



**T.C.  
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**KUMARİNLERİN SUBKRİTİK SU KROMATOĞRAFİSİ İLE  
AYRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Sema AKAY**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Berkant KAYAN**

**AKSARAY, 2015**





**T.C.  
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**KUMARİNLERİN SUBKRİTİK SU KROMATOĞRAFİSİ İLE  
AYRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Sema AKAY**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Berkant KAYAN**

**AKSARAY, 2015**

**AKSARAY ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ONAY BELGESİ**

Aksaray Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 132305406 numaralı Tezli Yüksek Lisans öğrencisi, "Sema AKAY", ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "KUMARİNLERİN SUBKRİTİK SU KROMATOĞRAFİSİ İLE AYRILMASI" başlıklı tezini, aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

**Tez Danışmanı :**      **Doç. Dr. Berkant KAYAN**      .....

**Aksaray Üniversitesi**

**Jüri Üyeleri :**      **Doç. Dr. Belgin GÖZMEN**      .....

**Mersin Üniversitesi**

**Jüri Üyeleri :**      **Doç. Dr. Mehmet ODABAŞI**      .....

**Aksaray Üniversitesi**

**Teslim Tarihi:**

**Savunma Tarihi: 12 Ocak 2015**

## **DOĞRULUK BEYANI**

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın yazdığımı, yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden olduğunu ve bu eserleri her kullanışımda alıntı yaparak yararlandığımı belirtir; bunu şerefimle doğrularım.

Enstitü tarafından belli bir zamana bağlı olmaksızın, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildiririm.

**Sema AKAY**

## ÖNSÖZ

Son yılların en önemli kromatografik tekniklerinden biri olan yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile bileşenlerin ayrılması çalışmaları, günden güne artan teknolojik gelişmelerle çok daha önemli bir boyut kazanmaktadır. Bununla birlikte yüksek performanslı sıvı kromatografisinde yeni nesil sabit faz çalışmaları da araştırmacılar tarafından dikkat çekici bir şekilde takip edilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmaların amacı, yeşil kimya felsefesine uygun olarak, kromatografik analizler esnasında harcanan organik çözücü miktarını minimum seviyeye indirmek ve iyi bir ayırım gerçekleştirmektir. Bu noktadan hareketle, bu çalışmada organik çözücü sarfiyatını ortadan kaldıran ve saf suyu mobil faz olarak kullanan, subkritik su kromatografi sisteminin kurulması ve uygulanabilirliğinin araştırılması öngörülmüştür.

Bu araştırmada, çalışmanın amacına uygun olarak kumarin ve türevlerinin subkritik su kromatografi sistemi ile ayrılmaları, iki farklı kolon sisteminde incelenmiştir. Birinci kolon sisteminde ticari olarak satılan ve sabit faz içerikleri farklı olan sıvı kromatografi kolonları kullanılarak ayrımlar gerçekleştirilmiştir. İkinci kolon sisteminde, kolon dolgu maddesi (sabit faz) olarak Naftilamin takılı poli(hidroksietil metakrilat-N-metakriloil-(L-histidin)-metilester (NA-PHEMAH) mikroküreleri sentezlenmiş ve sabit faz olarak bileşiklerin kromatografik ayrımlarında kullanılmıştır.

Bu tez, KBAG 112T336 Nolu Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (Tübitak) Projesi ile desteklenmiştir.

## **TEŞEKKÜR**

Çalıőmalarım boyunca maddi ve manevi her konuda destek olan, sabrı ve hoőgörüőüyle fikirlerini, deneyimlerini esirgemedен paylaşan değerli danıőmanım Doç. Dr. Berkant KAYAN'a ve bütün hayatım boyunca maddi ve manevi fedakarlıkları ile bugünlere gelmemde en büyük pay sahibi olan, her konuda beni destekleyen ve her zaman da destekleyeceklerine inandığım canım AİLEM'e sonsuz teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER DİZİNİ.....	x
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. LİTERATÜR ÖZETİ.....</b>	<b>3</b>
2.1 Kromatografi.....	3
2.2 Kromatografik Metotların Sınıflandırılması.....	4
2.2.1 Ayrılma mekanizmasına göre.....	4
2.2.2 Uygulama biçimine göre.....	4
2.2.3 Faz tipine göre.....	4
2.3 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi.....	5
2.4 Ters Faz Sıvı Kromatografisi.....	6
2.5 Yüksek Sıcaklık Sıvı Kromatografisi.....	6
2.6 Subkritik Su Kromatografisi.....	8
2.6.1 Subkritik su.....	8
2.6.2 Subkritik su kromatografisinde kolon sistemleri.....	13
2.6.3 Subkritik su kromatografisinde dedektör sistemleri.....	15
2.6.4 Kumarinler.....	16
2.6.5 Kumarinlerin analizi.....	18
2.6.6 Yüksek sıcaklık sıvı kromatografisi ve subkritik su kromatografisi ile ilgili önceki çalışmalar.....	19
<b>3. MALZEME VE YÖNTEM.....</b>	<b>30</b>
3.1 Kullanılan Malzemeler.....	30
3.1.1 NA-PHEMAH kolon dolgu maddesinin sentezlenmesi.....	30
3.1.1.1 Metakriloamidohistidin (MAH) sentezi.....	31
3.1.1.2 Poli(HEMA-MAH) (PHEMAH) mikrokürelerin hazırlanması.....	31
3.1.1.3 PHEMAH mikrokürelere naftilamin takılması.....	32
3.2 Kullanılan Cihazlar.....	36
3.2.1 Subkritik su kromatografi sistemi.....	37
3.3 Yöntem.....	38
<b>4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....</b>	<b>40</b>
4.1 Kromatografik Şartların Belirlenmesi.....	40
4.2 HPLC Kolonu Kullanılarak Bileşenlerin Ayrılması.....	42
4.2.1 Waters XTerra MS C18.....	42
4.2.2 Waters XBridge C18.....	43
4.2.3 Zorbax RRHD Eclipse Plus.....	44
4.2.4 Zorbax SB Phenyl.....	45
4.2.5 Zorbax SB C18.....	46
4.3 Entalpi ve Entropi Değerlerinin Hesaplanması.....	49
4.4 NA-PHEMAH Kolonun Termal Kararlılığı.....	50



4.5 NA-PHEMAH Mikrokürelerin Sabit Faz Olarak Kullanıldığı Kromatografik Ayrımlar.....	53
<b>5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....</b>	<b>63</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>66</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>72</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>74</b>

## ÖZET

### KUMARİNLERİN SUBKRİTİK SU KROMATOĞRAFİSİ İLE AYRILMASI

Bu çalışma iki kısımdan oluşmaktadır. Çalışmanın birinci kısmında, yeni tasarlanan kromatografi sistemi kullanılarak, kumarin, vanilin ve etil vanilin bileşiklerinin subkritik su kromatografisi ile ayrılması araştırılmıştır. Kromatografik ayrımlar, Waters XTerra MS C18, Zorbax RRHD Eclipse Plus, Zorbax SB Phenyl, Zorbax SB C18, and Waters XBridge C18 kolonları içeren beş farklı kolon kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sıcaklığın artmasıyla birlikte çalışılan üç bileşimde alıkonma zamanları kısalmıştır. Çalışılan beş farklı kolon içinde Zorbax SB Phenyl ve Zorbax SB C18 iyi sonuçlar vermesine rağmen, en iyi ayırım Waters XBridge C18 kolonunda elde edilmiştir. Kumarin, vanilin ve etil vanilin bileşiklerinin subkritik su kromatografisi ile ayrımları 100 ile 200 °C arasında, hem sabit hem değişken akış hızlarında gerçekleştirilmiştir. Sıcaklığın, alıkonma faktörüne etkisi Van't Hoff eşitliği ile incelenmiştir.

Çalışmanın ikinci kısmında, subkritik su kromatografisinde kolon dolgu materyali (sabit faz) olarak kullanılacak olan Poli(HEMA-MAH) (PHEMAH) (poli(hidroksietil metakrilat-N-metakriloil-(L-histidin)-metilester) mikroküreleri sentezlenmiştir ve yüksek sıcaklıkta kararlılık ve dayanıklılık testleri yapılmıştır. Bu moleküller yüksek sıcaklıkta kararlılık ve dayanıklılık gösterebilmektedir.

Sentezlenen bu kolon dolgu maddesi ile kumarin, vanilin, etil vanilin, 6-metil kumarin ve 7-metil kumarin bileşiklerinin ayrılması 125 ile 200 °C arasında gerçekleştirilmiştir. Metanol/Su karışımı (%2-97 ve %5-94) mobil faz olarak kullanılmıştır. En iyi ayırım yüksek sıcaklıkta %5-94 metanol/su oranında gözlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Kumarin, Vanilin, Etil Vanilin, Subkritik Su Kromatografisi, 6-Metil Kumarin, 7-Metil Kumarin, PHEMAH

## ABSTRACT

### SEPARATION OF COUMARINS BY SUBCRITICAL WATER CHROMATOGRAPHY

In this study consist of two parts. In the first part of the study, we investigated the potential application of SBWC technique for separation of coumarin, vanillin, and ethyl vanillin using new design chromatography system. Chromatographic separations were performed on five columns including Waters XTerra MS C18, Zorbax RRHD Eclipse Plus, Zorbax SB Phenyl, Zorbax SB C18, and Waters XBridge C18 columns. Retention time of all three solutes was shortened with increasing water temperature. While separations on Zorbax SB Phenyl and Zorbax SB C18 columns are good, Waters XBridge C18 column yielded the best separation among the five commercial columns tested. Separation of coumarin, vanillin, and ethyl vanillin has been carried out using SBWC at temperatures ranging from 100 to 200 °C with both constant and variable flow rates. The temperature effect on retention factor was examined using van't Hoff equation.

In the second part of the study, was synthesized the poly (HEMA-MAH) (PHEMAH) poly(hydroxyethylmethacrylate-N-methacryloyl-(L-histidine)-methylester) microspheres to be used as the column filling material (stationary phase) in subcritical water chromatography and their stability and durability tests were carried out at elevated temperature. These molecules can exhibit stability and durability at elevated temperature.

Separation of coumarin, vanillin, ethyl vanillin, 6-methyl coumarin and 7-methyl coumarin have been carried out with the synthesised this column filling material at temperatures ranging from 125 to 200 °C. Methanol/ Water mixture (%2-97 and %5-94) were used as mobile phase in this process. The best separation was observed at % 5-94 methanol/water ratio at high temperature.

**Keywords:** Coumarin, Vanillin, Ethyl Vanillin, Subcritical Water Chromatography, 6-Methyl Coumarin, 7-Methyl Coumarin, PHEMAH.

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1: Subkritik suyun faz diyagramında gösterilmesi.....	8
Şekil 2.2: Suyun bazı fiziksel özelliklerinin sıcaklık ile değişimi.....	9
Şekil 2.3: Suyun dielektrik sabitinin sıcaklıkla değişimi.....	10
Şekil 2.4: Kumarinin molekül yapısı.....	17
Şekil 2.5: Urasil ve parabenlerin HTLC ile ayrımı.....	19
Şekil 2.6: Vanilin test karışımlarının HTLC ile ayrılması.....	20
Şekil 2.7: Test karışımlarının HTLC ile ayrımı.....	21
Şekil 2.8: Kafein ve türevlerinin HTLC ile ayrılması.....	22
Şekil 2.9: Benzenlerin ve aromatik bileşiklerin SBWC ile ayrılması.....	23
Şekil 2.10: Kafein türevlerinin SBWC ile ayrımı.....	23
Şekil 2.11: Stereoidlerin SBWC ile ayrılması.....	24
Şekil 2.12: Anilin ve türevlerinin SBWC ile ayrılması.....	25
Şekil 2.13: Antikanser ilaçların SBWC ile ayrımı.....	25
Şekil 2.14: Purin ve primidinlerin SBWC ile ayrılması.....	26
Şekil 2.15: Barbitüratların SBWC ile ayrılması.....	27
Şekil 2.16: Sitostatiklerin ve antibiyotik ilaçların SBWC ile ayrılması.....	28
Şekil 2.17: El kremesindeki niasinamidin SBWC ile ayrılması.....	29
Şekil 3.1: PHEMAH mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılan polimerizasyon sistemi.....	31
Şekil 3.2: Naftilamin molekülünün PHEMAH mikrokürelere takılması.....	33
Şekil 3.3: Naftilamin takılı PHEMAH ile Kumarin etkileşiminin şematik gösterimi.....	33
Şekil 3.4: Naftilamin takılı PHEMAH moleküllerinin SEM görüntüleri.....	34
Şekil 3.5: PHEMA'nın termal bozunma eğrisi.....	35
Şekil 3.6: Sabit fazın kolona doldurulması için kullanılan kolon doldurma sistemi.....	36
Şekil 3.7: Subkritik Su Kromatografi Sistemi.....	37
Şekil 4.1: Kumarin, Vanilin ve Etil vanilinin UPLC ile ayrılması sonucu elde edilen kromatogramlar-1.....	40
Şekil 4.2: Kumarin, Vanilin ve Etil vanilinin UPLC ile ayrılması sonucu elde edilen kromatogramlar-2.....	41
Şekil 4.3: Kumarin ve türevlerinin Waters XTerra MS C18 kolon ile farklı sıcaklıklarda ayrılması.....	43
Şekil 4.4: Kumarin ve türevlerinin Waters XBridge C18 kolon ile farklı sıcaklıklarda ayrılması.....	44
Şekil 4.5: Kumarin ve türevlerinin Zorbax RRHD Eclipse Plus kolon ile farklı sıcaklıklarda ayrılması.....	45
Şekil 4.6: Kumarin ve türevlerinin Zorbax SB Phenyl kolon ile farklı sıcaklıklarda ayrılması.....	46
Şekil 4.7: Kumarin ve türevlerinin Zorbax SB C18 kolon ile farklı sıcaklıklarda ayrılması.....	47

<b>Şekil 4.8:</b> Kumarin ve türevlerinin naftilamin-PHEMA sabit fazlı kolonda gerçekleştirilen termal kararlılık kromatogramları.....	51
<b>Şekil 4.9:</b> SBWC’de ısıtma süresinin alıkonma faktörü üzerine etkisi.....	52
<b>Şekil 4.10:</b> SBWC’de ısıtma süresinin tabaka sayısı üzerine etkisi.....	52
<b>Şekil 4.11a:</b> Kumarin ve karışımlarının naftilamin-PHEMAH sabit fazlı kolonda gerçekleştirilen ayırım kromatogramları.....	54
<b>Şekil 4.11b:</b> Kumarin ve karışımlarının naftilamin-PHEMAH sabit fazlı kolonda gerçekleştirilen ayırım kromatogramları.....	54
<b>Şekil 4.12a:</b> Kumarin ve karışımlarının naftilamin-PHEMAH sabit fazlı kolonda gerçekleştirilen ayırım kromatogramları.....	55
<b>Şekil 4.12b:</b> Kumarin ve karışımlarının naftilamin-PHEMAH sabit fazlı kolonda gerçekleştirilen ayırım kromatogramları.....	56
<b>Şekil 4.13a:</b> Kumarin ve karışımlarının naftilamin-PHEMAH sabit fazlı kolonda gerçekleştirilen ayırım kromatogramları.....	57
<b>Şekil 4.13b:</b> Kumarin ve karışımlarının naftilamin-PHEMAH sabit fazlı kolonda gerçekleştirilen ayırım kromatogramları.....	57
<b>Şekil 4.14a:</b> Kumarin ve karışımlarının naftilamin-PHEMAH sabit fazlı kolonda gerçekleştirilen ayırım kromatogramları.....	58
<b>Şekil 4.14b:</b> Kumarin ve karışımlarının naftilamin-PHEMAH sabit fazlı kolonda gerçekleştirilen ayırım kromatogramları.....	59

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
<b>Çizelge 3.1:</b> PHEMAH mikrokürelerin polimerizasyon koşulları.....	32
<b>Çizelge 4.1:</b> UPLC ve SBWC ile gerçekleştirilen ayırım sonuçlarının karşılaştırılması.....	41
<b>Çizelge 4.2:</b> Kumarin ve türevlerinin ayrılmasında kullanılan HPLC kolonları ve özellikleri.....	42
<b>Çizelge 4.3:</b> Bileşiklerin alıkonma zamanına sıcaklığın etkisi.....	48
<b>Çizelge 4.4:</b> Farklı kolon türleri ile kumarin ve türevleri için elde edilen entalpi verileri.....	50
<b>Çizelge 4.5:</b> Kumarin ve türevlerinin kromatografik parametrelerinin sıcaklığa bağlı olarak değişmesi (Sabit faz: NA-PHEMAH).....	60

## SİMGELER DİZİNİ

<b>cm</b>	Santimetre
<b>°C</b>	Santigrat Derece
<b>dk</b>	Dakika
<b>g</b>	Gram
<b><math>\Delta H^\circ</math></b>	Sabit fazdan mobil faza çözünen için standart entalpi
<b><math>\Delta S^\circ</math></b>	Sabit fazdan mobil faza çözünen için standart entropi
<b><math>\phi</math></b>	Hacim faz oranı
<b><math>k'</math></b>	Alıkonma faktörü
<b>M<math>\Omega</math></b>	Megaohm
<b>mg</b>	Miligram
<b>mL</b>	Mililitre
<b>mm</b>	Milimetre
<b><math>\mu</math>L</b>	Mikrolitre
<b><math>\mu</math>m</b>	Mikrometre
<b>nm</b>	Nanometre
<b>ppm</b>	mg Çözünen/Litre
<b>rpm</b>	Dakikadaki devir sayısı
<b>R<sup>2</sup></b>	Korelasyon katsayısı

## KISALTMALAR DİZİNİ

AIDS	Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu
BPO	Benzoil Peroksit
CAD	Yüklü Aerosol Dedektör
DMSO	Dimetilsülfoksit
EGDMA	Etilen Glikol Dimetakrilat
FID	Alev İyonlaştırılmalı Dedektör
GC	Gaz Kromatografisi
GC/MS	Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi
HC	Hiper-Çapraz Bağlı
HEMA	2-hidroksietil Metakrilat
HIV	İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HSCCC	Yüksek Hızlı Karşıt Akım Kromatografisi
HTLC	Yüksek Sıcaklıklı Sıvı Kromatografisi
ICP/MS	İndüktif Eşleşmiş Plazma/Kütle Spektrometresi
IR	Kızıl Ötesi Spektroskopi
LC	Sıvı Kromatografisi
LC/MS	Sıvı Kromatografisi/Kütle Spektrometresi
MAH	Metakriloamidohistidin
MS	Kütle Spektrometresi
NA-PHEMAH	Naftilamin takılı poli(hidroksietil metakrilat-N-metakriloil-(L-histidin) metilester
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans



PHEMAH	Poli(hidroksietil metakrilat-N-metakriloil-(L-histidin) metilester
Poli(HEMA-MAH)	Poli(hidroksietil metakrilat-N-metakriloil-(L-histidin) metilester
PVAL	Polivinilalkol
RI	Reaktif İndeks
RP	Ters Faz
RPLC	Ters Faz Sıvı Kromatografisi
SBWC	Subkritik Su Kromatografisi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SFC	Süperkritik Akışkan Kromatografisi
TGA	Termogravimetrik Analiz
THF	Tetrahidrofur
TLC	İnce Tabaka Kromatografisi
UPLC	Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi
UV/VIS	Mor Ötesi/Görünür Bölge Spektroskopisi

