L⁻¹ (32.gün).

III.2.1.10. Çift Yönlü Yürütme ile Yapılan Çalışma

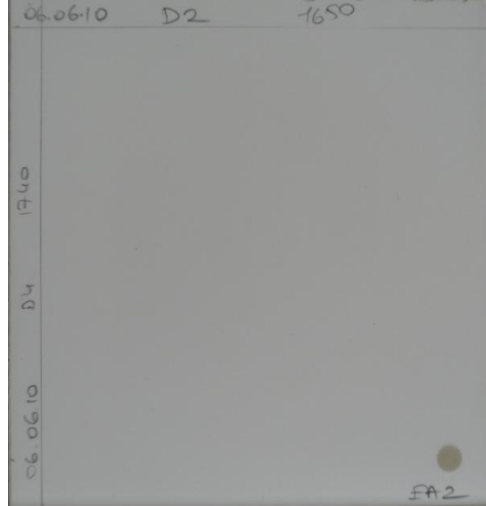
Medić ve arkadaşlarının (98) çalışmalarında kullandığı sistem oluşturuldu. Birinci yön için n-Hekzan: Etilasetat: Asetik asit (v/v) (31:14:5) ve ikinci yön için Kloroform: Metanol: Formikasit (v/v) (44:3.5:2.5) çözücü sistemleri hazırlandı. 10x10 plakalar hazırlandı. Çözücü tankının üç tarafı süzgeç kağıdıyla kaplandı. Çözücü karışımının doyumluğa ulaşabilmesi için bir gün süreyle bekletildi. Örneklemeye için ellajik asitin EA12: 2.4×10^{-3} mol.L⁻¹ EA2: 7.6×10^{-3} mol.L⁻¹ konsantrasyonları ve gallik asitin GA: 1.5×10^{-2} mol.L⁻¹ konsantrasyonu kullanıldı. İlk yürütme yapıldıktan sonra plakalar oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Daha sonra plaka 90° döndürülerek çözücü tankına yerleştirildi. Çift yönlü yürütme gerçekleştirildi. GA sistemde ilerlerken, EA sistemde yürümedi (Şekil III.33, Şekil III.34, Şekil III.35). GA için Rf değeri 0.17 olarak hesaplandı.



Şekil III.33. Birinci yön: n-Hekzan: Etilasetat: Asetik asit (31:14:5), İkinci yön: Kloroform: Metanol: Formikasit (44:3.5:2.5). Örnek konsantrasyonu: GA: 1.5×10^{-2} mol.L⁻¹.



Şekil III.34. Birinci yön: n-Hekzan: Etilasetat: Asetik asit (31:14:5), İkinci yön: Kloroform: Metanol: Formikasit (44:3.5:2.5). Örnek konsantrasyonu: EA12: 2.4×10^{-3} mol.L⁻¹.



Şekil III.35. Birinci yön: n-Hekzan: Etilasetat: Asetik asit (31:14:5), İkinci yön: Kloroform: Metanol: Formikasit (44:3.5:2.5). Örnek konsantrasyonu: EA2: 7.6×10^{-3} mol.L⁻¹.

Tablo III.3. Kullanılan çözücü sistemlerindeki Ellajik asit Rf değerleri.

Çözücü sistemi	Hacim oranları (v:v)	EA Rf	Kuyruklanma
Toluen:Etilasetat: Formik asit: Metanol	30:30:8:2	0,49	Var
Toluen:Etilasetat: Formik asit: Metanol	20:40:8:2	0,59	Var
Toluen:Etilasetat: Formik asit: Metanol	12:48:8:2	0,64	Var

Toluen:Etilasetat: Formik asit: Metanol	40:20:8:2	0,33	Var
Toluen:Etilasetat: Formik asit: Metanol	48:12:8:2	0,17	Var
Toluen:Etilasetat: Formik asit: Metanol	56:4:8:2	-	-
Toluen: Metanol: Formik asit	30:32:8	-	-
Toluen: Aseton: Formik asit: Metanol	30:30:8:2	0,67	Var
Toluen: THF: Formik asit: Metanol	30:30:8:2	0,77	Az
Toluen: Aseton: THF: Formik asit	20:10:30:8	0,88	Az
Toluen: Dioksan: Formik asit: Metanol	30:30:8:2	0,55	Var
Toluen: n-Bütanol: Formik asit: Metanol	40:20:8:2	0,19	Var
Toluen: n-Bütanol: Formik asit	40:22:8	0,19	Var
Birinci yön: Toluen: THF: Formic: Metanol İkinci yön: Toluen: THF: Amonyak: Metanol	30:30:8:2 30:30:2:8	0,60	Var
Birinci yön: n-Hekzan: Etilasetat: Asetik asit İkinci yön: Kloroform: Metanol: Formik asit	31:14:5 44:3.5:2.5	-	-

Tablo III.4. Kullanılan çözücü sistemlerindeki Gallik asit Rf değerleri

Çözücü sistemi	Hacim oranları (v:v)	GA Rf	Kuyruklanma
Toluen: Dioksan: Formik asit: Metanol	30:30:8:2	0,55	Az

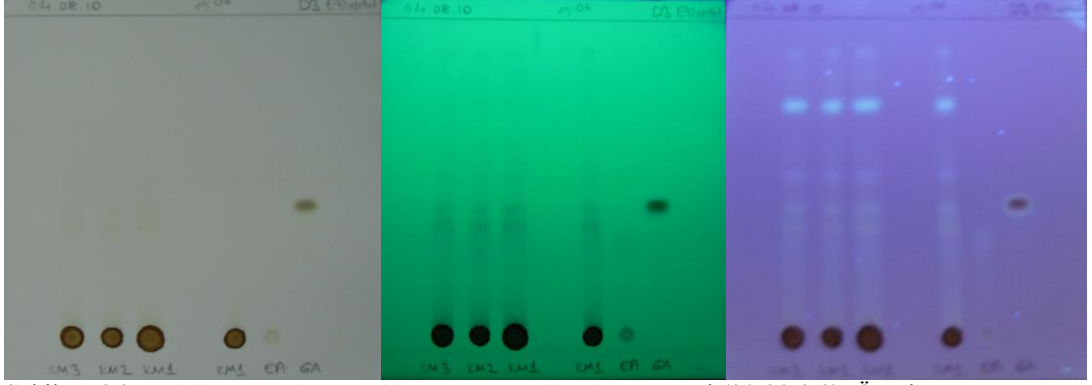
Toluen: n-Bütanol: Formik asit: Metanol	40:20:8:2	0,32	Az
Toluen: n-Bütanol: Formik asit	40:22:8	0,32	Az
Birinci yön: Toluen: THF: Formik: Metanol İkinci yön: Toluen: THF: Amonyak: Metanol	30:30:8:2 30:30:2:8	0,62	Yok
Birinci yön: n-Hekzan: Etilasetat: Asetik asit İkinci yön: Kloroform: Metanol: Formik asit	31:14:5 44:3.5:2.5	0,17	Az