## 1. GİRİŞ

Kumarin, (2H-1-benzopiran-2-on) fitokimyasal sınıfta uçucu bir organik bileşik olup, birçok bitki türünde ve özellikle tarçında oluşan doğal maddedir. Bazı bitkilerde doğal olarak bulunan bu bileşik sentetik olarak da üretilmektedir. Kumarin oldukça geniş bir kullanım alanına sahip olmakla birlikte özellikle kendine has kokusundan dolayı gıdalarda katkı maddesi ve kozmetik alanındaki birçok üründe bileşen olarak kullanılmaktadır. Doğal kumarin içeren gıdalar oldukça güvenli olmasına rağmen, gıda maddelerinde katkı maddesi olarak kullanılması karaciğer ve böbrekte yaptığı toksik etkiden dolayı oldukça sınırlandırılmıştır. Kumarinlerin kromatografik olarak ayrılması ile ilgili literatürde birçok analiz metodu kullanılmaktadır. Kullanılan analiz metotları arasında en etkili ayırma yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile yapılan ayırmadır. Sıvı kromatografisinde (LC), ters faz sıvı kromatografisi (RPLC) günümüzde oldukça popüler bir analitik teknik olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte geleneksel RPLC kullanımı için organik çözücüler gerekmektedir ve dünya çapında sadece kromatografik ayırımlar için dahi muazzam bir çözücü tüketimi mevcuttur. 2006 yılından günümüze kadar yaklaşık 130.000 HPLC cihazı kullanılmakta ve bu sıvı kromatografilerinin yaklaşık %71'ini oluşturmaktadır. Bununla birlikte yılda 16.000 yeni HPLC satılmaktadır. Genel olarak bir HPLC haftada 20 saat çalışmakta ve tek bir HPLC yılda ortalama 60 litre çözücü harcamakta ve 60 litre atık meydana getirmektedir (Genellikle, asetonitril, metanol, izopropanol, hekzan ve diğer tampon çözücüler). Bu analitik HPLC'lerin mobil faz ihtiyacını karşılamak için yılda 8.000.000 litre çözücü üretilmektedir. HPLC'de kullanılan bu organik çözücüler toksik ve pahalı olmasının yanında ayırım sonunda oluşan atıklar çevre ve insan sağlığı açısından oldukça tehditkâr ve bu atıkların giderim maliyeti de bir o kadar yüksektir. Gelişmekte olan ülkelerde teknolojinin kontrolsüz kullanımı sonucu ortaya çıkan en büyük problemlerden biri, belki de en önemlisi endüstriyel atık suların oluşturduğu kirliliktir. Dolayısıyla, bu çevresel kaygılar nedeniyle alınan katı tedbirler ile daha da önem kazanan ayırma, saflaştırma ve tayin metotlarında katı/sabit faz olarak kullanılmak üzere, "doğa ile dost" ürünler ile ilgili araştırmalara

ve bu ürünlerin kullanımlarının yaygınlaştırılmasına büyük önem verilmektedir. Özellikle çevre ile ilgili kaygılar nedeniyle bu amaç doğrultusunda konuya duyarlı kuruluşlar önemli bütçeler ayırmaktadır. Literatürde yeşil kromatografi olarak da nitelendirilen ve son yıllarda dünyada oldukça ilgi duyulan subkritik su kromatografisi (SBWC) eluent olarak saf suyun kullanıldığı bir kromatografi tekniğidir. Ayırma, saflaştırma ve tayin metotlarında aranan özelliklerden bazıları; hassasiyet, seçicilik, hız, düşük maliyet olarak belirtilebilir. Subkritik su kromatografisi gösterdiği bu özellikler, çevre dostu ve ekonomik olması nedeniyle yeşil kimya alanında gitgide önem kazanmaktadır.

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

### 2.1 Kromatografi

Kromatografi 1903 yılında Rus bilim adamı Tswett tarafından keşfedilmiştir. Tswett bitki pigmentlerini ayırmak için kromatografiyi kullanmıştır. Yaptığı çalışmada toz kalsiyum karbonat ile doldurulmuş bir cam kolon kullanmıştır. Bu cam kolondan bitki pigmentlerini içeren çözeltiyi geçirerek klorofil ve ksantofil gibi birçok bitki pigmentini ayırmayı başarmıştır. Ayrılan maddeler kolonda renkli bantlar halinde gözüktüğü için yönteme kromatografi adını vermiştir (Skoog vd., 1998).

Kromatografi, bir karışımdaki iki ya da daha fazla bileşenin, hareketli (taşıyıcı) bir faz yardımıyla, sabit (durgun) bir faz arasından değişik hızlarda hareket etmeleri esasına dayanır. Ayrılabacak bileşenler, sabit ve hareketli fazda farklı dağılıma ve tutunma özellikleri gösterdiğinden, kolonu farklı sürelerde terk ederler.

Kromatografide durgun faz, bir katı veya katı yüzeyine kaplanmış bir sıvı fazdır. Durgun fazın üzerinden akan hareketli faz ise bir gaz veya sıvı fazdır. Hareketli fazın sıvı olduğu kromatografi türüne Sıvı Kromatografi (LC); hareketli fazın gaz olduğu kromatografi türüne ise Gaz kromatografi (GC) denir. GC, gaz, uçucu sıvı ve katı karışımlar için uygulanan bir tekniktir. Sıvı kromatografi ise özellikle ısı olarak kararsız ve uçucu olmayan örnekler için uygulanmaktadır.

Bir kantitatif analiz tekniği olan kromatografide amaç, anlamlı bir süre içinde iyi bir ayırma yapmaktır. Ayırmayı etkileyen parametreler aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- Kolon ile ilgili olanlar: türü, boyutları
- Hareketli faz ile ilgili olanlar: türü, bileşimi, akış hızı
- Ölçüm ile ilgili olanlar: dedektör türü, dalga boyu vb.
- Örnek ile ilgili olanlar: örnek derişimi, örnek hacmi.

Kromatografik yöntemlerle, kimyasal ve fiziksel özellikleri birbirine çok yakın bileşenlerden oluşan karışımları, tümüyle, kolayca ve kısa sürede ayırmak olanaklıdır (URL- 1).

## **2.2 Kromatografik Metotların Sınıflandırılması**

Kromatografik metotlar üç farklı şekilde sınıflandırılmaktadır.

- Ayrılma Mekanizmalarına Göre
- Uygulama Biçimine Göre
- Faz Tipine Göre

### **2.2.1 Ayrılma mekanizmalarına göre**

Kromatografik metotlar, numunenin kolonda farklı şekilde tutunması ve ayrılmasına göre sınıflandırılabilir. Bu yöntemler;

- Adsorpsiyon Kromatografisi
- Dağılma Kromatografisi
- İyon Değiştirme Kromatografisi
- Jel Filtrasyon (Moleküler Eleme) Kromatografisi
- İyon Çifti Kromatografisi
- Afinite Kromatografisi

### **2.2.2 Uygulama biçimine göre**

Kromatografik metotlar, numuneye uygulanan ayırma yöntemine göre sınıflandırılabilirler. Bu yöntemler;

- Düzlemsel Kromatografi
- Kağıt Kromatografisi
- İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)
- Kolon Kromatografisi
  - Süperkritik Akışkan Kromatografisi (SFC)
  - Subkritik Su Kromatografisi (SBWC)

### **2.2.3 Faz tipine göre**

Kromatografik metotlar, sıvı ve gaz olmak üzere, hareketli fazın tipine göre sınıflandırılabilir.

- Sıvı Kromatografisi
  - Sıvı-Katı Kromatografisi
  - Sıvı-Sıvı Kromatografisi
- Gaz Kromatografisi
  - Gaz-Katı Kromatografisi
  - Gaz-Sıvı Kromatografisi

### **2.3 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)**

Sıvı kromatografi (LC) bir ayırma tekniğidir. Bir sıvıda çözülmüş ayrılacak bileşenler, bir kolon içerisinde bulunan genellikle katı bir destek üzerindeki sabit faz ile farklı etkileşmelere girerek, kolon içinde değişik hızlarda ilerler. Kolonu değişik zamanlarda terk ederler ve böylece birbirlerinden ayrılırlar.

Sıvı kromatografisinin özel bir uygulaması olan yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yönteminde, hareketli faz sıvı ve sabit faz ise çok küçük katı parçacıklardan oluşur. Sabit faz olarak kullanılan parçacık boyutlarının önemli ölçüde küçültülmesiyle hareketli faz ile etkileşen sabit faz yüzey alanı büyür ve böylece kolonun etkinliği artırılmış olur. Çok sıkı bir şekilde doldurulmuş kolonda uygun akış hızları elde edebilmek için, sıvıya birkaç yüz psi'lik veya daha yüksek bir basınç uygulanması gerekir. Bu şekilde elde edilen sıvı kromatografi sistemlerine kullanılan yüksek basınçtan ve artırılmış performanslarından dolayı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) adı verilir.

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi, esas olarak gaz kromatografisine benzer. Hızlı, tekrarlanabilir, doğru ve klinik laboratuvarlarda az miktar numuneyle çalışma olanağı sağlayan bu iki kromatografi yöntemi son yıllarda büyük gelişmeler göstermişlerdir. Ancak gaz kromatografisinde hareketli faz olarak kullanılan gazın ayırmayı etkileyici bir özelliğinin bulunmamasına karşılık HPLC'de hareketli faz olarak kullanılan çözücülerin ayırmayı etkileyici özelliklerinin bulunması, gaz kromatografisinde sadece uçucu olan ya da uçucu hale gelebilen maddelerin analiz edilebilmesi, HPLC'nin daha geniş bir kullanım alanına sahip olmasını sağlamaktadır.

Yüksek performanslı sıvı kromatografisinde durgun faz ile hareketli fazın bağıl polaritelerine göre normal faz ve ters faz olarak belirtilen iki tip dağılma kromatografisinden bahsedilir. Normal faz sıvı kromatografisi durgun fazın polar, hareketli fazın ise daha çok n-hekzan ve n-pentan gibi apolar çözücülerin olduğu kromatografi sistemidir. Bu sistemde polarlığı en az olan numune kolondan ilk önce çıkar. Ters faz sıvı kromatografisi (RPLC) günümüzde oldukça popüler bir sıvı kromatografisi tekniği olarak kullanılmaktadır (Skoog vd., 1998; Özcan, 2010; Orbey vd., 2012; URL-1).

#### **2.4 Ters Faz Sıvı Kromatografisi (RPLC)**

Ters faz sıvı kromatografisinde (RPLC), durgun faz apolar bir hidrokarbon; hareketli faz ise nispeten polar olan bir çözücüdür. Ters faz tekniğinde polarlığı en çok olan bileşen kolondan ilk önce çıkar ve hareketli fazın polarlığı arttıkça elüsyon zamanı da artar.

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile yapılan bütün ayırma işlemlerinin dörtte üçünden daha fazlasının oktil veya oktildesil siloksan bağlı dolgu maddesi bulduran ters faz sıvı kromatografisi ile yapıldığı söylenebilir. Bu tür dolgu maddelerinde uzun zincirli hidrokarbon grupları parçacık yüzeyine dik ve birbirine paralel olacak şekilde hazırlanır; böylelikle apolar bir hidrokarbon yüzey elde edilmiş olur. Bu dolgu maddeleri ile kullanılan hareketli faz ise, genellikle çeşitli konsantrasyonlarda metanol, asetonitril veya tetrahidrofur gibi çözücülerini içeren sulu çözeltilerdir (Skoog vd., 1998).

Normal faz ile ters faz sıvı kromatografisi arasındaki en büyük fark, ters faz sıvı kromatografisinde hareketli faz içinde su kullanılmasıdır. Şart olmamakla beraber, bol ve ucuz olan suyun kullanılması kromatografiye gerçekten büyük avantajlar sağlamaktadır (Özçimder ve Demirci, 2004).

#### **2.5 Yüksek Sıcaklık Sıvı Kromatografisi (HTLC)**

Yüksek sıcaklık sıvı kromatografisi (HTLC), ortam sıcaklığının üzerinde (40 °C) ve süperkritik sıcaklığın altında (374 °C) yer almaktadır. Yüksek sıcaklık sıvı kromatografisi, subkritik su kromatografisinin organik çözücü kullanılan hali olarak düşünülebilmekte ve alternatif olarak saf suyun elüsyon gücü yüksek sıcaklıkta

mobil faz olarak organik çözücü-su karışımı kullanılarak da ayarlanabilmektedir (McNeff vd., 2007; Yang, 2007a).

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi parametreleri ve genel koşullar göz önüne alındığında bir kromatografik ayırım yaklaşık 6-60 dakika (dk) gerektirmekte ve geleneksel HPLC'de uzun alıkonma zamanından dolayı çözücü tüketimi de zamanla orantılı olarak yüksek olmaktadır. Analitik tekniklerdeki amaç; süreyi ve maliyeti azaltmak için iyileştirmeler yapmaktır. Nanopartiküllerle kaplı kısa kolonlarla LC ayırımlarının hızı ve seçiciliği geliştirilebilmektedir. LC'yi hızlandırmanın bir diğer yolu da yüksek sıcaklık uygulamaktır. Artan sıcaklıkla mobil fazın viskozitesinin azalması daha yüksek akış hızında analiz yapılmasına olanak vermekte ve buna bağlı olarak kromatografik ayırım süresi oldukça kısalmaktadır (Wenclawiak vd., 2008).

Sıcaklığın artması sıvıların dielektrik sabitini azaltmaktadır. Bu da sıcaklığın uygun yükseltildiği sürece mobil fazdaki organik çözücü oranını azaltmasına izin vermektedir. Genel bir kural olarak sıcaklıktaki 2-6 °C'lik artış, mobil fazdaki organik çözücü miktarının %1 azaltılmasına karşılık gelmektedir. Böylece artan sıcaklık analiz sonrası oluşacak atığın bertaraf maliyetinin azaltılmasına önemli ölçüde katkı sağlamaktadır (McNeff vd., 2007).

LC ayırımlarını optimize ederken kullanılan mobil fazın bileşimine, pH değerine ve iyonik gücüne; durgun fazın tipine, partikül büyüklüğüne, gözenek boyutuna ve maddelerin en iyi şekilde ayırımı sağlamak için kolon çapına dikkat edilmelidir. Ancak sıcaklık LC ayırımlarında bir diğer önemli parametredir ve RPLC'de artan sıcaklıkla elüentin viskozitesi azaldığı için analitlerin difüzyonu ve kütle transferi artmakta, yüksek sıcaklıkta iyi ayırımlar elde edilmektedir (Yang, 2006).

Artan kolon sıcaklığı, analiz süresinin kısılmasında, alıkonma zamanının değişmesinde, seçiciliğin kontrolünde, dedektör sinyalinin iyileştirilmesinde veya etkinliğin değişmesinde rol alabilmektedir. Sıcaklık, seçiciliği belirgin bir şekilde etkilemektedir. Seçiciliği ayarlamak için mobil fazın pH'ından ziyade sıcaklığının tercih edilmesinin sebepleri aşağıda belirtilmiştir.

- Alıkonma ve sıcaklık arasındaki ilişki pH'a göre daha güvenilirdir.
- Sıcaklık çok esnek ve pH'a göre kolay ayarlanabilir bir parametredir.

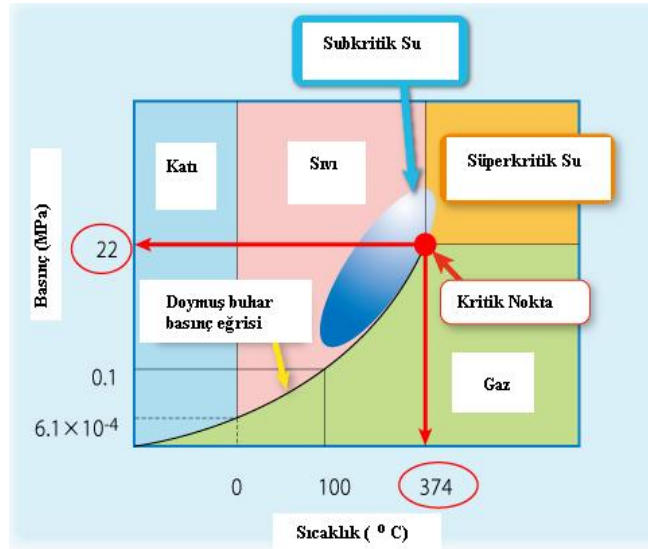


- Mobil fazın pH'ı yerine sıcaklığını ayarlamak daha güvenilir analizlerin gerçekleşmesini sağlamaktadır.
- Tampon çözelti hazırlamadaki küçük bir hata pik çözünürlüğünün azalmasına yol açarken, sıcaklıktaki küçük bir değişim pik çözünürlüğünün ve ayırımın iyileştirilmesi için yeterli olabilmektedir (Heinisch ve Rocco, 2009).

## 2.6 Subkritik Su Kromatografisi (SBWC)

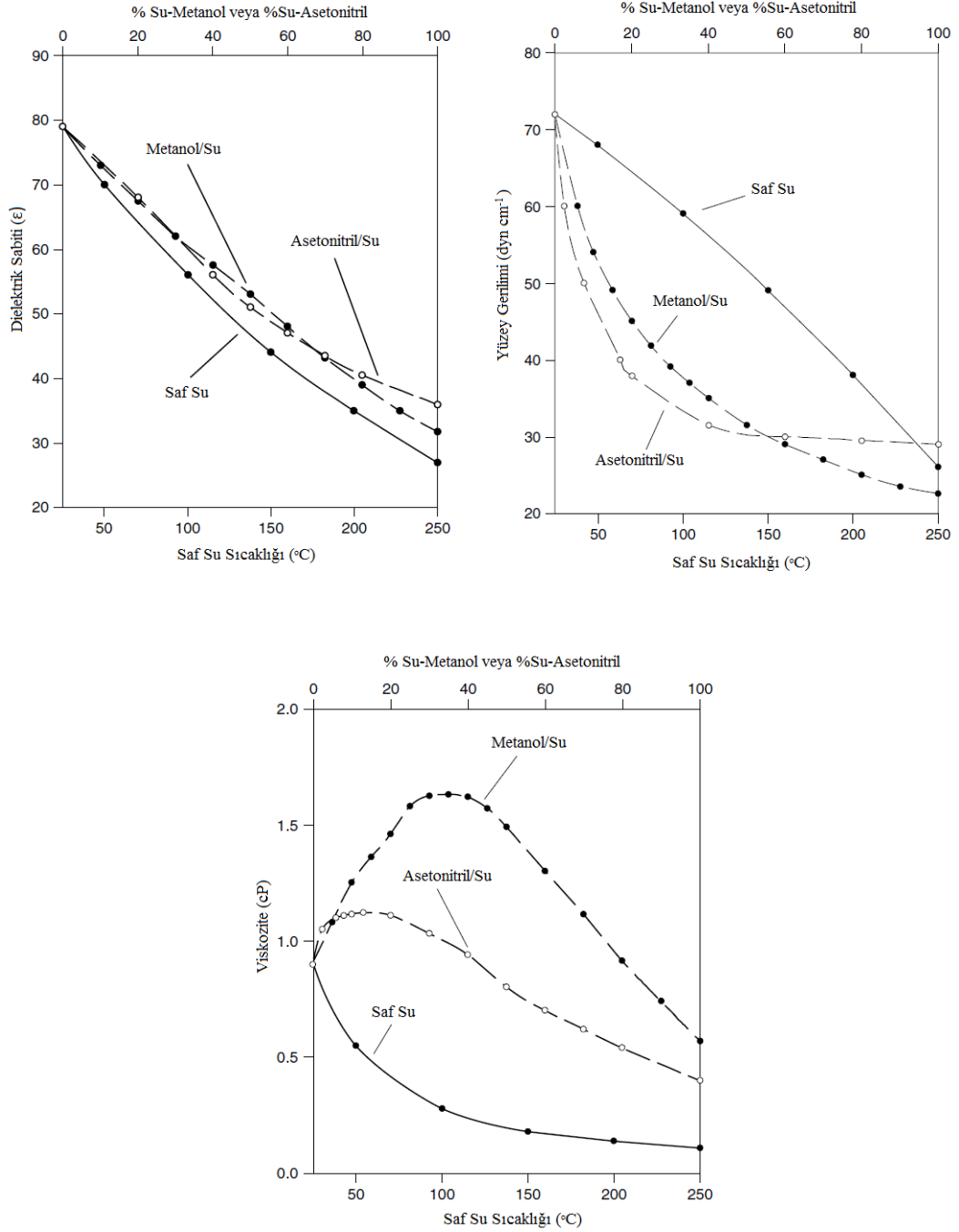
### 2.6.1 Subkritik su

Su, kaynama sıcaklığı ile kritik sıcaklığı arasında subkritik su (Şekil 2.1) olarak adlandırılmaktadır. Su normal şartlarda oldukça polar bir yapıya sahiptir ve bu şartlarda polar maddeler ve tuzların çoğu için mükemmel bir çözücü özelliği göstermektedir.



Şekil 2.1: Subkritik suyun faz diyagramında gösterilmesi.

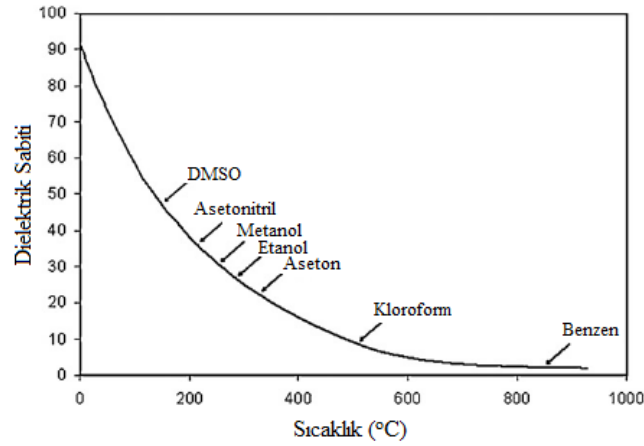
Suyun sıcaklığının artırılması ile dielektrik sabiti, difüzyon hızı, viskozitesi ve ayrışma sabiti gibi fizikokimyasal özelliklerinde değişim meydana gelmektedir (Şekil 2.2). Sıcaklığın artırılması ile suyun difüzyon hızı artmakta, viskozitesi ve yüzey gerilimi azalmakta bununla birlikte polaritesinin azalması suyun apolar yapıdaki molekülleri çözme gücünün artmasına neden olmaktadır. Subkritik suyun mükemmel yapısı ile fiziksel özellikleri ayarlanabilmektedir (Yang vd., 2007b).



**Şekil 2.2:** Suyun bazı fiziksel özelliklerinin sıcaklık ile değişimi (Yang ve Kapalavavi, 2011).

Subkritik su kromatografisi (SBWC), sıvı kromatografisinde yürütücü faz olarak subkritik suyun kullanıldığı kromatografi türüdür. Subkritik su kromatografisinin pek çok potansiyel avantajı vardır. Bunlar arasında artan analiz hızı, gelişmiş bir ayırım ile azalan ve minimuma indirilen organik çözücü sarfiyatı özellikle belirtilebilir. Saf suyun eluent olarak kullanılması sıvı kromatografisinde en uç nokta olarak belirtilebilir, nitekim subkritik su için “ Ayırma biliminde kullanılacak nihai yeşil

çözücü” tanımı yapılmaktadır. Sıvı kromatografisinin en yaygın kullanılan tekniği olan ters-faz sıvı kromatografisinde (RPLC), metanol, asetonitril veya tetrahidrofuran (THF) gibi su ile karışabilen organik çözücüler kullanılmaktadır. Kullanılan bu organik çözücüler yalnızca toksik ve yanıcı değil aynı zamanda ayırım sonunda meydana getirdikleri atık miktarından dolayı oldukça pahalı ve çevreye zararlı bir durum oluşturmaktadırlar. Bu yüzden saf suyun eluent olarak kullanılması büyük bir fırsat yaratmakla birlikte, ucuz ve çevre dostu bir bileşik olması suyun kromatografide eluent olarak kullanılmasını avantajlı kılmaktadır. Normal şartlarda saf suyun yüksek polariteye sahip olması, oldukça düşük yürütücü (elutropik) güce sahip olması suyun RPLC’de etkili bir eluent olmasını engellemektedir (Allmon ve Dorsey, 2009). Bununla birlikte suyun dielektrik sabiti artan sıcaklıkla birlikte dikkat çekici bir şekilde azalmaktadır. Dielektrik sabiti suyun polaritesi ile ilgili olup, dielektrik sabitinin değişmesinden dolayı belirlenen sıcaklıkta su, su-organik çözücü karışımı gibi davranabilmektedir. Suyun sıcaklığının 150 °C’nin üzerine çıkarılmasıyla suyun dielektrik sabiti normal koşullardaki Dimetilsülfoksitin (DMSO) dielektrik sabitine yakın bir değer almaktadır (Şekil 2.3). Benzer şekilde suyun sıcaklığının 200-250 °C arasında bir değerde tutulmasıyla suyun dielektrik sabiti asetonitril ve metanolün dielektrik sabitine yaklaşmaktadır (Prini, 1997).



**Şekil 2.3:** Suyun dielektrik sabitinin sıcaklıkla değişimi (Carr vd., 2011).

Suyun sıcaklığının artırılması sadece dielektrik sabitini değiştirmemekte aynı zamanda artan sıcaklıkla bağlı enerji yoğunluğu ve hidrojen bağları asiditesi de azalmaktadır ve bu değişimlerden dolayı saf su daha az polar organik çözücülerle benzer özellikler gösterebilmektedir (Carr vd., 2011). Bununla birlikte suyun normal koşullardaki ve subkritik koşullardaki termodinamik özellikleri hidrojen bağlarının

gücü ve yapısı ile açıklanabilmektedir. Sudaki hidrojen bağları kendi içinde ilişkilendirilebilir, su molekülleri arasındaki hidrojen bağlarının gücü ortamda bulunan diğer hidrojen bağlarından etkilenmektedir. Hidrojen bağlarındaki küçük değişimler dielektrik sabitini ve buharlaşma ısını etkilemektedir. Düşük sıcaklıklarda hidrojen bağları güçlü ve suyun dielektrik sabiti yüksektir. Suyun sıcaklığının artmasıyla birlikte su moleküllerindeki hidrojen bağında bir zayıflama ve buna bağlı olarak suyun polaritesinde azalma meydana gelmektedir. Bu etkiler sayesinde hidrofobik bileşiklerin çözünürlüğünde artış olmaktadır. Polar olmayan organik bileşiklerin çözünürlüğünün subkritik su ortamında artması sadece dielektrik sabitinin düşmesine bağlı değil aynı zamanda çözünen ile çözücü arasındaki bir takım kompleks molekül içi etkileşimlerden de kaynaklanmaktadır. Kompleks moleküller arası etkileşimler sıcaklığa bağlı olarak farklı çözünürlük davranışı gösterebilmektedir. Organik bileşiklerin subkritik su şartlarındaki çözünürlüğünde, birbirine zıt etki yaratan iki farklı etkin süreç (pozitif ısı- negatif ısı) rol oynamaktadır. Çözünürlüğün pozitif ısı (yürütücü kuvvet) suda kavite oluşumu esnasında meydana gelen ısıdan, negatif ısı ise hidrojen bağlarının çözücü molekülleri etrafındaki kafes ya da buzdağı şeklindeki yapılarından kaynaklanmaktadır. Bu süreçlerden kafes oluşum modeli etkinse suyun sıcaklığının artması ile çözünürlük azalmakta ancak kavite oluşum ısı, kafes oluşum ısından fazla ise sıcaklığın artması ile çözünürlük artmaktadır. Bir çok literatür çalışması göstermektedir ki 160 °C ve üzerindeki sıcaklıklarda polar olmayan organik bileşiklerin çözünürlükleri önemli derecede artmaktadır. Bu hızlı artış kavite oluşum ısısının kafes oluşum ısısına göre oldukça fazla etkin olduğunu göstermektedir (Prini vd., 1991; Nezbeda ve Pavlicek, 1996; Miller vd., 1998a,b; Cafferena ve Grigera 2004; Nakahara vd., 2001).

Subkritik suyun dielektrik sabiti, yüzey gerilimi ve viskozitesi gibi fizikokimyasal özellikleri geniş bir çalışma aralığında ayarlanabilmektedir. Suyun sıcaklığının arttırılmasıyla bu fiziksel özelliklerin sayısal değerleri dikkat çekici bir şekilde azalmaktadır. Sıcaklığın arttırılması sonucu önemli derecede azalan suyun viskozitesi ile birlikte sistem geri basıncı da oldukça düşmekte ve düşen geri basınç sayesinde yüksek hızda mobil faz akışıyla hızlı ve iyi ayırım yapılabilir. Bununla birlikte yüksek ayırma sıcaklığı ile düşük molekül ağırlığına sahip analitlerin ayrılmasında alıkonma zamanı düşürülebilmekte ve kısa analiz süresine olanak sağlamaktadır.

Yüksek sıcaklık ve hızlı elüsyon birlikte kullanıldığında ayırma süresi oldukça kısalmaktadır. Sıcaklıkla değişen bir diğer parametre suyun ayrışma sabitidir. Suyun ayrışma sabiti su sıcaklığının 25-250 °C arasında tutulmasıyla önemli derecede arttırılabilir ancak sıcaklığın 250 °C'nin üstünde tutulduğu şartlarda ayrışma sabiti değeri azalma göstermektedir. Bunun anlamı subkritik su, normal şartlardaki su ile kıyaslandığında kuvvetli asit ve kuvvetli baz davranışı gösterebilmektedir. Bu konuda çok detaylı araştırma yapılmış olmamasına rağmen protonca zengin subkritik suyun çözünenlerin alıkonma ve bozunmalarını önemli derecede etkilediği düşünülmektedir (Yang vd., 1998, 2007a).

Subkritik su şartlarında uygulanan basınç suyu belirlenen sıcaklık şartlarında sıvı fazda tutmaya yaramaktadır. Basınç polar olmayan organik bileşiklerin çözünürlüğü üzerine ihmal edilebilecek düzeyde bir etkiye sahiptir, hatta ortamın basıncının arttırılması ile organik bileşiklerin çözünürlüklerinin çok az derecede azaldığı tespit edilmiştir. Subkritik su kromatografisi özellikle son on yılda dikkat çekici bir şekilde önem kazanmaya başlamıştır. Çevre dostu bir işlem olmasının yanında suyun fiziksel özelliklerinin sıcaklıkla değişiyor olması kromatografik çalışmalarda aşağıda belirtilen özelliklerin mümkün olmasını sağlamaktadır;

- Yüksek ayırma hızı sağlanması (Düşük geri-basınç)
- Ayrımda uzun kolon kullanılmasına olanak vermesi
- Geliştirilebilen kolon etkinliği oluşturması
- Geniş aralıkta dedektör seçimi

Subkritik su kromatografisinde yüksek sıcaklıkla çalışılması nedeniyle analitlerin bu şartlarda kararlı olması beklenir. Bazı organik bileşikler uzun tutulan ısıtma sürelerinden dolayı bozunmaya uğrasalar dahi çoğu analitler yüksek sıcaklıktaki kromatografik ayrımlarda kararlı olabilmektedirler. Artan sıcaklıkla birlikte kısalan analiz süresi sayesinde analit minimum düzeyde yüksek sıcaklığa maruz kalmakta ve bozunma olasılığı en düşük seviyede tutulmaktadır. Suyun polaritesinde artan sıcaklıkla azalma olmasına rağmen, 100 °C'deki elüsyon gücü çoğu analitler için hala yetersiz olmaktadır. Bu yüzden subkritik su şartlarında başarılı bir ayırmanın yapılabilmesi için sıcaklık aralığının 100-200 °C arasında tutulması gerekmektedir. (Hartonen ve Riekkola, 2008).

## 2.6.2 Subkritik su kromatografisinde kolon sistemleri

Subkritik su kromatografisinde kullanılan kolonlar dolgu maddeleri içeriklerine göre sınıflandırılabilir. Silika merkezli RP kolonlar çok kullanılmalarından ve etkili ayırım yapmalarından dolayı SBWC'de oldukça fazla kullanılmaktadır. BDS-Hypersil, Nucleosil- C18 AB, Chrompack ODS, MS Xterra C18, Zorbax, Spherisorb ODS2, Kromasil C18, Luna C18 vb. kolon çeşitleri silika merkezli dolgu maddeleri içermektedir. Silika merkezli bu kolonlar genellikle 50 ile 150 °C sıcaklık aralığında çalışabilmektedir. Ancak saf suyun 100 °C civarında elüsyon gücü hala zayıf olduğundan etkili bir ayırım yapmak için sıcaklığın 100-200 °C aralığında tutulması gerekmektedir. Silika merkezli kolonlar 80 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda hidrolize başlamakta, bazik koşullara (> pH=8,5) karşı kararlılıkları sınırlanmaktadır. Yine de silika jel iyi kolon etkinliği sağladığından 80 °C'ye kadar HTLC için uygun olmaktadır. 80 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda ve özellikle su miktarının çok yüksek olduğunda silika jel çözülmeye başlamakta ve buna bağlı olarak kolon ömrü oldukça kısalmaktadır.

Yüksek sıcaklıklarda yapılan çalışmalarda silika merkezli kolonlarda bazı problemlerle karşılaşılmasından dolayı zirkonyum merkezli kolonlar geliştirilmiştir. Bu kolonların, mobil faz olarak organik çözücü-su karışımı kullanıldığında yüksek sıcaklıklarda daha fazla dirençli ve kararlı oldukları tespit edilmiştir. Zirkonyum merkezli kolonların en büyük avantajları pH=1-14 aralığındaki kararlılıkları ile silika jel üzerindeki silanol grupların asidik özellik göstermemesi ve zirkonyum oksitinin uygulama olanakları genişletilerek farklı malzemelerle, ve polimerlerle kaplanabilmesidir. Bu yüzden bu tip kolonlar SBCW'de diğer kolon tipleri arasında alternatif bir tür olabilmektedir. Zirkonyum merkezli kolonlarda ayırma sıcaklığı 100-200 °C arasında değişmekle birlikte en yüksek çalışma sıcaklığı 370 °C olarak belirlenmiştir. SBWC'de en popüler kullanılan zirkonyum merkezli kolon ZirChrom-PBD olmakla birlikte ZirChrom- PS, ZirChrom- CARB ve ZirChrom Diamond Bond C18 çeşitleri de mevcuttur.

Polimer bazlı kolonların uzun zamandır yüksek sıcaklıklarda jel filtrasyon kromatografide kullanılmaları bu tür kolonların subkritik su şartlarında oldukça kararlı olmaları beklentisini doğurmuştur. SBWC'de geniş çaplı kullanılan polimer içerikli kolonlar PRP- 1 ve PLRP- S kolon türleridir. Bu tarz kolonların ayırım

sıcaklığı 100-200 °C arasında değişmekte ve yüksek sıcaklıkta termal kararlılık gösterdikleri bilinmektedir. Ancak bu özelliklerinin aksine kolon verimliliği silika merkezli ve zirkonyum merkezli kolonlara göre daha zayıf olmaktadır. Bu dezavantaj sadece ortam sıcaklığında geçerlidir ve yüksek sıcaklıkta difüzyon oranı artmakta, mobil faz viskozitesi azalmaktadır. Son zamanlarda yüksek sıcaklıkta ters fazda kullanılmak üzere ET- RP1 faz Shodex firması tarafından piyasaya sürülmüştür. Ters faz özellikli yeni polimerik faz ET- RP1, yüksek sıcaklıkta ve yüksek akış hızında geleneksel ters faz kolonlar ile kıyaslanabilir bir etkinlik göstermektedir ve yüksek sıcaklıkta kararlıdır. LC ve LC/MS'de bazı farmasötik örneklerin analizinde kullanılmıştır. Bu özgün faz yüksek sıcaklık ve yüksek pH'da fiziksel ve kimyasal kararlılık ile kolon performansı olarak verimlilik ve inertlik açısından eşsiz özellikler sergilemektedir. Zhang ve arkadaşları hiper-çapraz bağlı (HC) polimerlerle kaplı silika bazlı yeni RPLC kolon dolgu malzemesini geliştirmişlerdir. Yeni sabit faz seçicilik, kararlılık ve verimlilik gibi 3 önemli parametre üzerine tasarlanmıştır. HC faz, asidik olarak kararlı ticari RPLC fazlardan daha yüksek asit kararlılığı göstermektedir. Silika bazlı, asit kararlı HC fazlar, ilgi çekici kromatografik özellikleri ile özellikle de yüksek sıcaklıklarda ve asidik ortamda bazların ve biyolojik analitlerin ayrımında çok kullanışlı olmaktadır. HC fazların seçicilik çeşitliliği ve yüksek asit kararlılığı, yüksek sıcaklıkta farmasötikler, hidrofobik aminler, protein ve peptitler de dahil olmak üzere ultra hızlı ayrımlarla çeşitli uygulamalara olanak sağlamaktadır.

Poröz grafit karbonların yüksek sıcaklıkta yüksek termal kararlılığa sahip olmalarından dolayı SBCW'de kullanımları incelenmiş ve 225 °C sıcaklıkta Hypercarb kolonlar bazı polar moleküllerin kromatografik ayrımında kullanılmıştır. Hypercarb, %100 karbon olduğu için kimyasal bağ içermemekte ve kimyasal olarak oldukça kararlı olduğundan yüksek sıcaklık şartlarında dahi analitleri oldukça kuvvetli tutabilmektedir. Hypercarb kolonlar SBWC'nin kinetik ve termodinamik davranışlarını açıklamada kullanılmıştır. Ancak poröz grafit karbon son derece aktif bir yüzeye sahip olduğu için kirlenmekte ve pik şekillerinin asimetric olmasına neden olmaktadır. Termal kararlılıklarına rağmen kolon performansları, paslanmaz çelik kolon malzemesi ile poröz grafit karbonun termal genişlemelerindeki farklılıklardan ve mekanik stresten dolayı zamanla azalmaktadır.

Yeni tip HPLC kolon materyali Kanazawa ve arkadaşları tarafından geçtiğimiz on yıl içinde geliştirilmiştir. Saf suyun eluent olarak kullanıldığı ayırmalarda sabit faz değişen sıcaklık veya pH'a bağlı olarak hidrofilik durumdan hidrofobik duruma veya yüklü durumdan yüksüz duruma değişebilmektedir. Bu sayede çözünen maddelerin alıkonması sıcaklık veya pH'a bağlı olarak kolaylıkla kontrol edilebilmektedir. Ayırma sıcaklığı 5-50 °C arasında değişen bu tip kolonlar ile biyomoleküler ve ilaçların ayırımı yapılabilmektedir.