III.2.2.Kestane Örnekleri ile Yapılan Kromatografik Çalışmalar

Jeganathan N.S. ve Kannan K.'nin (58) çalışmalarında kullandığı sistem Toluen: Etil Asetat: Formik asit: Metanol (30:30:8:2) ve bu sistemden yola çıkarak oluşturulan Toluen: THF: Formik asit: Metanol (v/v) (30:30:8:2) seçildi. Çalışma, 10x14x14 cm büyüklüğünde cam kapta yapıldı. Çözücü tankının içerisine kenar yüzeyini kaplayacak büyüklükte süzgeç kağıdı kesildi, yerleştirildi. Çözücü tankı cam kapak ile kapatılıp vazelinlendi. Bir gün süreyle doygunluk için bekletildi. 10x10 büyüklüğünde plakalar hazırlandı. Örnekleme kapiler ile beşer spot şeklinde yapıldı. Her spotta fön ile kurutma yapıldı. Plaka çözücü tankının içine tabandan itibaren 0,5 cm çözücü karışımı içerisinde kalacak şekilde eğik olarak yerleştirildi. Yürütme işlemi yaklaşık 15 dak sürdü. Plakalar oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruma işleminden sonra plakalara UV lamba altında (254 nm / 366nm) bakıldı. Ellajik asit ve Gallik asit standartları EA2: 7.6×10^{-3} mol.L⁻¹ ve GA: 1.5×10^{-2} mol.L⁻¹ konsantrasyonlarında kullanıldı.

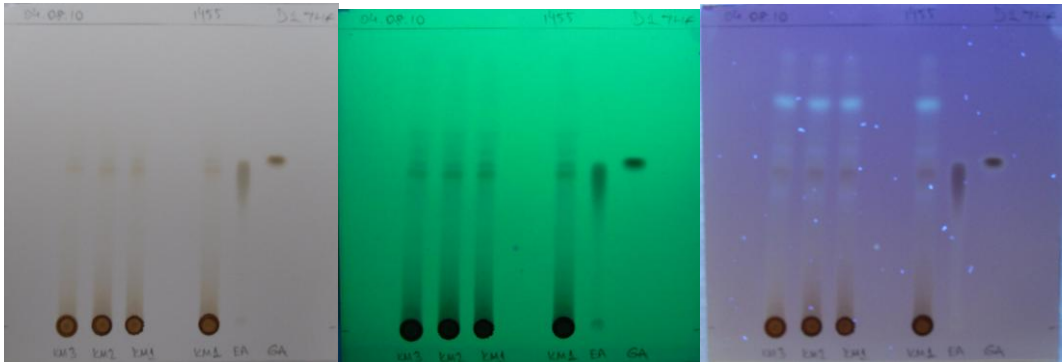
Kestane meyve kabuğu (KMK) örnekleri için Jeganathan N.S. ve Kannan K.'nin (58) çalışmalarında kullandığı sistem Toluen: Etil Asetat: Formik asit: Metanol (30:30:8:2) kullanıldığında EA2 standardı için Rf değeri 0,29 GA standardı için Rf

değeri 0,40 hesaplandı. Örnekte belirgin bandlar görülmekle birlikte, ellajik asidin olduğu bölgede kuyruklu yürüme gözlemlendi (Şekil III.36).



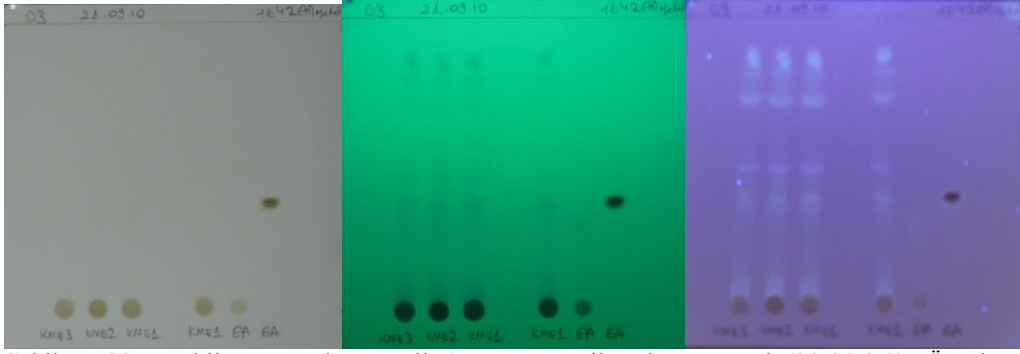
Şekil III.36. Mobil Faz: Toluene: Etil Asetat: Formik asit: Metanol (30:30:8:2). Örnek: Kestane meyve kabuğu (KMK). EA2 : 7.6×10^{-3} mol.L⁻¹ GA: 1.5×10^{-2} mol.L⁻¹. (Soldan sağa gün ışığı, UV 254 nm, UV 366 nm' deki fotoğraflar)

Kestane meyve kabuğu (KMK) örnekleri modifiye edilen sistemde Toluene: THF: Formik asit: Metanol (v/v) (30:30:8:2) yürütüldü. EA2 standardı için Rf değeri 0,54 GA standardı için Rf değeri 0,58 hesaplandı (Şekil III.37). Bu sistemde bandların birbirine daha yakın olduğu gözlemlendi.



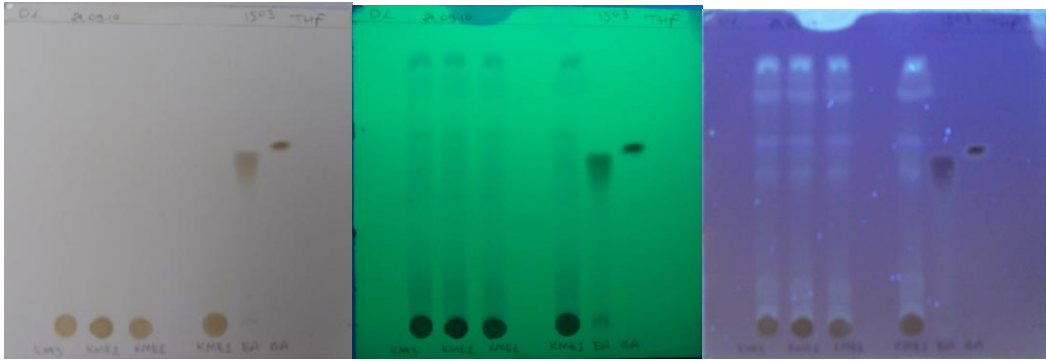
Şekil III.37. Mobil Faz: Toluene: THF: Formik asit: Metanol (30:30:8:2). Örnek: Kestane meyve kabuğu (KMK). EA2 : 7.6×10^{-3} mol.L⁻¹ GA: 1.5×10^{-2} mol.L⁻¹. (Soldan sağa gün ışığı, UV 254 nm, UV 366 nm' deki fotoğraflar)

Kestane meyve örneği için Jeganathan N.S. ve Kannan K.'nin çalışmalarında kullandığı sistem Toluene: Etil Asetat: Formik asit: Metanol (30:30:8:2) kullanıldığında EA2 standardı için Rf değeri 0,25 GA standardı için Rf değeri 0,40 hesaplandı (Şekil III.38).