Synovec ve arkadaşları normal şartlardaki suyun eluent olarak kullanıldığı ters faz ayırmalarında başarıya ulaşmak için, sabit fazın poröz olmayan cam tanecikleri veya silika ile kaplandığı özel bir kolon materyali geliştirmişlerdir. Normal şartlardaki suyun elüsyon gücü oldukça zayıf olduğundan analitlerin alıkonma sürelerini kısaltmak için mobil faz hacmine nispeten sabit faz hacim oranı azaltılmıştır. Normal şartlardaki saf su ile başarılı kromatografik ayırmalar yapabilmek için daha polar olan siyano propil sabit fazını içeren Spheri- 5 kolon türleri kullanılmaktadır (Bruckner vd., 1997; (Yang vd., 1999, 2002, 2003); Kephart ve Dasgupta, 2002; Kondo vd., 2002; Saha vd., 2003; Guillamme vd., 2004; Kanazawa vd., 2006; Teutenberg vd., 2006; Pereira, 2007; Smith, 2008; Vanhoenacker vd., 2010; Wenclawiak vd., 2008; Zhang vd., 2012).

### **2.6.3 Subkritik su kromatografisinde dedektör sistemleri**

Ters faz sıvı kromatografisi (RPLC) ile analiz yapılırken organik çözücü kullanımından dolayı seçilecek dedektörün bu çözücülere tepkisi sınırlı olmaktadır, örneğin refraktif indeks (RI) dedektör geleneksel organik çözücü kullanımından dolayı RPLC'de kullanılmamaktadır. Sadece suyun eluent olarak kullanılmasıyla dedektör seçiminde önemli bir artış meydana gelmektedir. Literatür çalışmaları göstermektedir ki klasik HPLC ve subkritik su kromatografisi çalışmalarında en sık kullanılan dedektör mor ötesi veya mor ötesi-görünür bölge spektroskopisi (UV veya UV/VIS) dedektörüdür. Yüksek sıcaklıkta mobil fazı sıvı halde tutmak ve dedektörün akış hücresine zarar vermemek için dedektör çıkışında bir geri basınç regülatörüne ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca dedektörün duyarlılığı, dedektöre gelen mobil fazın sıcaklığından etkilendiğinde sorun yaratmaktadır. Subkritik su kromatografisinde mobil faz 200 °C'nin üzerine kadar ısıtıldıktan sonra dedektöre gelmeden önce soğutulmalıdır. Çoğu uygulamada mobil fazı soğutmak için



laboratuvar ölçekli veya ev yapımı soğutucular kullanılmıştır. Dedektörden önce buzlu su banyosu yerleştirilmiş ve kapiler boru banyoya daldırılmıştır. Ancak rutin analizlerde sıcaklığın doğru bir şekilde kontrol edilmesi gerekmektedir. Teknik olarak da bu işlem Peltier soğutucu ile elde edilmektedir. Ayrıca mobil faz dedektöre ulaşmadan önce modern ısıtma sistemi mobil fazı soğutmaya izin vermelidir. Dedektörün çalışması belli bir maksimum sıcaklık ve basınç şartlarında gerçekleşeceği için analiz ve soğutma için gerekli şartların belirlenmesi gerekmektedir.

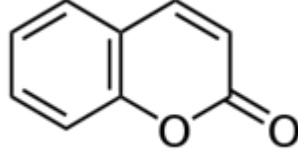
UV, SBWC’de çok kullanılan bir dedektördür ancak kromofor gruplar olmadan analitleri algılaması zorlaşmaktadır. Alev iyonlaştırmalı dedektör (FID) gibi bir GC dedektörü SBWC için ideal bir dedektördür. Çünkü SBWC- FID sistemi, SBWC-UV sisteminde olduğu gibi kolon sonunda soğutucu gerektirmemekte ve soğutucu döngüsünden kaynaklanan pik genişlemelerini de ortadan kaldırmaktadır. FID, HPLC ile kullanılmamaktadır, çünkü HPLC’de kullanılan organik çözücüler FID’de çok güçlü sinyallere sebep olmaktadır. Su, C- H bağı içermediği için, FID suya cevap vermemekte ve dolayısıyla mobil faz olarak su kullanıldığında FID, LC’de gaz faz dedektörü olarak çalıştırılabilmektedir.

UV ve FID’ye ek olarak çok pahalı olan Nükleer Manyetik Rezonans (NMR), Kütle Spektrometresi (MS), Kızılötesi Spektroskopi- Morötesi Spektroskopi- Nükleer Manyetik Rezonans- Kütle Spektrometresi (IR- UV- NMR- MS), İndüktif Eşleşmiş Plazma- Kütle Spektrometresi (ICP- MS), Yüklü Aerosol Dedektör (CAD) gibi dedektörler de test edilmiş ve çalışmalarda yer almıştır (Teutenberg, 2009; Yang ve Kapalavavi, 2011).

#### **2.6.4 Kumarinler**

Kumarin (2H-1-benzopiran-2-on), bir çok bitki türünde ve özellikle tarçında bulunan, doğal uçuculuğa sahip fitokimyasal sınıfta bir organik bileşiktir (Maggi vd.,2011). En çok vanilyaya benzeyen kokusuyla tanınır ve yeni biçilmiş çimlerin hoş kokmasının sebebi yapısında yer alan kumarin bileşimidir. Tonka fasülyesi, akasya, lavanta, lovage (yaban kerevizi), sarıyonca, geyikdili, kayısı, çilek, kiraz ve tarçını kapsayan pek çok bitkinin meyve, kabuk, gövde, yaprak ve dallarında, yeşil çayda bulunan doğal bir üründür. Kapalı formülü  $C_9H_6O_2$ , molekül ağırlığı 146.15 g/mol

olan kumarin, parlak, beyaz kristal yapılu bir maddedir. Erime noktası 68-70 °C ve kaynama noktası 297-299 °C dir. Kumarin kloroformda çözüldüğünde UV'de 272 nm'de maksimum absorpsiyon gösterir. Etanol, kloroform, dietiler ve yağlarda kolay çözünür, kaynar suda az, 20 °C 'deki suda çok az çözünmektedir (Sethna ve Shah, 1945). Kumarin ilk defa 1822 yılında Tonka fasüyesinden izole edilmekle beraber, 1868 yılından bu yana laboratuvarlarda sentezlenmekte ve pek çok amaç için kullanılmaktadır (Maggi vd., 2011).( Şekil 2.4).



**Şekil 2.4:** Kumarinin molekül yapısı (Rodrigues vd., 2008).

Çok yönlülüklerinden dolayı ilaç endüstrisinde antibiyotik, antiviral, antimikrobiyal ve antikoagulant ajan olarak, biyolojik sistemlerde pH indikatörü olarak ve bunun yanı sıra tıp biliminde kullanılmaktadır ( Karaliota vd., 2001; Georgieva vd, 2010). Tıpta kanın pıhtılaşmasını önlemesi sebebiyle kullanılırken, kumarin türevleri asetilkolinesterlerini inhibe ederek ve beyindeki asetilkolin miktarını artırarak öğrenme ve anlama hafıza fonksiyonları ile bağlantılı hastalıkların (Alzheimer ve Parkinson gibi hastalıklar) tedavilerinde kullanılabilirler (Zhou vd., 2010). Kumarin ve kumarin türevleri son zamanlarda potansiyel olarak kanser tedavisinde ve HIV inhibitörü olarak AIDS hastalığının tedavisinde de yer almaktadır. Damarlardaki kan akışını arttırmakta ve kapiler geçirgenliği azaltmaktadır. Kumarinin uzun süre yüksek dozda kullanılması toksik etki yaratmakta ve karaciğeri tahrip etmektedir (Rodrigues vd., 2008).

Kumarinler hoş kokulu olmaları nedeniyle parfüm sanayinde koku verici olarak kullanılmaktadırlar. Aynı zamanda hoş kokularından dolayı hoş gitmeyen kokuları maskelemek amacıyla da haricen kullanılmaktadır (Guenther, 1975).

Kumarinler; bilim ve teknolojinin farklı alanlarında kullanılmaktadır. Sentetik ipliklerin boyanmasında, kumarin türevleri doğrusal olmayan optiklerde, kumarinli polimerlerde, sürekli dalga modülasyonu için elektrooptik malzemelerde, diyot lazerlerin frekanslarını artırmada ve fotorefraktif malzemelerde, kromatografide belirteç olarak, protein çalışmalarında biyolojik alanda kullanılmaktadır. Kumarin ve

türevlerinin bu kadar fazla alanda kullanılmasının sebebi, antrasen ve piren aromatik halka sistemlerinden farklı halka yapılarına ve farklı absorpsiyon-emisyon özelliklerine sahip olmalarıdır (Nenkowich vd., 1997; Christie ve Lui, 1999; Kozyra vd., 2002).

### **2.6.5 Kumarinlerin analizi**

Endüstri, ilaç ve çevre alanında kumarinin çok kullanılması araştırmacıları kumarin ve türevlerini analiz yöntemlerini araştırmaya yöneltmiştir (O’Kennedy ve Thordes, 1997).

Kumarinlerin tanınmasında, ince tabaka kromatografisi kısa sürede sonuç alınması nedeniyle sık kullanılan bir yöntemdir. İnce tabaka kromatografisi (TLC) genellikle kolondan alınan örneğin anlaşılabilmesi için kolon kromatografisi ile birlikte kullanılır. TLC yönteminde adsorban olarak silika jel, çözücü sistemi olarak da toluen: etil format: formik asit (5: 4: 1), benzen: etilasetat (9: 1), benzen: metanol (9: 1) ve benzen: aseton (9: 1) karışımları kullanılmaktadır. Ayırma sonucu elde edilen lekeler UV ışığı altında incelenmektedir (Şener ve Mutlugil, 1987).

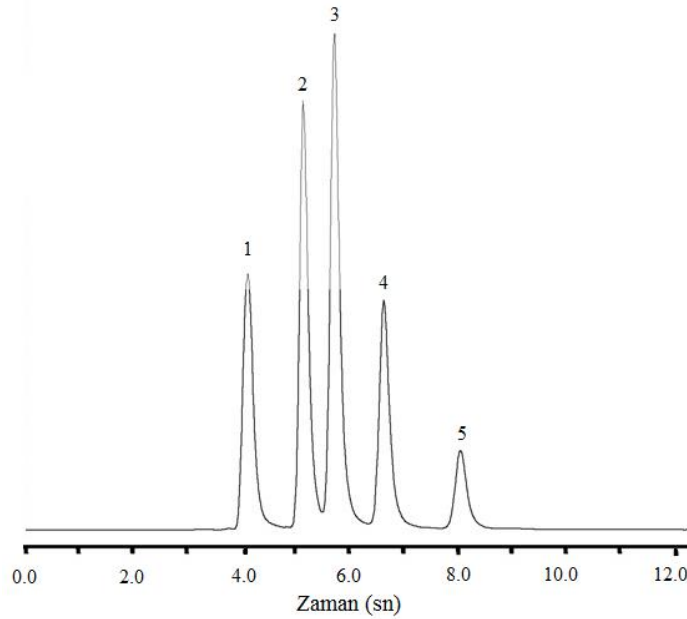
Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi moleküllerin fiziksel veya kimyasal farklılıklarından faydalanarak ayrılmalarını sağlar. HPLC ile ayırma, analitin polaritesinin derecesiyle ve analitin iki faz arasında dağılmasıyla sağlanır. Kumarinlerde *invivo* ve *invitro* metabolik çalışmalarında, bitki ekstraktlarında ve tatlandırıcılarla ilgili çalışmalarda HPLC yöntemine başvurulmaktadır. Ayırma, metanol ve asetonitril gibi farklı mobil fazlarla C18 ve C8 gibi çeşitli sabit fazlar üzerinde elde edilmektedir.

Gaz kromatografisi (GC), uçucu organik ve inorganik bileşikler ile termal kararlılığın olanak sağladığı bir yöntemdir. Ayırmada erimiş silika kapillerleri üzerinde helyum taşıyıcı gazı kullanılır. Farklı metodlar için, son sıcaklık 360 °C olana kadar sıcaklık dereceleri 80 °C/dk veya 100 °C/dk şeklinde değiştirilmektedir. Gaz kromatografisi, tütün ve sebzedeki kumarinlerin ayrılmasında kullanılmıştır (O’Kennedy ve Thordes, 1997).

## 2.6.6 Yüksek sıcaklık sıvı kromatografisi ve subkritik su kromatografisi ile ilgili önceki çalışmalar

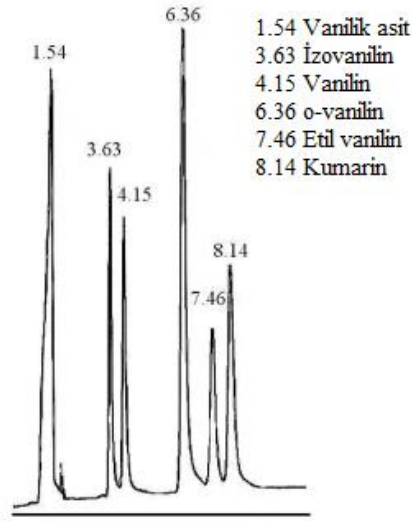
Kumarin ve kumarin türevi bileşiklerin ayrılmasında en çok kullanılan yöntem ters faz sıvı kromatografisi yöntemidir. Normal şartlarda ve yüksek sıcaklıklarda sıvı kromatografisi ile bileşiklerin ayrılmasında mobil faz olarak su kullanıldığında, elüsyon gücünü artırmak için suyun yanında organik çözücüler de yer almaktadır.

Urasil ve parabenlerden oluşan karışımın ayırımında mobil faz olarak su: asetonitril karışımı (50: 50) kullanılmıştır. Kromatografik ayırım 90 °C'de, Acquity BEH C18 (2.1 mm I.D. x 50 mm, 1.7µm) kolonda, 1800 µL/dk akış hızında gerçekleştirilmiştir. Mobil fazdaki asetonitril oranı, iyi bir çözünürlük ( $R_s=1.5$ ) elde etmek için %50'ye çıkarılmıştır ve buna bağlı olarak ayırım 8 saniye içerisinde ultra hızda gerçekleşmiştir (Veuthey vd., 2007). Elde edilen kromatogram Şekil 2.5'te gösterilmiştir.



**Şekil 2.5:** Urasil ve parabenlerin HTLC ile ayırımı (1. urasil, 2. metilparaben, 3. etilparaben, 4. propilparaben, 5. bütülpaben) (Veuthey vd., 2007).

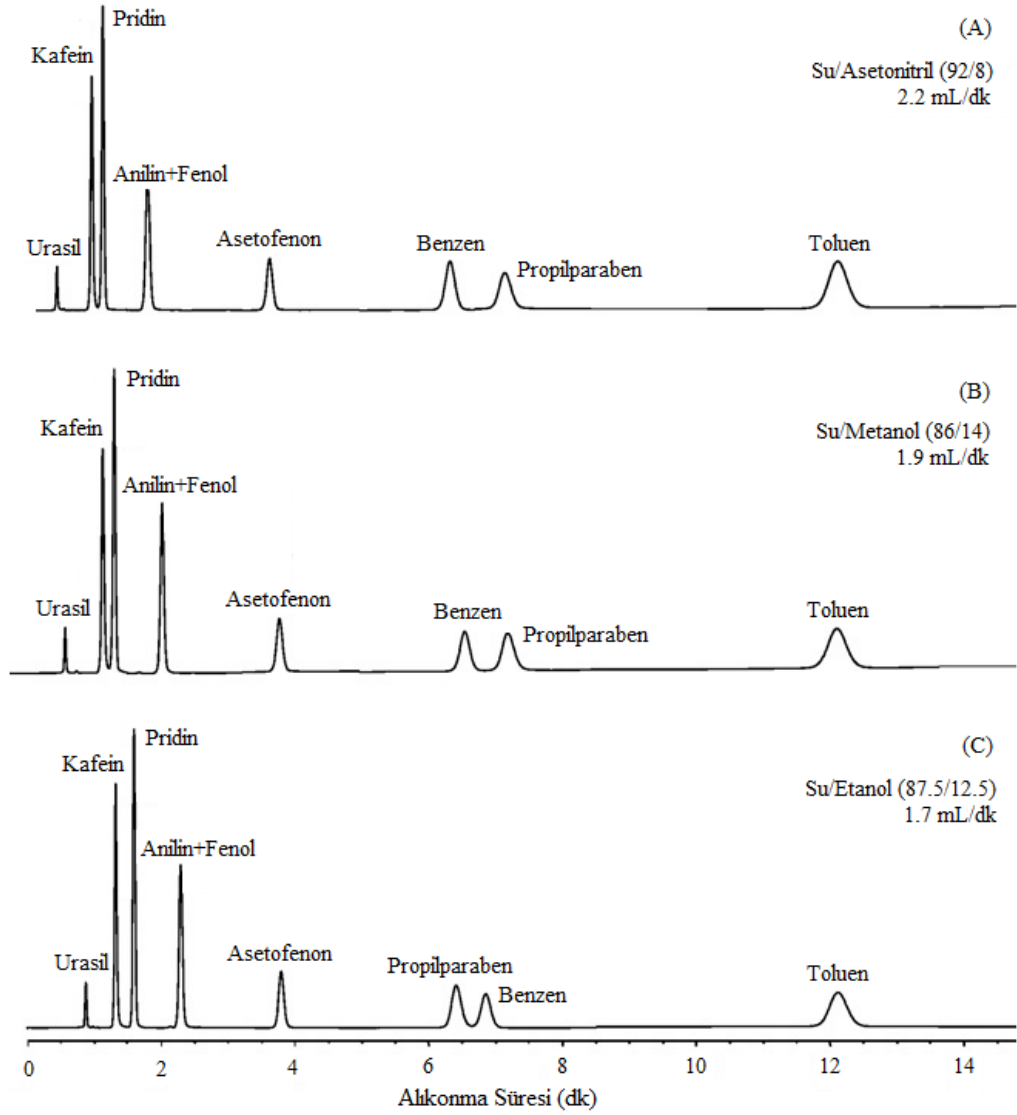
Lavine vd., (2002) vanilik asit, izovanilin, o-vanilin, etil vanilin, vanilin ve kumarinin kromatografik ayırımında ters faz sıvı kromatografisi yöntemini kullanmışlardır. Mobil fazda suya yardımcı çözücü olarak %2.25 bütanolün kullanıldığı ayırım C18 alkil bağlı kolonda gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kromatogram Şekil 2.6'da gösterilmiştir.