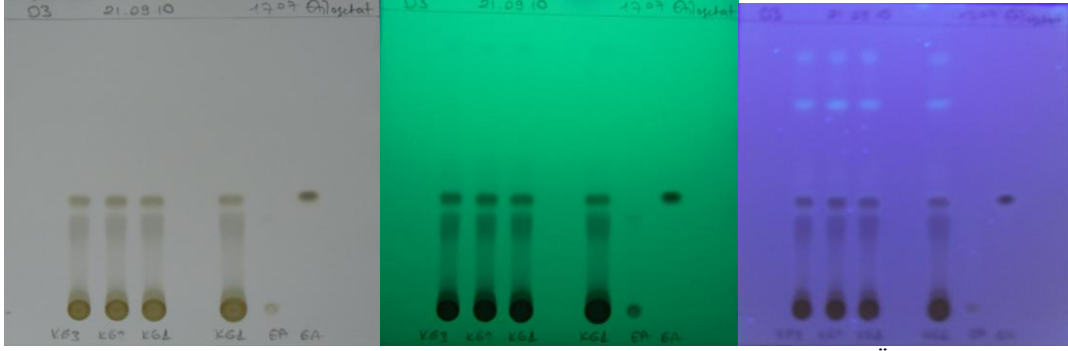
Şekil III.38. Mobil Faz: Toluen: Etil Asetat: Formik asit: Metanol (30:30:8:2). Örnek: Kestane meyvesi (KME). EA2 : 7.6×10^{-3} mol.L⁻¹ GA: 1.5×10^{-2} mol.L⁻¹. (Soldan sağa gün ışığı, UV 254 nm, UV 366 nm' deki fotoğraflar)

Kestane meyve (KME) örnekleri modifiye edilen sistemde Toluen: THF: Formik asit: Metanol (v/v) (30:30:8:2) yürütüldü. EA2 standardı için Rf değeri 0,58 GA standardı için Rf değeri 0,60 hesaplandı (Şekil III.39).



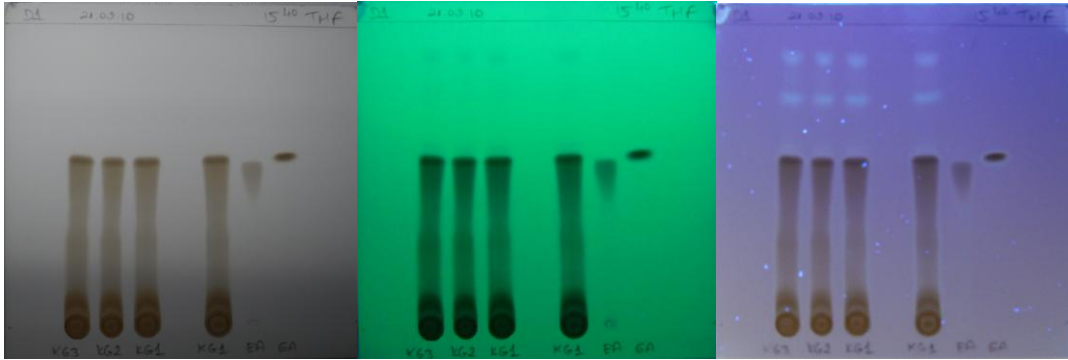
Şekil III.39. Mobil Faz: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (30:30:8:2). Örnek: Kestane meyvesi (KME). EA2 : 7.6×10^{-3} mol.L⁻¹ GA: 1.5×10^{-2} mol.L⁻¹. (Soldan sağa gün ışığı, UV 254 nm, UV 366 nm' deki fotoğraflar)

Kestane ağaç gövdesi iç kısım (KAG) örneği Jeganathan N.S. ve Kannan K.'nin çalışmalarında kullandığı sistemde Toluen: Etil Asetat: Formik asit: Metanol (30:30:8:2) kullanıldığında EA2 standardı için Rf değeri 0,31 GA standardı için Rf değeri 0,41 hesaplandı (Şekil III.40).



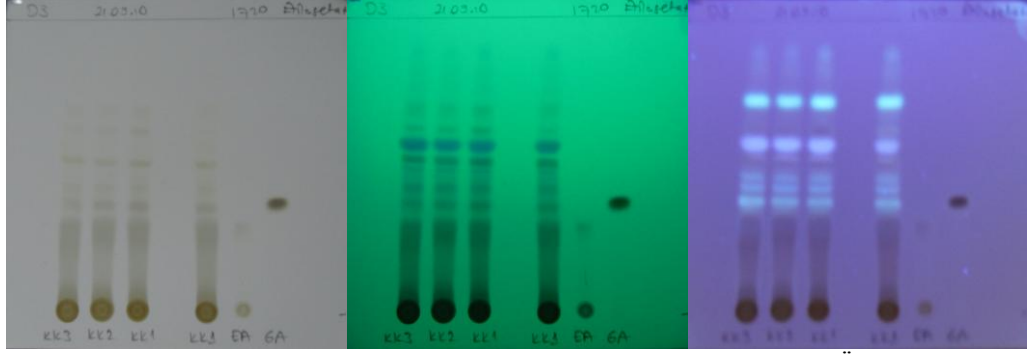
Şekil III.40. Mobil Faz: Toluen: Etil Asetat: Formik asit: Metanol (30:30:8:2). Örnek: Kestane ağaç gövdesi iç kısım (KAG). EA2 : $7.6 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ GA: $1.5 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$. (Soldan sağa gün ışığı, UV 254 nm, UV 366 nm' deki fotoğraflar)

Kestane ağaç gövdesi iç kısım (KAG) örneği modifiye edilen sistemde Toluen: THF: Formik asit: Metanol (v/v) (30:30:8:2) yürütüldü. EA2 standardı için Rf değeri 0,50 GA standardı için Rf değeri 0,58 hesaplandı (Şekil III.41).



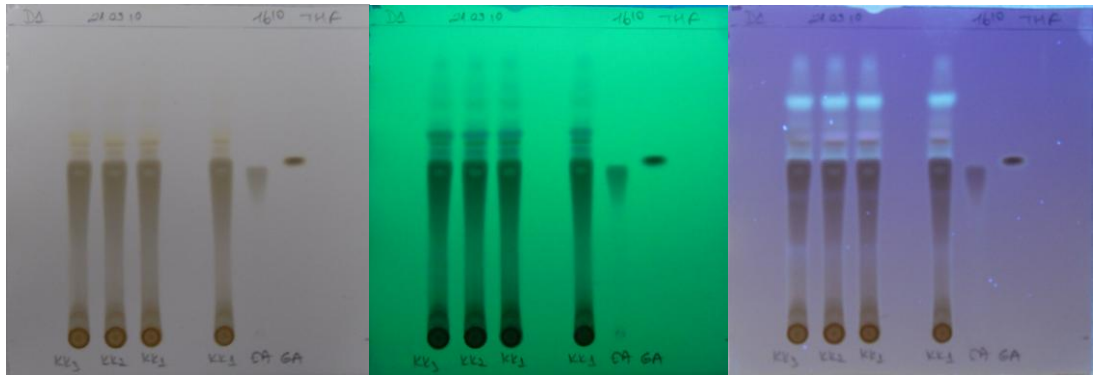
Şekil III.41. Mobil Faz: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (30:30:8:2). Örnek: Kestane ağaç gövdesi iç kısım (KAG). EA2 : $7.6 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ GA: $1.5 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$. (Soldan sağa gün ışığı, UV 254 nm, UV 366 nm' deki fotoğraflar)

Kestane ağaç kabuğu (KAK) örneği Jeganathan N.S. ve Kannan K.'nin çalışmalarında kullandığı sistemde Toluen: Etil Asetat: Formik asit: Metanol (30:30:8:2) kullanıldığında EA2 standardı için Rf değeri 0,30 GA standardı için Rf değeri 0,38 hesaplandı (Şekil III.42).