**Şekil 2.6:** Vanilin test karışımlarının HTLC ile ayrılması (Lavine vd., 2002).

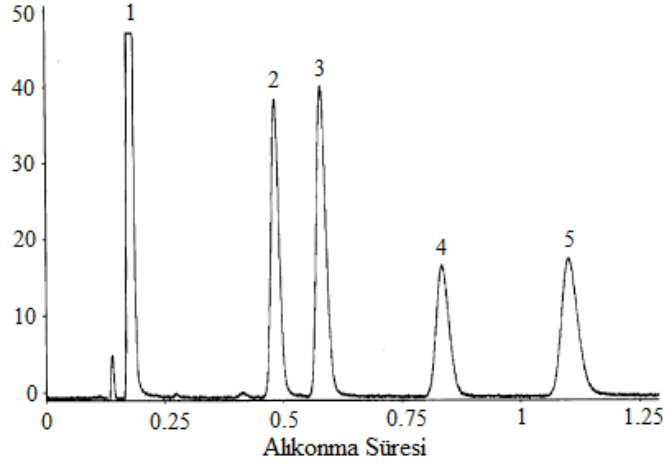
Hoene ve arkadaşları mobil faz olarak %0.1 formik asit ile asitlendirilmiş su: asetonitril (87.5: 12.5) karışımını kullanarak Zorbax SB C18 (50 mm x 3 mm, 1.8 µm) kolonda gıda katkı maddelerini (aspartam, kateşin, kafein, rutin) HTLC ile ayırmayı başarmışlardır. Ayrımda sıcaklık gradienti kullanılmış ve sıcaklık 90 °C'den 120 °C'ye çıkarıldığında gıda katkı maddelerinin ayrımı 1 dakika içerisinde gerçekleşmiştir (Wenclawiak vd., 2008) .

Vanhoenacker vd., (2010), mobil fazda su yanında asetonitril, metanol, etanol gibi organik çözücüler kullanarak ters faz özellikli polimerik sabit fazlı ET- RP1 kolonun performansını değerlendirmişlerdir. 150 °C'de, test karışımı olarak urasil, kafein, pridin, anilin, fenol, asetofenon, benzen, propilparaben ve tolueni kullanmışlardır. Farklı organik çözücülerle önemli seçicilik farklılıkları tespit edilmiş ve etanol diğer iki çözücü ile karşılaştırıldığında, etanol ile kafein ve piridin ayrımının daha belirgin olduğu ve propilparaben ile benzenin elüsyon sırasının değiştiği gözlemlenmiştir. Ayrım sonucunda ET- RP1 kolonun yüksek sıcaklıkta organik çözücü miktarının azalmasına veya asetonitril ve metanolün biyobozunur etanol ile yer değiştirmesine olanak sağladığı belirtilmiştir. Elde edilen kromatogramlar Şekil 2.7'de gösterilmiştir.



**Şekil 2.7:** Test karışımlarının HTLC ile ayırımı (Vanhoenacker vd., 2010).

Guillamme vd., (2004) Hypercarb (1 mm i.d. x 100 mm) kolon ile 180 °C çalışma sıcaklığında ve 500 µL/dk akış hızında, UV 254 nm’de su: asetonitril (70: 30) karışımını mobil faz olarak kullanarak kafein ve türevlerini HTLC ile ayırmayı başarmışlardır. Yüksek sıcaklıkta ayırım hızı oldukça artmış ve alıkonma süresi 1.25 dakika olarak tespit edilmiştir. Ayrılan maddeler Şekil 2.8’de gösterilmiştir.

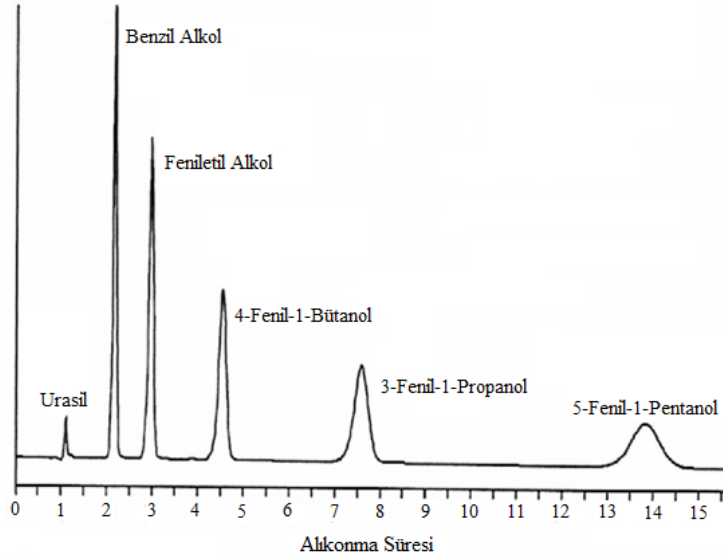


**Şekil 2.8:** Kafein ve türevlerinin HTLC ile ayrılması (1. Hipoksantin, 2. Teobromin, 3. Teofilin, 4. Kafein, 5.  $\beta$ - hidroksi- etil- teofilin) (Guillamme vd., 2004).

Literatürde pek çok organik bileşiğin subkritik su kromatografisi ile ayrımı gerçekleştirilmiştir. Bunlar; karbonhidratlar, aminoasitler, alkoller, karboksilli asitler, fenoller, anilinler, suda çözünebilir vitaminler, kafein türevleri, herbisitler, steroidler, benzen ve türevleri, parabenler, fungusitler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, pliklorlu bifeniller, model ilaçlar vb. yapılar olarak belirtilebilir (Yang, 2007a; Hartonen ve Riekkola, 2008).

Tiihonen vd., (2005) bazı karbonhidratların (maltoz, glikoz, mannoz, sorbitol, arabinoz vb.) ayrımını sülfolanmış PS- DVB katyon değişim kolonu ( 2.2 cm i.d x 26 cm) kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Bazı karbonhidratların 100 °C'de bozunmaya başladığını ve şekerlerin ayrılması için sıcaklık limitinin 125 °C civarında tutulması gerektiğini tespit etmişlerdir. Sıcaklığın artırılması ve düşürülen ayırma süresi ile karbonhidratların etkin bir şekilde ayrımının gerçekleştiğini belirtmişlerdir.

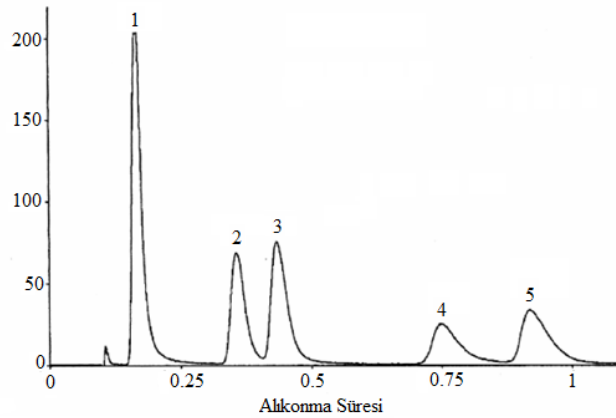
Liu vd., (2005) benzenleri ve aromatik alkollerini saf suyu eluent olarak kullanarak UV 254 nm'de SBCW ile ayırmayı başarmışlardır. Şekil 2.9'da ayrılan maddeler gösterilmektedir.



**Şekil 2.9:** Benzenlerin ve aromatik bileşiklerin SBWC ile ayrılması (Liu vd., 2005).

Wilson (2000) insan üresindeki parasetamol'un kromatografik ayrımını SBWC'de gerçekleştirmiştir. Farklı seçiciliğe sahip birçok kolon türü ile çalışmıştır. Parasetamol ve diğer model ilaçlar için (fenasetin, antipirin, kafein) en iyi ayrımın PLRP- S kolonda (5µm, 15 cm x 4 mm i.d) 205 °C, Oasis kolonda (5 µm, 15 cm x 2.1 mm i.d) 208 °C, XTerra RP 18 kolonda (5 µm, 15 cm x 4.6 mm i.d) 165 °C sıcaklıkta gerçekleştiğini tespit etmiştir. Sitostatik ve antibiyotik ilaçlar için %0.1 formik asit içeren suyu eluent olarak ve ZirChrom PS kolon (15 cm x 4.6 mm i.d) kullanarak mükemmel ayrımlar gerçekleştirmiştir.

Guillamme vd., (2004) ZirChrom DB C18 kolon ile 150 °C çalışma sıcaklığında UV 254 nm'de saf suyu eluent olarak kullanarak kafein ve türevlerini SBWC ile ayırmışlardır. Ayrılan maddeler Şekil 2.10'da gösterilmektedir.

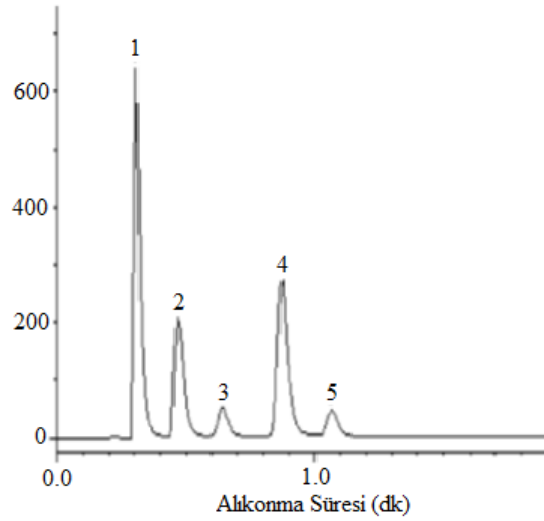


**Şekil 2.10:** Kafein ve türevlerinin SBWC ile ayrımı (1. Hipoksantin, 2. Teobromin, 3. Teofilin, 4. Kafein, 5. β-hidroksi-etil-teofilin) (Guillamme vd., 2004).



Ayano vd., (2006) Stereoidleri (hidrokortizon, prednisol, dekametazon, hidrokortizon asetat, testesteron) saf suyu eluent olarak kullanarak UV 254 nm'de SBCW ile ayırmayı başarmışlardır.

Teutenberg vd., (2006) saf suyu eluent olarak ve ZirChrom PBD (4.6 x 150 mm, 3 µm) kolon kullanarak UV 200 nm'de, 185°C çalışma sıcaklığında, stereoidleri ayırmayı başarmışlardır (Şekil 2.11). Sıcaklık ve akış hızı yükseltildiği için hızlı bir elüsyon ile ayırım 1.2 dakika sonra tamamlanmıştır. Yüksek sıcaklıkta kütle transferi arttığı için kolon etkinliği artmış ve simetrik pikler elde edilmiştir.



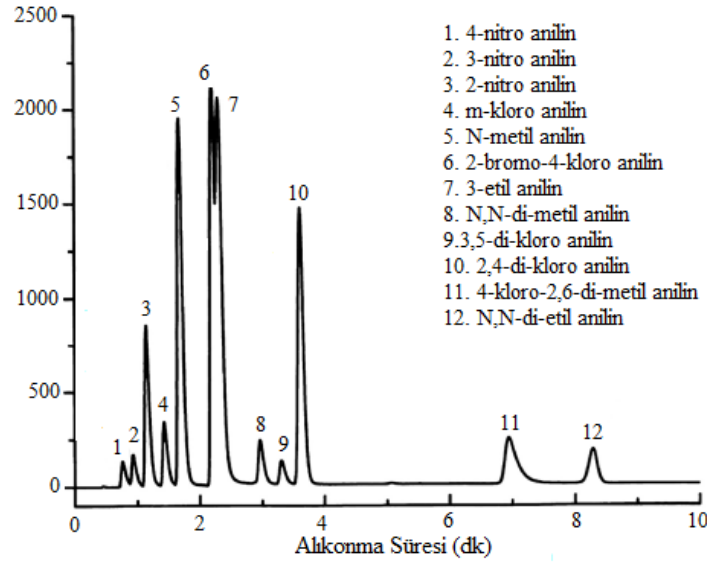
**Şekil 2.11:** Stereoidlerin SBWC ile ayrılması (1. Asetonitril, 2. Estriol, 3. Androstadiendion, 4. Estron, 5. Dehidroepiandrosteron) (Teutenberg vd., 2006).

Termal kararlılığa sahip vitaminlerin ayrılması Polistiren Divinilbenzen (PS- DVB) kolon dolgu maddesi kullanılarak başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. 180 °C ve 200 °C'de sırasıyla piridoksin ve riboflavinin degradasyona uğradığına dair herhangi bir kanıt bulunamamış ve bu maddelerin sırasıyla 2.94 ve 3.78 dakika elüsyon zamanlarında ayrımları yapılmıştır. Tiamin'in yapılan ayırım sürecinde 160 °C'de bozunmaya uğradığı fakat 50 °C sıcaklıkta mükemmel bir şekilde ayırımının gerçekleştiği görülmüştür. Bu sonuç bileşiklerin ayrılmasında analit ile çalışılacak kolon tipinin uyumu ve elüsyon için sıcaklığın mümkün olduğu kadar düşük tutulması gerektiğini belirtmektedir (Chienthavorn vd., 2004).

Yarita vd., (2003) 100-150 °C sıcaklık aralığında mobil faz olarak aşırı ısıtılmış suyu kullanarak fenolik bileşiklerin seçiciliğini Van't Hoff eşitliği ile incelemiştir. Bu

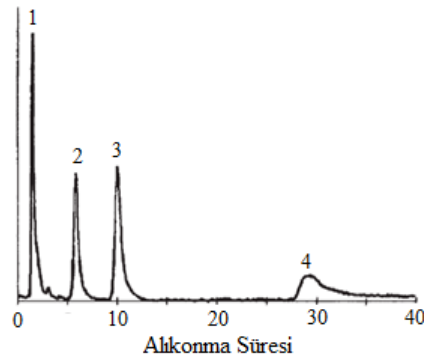
örnek Van't Hoff eşitliğinin genişletilmiş sıcaklık aralıklarında kullanılabilir olduğunu ve düşük sıcaklıklarda bu davranışın sınırlandığını göstermektedir.

Shen vd., (2006) mobil faz olarak saf su ve XBridge kolon (2.1 mm x 15 cm, 3.5 µm) kullanarak, 150-200 °C arası sıcaklık programıyla anilin ve türevlerini ayırmayı başarmışlardır (Şekil 2.12).



Şekil 2.12: Anilin ve türevlerinin SBWC ile ayrılması (Shen vd., 2006).

İlaçların ve bazı alkaloidlerin subkritik su kromatografisi ile ayrılması bu alanda çalışanlar için özellikle dikkat çekicidir. Bazı antikanser ilaçlarının (5- florourasil, metotreksat, 7- hidroksimetotreksat ve etoposid) kromatografik ayrımları PS- DVB kolon dolgu maddesi kullanılarak pH'ı 3.5 tamponlanmış mobil fazda 150 °C'de gerçekleştirilmiştir. Antikanser ilaçların pH'a bağlılığı incelenmiş ve oldukça iyi ayrılmış pikler elde edilmiştir. Ayrılan maddeler Şekil 2.13'te gösterilmektedir (Teutenberg vd.,2001).

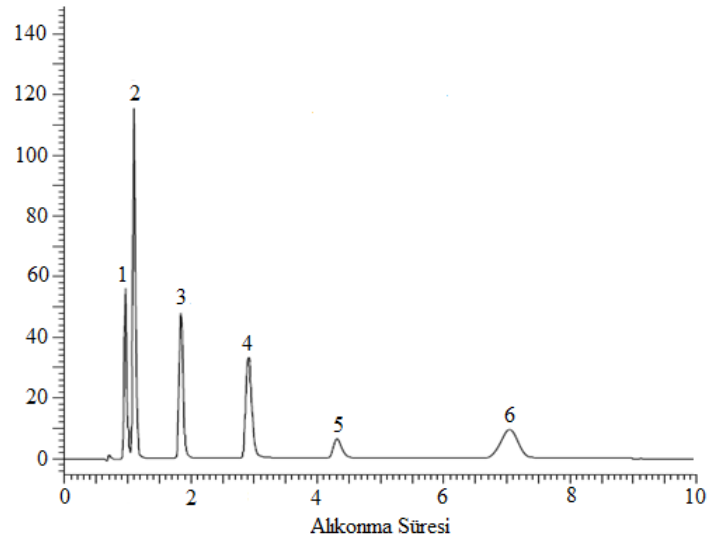


Şekil 2.13: Antikanser ilaçların SBWC ile ayrımı (1. 5- florourasil, 2. Metotreksat, 3. 7- hidroksi metotreksat, 4. Etoposid).

Tajuddin ve Smith (2002), saf suyu mobil faz olarak ve PS- DVB kolon kullanarak 75–185°C arası sıcaklık programı ile parasetamol, salisilamid, metil paraben, fenasetinil paraben'i ayırmayı başarmışlardır.

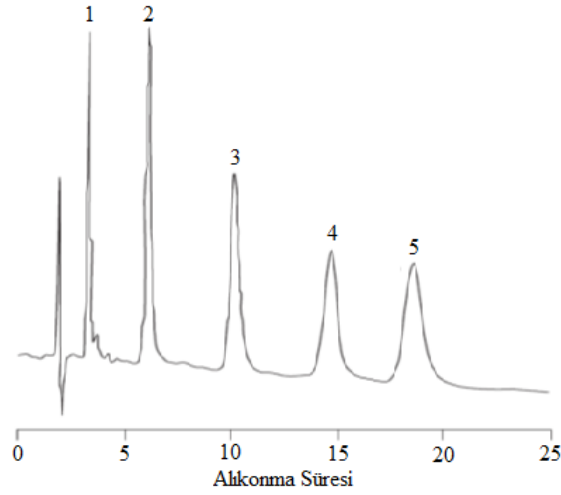
Sanagi vd., (2005) mobil faz olarak saf suyu ve test bileşikleri olarak alkil aril ketonlar ile barbitüratları kullanarak 100-200 °C sıcaklık aralığında, PS- DVB (polistiren- divinilbenzen) kolonun performansını değerlendirmişlerdir. Yüksek sıcaklıkta gelişen kolon etkinliği ile iyi bir ayırım gerçekleştirilmiştir. Seçilen bileşikler ile çalışılan sıcaklık aralığında doğrusal bir van't Hoff grafiği elde edilmiş ve mobil faz olarak %100 saf suyun kullanımı ile barbitüratların ayırımında ters faz sıvı kromatografisi başarılı bir şekilde uygulanmıştır.

Pereira vd., (2007) Hypercarb kolonda, UV 254 nm'de mobil faz olarak saf suyu kullanarak 190 °C'de purin ve primidinleri ayırmayı başarmışlardır. Kromatografik ayırım sonucunda yüksek sıcaklıkta gelişen pik simetrisiyle birlikte iyi bir ayırma seçiciliği elde edilmiştir. Şekil 2.14'te ayrılan maddeler gösterilmektedir.



**Şekil 2.14:** Purin ve primidinlerin SBWC ile ayrılması (1. Sitozin, 2. Urasil, 3. Timin, 4. Hipoksantin, 5. Guanin, 6. Ksantin) (Pereira vd., 2007).

Smith (2002), saf suyu eluent olarak ve PS- DVB kolon kullanarak 200 °C çalışma sıcaklığında barbitüratların ayırımını gerçekleştirmiştir. Şekil 2.15'te ayrılan maddeler gösterilmektedir.



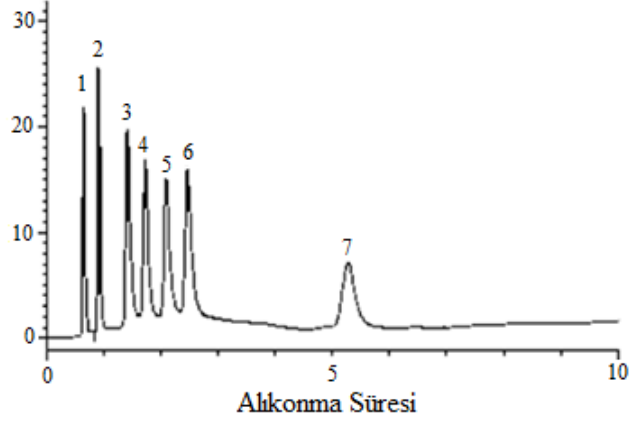
**Şekil 2.15:** Barbitüratların SBWC ile ayrılması ( 1. Barbiton, 2. Fenobarbiton, 3. talbarbiton, 4. amilobarbiton, 5. heptabarbiton) (Smith, 2002).