Şekil III.42. Mobil Faz: Toluen: Etil Asetat: Formik asit: Metanol (30:30:8:2). Örnek: Kestane ağaç kabuğu (KAK). EA2 : 7.6×10^{-3} mol.L⁻¹ GA: 1.5×10^{-2} mol.L⁻¹. (Soldan sağa gün ışığı, UV 254 nm, UV 366 nm' deki fotoğraflar)

Kestane ağaç kabuğu (KAK) örneği modifiye edilen sistemde Toluen: THF: Formik asit: Metanol (v/v) (30:30:8:2) yürütüldü. EA2 standardı için Rf değeri 0,55 GA standardı için Rf değeri 0,58 hesaplandı (Şekil III.43).



Şekil III.43. Mobil Faz: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (30:30:8:2). Örnek: Kestane ağaç kabuğu (KAK). EA2 : 7.6×10^{-3} mol.L⁻¹ GA: 1.5×10^{-2} mol.L⁻¹. (Soldan sağa gün ışığı, UV 254 nm, UV 366 nm' deki fotoğraflar)

BÖLÜM IV.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada dört farklı kestane örneği, kestane meyvesinin kabuğu (KMK), kestane meyvesi (KME), kestane ağaç gövdesi iç kısım (KAG), kestane ağaç kabuğu (KAK) öğütme, sabit tartıma getirme ve eleme ön işlemlerinden geçirildi. Bu işlemler sırasında tanecik büyüklüklerinin tekdüze olması hedeflendi. Ekstraksiyon için sokslet gibi geleneksel yöntemlerden üstün olan hızlandırılmış çözücü ekstraksiyon yöntemi (ASE cihazı) kullanıldı. ASE cihazı, yüksek sıcaklık ve basınç kullanımı ile çözücü tüketimini ve ekstraksiyon zamanını azaltmaktadır. Yüksek basınç çözücüyü kaynama noktasının altında tutarken, artmış sıcaklık ekstraksiyon kinetiğini hızlandırır, böylece bir örneği kısa bir zamanda (yaklaşık 30 dak) hızla ekstrakte etmek mümkündür. Ekstraksiyon koşulları Tablo III.1 de verilmiştir. Ekstraktlar, evaporatörde 60°C de kuruluğa kadar uçuruldu. Kalıntılar EA'nın çözünürlüğünün yüksek olduğu metanolde çözüldü ve -20°C de saklandı.

İTK uygulamasında tekrarlanabilirlik ve düzgün bir yürümenin sağlanması için çözücü tankının iç yüzeyi süzgeç kağıdıyla kaplandı ve tank bir gün önce hazırlandı. 10x10 plakalar ile çalışıldı. Örnek aynı spotun 5 er kez uygulanması ile yapıldı. Bu yolla derişimi bağıl olarak yüksek bir örnek çözeltisinin bir defada uygulanmasıyla oluşabilecek uygulama yerindeki yayılmanın ve buna bağıl olarak ortaya çıkabilecek kuyruklanmanın önüne geçildi.

İlk olarak kestane kabuğu kaynaklı ellajik asit standart çözeltileri ile çalışıldı. Farklı çözücü sistemlerindeki Rf değerleri incelendi.

1. Referans alınan sistemde (58) (Toluen: Etil Asetat: Formik asit: Metanol (30:30:8:2) ilk deneme yapıldı. Ellajik asit için Rf değeri 0,49 hesaplandı. Bu sistemde etilasetat ve toluen çözücü miktarları değiştirilerek çözücü karışımı farklı polaritelerde elde edildi. Karışımda polaritesi toluene göre daha fazla olan etilasetat miktarı arttırıldığında (Toluen: Etilasetat: Formik asit: Metanol (v/v) (20:40:8:2) ellajik asit için Rf değeri 0,59 hesaplandı. Etil asetat miktarı daha da arttırıldığında

(Toluen: Etilasetat: Formik asit: Metanol (v/v) (12:48:8:2) ellajik asit için Rf değeri 0,64 hesaplandı. Buradan hareketle sistemimizde polarite arttıkça ellajik asit daha fazla yürüdü, Rf değeri sistematik bir şekilde arttı.

2. Referans sistemde polariteyi düşürmek adına toluen miktarı arttırıldı (Toluen: Etilasetat: Formik asit: Metanol (v/v) (40:20:8:2). Bu durumda ellajik asit için Rf değeri 0,33 hesaplandı. Sistemin polaritesi daha da düşürüldü (Toluen: Etilasetat: Formik asit: Metanol (v/v) (48:12:8:2). Bu durumda Rf değeri 0,17 hesaplandı. Toluen miktarı daha da arttırıldığında (Toluen: Etilasetat: Formik asit: Metanol (v/v) (56:4:8:2) ellajik asitte yürüme gözlenmedi.

3. Etil asetat içermeyen sistemimizde (Toluen: Metanol: Formikasit (v/v) (30:32:8) ellajik asit örneğimiz dağıldı. Düzgün bir yürüme gözlenmedi. Ortamda aşırı metanol varlığı örneğimizin dağılmasına sebep oldu.

4. Etil asetat yerine polaritesi daha yüksek aseton kullanıldı (Toluen: Aseton: Formik asit: Metanol (v/v) (30:30:8:2). Bu durumda ellajik asit için Rf değeri 0,67 hesaplandı. Metanol ile asetonun polariteleri aynı olmasına rağmen metanol varlığında örnek dağılırken, aseton kullanılan sistemde beklenildiği gibi polarite arttığından ellajik asidin Rf değeri artış gösterdi.

5. Etil asetat yerine THF kullanıldı (Toluen: THF: Formik asit: Metanol (v/v) (30:30:8:2). Bu durumda ellajik asidin Rf değeri 0,77 hesaplandı.

6. Etil asetat yerine THF ve aseton birlikte kullanıldı (Toluen: Aseton: THF: Formik asit (20:10:30:8). Bu durumda ellajik asit için Rf değeri 0,88 hesaplandı.

7. Etilasetat yerine dioksan kullanıldı (Toluen: Dioksan: Formik asit: Metanol (v/v) (30:30:8:2). Gallik asit ve ellajik asidin Rf değerleri 0.55 hesaplandı.

8. Etil asetat yerine n-Bütanol kullanıldı (Toluen: n-Bütanol: Formik asit: Metanol (v/v) (40:20:8:2). Gallik asit örnekleri için Rf değeri 0,33 ellajik asit örnekleri için Rf

değeri 0.19 olarak hesaplandı. Bu sistemde metanol kullanılmadan çalışıldı (Toluen: n-Bütanol: Formik asit (v/v) (40:22:8). Bu durumda bir değişiklik gözlenmedi.

9. Çift yönlü yürütme yapıldı. Birinci yön için Toluen: THF: Formik asit: Metanol (v/v) (30:30:8:2) ve diğer yön için Toluen: THF: NH₃: Metanol (v/v) (30:30:2:8) seçildi. Bu sistemde ayrılma gözlenmezken yapılan bir denemede tesadüfi gözlenen ayrılma nedeniyle stabilite kontrolü yapıldı. Hazırlanan ellajik asit ve gallik asit örnekleri belirli gün aralıklarıyla yürütüldü. 1.günden 32. güne kadar süren yürütmelerde bir farklılık gözlenmedi.

10. Çift yönlü yürütme için yeni bir sistem denendi (Birinci yön: n-Hekzan: Etilasetat: Asetik asit (31:14:5), İkinci yön: Kloroform: Metanol: Formikasit (44:3.5:2.5). Gallik asit için Rf değeri 0,17 hesaplanırken, ellajik asit bu sistemde yürümedi. Tablo III.3 ve tablo III.4 de yukarıda verilen çözücü sistemleri ve ellajik asit ve gallik asit Rf değerleri verilmiştir.

Sonuç olarak bu sistemlerden elde edilen veriler ışığında kestane örnekleri ile çalışmak üzere Toluen: Etil Asetat: Formik asit: Metanol (30:30:8:2) (sistem I) ve Toluen: THF: Formik asit: Metanol (v/v) (30:30:8:2) (sistem II) seçildi.

Etilasetat içeren sistemlerde bantların birbirinden daha iyi ayrıldığı, THF içeren sistemlerde ise bantların birbirine daha yakın olduğu gözlemlendi. Seçilen iki sistemde örneklere ilişkin Rf değerleri ve bağıl standart sapmaları (RSD) Tablo IV.1' de verilmiştir.

TabloIV.1. Kestane meyve ve ağaç örneklerinin seçilen iki sistemdeki Rf değerleri

Sistem: Toluen: Etil Asetat: Formik asit: Metanol (30:30:8:2)					Sistem: Toluen: THF: Formik asit: Metanol (v/v) (30:30:8:2)				
Örnek	EA2 Rf değeri	RSD EA	GA Rf Değeri	RSD GA	Örnek	EA2 Rf değeri	RSD EA	GA Rf Değeri	RSD GA
KMK	0,29	%9,2	0,40	%5,98	KMK	0,54	%6,08	0,58	%1,7
KME	0,25		0,40		KME	0,58		0,60	
KAG	0,31		0,41		KAG	0,50		0,58	
KAK	0,30		0,38		KAK	0,55		0,58	

Toluen: Etil Asetat: Formik asit: Metanol (30:30:8:2) sistemi ile yapılan çalışmalarda iki kestane meyve örneği KMK ve KME' de bantlar keskin olmayıp, diğer iki kestane ağaç örneği olan KAG ve KAK' da daha keskin ve net spotlar elde edildi. Dört örneğin kromatogramlarında bu çalışmada ayrılması hedeflenen ve standartları ile aynı alıkonma zamanına sahip ellajik asit ve gallik aside ilaveten değişik sayıda farklı maddeler gözlemlendi. Şekil III.36 de KMK örneğinde EA ve GA ya ilave 5 spot; Şekil III.38 da KME örneğinde ilave 4 spot; Şekil III.40 de KAG örneğinde 4 ilave spot; Şekil III.42 da KAK örneğinde 8 ilave spot gözlenmiştir.

Kestane meyve kabuğu (Şekil III.36), kestane meyvesi (Şekil III.38) ve kestane ağaç kabuğu (Şekil III.42) örneklerinin Toluen: Etil Asetat: Formik asit: Metanol (30:30:8:2) sisteminde gerçekleştirilen ayrılmalarına UV lambada (366 nm) bakıldığında GA standardı floresans göstermezken, bu örnekler içindeki GA ile aynı alıkonma zamanında yürüyen madde floresans göstermektedir. Bu durum maddenin saf olmadığını düşündürmektedir.

Bu çalışmada EA ve GA için spotların etkin bir şekilde ayrılması açısından bakıldığında sistem I' in, tekrarlanabilirlik açısından bakıldığında sistem II' nin bu analize daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

Tablo IV.1' de sistem II kullanıldığında standartların Rf değerlerinin bağıl standart sapmalarının sistem I ile karşılaştırıldığında daha düşük olduğu saptanmıştır. Sistem I için EA Rf bağıl standart sapma değeri % 9,2 iken sistem II için EA Rf bağıl standart sapma değeri % 6,08, sistem I için GA Rf bağıl standart sapma değeri % 5,98 iken sistem II için GA Rf bağıl standart sapma değeri % 1,7 olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak, bu çalışmada kestane ağaç gövdesi iç kısım (KAG) ve kestane ağaç kabuğu (KAK) örneklerine ilişkin kromatogramlarda sistem I kullanıldığında EA olduğu düşünülen bandın diğer maddelerden etkin bir şekilde ayrıldığı, sistem II kullanıldığında ise, bantların ayrılma etkinliğinin düşük olduğu belirlenmiştir. Buna karşın sistem II' de bağıl olarak yüksek RSD değerleri ile tekrarlanabilirliği yüksek olan kromatografik bir ayrılma gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmanın geliştirilmesi için daha fazla miktarda kestane ekstresi elde edilerek merkezkaç kuvveti ile çalışan bir İTK sistemi olan “kromatotron” kullanılmalı ve ellajik asit ve gallik asit olduğu düşünülen spotlarla ilgili olarak IR, kütle spektrometrisi, elementel analiz gibi çeşitli yöntemlerin kullanılacağı kalitatif bir çalışma gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Amakura Y. , Okada M. , Tsuji, S. & Tonogai, Y. (2000). High performance liquid chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits. *Journal of Chromatography*, 896, 87-93.
2. Okuda T., Yoshida T., Hatano T., in: Huang M.T., Ho C.T., Lee C.Y. (Eds.) (1992) Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health II, ACS Symposium Series, Vol. 507, American Chemical Society, Washington, DC, p. 87.
3. Okuda T., Yoshida T., Hatano T., in: Yagi K. (Ed.)(1993) Antioxidant Phenolics in Oriental Medicine, Japan Sci. Soc. Pres, Tokyo, p.333.
4. Namiki M., Yamashita K., Osawa T., in: Yagi K. (Ed.) (1993), Active Oxygen Lipid Peroxides and Antioxidants, Japan Sci. Soc. Press, Tokyo, p. 319.
5. Tanaka T.,(1999) Structure, property and function of plant polyphenols, *Foods Food Ingrid. J. Jpn.* 180, p. 64.
6. Okuda T., Zasshi Y. (1995) Tannins, a new family of bio-active natural organic compounds (questions and answers). *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* 115(2), 81-100.
7. Lee J., (2004), Hydrolytic and antioxidant properties of ellagic acid and its precursors present in muscadine grape, Doctor of Philosophy Thesis, University of Florida. Florida, 104s.
8. Häkkinen S.H., Kärenlampi S.O., Mykkänen H. M., Heinonen I. M., Törrönen A.R.,(2000), Ellagic acid content in berries: influence of domestic processing and storage, *European Food Research and Technology*, 212, 75-80.
9. Häkkinen S.H., Törrönen A.R., (2000), Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and Vaccinium species: Influence of cultivar, cultivation site and technique, *Food Research International*, 33, 517-524.