Fields vd., (2001) parasetamol, antipirin ve kafein'i, saf suyu eluent olarak kullanarak 225 °C çalışma sıcaklığında Hypercarb, PS- DVB ve Zirconia PBD kolonları ile ayırmayı başarmışlardır.

Yang (2007a) bazı fenol, alkol ve karboksilik asitlerin ayrılmasında mobil faz olarak saf su kullanmışlar ve 160-210 °C'de, Polymerx RP- 1 (PS- DVB) analitik kolonunu kullanarak belirtilen bileşiklerin kromatografik ayrımını gerçekleştirmişlerdir. Alkol, fenol ve karboksilik asit türevi bileşiklerin alev iyonlaştırmalı dedektörde (FID) daha iyi gözlenebilmesi nedeniyle, LC/FID kombine edilmiştir.

Sanagi vd., (2004) Triazol fungusitleri (heksakonazol, tebukonazol, propikonazol ve difenokonazol) mobil faz olarak saf suyu kullanarak analiz etmişlerdir. ZirChrom PBD (10 cm × 2.1 mm i.d., 3 µm) kolonda, 100-150 °C çalışma sıcaklığında, 195 nm'de başarılı bir ayırım gerçekleştirilmiştir.

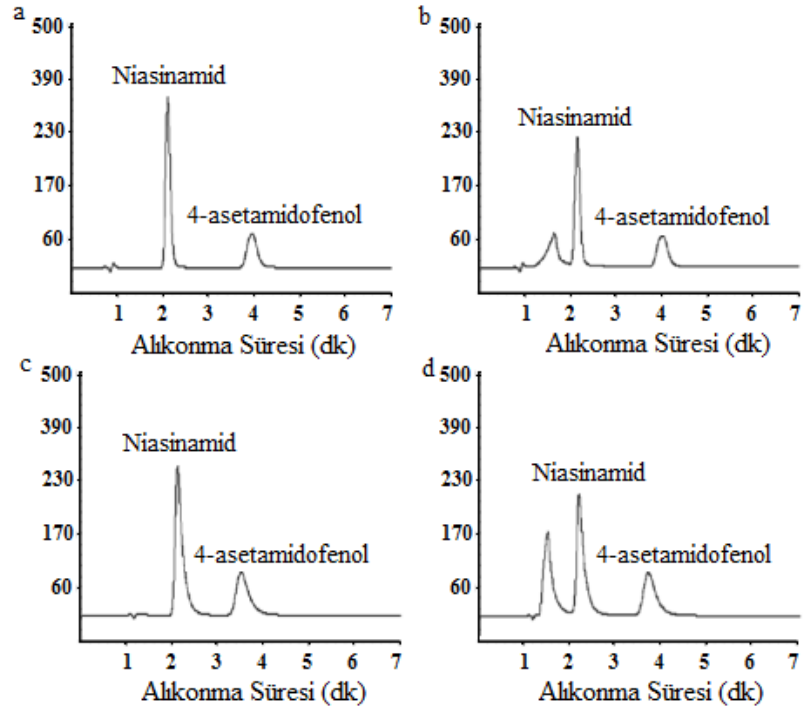
Teutenberg vd., (2006) mobil faz olarak saf su - %1 formik asit ve ZirChrom PS kolon (4.6 x 150 mm, 3 µm) kullanarak, 40-130 °C arası sıcaklık programıyla sitostatikleri ve antibiyotik ilaçları UV 254 nm'de ayırmışlardır. 40 °C'lik bir sıcaklık gradyanı ile başlayan bu karışımın ayrılmasında mobil faz sıcaklığı, 4 dakika içinde hemen 40 °C'den 130 °C'ye yükseltilmiş ve daha sonra doğrusal olarak sabit tutulmuştur. Etoposid elüsyonundan sonra, ön ısıtma ve kolon modülü soğutulmuştur. (Şekil 2.16).



**Şekil 2.16:** Sitostatiklerin ve antibiyotik ilaçların SBWC ile ayrılması (1. Sitarabin, 2. 5-florourasil, 3. Sülfadiazin, 4. Sülfatiazol, 5. Sülfametoksipridazin, 6. Kloramfenikol, 7. Etoposid) (Teutenberg vd., 2006).

Yan vd., (2000) 120 °C’de suyun düşük viskozitesinden dolayı polistiren kaplı zirkonya kolonda 12 mL/dk’ya kadar yüksek akış hızı kullanarak 30 saniyeden az bir sürede fenollerin ayrımını gerçekleştirmişlerdir.

Yang vd., (2011) Procter & Gamble şirketi ile birlikte subkritik su kromatografisinin endüstriye yönelik bir uygulamasını gerçekleştirerek saf suyu eluent olarak kullanarak el kremlerinde bulunan niasinamid bileşiğinin ayrılması için metot geliştirmişlerdir. İki farklı kolon tipi kullanılarak yapılan çalışma, UV 235 nm’de gerçekleştirilmiş ve subkritik su kromatografisi ile yüksek performanslı sıvı kromatografisi karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 2.17’de gösterilmiştir.



**Şekil 2.17:** El kremdeki niasinamidin SBWC ile ayrılması (a) 1. Numunenin 80 °C’de saf su kromatografisi, akış hızı 1.8 mL/dk (b) 2. Numunenin 80 °C’de saf su kromatografisi, akış hızı 1.8 mL/dk (c) 1. Numunenin 25 °C’de HPLC, akış hızı 1.2 mL/dk (d) 2. Numunenin 25 °C’de HPLC, akış hızı 1.2 mL/dk (Yang vd., 2011).

### **3. MALZEME VE YÖNTEM**

#### **3.1 Kullanılan Malzemeler**

Kumarin, vanilin, etil vanilin, 6-metil kumarin, 7-metil kumarin, (L)-histidin metilester, metakriloil klorür, 2-hidroksietil metakrilat (HEMA), etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) Sigma/Aldrich'ten (Steinheim, Almanya) satın alınmıştır. Metanol, etanol, etilasetat, toluen ve formik asit Merck (İstanbul, Türkiye) firmasından sağlanmıştır. Ultra saf su (18.2 MΩ- cm) MilliPore Milli- Q Gradient su arıtma sistemi (Billerica, MA, ABD) kullanılarak hazırlanmıştır.

Bütün kromatografik ayırmalarda mobil fazı asitlendirmek için %1 formik asit kullanılmıştır. Test karışımları ultra saf su kullanılarak ve karışım konsantrasyonları 5- 40 ppm (mg/L) arasında tutularak her zaman taze hazırlanmıştır.

XTerra MS C18 ve XBridge C18 kolonlar Waters Corporation (Milford, ABD) firmasından, Zorbax RRHD Eclipse Plus, Zorbax SB Phenyl ve Zorbax SB C18 kolonlar ise Agilent Technologies (Santa Clara, ABD) firmasından sağlanmıştır.

##### **3.1.1 NA-PHEMAH kolon dolgu maddesinin sentezlenmesi**

Kumarinlerin subkritik su kromatografisi ile saflaştırılmasında kolon dolgu maddesi olarak Poli(HEMA-MAH) (PHEMAH) mikroküreleri sentezlenmiş, ligand olarak naftilamin polimere katılmıştır. Elde edilen polimerik yapı kumarinlerin ayrılmasında kolon dolgu maddesi olarak kullanılmıştır. Çalışmada 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) ve Metakriloamidohistidin (MAH) sırasıyla monomer ve ko-monomer olarak seçilmiştir. Kromatografik ayırmada ligand olarak görev yapacak olan 1-naftilamin ise polimere MAH monomerinin imadazol halkası üzerinden takılmıştır. Kolon dolgu maddesinin hazırlanma yöntemi aşağıda verilmiştir.

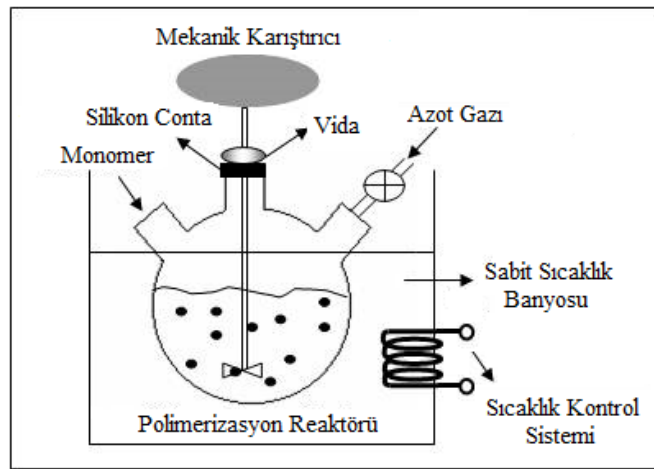
### 3.1.1.1 Metakriloamidohistidin (MAH) sentezi

MAH sentezi için, aşağıdaki deneysel yöntem uygulanmıştır:

5.0 gram (g) L-histidin metil ester ve 0.2 g hidrokinon 100 mililitre (mL) diklorometan çözeltisinde çözülmüştür. Bu çözelti 0 °C'ye kadar soğutulmuş ve 12.7 g trietilamin çözeltiye eklenmiştir. 5 mL metakriloil klorür, iki saat boyunca oda sıcaklığında manyetik karışan çözeltiye katılmıştır. Kimyasal tepkime periyodunun sonunda, hidrokinon ve tepkimeye girmeyen metakriloil klorür %10'luk sodyum hidroksit çözeltisinden özütlenmiştir. Sulu faz rotary evaporatörde uzaklaştırılmıştır. Reaksiyon sonunda MAH monomeri eter- sikloheksan karışımında kristallendirilmiş ve daha sonra etil alkolde çözülmüştür.

### 3.1.1.2 Poli(HEMA-MAH) (PHEMAH) mikrokürelerin hazırlanması

Poli(HEMA-MAH) mikroküreler süspansiyon polimerizasyonu ile hazırlanmıştır. Yöntem şu şekilde özetlenebilir: stabilizatör, polivinil alkol (PVAL), sürekli fazın hazırlanması için 50 mL ultra saf suda çözülmüştür. Dispersiyon faz HEMA (8.0 mL), MAH (1.0 g) ve toluen (12.0 mL) bir test tüpünde karıştırılarak hazırlanmıştır. Başlatıcı, benzoil peroksit (BPO) (100 mg), bu homojen çözeltide çözülmüştür. Dispersiyon faz, sıcaklık kontrolüne sahip su banyosunda bulunan camdan yapıli polimerizasyon reaktöründeki sürekli faza eklenmiştir. Polimerizasyon reaktörü 600 rpm'de 30 dakika karıştırılarak 65 °C'ye kadar ısıtılmıştır. Polimerizasyon 65 °C'de 4 saat ve 90 °C'de 2 saat yürütülmüştür (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: PHEMAH mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılan polimerizasyon sistemi.



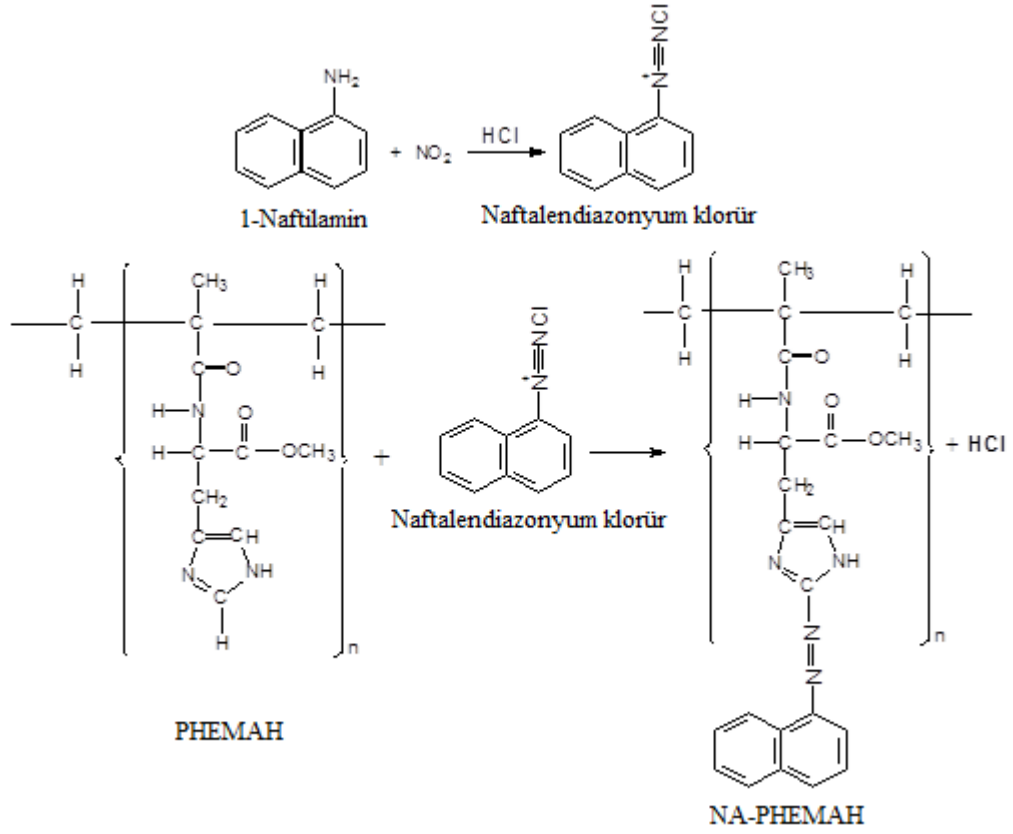
Polimerizasyon tamamlandıktan sonra, tepkimeye girmeden kalan monomerin ve diğer karışımdaki maddelerin uzaklaştırılması için yıkama yöntemi uygulanmıştır. Daha sonra mikroküreler etil alkol ve ultra saf su ile yıkanmıştır. Polimerizasyon koşulları Çizelge 3.1’de verilmiştir.

**Çizelge 3.1:** PHEMAH mikrokürelerin polimerizasyon koşulları.

<u>Sulu Dispersiyon Faz</u> Damıtık su :50 mL PVAL:0.2 g	<u>Organik Faz</u> MAH:40 mg EGDMA: 8.0 mL Toluen : 12 mL BPO : 0.1 g
<u>Polimerizasyon Koşulları</u> Reaktör hacmi: 100 mL Karıştırma hızı: 600 rpm Sıcaklık ve zaman: ilk önce 65 °C’de 4 saat, sonra 90°C’de 2 saat	

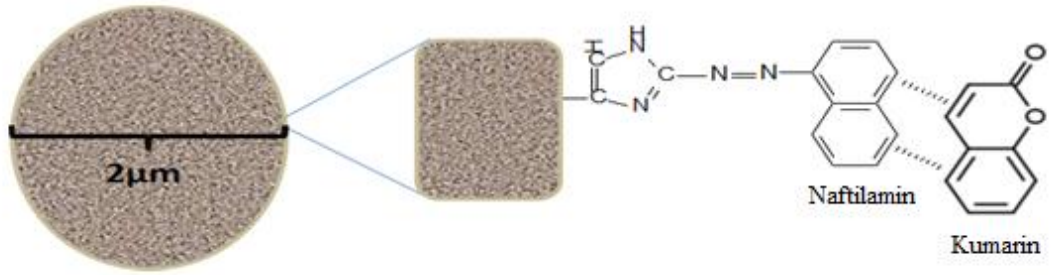
### 3.1.1.3 PHEMAH mikrokürelere naftilamin takılması

Naftilamin takılı PHEMAH (NA-PHEMAH) mikroküreler, 1-naftilaminin diazolanması ve hazırlanan bu molekülün PHEMAH mikrokürelere takılmasıyla elde edilmiştir. Reaksiyonlar Şekil 3.2’de şematize edilmiştir. Bu amaçla, 25 mg’lık 1-naftilamin 10 mL, 1 Molar hidroklorik asitte çözünmüştür. 5 mL soğuk suda çözünen 75 mg’lık sodyum nitrit örneği, 1-naftilamin çözeltisine damla damla ilave edilerek reaksiyon başlatılmıştır. Yaklaşık 10 dakika karıştırılan reaksiyon karışımına PHEMAH mikroküreler ilave edilmiş ve reaksiyon, pH=9.5’te sabit tutularak oda sıcaklığında 3 saat sürdürülmüştür. Reaksiyon sonunda elde edilen kahverengimsi PHEMAH mikroküreler 0.01 Molar fosfat (pH=6.0) tamponunda spektrofotometrik olarak boya sızması bitinceye kadar yıkanmıştır. Mikrobiyal kirliliği önlemek amacıyla mikroküreler, buzdolabında % 0,02 sodyum azid çözeltisinde saklanmıştır.



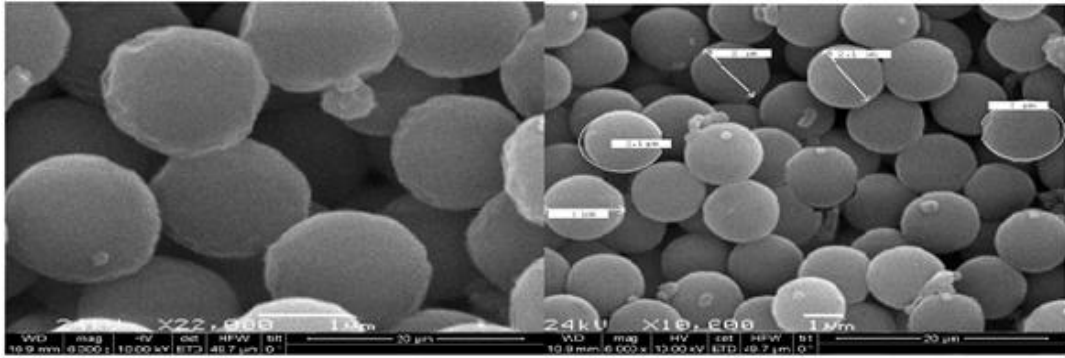
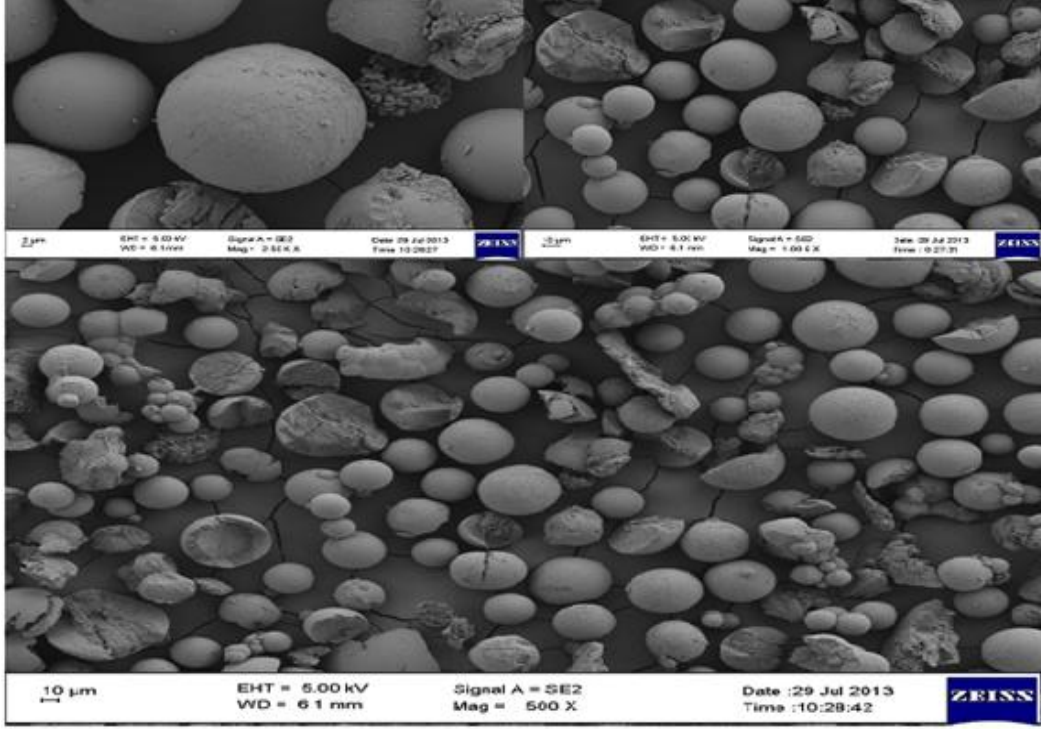
**Şekil 3.2:** Naftilamin molekülünün PHEMAH mikrokürelere takılması.

Naftilamin takılı PHEMAH ile Kumarin arasındaki olası etkileşim Şekil 3.3'te şematize edilmiştir.



**Şekil 3.3.** Naftilamin takılı PHEMAH ile Kumarin etkileşiminin şematik gösterimi.

Elde edilen NA-PHEMAH moleküllerinin Taramalı Elektron Mikroskopi (SEM) görüntüleri Şekil 3.4'te gösterilmiştir.



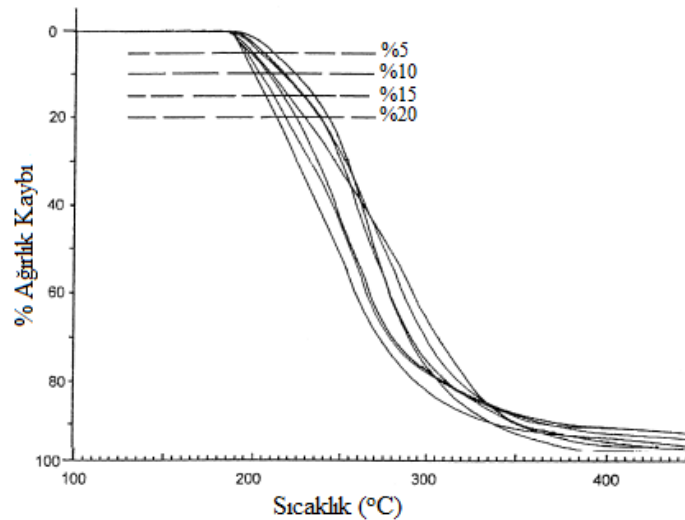
**Şekil 3.4:** Naftilamin takılı PHEMAH moleküllerinin SEM görüntüleri.

Sabit faz olarak kullanılacak partiküllerin sentezlenmesinden sonra, kromatografik ayırmaların yüksek sıcaklıklarda yapılacak olması nedeniyle, sentezlenen partiküller 100-200 °C sıcaklık aralığında ısı testine maruz bırakılarak kararlılıkları ölçülmüş ve molekül yapısında herhangi bir değişim olup olmadığı kontrol edilmiştir. Isı testleri sonucunda partiküllerin yapısında herhangi bir bozunma meydana gelmediği gözlemlenmiş ve yüksek sıcaklıklarda kararlılığını koruduğu tespit edilmiştir.

Naftilamin takılı PHEMAH mikrokürelerinin yapısında 100-200 °C sıcaklık aralığında herhangi bir değişim meydana gelmemiştir. Ancak literatürde PHEMA'nın

ortam sıcaklığı- 340 °C ve 340-400 °C sıcaklık aralığında termal olarak bozunmaya uğradığı belirtilmiştir. Termal bozunmadaki aktivasyon enerjisi termogravimetrik analiz (TGA) ile belirlenmiş ve bozunma sonucu oluşan ürünler IR, GC/MS ile karakterize edilmiştir. IR'deki sonuçlara göre polimerin 320 °C'ye kadar ısıtılmasıyla IR spektrumunda bir değişim gözlenmezken 340 °C'den sonra spektrumda O-H bandı yoğunluğunun azaldığı ve C=C bandından kaynaklanan bir omuz gözlemlenmiştir. Ayrıca polimerin yapısında çok sayıda metakrilat olduğu için de farklı bantlar oluşmuştur. GC/MS verilerine göre termal bozunma iki aşamada gerçekleşmiştir. İlk aşamada parçalanma ürünü olarak %72 verimle HEMA ana ürünü oluşmuştur. Yine bu aralıkta ikinci önemli ürün olarak %13.5 verimle 2-izopropeniloksietil metakrilat ile etilen glikol, metakrilik asit ve di-oksolan gibi bazı küçük ürünler elde edilmiştir. İkinci aşamada %42.2 verimle 2-izopropeniloksi-etil metakrilat ana ürünü oluşurken %38.4 verimle monomer oluşmuştur.

PHEMA'nın termal bozunmasındaki aktivasyon enerjisi termogravimetrik analiz (TGA) ile tahmini olarak belirlenmiş ve 129.8 kJ/mol bulunmuştur. PHEMA'nın bozunması ortam sıcaklığı- 340 °C ve 340-400 °C sıcaklık aralığında tek aşamada %20 ağırlık kaybıyla gerçekleşmiştir. Bozunma 195 °C'de başlamış ve 400 °C'de tamamlanmıştır. 400 °C'de orijinal ağırlığın %5-6'sı kadar siyah kalıntı tespit edilmiştir. Şekil 3.5'te PHEMA'nın ağırlık kayıpları gösterilmiştir (Demirelli vd., 2001).



**Şekil 3.5:** PHEMA'nın termal bozunma eğrisi.

Termal kararlılık testleri sonucunda NA- PHEMAH mikroküreler kolona slurry-packing tekniği (katı fazın süspansiyon halinde kolona yüklenmesi ve yerçekimi

etkisiyle kolona doldurulması) ile doldurulmuştur. Sentezlenen mikrokürelerin boş kolona doldurulması işleminde kullanılan cihaz Şekil 3.6'da gösterilmiştir.



**Şekil 3.6:** Sabit fazın kolona doldurulması için kullanılan sistem.

### 3.2 Kullanılan Cihazlar

ISCO 260 D şırınga tipi pompa (Teledyne Isco, Lincoln, ABD) ile Perkin-Elmer Flexar LC sistemi (Waltham, ABD) bir araya getirilerek subkritik su kromatografisi oluşturulmuştur. ISCO pompanın çıkışına doğrudan Flexar LC enjektör (10 µL) bağlanmıştır ve ardından ayırma kolonu ve Flexar UV detektör gelmektedir.

Kolon, Teknosem kolon ısıtma ünitesi (İstanbul, Türkiye) içine yerleştirilmiştir. Bu ünite kolon sıcaklığını ve mobil faz sıcaklığını kontrol etmek için blok ısıtıcı fırın olarak kullanılmıştır. Kolon ve dedektör arasına, mobil fazın UV akış hüresine girmeden önce elüsyon sıcaklığını düşürmek için Peltier soğutma ünitesi (Teknosem, İstanbul, Türkiye) ve mobil fazı sıvı durumda tutmak için yeterli basınç sağlayacak geri basınç düzenleyicisi bağlanmıştır. UV dalgaboyu 278 nm'ye ayarlanmıştır. Elde edilen sonuçların saklanması için Perkin Elmer Chromera Kromatografi veri sistemi kullanılmıştır.

### 3.2.1 Subkritik su kromatografi sistemi

Kumarin ve türevlerinin subkritik su ortamında kromatografik analizini gerçekleştirmek üzere Şekil 3.7’de belirtilen subkritik su kromatografi sistemi kurulmuştur ve sistem üzerinde yer alan bileşenler aşağıda kısaca açıklanmıştır.



Şekil 3.7: Subkritik su kromatografi sistemi.

Sistem bileşenleri:

#### 1. Sub/Süperkritik Akışkan sistemi - ISCO 260 D Şırınga Pompa

ISCO 260 D marka şırınga pompa, yapısında yer alan rezervuarı sayesinde mobil fazı depolamakta ve istenilen akış hızında laminer bir şekilde sisteme gönderebilmektedir. Su ve sıvı organik çözücüler dışında, sıvı karbondioksit depolayabilmekte ve süperkritik akışkan şartlarında çalışma yapılmasına olanak sağlamaktadır.

#### 2. Kolon Isıtıcısı

Kolon ısıtıcısı, bileşenlerin ayrılmasında kullanılacak sıvı kromatografi kolonunun sıcaklığını subkritik su şartlarına ulaştırabilmek ve bu şartlarda çalıştırmak için kullanılmaktadır. Maksimum 200 °C sıcaklığa çıkabilmekte ve  $\pm 1$  °C hassaslıkta çalışabilmektedir.

### 3. Soğutucu Sistem

Soğutucu sistem, subkritik su kromatografi sisteminin en önemli bileşenlerinden birini oluşturmaktadır. Subkritik şartlarda mobil fazın yüksek sıcaklıkta kullanılması ve direkt dedektörle temas halinde olması çalışılan dedektörün hassasiyetini yitirmesine ve bozulmasına yol açmaktadır. Peltier soğutma sistemi olarak nitelendirilen bu bileşen, alüminyum plakalardan oluşmakta ve elektron akımı ile soğutma yapmaktadır. Kolon ve bağlantı aparatlarından gelen sıcak mobil fazı oda sıcaklığına kadar soğutup, mobil fazın normal şartlarda dedektöre geçişine olanak sağlamaktadır.

### 4. Enjeksiyon Portu

Ayrılması istenen bileşenlerin sisteme enjekte edilmesinde kullanılmaktadır.

### 5. UV/VIS Dedektör

Subkritik su sisteminde bileşenlerin tanınmasında kullanılmaktadır. Perkin-Elmer Flexar marka UV dedektör 200-800 nm dalga boyunda çalışma aralığına sahiptir.

### 6. Akım Korumalı Çoklu Priz

Kromatografi sistemini akım değişimlerine karşı korumaktadır.

### 7. Güç Kaynağı

Kromatografi sistemini akım-voltaj değişimlerine karşı korumaktadır.

### 8. Bilgisayar ve Kromatografik Yazılım Sistemi

Perkin-Elmer Chromera marka kromatografik yazılım sistemi, subkritik su kromatografisi sonucu elde edilen verilerin görüntülenmesinde ve saklanmasında kullanılmaktadır.

## 3.3 Yöntem

Subkritik su kromatografisinde mobil faz olarak kullanılacak subkritik suyun oluşturulması için ultra saf su ile 100-200 °C sıcaklık aralığında çalışılmıştır. Ayrıca yüksek sıcaklıkta suyun elüsyon gücünü artırmak için mobil faza %2 ve %5 oranında

metanol eklenerek yüksek sıcaklık sıvı kromatografisi (HTLC) kullanılmıştır. Kromatografik olarak ayrılacak bileşenler sıvı fazda çözülerek sisteme enjekte edilmiştir ve farklı sıcaklık programlarında ve farklı alıkonma zamanlarında ayırma gerçekleştirilmiştir. Kromatografik sistemin sıcaklık programı ile çalışılması ve yüksek sıcaklıklara çıkılması dolayısıyla analitik kolondan sıcak olarak çıkan çözeltilerin dedektörde sinyal olarak algılanmasından önce sıcak numunenin dedektöre zarar vermemesi için numune, soğutma borularından geçirilerek soğutulmuştur ve sonra dedektöre gönderilmiştir. Elde edilen kromatogramlar dikkate alınarak maddelerin kalitatif olarak ayrılması incelenmiştir. Çalışılan numunelerin kromatografik ayrımlarının yüksek sıcaklıklarda gerçekleşmesi nedeniyle, çalışılan sıcaklıklarda sabit fazın zarar görmemesi ve bileşiklerin mümkün olan en iyi ayrımının yapılabilmesi için kullanılacak kolon tipleri belirlenmiştir.



## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1 Kromatografik Şartların Belirlenmesi

Kumarin ve kumarin türevlerinden olan vanilin ve etil vanilin bileşiklerinin normal şartlar altında ultra performanslı sıvı kromatografi (UPLC) ile kromatografik şartlarının belirlenmesi için Agilent 1290 Infinity marka UPLC cihazı kullanılmıştır. Kumarin ve türevlerini içeren karışımın kromatografik analizi gradient elüsyon sisteminde ve Waters XTerra MS C18 (4,6 mm x 100 mm ve 3,5 µm) marka kolon kullanılarak aşağıda belirtilen koşullarda gerçekleştirilmiştir.

Çözücü Sistemi: (A)- % 1 Formik asit içeren Su ve (B)- Asetonitril

Kolon Sıcaklığı: 40 °C

Akış hızı: 1 mL/dk

Numune derişimi: 10 ppm

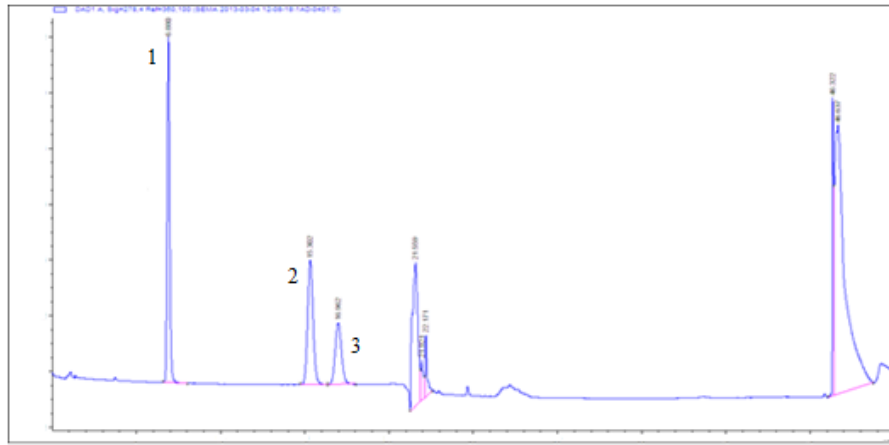
Enjeksiyon miktarı: 5 µL

Dalga boyu: 278 nm (UV)

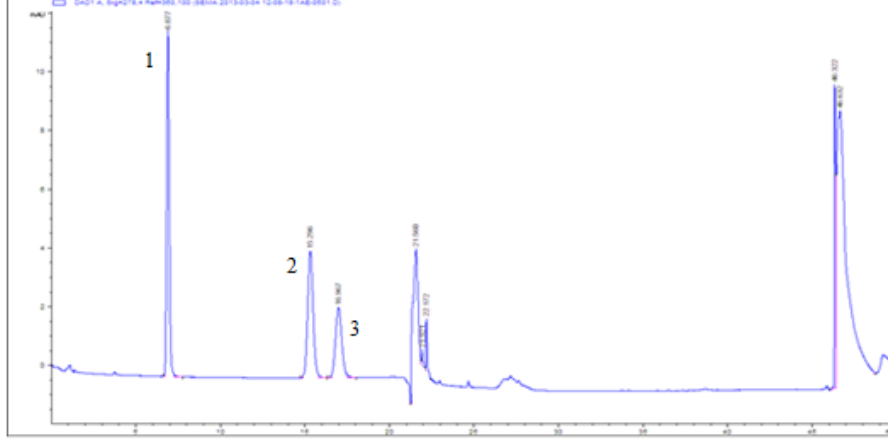
Elüsyon Zamanı: 0-20 dk ( % 90 A ve % 10 B)

20-45 dk ( % 10 A ve % 90 B)

Yukarıda belirtilen şartlarda gerçekleştirilen ayırma sonucunda elde edilen kromatogramlar Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’de gösterilmiştir.



**Şekil 4.1:** Kumarin, Vanilin ve Etil vanilinin UPLC ile ayrılması sonucu elde edilen kromatogramlar-1 (1. Vanilin; 2. Etil Vanilin; 3. Kumarin).



**Şekil 4.2:** Kumarin, vanilin ve Etil vanilinin UPLC ile ayrılması sonucu elde edilen kromatogramlar-2 (1. Vanilin; 2. Etil Vanilin; 3. Kumarin).

Normal şartlarda yapılan kromatografik analiz sonucu vanilin, etil vanilin ve kumarinin literatür çalışmalarında da belirtildiği gibi sırasıyla 6.87, 15.29 ve 16.96 alıkonma zamanlarında geldikleri tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1’de, UPLC ve SBWC sistemlerinde gerçekleştirilen ilk denemelerde, Waters XTerra MS C18 kolonda yapılan ayırım için geçen süre ve harcanan organik çözücü miktarı karşılaştırılmıştır.

**Çizelge 4.1:** UPLC ve SBWC ile gerçekleştirilen ayırım sonuçlarının karşılaştırılması.

Sıcaklık	Alıkonma Zamanı (dk)			Tüketilen Asetonitril (mL)	Atık Asetonitril (mL)
	Vanilin	Etil Vanilin	Kumarin		
UPLC (40°C)	6.87	15.29	16.96	24.5	24.5
SBWC (150°C)	4.60	8.82	12.40	0	0
SBWC (180°C)	3.36	5.64	7.98	0	0
SBWC (200°C)	2.93	4.57	6.38	0	0

Çizelge 4.1 incelendiğinde, 40 °C’de UPLC ile yapılan çalışmalarda kumarinin alıkonma süresi 17 dakika olarak tespit edilirken, 150 °C’de SBWC ile yapılan çalışmalarda kumarinin alıkonma süresi 12 dakika olarak tespit edilmiştir. Yüksek sıcaklıklarda suyun dielektrik sabiti azaldığı için elüsyon gücü artmış ve gerçekleştirilen kromatografik ayırımda su, su-organik çözücü karışımı gibi

davranmıştır. Bunun yanında viskozitesinin de azalması hızlı bir ayırma olanak sağlayıp analiz süresini kısaltmıştır. Çizelge 4.1’de de görüldüğü gibi artan sıcaklıkla maddelerin alıkonma süreleri kısalmış ve organik çözücü sarfiyatı sıfıra indirilmiştir. Böylece subkritik su kromatografisinin zararlı organik çözücüler olmaksızın göstermiş olduğu ayırma performansı ile güvenilir, ekonomik ve çevre açısından yeşil bir teknik olduğu belirtilmiştir.