10. Clifford M. N. , & Scalbert A. (2000), Ellagitannins- nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1118-1125.
11. Mullen W., McGinn J. , Lean M. EJ. , MacLean M.R. , Gardner P. , Duthie G.G. , Crozier A. , (2002b). Ellagitannins, flavonoids and other phenolics in red raspberries and their contribution to antioxidant capacity and vasorelaxation properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 5191-5196.
12. Kawamoto H, Nakatsubo F.(1997) Effects of environmental factors on two-stage tannin-protein co-precipitation. *Phytochemistry* 46:479-483.
13. Charrier B., Haluk J.P., Marques M.,(1992) HPLC analysis of gallic and ellagic acids in European oakwood (*Q. Robur L.*) and Eucalyptus (*E. globulus*), *Holzforchung* 46 (1) 87–89.
14. Häkkinen S.H., Kärenlampi S.O.,Heinonen I.M., Mykkänen H.M., Törrönen A.R.,(1998) HPLC method for screening of flavonoids and phenolic acids in berries *J. Sci. Food Agric.* 77 , 543-551.
15. Shahrzad S., Bitsch I, (1996) Determination of some pharmacologically active phenolic acids in juices by high-performance liquid chromatography *J. Chromatogr. A* 741, 223-231.
16. Daniel E.M. , Krupnick A.S., Heur Y.H., Blinzler J.A., Nims R.W., Stoner G.D.(1989), Extraction, stability, and quantitation of ellagic acid in various fruits and nuts *J. Food Comps. Anal.* 2, 338-349.
17. Rommel A., Wrolstad R.E.(1993), Influence of acid and base hydrolysis on the phenolic composition of red raspberry juice. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 41,1237-1241.
18. Versari A., Biesenbruch S., Barbanti D. , Farnell P.J., Galassi S., (1997) Effects of pectolytic enzymes on selected phenolic compounds in strawberry and raspberry juices *Food Res. Int.* 30 , 811-817.

19. Häkkinen S., Heinonen M., Kärenlampi S., Mykkänen H., Ruuskanen J., Törrönen R.,(1999) Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries, *Food Res. Int.* 32 , 345-353.
20. Bala, I., Bhardwaj, V., Hariharan, S., Kumar, M.N.V.R., (2006), Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 40, 206-210.
21. Bianco M.A., Handaji A., Savolainen H.,(1998) Quantative analysis of ellagic acid in hardwood samples, *The Science of the Total Enviroment* 222 , 123-126.
22. Vekiari S.A., Gordon M.H., Garcia- Macias P., Labrinea H.,(2008) Extraction and determination of ellagic acid content in chestnut bark and fruit, *Food Chemistry* 110, 1007-1011.
23. Pinto M.S., Lajolo F.M., Genovese M.I.,(2008) Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.)*Food Chemistry* 107 , 1629-1635.
24. Narayanan, B.A., Geoffroy, O., Willingham, M.C. , Re, G.G. , Nixon, D.W. , (1999). p53/p21 (WAF1/CIP1) Expression and its possible role in G1 arrest and apoptosis in ellagic acid treated cancer cells. *Cancer Letters* 136, 215-221.
25. Cuartero M., Ortuño J.A., Truchado P., García M.S., Tomás-Barberán F.A., Albero M.I. (2011) Voltammetric behaviour and square-wave voltammetric determination of the potent antioxidant and anticarcinogenic agent ellagic acid in foodstuffs. *Food Chemistry*.
26. Aguilera-Carbo A., Augur, C., Prado-Barragan, L.A., Faveal-Torres, E., Aguilar, C. N., (2007), Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins, *Applied Microbiology Biotechnology*, 1-11.
27. Akagi K., Hirose M., Hoshiya T., Mizoguchi Y., Ito N. & Shirani T. (1995). Modulating effects of ellagic acid, vanillin and quercetin in a rat medium term multi-organ carcinogenesis model, *Cancer letters*, 94, 113-121.

28. Sigman C. C., Helmes C. T., Fay J. R., Lundquist P. L. & Perry L. R. (1984). A study of chemicals in the wood and associated industries for the selection of candidates for carcinogen bioassay, 1. Naturally-occurring wood chemicals. *Journal of Environmental Science and Health, A19(5)*, 533-577.
29. Bhargava U.C., Westfall B. A.,(1968) Antitumor activity of juglans nigra (black walnut)*J. Pharm. Sci.* 57 ,1674-1677.
30. Mandal S., Stoner G.D.,(1990) Inhibition of N-nitrosobenzylmethylamine-induced esophageal tumorigenesis in rats by ellagic, *Carcinogenesis* 11 , 55-61.
31. Wood A.W., Huang M.T., Chang R. L., Newmark H. L., Lehr R.E., Yagi H., Sayer J. M., Jerina D. M., Cornney A.H., (1982) Inhibition of the mutagenicity of bay-region diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by naturally occurring plant phenols: Exceptional activity of ellagic acid, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 , 5513.
32. Khandurja K.L., Gandhi R.K., Pathania V., Shal N.,(1999) Prevention of N-nitrosodiethylamine-induced lung tumorigenesis by ellagic acid and quercetin in mice.*Food Chem. Toxicol.* 37, 313-318.
33. Wilson T.C., Hagerman A.E., (1990) Quantitative determination of ellagic acid, *Journal of Agricultural Food Chemistry* 38 : 1678-1683.
34. Hayatsu H., Arimoto S., Negishi T., (1988) Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis . *Mutat Res* 202: 429-446.
35. Strube M., Dragsted L.O., Larsen J.C. (1993) Naturally occurring antitumorigens. I Plant phenols. Nordiske Seminar- og Arbejdsrapporter 605, Nordic Council of Ministers, Copenhagen, Denmark.
36. Mukhtar H., Das M., Del Tito B.J. Jr., Bickers D.R., (1984) Protection against 3-methylcholanthrene induced skin tumorigenesis in BALB/c mice by ellagic acid, *Biochem Biophys Res Commun* 119:751-757.

37. Sharma S., Stutzman J.D., Kellof G.J., Steele V.E. (1994) Screening of potential chemopreventive agents using biochemical markers of carcinogenesis. *Cancer Research* 54 : 5848-5855.
38. Harttig U., Hendricks J.D., Stoner G.D., Bailey G.S. (1996) Organ specific, protocol dependent modulation of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene carcinogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by dietary ellagic acid, *Carcinogenesis* 17 : 11, 2403-2409.
39. Corthout, J., Peiters L.A., Claeys M., Vanden Berghe D.A. , Vleitnick A.J., (1991), Antiviral ellagitannins from *Spondia mombin*. *Phytochemistry* 30, 1129-1130.
40. Kalt, W., Forney, C. F., Martin, A., & Prior, R. L. (1999). Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4638-4644.
41. Stoner, G.D., & Morse, M.A. (1997). Isothiocyanates and plant polyphenols as inhibitors of lung and esophageal cancer. *Cancer Letters*, 114, 113-119.
42. Okuda, T. (2005). Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry*, 66, 2012-2031.
43. Boukharta M., Jalbert G., Castonguay A., (1992). Biodistribution of ellagic acid and dose-related inhibition of lung tumorigenesis in A/J mice. *Nutrition and Cancer* 18, 181-189.
44. Tanaka T., KOjima T., Kawamori T., Wang A., Suzui M., Okamoto K., Mori H., (1993). Inhibition of 4-nitroquinoline-1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis by the naturally occurring plant phenolics caffeic, ellagic, chlorogenic and ferulic acids. *Carcinogenesis* 14, 1321-1325.
45. Mukhtar H.A., Das M., Bickers D.R., (1986). Inhibition of 3methyl-cholantherne induced skin tumorigenicity in BALB/c mice by chronic oral feeding of trace amounts of ellagic acid in drinking water. *Cancer Research* 46, 2262-2265.

46. Rao C.V., Tokumo K., Rigoty J., Zang E., Kelloff G., Reddy B.S., (1991). Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary administration of piroxicam, difluoromethornithine, 16 β -fluor-5-androsten-17-one and ellagic acid individually and in combination, *Cancer Research* 51, 4528-4534.
47. Mahdavi D.L., Salukhe D.K., (1995). Toxicological aspects of food antioxidants. In: Mahdavi, D.L., Deshpande, S.S., Salukhe, D.K. (Eds.), *Food Antioxidants*. Dekker, New York.
48. Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56, 317-333.
49. Sellapan, S., & Akoh, C. C. (2002). Flavonoids and antioxidant capacity of Georgia grown *Vidalia* onions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5338-5342.
50. García del Moral, P., Arín, M.J., Resines, J.A., & Díez, M.T. (2007). Determination of ellagic acid in oak leaves and in sheep ruminal fluid by ion-pair RP-HPLC. *Journal of Chromatography B*, 855, 276-279.
51. Venkat Ratnam, D., Bhardwaj, V., & Ravi Kumar, M. N. V. (2006). Simultaneous analysis of ellagic acid and coenzyme Q10 by derivative spectroscopy and HPLC. *Talanta*, 70, 387-391.
52. Mullen, W., Yokota, T., Lean, M. E. J., & Crozier, A. (2003). Analysis of ellagitannins and conjugates of ellagic acid and quercetin in raspberry fruits by LC-MS, *Phytochemistry*, 64, 617-624.
53. Chang, Y. S., Lin, M. S., Jiang, R. L., Huang, S. C., & Ho, L. K. (1996). 20-epibryonolic acid, phytosterols and ellagic acid from *coriaria intermedia*. *Phytochemistry*, 42, 559-560.
54. Gómez-341 Caravaca, A. M., Verardo, V., Segura-Carretero, A., Caboni, M. F., & Fernández-Gutierrez, A. (2008). Development of a rapid method to determine phenolic and other polar compounds in walnut by capillary electrophoresis-

- electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatogr A*, 1209, 238-245.
55. Thakur, K., & Pitre, K. S. (2008). Polarographic (DCP & DPP) Determination of Ellagic Acid in Strawberries & Pharmaceutical Formulations. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 55, 143-146.
 56. Khallouki F., Haubner R., Hull W.E., Erben G., Spiegelhalder B., Bartsch H., Owen R.W.,(2007), Isolation, purification and identification of ellagic acid derivatives, catechins, and procyanidins from the root bark of *Anisophyllea dichostyla* R.Br., *Food and Chemical Toxicology* 45, 472-485.
 57. Nara O., (1997), Effective purification of ellagic acid by successive automatic recrystallization and absolute determination of purity by absorptivity ratio, *Analytica Chimica Acta*, 338, 247-253.
 58. Jeganathan N.S., Kannan K., (2008), HPTLC Method for estimation of ellagic acid and gallic acid in Triphala Churanam formulations, *Journal of Phytochemistry* 2(1), 1-9.
 59. Maria do Carmo B.M. de Vasconcelos, Richard N. Bennett, Stéphane Quideau, Rémi Jacquet, Eduardo A.S. Rosa, Jorge V. Ferreira-Cardoso (2010), Evaluating the potential of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) fruit pericarp and integument as a source of tocopherols, pigments and polyphenols. *Industrial Crops and Products*, 31, p.301–311.
 60. Berta Gonçalves , Olga Borges , Helena Soares Costa , Richard Bennett , Mariana Santos , Ana Paula Silva (2010), Metabolite composition of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) upon cooking: Proximate analysis, fibre, organic acids and phenolics. *Food Chemistry*, 122 p.154–160.
 61. Zhou, B., Wu, Z., Li, W., Zhang, J., & Hu, X. (2008). Analysis of ellagic acid in pomegranate rinds by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. *Phytochemical Analysis*, 19, 86-89.

62. Özkarakaş İ. , Kestane Tarımı, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü İzmir.
63. Subaşı B.,(2004). Kestane Sektör Profili. *İstanbul Ticaret Odası Etüt ve Araştırma Şubesi*.
64. Connor, W.E., (1997). The beneficial effects of omega - 3 fatty acids: cardiovascular disease and neuro – development. *Current opinion in Lipidology* 8: 1 – 3
65. Işık, N., 2003. Kestane ve Beslenmeye Katkıları, Bursa.
66. Barros Ana I.R.N.A. , Nunes Fernando M. , Gonçaves Berta , Richard N. Bennett , Ana Paula Silva (2011) Effect of cooking on total vitamin C contents and antioxidant activity of sweet chestnuts (*Castanea sativa* Mill.) *Food Chemistry*.
67. G. Va'zquez, E. Fontenla, J. Santos, M.S. Freire, J. Gonza' lez-A' lvarez, G. Antorrena (2008) Antioxidant activity and phenolic content of chestnut (*Castanea sativa*) shell and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark extracts industrial crops and products 2 8, 279–285.
68. Claudine Manach, Augustin Scalbert, Christine Morand, Christian Rémésy, and Liliana Jimenez Polyphenols: food sources and bioavailability (2004), *The American Journal of Clinical Nutrition* 79 727-47.
69. Uzuner S. (2008), Nar Suyunda Farklı Üretim ve Depolama Koşullarında Ellajik asit ve Toplam Antioksidan Aktivitelerindeki Değişimler, H.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara (Danışman: prof. Dr. Jale Acar).
70. Lee KH. (1992). 'Plant phenolics compounds as cytotoxic antitumour agents' in phenolic compounds in food and their Effects on health, II. Antioxidants and Cancer Prevention, pp. 367-379 ACS Symposium Series 506, American Chemical Society.
71. Chung KT, Wei CI, Johnson MG. (1998). Are tanens a double-edged sword in biology and health? *Trends in Food Sci and Tech*. 9: 168-175.

72. Chung KT, Wong TY, Wei CI, Huang YW, Lin Y. (1998). Tanens and human Health: a Review in Crit. Rev. Food Sci. Nutr.38(6):421-468.
73. Ratnoff OD, Crum JD. (1964). Activation of hageman factor by solution of ellagic acid. J. Lab. Clin. Med., 63, 359.
74. Özkan G., Baydar G. N., (2006) A Direct RP-HPLC Determination Of Phenolic Compounds İn Turkish Red Wines. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 19 (2), 229-234.
75. S. M. Fiuza. (2004) "Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties— a structure–activity relationship study. Part 1: Methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids". Elsevier.
76. Tsao, Makepeace (July 1951). "A New Synthesis Of Mescaline". *Journal of the American Chemical Society* 73 (11): 5495–5496.
77. Yılmaz İ. (2010) Antioksidan İçeren Bazı Gıdalar ve Oksidatif Stres *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 17 (2) 143-153 (2010).
78. Ken L.; Landriault M.; Fingas M.; Llompert M.: (2003) ” Accelerated solvent extraction (ASE) of environmental organic compounds in soils using a modified supercritical fluid extractor “, *J. Hazard. Mat.*, 102 93-104.
79. Obana H.; Kikuchi K.; Okihashi M.; Hori S. (1997):”Determination of Organophosphorus Pesticides in Foods Using an Accelerated Solvent Extraction System”, *Analyst*, 122 217–220.
80. Richter B. E.; Ezzell J. L.; Felix D.; Roberts K. A.; Later D. W.: (1995) “An accelerated solvent extraction system for the rapid preparation of environmental organic compounds in soil”, *Am. Lab.*, 27 24-28.
81. Richter B. E.: (2000)” Extraction of Hydrocarbon Contamination from Soils Using Accelerated Solvent Extraction”, *J. Chromatogr. A*, 874 217-224.

82. Drăgan D.; Cucu-man S.; Mocuna R.; Covaci A.: (2007) "Accelerated solvent extraction method for the determination of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in soil", *Revue Roumaine de Chimie*, 52(6) 597–601.
83. Yarita T.; (2001) "Extraction Behavior of Accelerated Solvent Extraction of DDT Metabolite from Fish Matrix", *Analytical sciences*, 17 913-915.
84. Popp P.; Keil P.; Moder M.; Paschke A.; Thuss U.: (1997) "Application of accelerated solvent extraction followed by gas chromatography, high-performance liquid chromatography and gas chromatography–mass spectrometry for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons, chlorinated pesticides and polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in solid wastes", *J. Chromatogr. A*, 774 203-211.
85. Hubert A.; Wenzel K.D.; Manz M.; Weissflog L., Engewald W.; Schüürmann G.; (2000) "High extraction efficiency for POPs in real contaminated soil samples using accelerated solvent extraction", *Anal. Chem.*, 72 1294-1300.
86. Concha-Graña E.; Turnes-Carou M. I.; Muniategui-Lorezo S.; Lopez-Mahia P.; Fernández- Fernández E.; Prada-Rodriguez D.; (2004) "Development of pressurized liquid extraction and cleanup procedures for determination of organochlorine pesticides in soils", *J. Chromatogr. A*, 1047 147-155.
87. Sporning S.; Bøwadt S.; Svensmark B.; Björklund E.; (2005) "Comprehensive comparison of classic Soxhlet extraction with Soxtec extraction, ultrasonication extraction, supercritical fluid extraction, microwave assisted extraction and accelerated solvent extraction for the determination of polychlorinated biphenyls in soil", *J. Chromatogr. A*, 1090 1–9.
88. Weichbrodt M.; Vetter W.; Lukas B.; (2000) AOAC. International, 83 1334-1343.
89. Wenzel K.D.; Hubert A.; Manz M.; Weissflog L.; Engewald W.; Schüürmann G.: (1998) "Accelerated solvent extraction of semivolatile organic compounds from biomonitoring samples of pine needles and mosses", *Anal. Chem.*, 70 4827- 4835.

90. Müller A.; Björklund E.; Holst C.V.: (2001) "On-line clean-up of pressurized liquid extracts for the determination of polychlorinated biphenyls in feedingstuffs and food matrices using gas chromatography–mass spectrometry", *J. Chromatogr. A*, 925 197-205.
91. De La Cal A.; Eljarrat E.; Barceló D.: (2003)" Determination of 39 polybrominated diphenyl ether congeners in sediment samples using fast selective pressurized liquid extraction and purification", *J. Chromatogr. A*, 1021 165-173.
92. Richter B. E.; Jones, B. A.;Ezzell, J. L.; Porter, N. L.; Avdalovic, N.; Pohl, C.: (1996) "Accelerated solvent extraction:a technique for sample preparation", *Anal. Chem.*, 68 1033-1039.
93. Schantz M. M.; Nichols J. J.; Wise S. A.: (1997) "Evaluation of Pressurized Fluid Extraction for the Extraction of Environmental Matrix Reference Materials", *Anal. Chem.*, 69, 4210-4219.
94. Kaufmann B.; Christen P.: (2002) "Recent Extraction Techniques For Natural Products: Microwave-Assisted Extraction And Pressurised Solvent Extraction", *Phytochemical Analysis*, 13 105-113.
95. Lou X.; Janssen H.G.; Cramers C. A.; (1997)" Parameters affecting the accelerated solvent extraction of polymeric samples", *Anal. Chem.*, 69 1598-1603.
96. Yalçın G (1999).: Kromatografik Analizin Temel İlkeleri ve Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi Uygulamaları. İstanbul.
97. Jork H., Funk W., Fischer W., Wimmer H., (1990) Thin Layer Chromatography Volume 1a, Germany.
98. Saric M., Jasprica I., Monar A., Smolic-Bubalo A., and Golja P.,(2004), Quantitative analysis of flavonoids and phenolic acids in propolis by two-dimensional thin layer chromatography, *J. Planar Chromatog.* 17, 459-462.

ÖZGEÇMİŞ

2 Temmuz 1985 tarihinde İstanbul'da doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi İstanbul'da tamamladım. 2003 yılında Marmara Üniversitesi Atatürk Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliği bölümünde lisans eğitimime başladım. 2008 yılında lisans eğitimimi bitirip, aynı yıl Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim dalında yüksek lisans eğitimime başladım. 2008-2010 yılları arasında Final Dergisi Dershanesi Beşiktaş şubesinde Kimya Öğretmeni olarak görev aldım. 2010 Aralık ayından itibaren Milli Eğitim Bakanlığında kadrolu Kimya Öğretmeni olarak çalışmaktayım.