#### 4.2 HPLC Kolonu Kullanarak Bileşenlerin Ayrılması

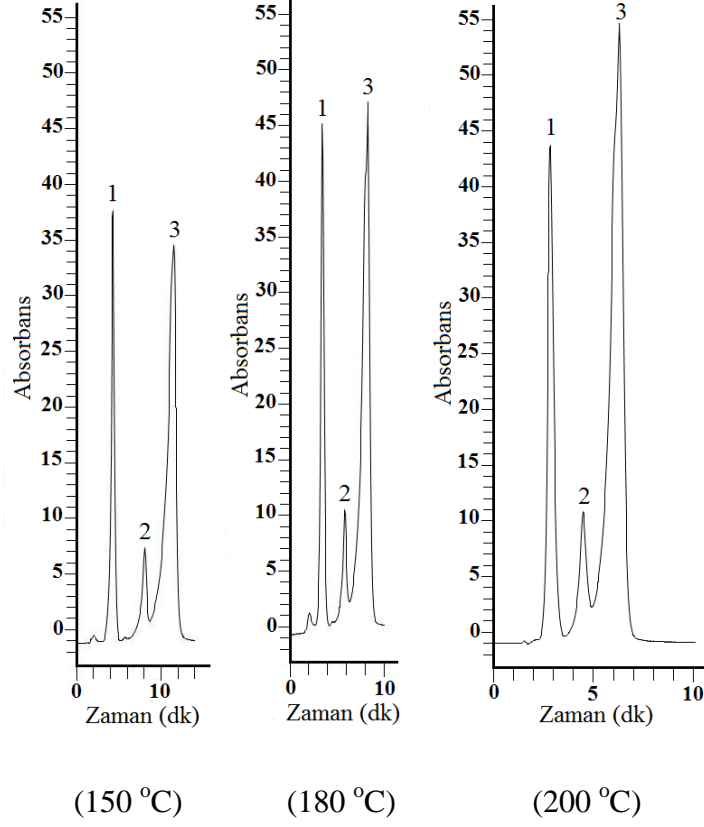
Karışımların subkritik su kromatografisinde etkin bir şekilde ayrılması için kromatografik çalışmalar 5 farklı sıvı kromatografi kolonu ile gerçekleştirilmiştir. Bu kolonların markaları ve özellikleri Çizelge 4.2’de belirtilmiştir. Kromatografik çalışmalarda bu kolonların kullanılmasının nedeni, sabit fazlarının yüksek sıcaklıkta gösterdikleri termal kararlılığın diğer ticari kolonlara göre daha fazla olmasıdır.

**Çizelge 4.2:** Kumarin ve türevlerinin ayrılmasında kullanılan HPLC kolonları ve özellikleri.

Kolon Markası	Kolon boyutu	Partikül boyutu	Sabit faz
Waters XTerra MS C18	4,6x100 mm	3,5 µm	Hibrit partiküller
Waters XBridge C18	4,6x100 mm	3,5 µm	3 Fonksiyonlu C18
Zorbax RRHD Eclipse Plus	2,1x50 mm	1,8 µm	Geliştirilmiş dimetil-n-oktadesil silan
Zorbax SB Phenyl	4,6x150 mm	5 µm	Mikro gözenekli silika
Zorbax SB C18	4,6x150 mm	5 µm	Sterik korumalı C18

##### 4.2.1 Waters XTerra MS C18 (4.6 mm x 100 mm, 3.5 µm)

Waters XTerra MS C18 kolonu kumarin ve türevlerinin subkritik su kromatografisi ile ayrılmasında kullanılmıştır. Mobil faz olarak %1 formik asit ve %99 ultra saf su kullanılmıştır. Kromatografik ayırmlar sıcaklık 100-200 °C arasında, mobil faz akış hızı 1.0 mL/dk ve numune konsantrasyonu 25 ppm olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Karışımların ayrılmasında sıcaklık etkisini göstermektedir (Şekil 4.3).

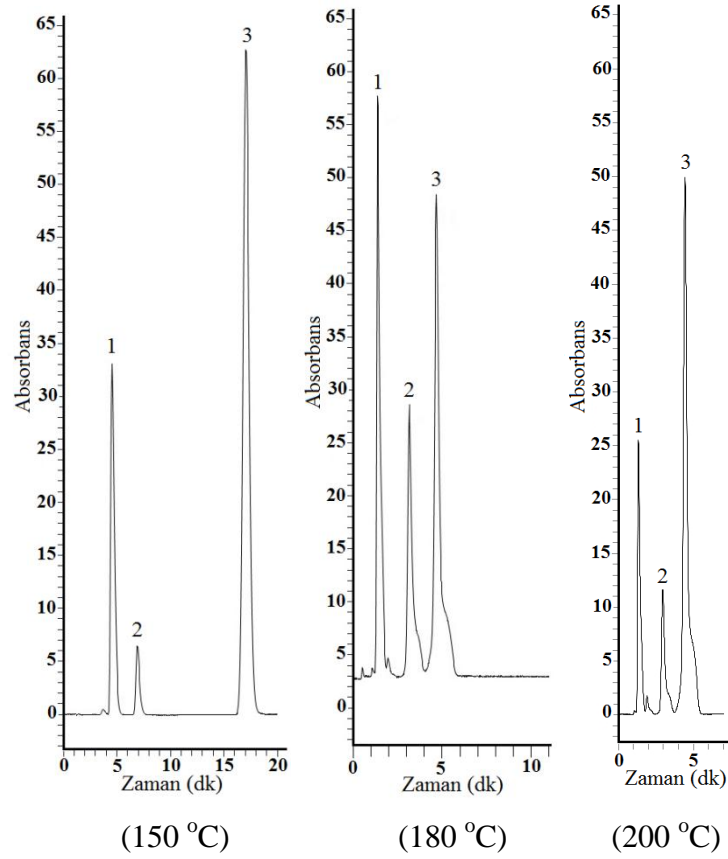


**Şekil 4.3:** Kumarin ve türevlerinin Waters X-Terra MS C18 kolon ile farklı sıcaklıklarda ayrılması ( 1. Vanilin, 2. Etil Vanilin, 3. Kumarin).

Waters XTerra MS C18 kolon kullanılarak yapılan çalışmalar sonucunda belirtilen bileşiklerin 200 °C'lik kolon sıcaklığındaki ayrımları toplamda 7 dakikada gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.3'te gösterilen kromatogramlar incelendiğinde sıcaklığın artırılması ile bileşiklerin alıkonma sürelerinde kısalma olduğu ancak etil vanilin ve kumarin piklerinin çakışması nedeniyle iyi bir ayrımın yapılamadığı gözlemlenmiştir. Sıcaklık artışıyla pik yüksekliklerinin iyileşmesinin analit çözünürlüklerindeki artıştan kaynaklandığı düşünülmektedir.

#### 4.2.2 Waters XBridge C18 (4.6 mm x 100 mm, 3.5 µm)

Waters XBridge C18 kolonu kumarin ve türevlerinin subkritik su kromatografisi ile ayrılmasında kullanılmıştır. Mobil faz olarak %1 formik asit ve %99 ultra saf su kullanılmıştır. Kromatografik çalışmalar 100-200 °C arasında gerçekleştirilmiş olup, mobil faz akış hızı 1.0 mL/dk ve 2.5 mL/dk arasında değiştirilmiş ve numune konsantrasyonu 25 ppm olacak şekilde ayrımlar yapılmıştır. Şekil 4.4'te, bileşenlerin ayrılmasında sıcaklık etkisini göstermektedir.

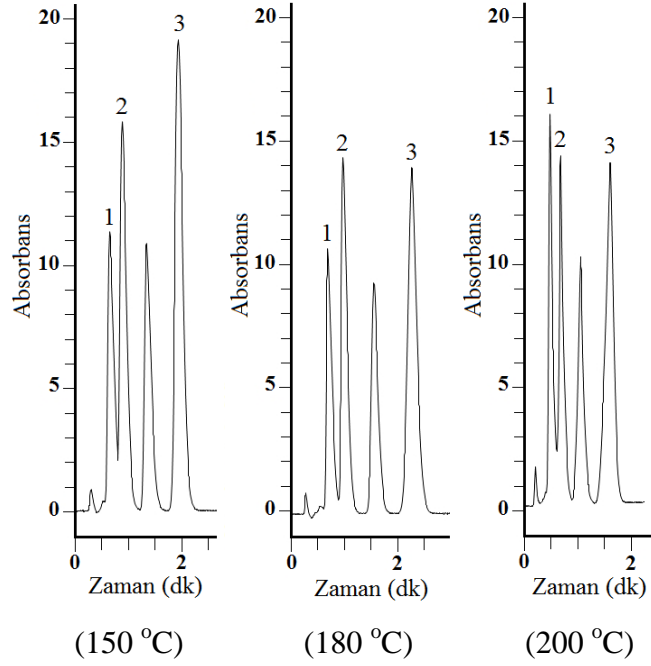


**Şekil 4.4:** Kumarin ve türevlerinin Waters X-Bridge C18 kolon ile farklı sıcaklıklarda ayrılması (1. Vanilin, 2. Etil Vanilin, 3. Kumarin).

Waters XBridge MS C18 kolon ile yapılan kromatografik ayrımlarda 150 °C’de bileşiklerin çok iyi bir şekilde ayrıldığı gözlemlenmiştir. Bununla birlikte sıcaklığın artırılmasıyla bileşiklerin alıkonma zamanlarında kısalma fakat pik karakterlerinde de bir değişim olduğu belirtilmiştir. Pik karakterlerindeki değişimlerin nedeni olarak yüksek sıcaklıklarda kolon dolgu maddesinin yapısında meydana gelen değişmelerin etkin olabileceği düşünülmektedir.

#### 4.2.3 Zorbax RRHD Eclipse Plus (2.1 mm x 50 mm, 1.8 µm)

Zorbax RRHD Eclipse Plus, kumarin ve türevlerinin subkritik su kromatografisi ile ayrılmasında kullanılan bir diğer kolondur. Mobil faz olarak %1 formik asit ve %99 ultra saf su kullanılmıştır. Kromatografik ayrımlar 100-200 °C arasında, mobil faz akış hızı 0.9 mL/dk ve 1.5 mL/dk aralığında ve numune konsantrasyonu 5 ppm olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.5’te, karışımların ayrılmasında sıcaklık etkisini göstermektedir.

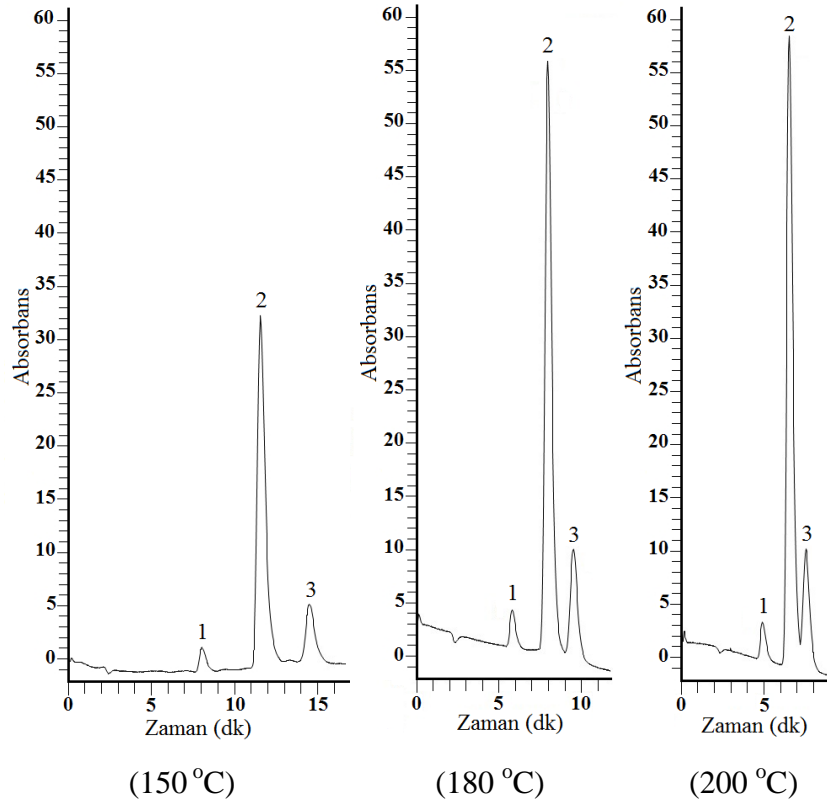


**Şekil 4.5:** Kumarin ve türevlerinin Zorbax RRHD Eclipse Plus kolon ile farklı sıcaklıklarda ayrılması (1. Vanilin, 2. Etil Vanilin, 3. Kumarin).

Zorbax RRHD Eclipse Plus kolonu, kolon ve partikül boyutları nedeniyle çalışılan diğer kolonlardan farklı bir takım özelliklere sahiptir. Kolon uzunluğunun 50 mm ve gözenek boyutunun 1,8  $\mu\text{m}$  olması yüksek kolon iç basıncı sağlamaktadır. Kolon iç basıncının dengelenmesi için çalışma değişik mobil faz akış hızlarında gerçekleştirilmiştir. Çalışılan bütün sıcaklıklarda bileşenlerin kromatogramlarından farklı olarak, parçalanma ürünü olduğu tahmin edilen bir pik gözlenmiştir. Yapılan ayırım çalışmalarında 150 °C’de bileşenlerin 3 dakika gibi bir sürede ayrıldığı ve sıcaklığın 200 °C’ye yükseltilmesi ile toplam alıkonma süresinin 2 dakika olduğu gözlemlenmiştir.

#### 4.2.4 Zorbax SB Phenyl (4.6 mm x 150 mm, 5 $\mu\text{m}$ )

Zorbax SB Phenyl kolonu kumarin ve türevlerinin subkritik su kromatografisi ile ayrılmasında yer almıştır. Mobil faz olarak %1 formik asit ve %99 ultra saf su kullanılmıştır. Kromatografik çalışmalar 100-200 °C arasında gerçekleştirilmiştir. Mobil faz akış hızı 1.0 mL/dk ve numune konsantrasyonu 25 ppm olacak şekilde ayarlanmıştır. Şekil 4.6’da, bileşenlerin ayrılmasında sıcaklık etkisini göstermektedir.

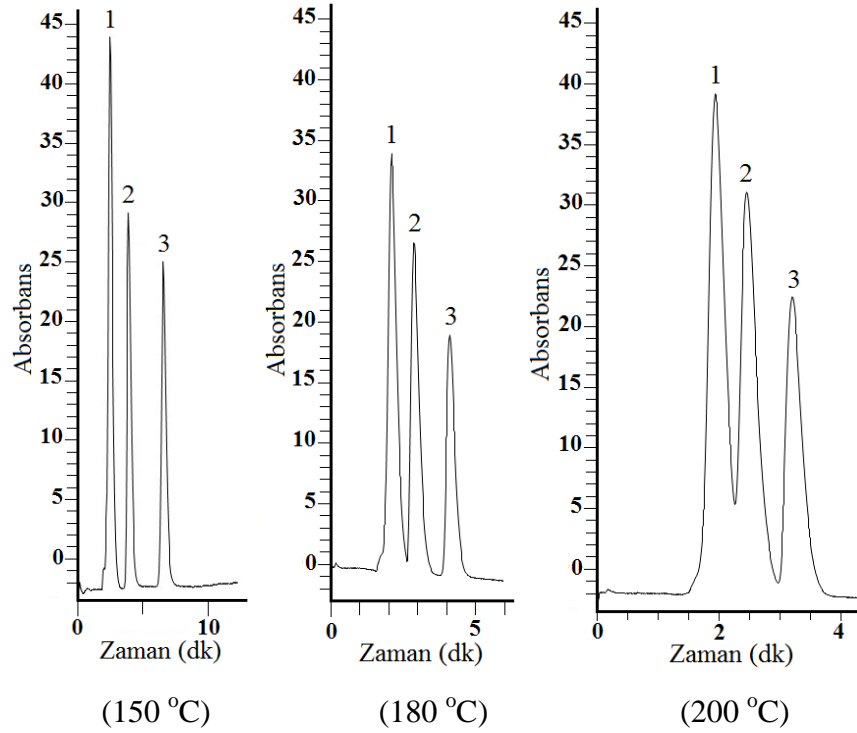


**Şekil 4.6:** Kumarin ve türevlerinin Zorbax SB Phenyl kolon ile farklı sıcaklıklarda ayrılması (1. Vanilin, 2. Etil Vanilin, 3. Kumarin).

Zorbax SB Phenyl kolon ile yapılan kromatografik çalışmalar sonucunda 150 °C’de bileşiklerin çok iyi bir şekilde ayrıldığı gözlemlenmiştir. Sıcaklığın artırılmasıyla bileşiklerin alıkonma sürelerinin kısaldığı ve çözünürlüklerinin arttığı belirlenmiştir. Ayrıca 200 °C’de etil vanilin ve kumarin piklerinin çakışması nedeniyle iyi bir ayırımın yapılamadığı tespit edilmiştir. Pik karakterindeki değişimin nedeni olarak yüksek sıcaklıklarda kolon dolgu maddesinin yapısında meydana gelen değişmelerin etkin olabileceği düşünülmektedir.

#### 4.2.5 Zorbax SB C18 (4.6 mm x 150 mm, 5 µm)

Zorbax SB C18 kolonu kumarin ve türevlerinin subkritik su kromatografisi ile ayrılmasında kullanılmıştır. Mobil faz olarak %1 formik asit ve %99 ultra saf su kullanılmıştır. Kromatografik ayrımlar sıcaklık 100-200 °C arasında, mobil faz akış hızı 1.0 mL/dk ve numune konsantrasyonu 10 ppm olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.7’de, karışımların ayrılmasında sıcaklık etkisini göstermektedir.



**Şekil 4.7:** Kumarin ve türevlerinin Zorbax SB C18 kolon ile farklı sıcaklıklarda ayrılması (1. Vanilin, 2. Etil Vanilin, 3. Kumarin).

Zorbax SB C18 kolonu kullanılarak yapılan ayırma işlemlerinde 150 °C’de bileşiklerin toplam 7 dakika gibi bir sürede ve çok iyi bir şekilde ayrıldıkları gözlemlenmiştir. Bununla birlikte sıcaklığın artırılması sonucu alıkonma sürelerinin azaldığı, kromatogramların birbirine yaklaşılmaya başladığı ve 200 °C sıcaklıkta vanilin ve etil vanilin piklerinin üst üste çakışmasıyla iyi bir ayırımın yapılamadığı tespit edilmiştir.

Kumarin ve türevlerinin farklı kolon türleri ile subkritik su kromatografisi kullanılarak gerçekleştirilen kromatografik ayırmlarında, bileşiklerin alıkonma zamanına sıcaklığın etkisi Çizelge 4.3’te gösterilmiştir.



**Çizelge 4.3:** Bileşiklerin alıkonma zamanına sıcaklığın etkisi.

Sıcaklık	Alıkonma zamanı (dk) (Waters XBridge C18 kolon)		
	Kumarin	Vanilin	Etil Vanilin
150 °C	17.07	4.55	6.90
180 °C (2.5)*	4.68	1.39	3.16
200 °C (2.5)*	4.44	1.34	2.96
Sıcaklık	Alıkonma zamanı (dk) (Waters XTerra MS C18 kolon)		
	Kumarin	Vanilin	Etil Vanilin
150 °C	12.40	4.60	8.82
180 °C	7.98	3.36	5.64
200 °C	6.38	2.93	4.57
Sıcaklık	Alıkonma zamanı (dk) (Zorbax SB Phenyl kolon)		
	Kumarin	Vanilin	Etil Vanilin
150 °C	14.50	8.04	11.55
180 °C	9.52	5.80	7.96
200 °C	7.53	4.91	6.52
Sıcaklık	Alıkonma zamanı (dk) (Zorbax RRHD Eclipse Plus kolon)		
	Kumarin	Vanilin	Etil Vanilin
150 °C (0.9)*	1.93	0.65	0.88
180 °C (1.1)*	2.26	0.69	0.98
200 °C (1.5)*	1.61	0.48	0.68
Sıcaklık	Alıkonma zamanı (dk) (Zorbax SB C18 kolon)		
	Kumarin	Vanilin	Etil Vanilin
150 °C	6.57	2.49	3.10
180 °C	4.10	2.10	2.87
200 °C	3.20	1.94	2.46

(\* Mobil faz akış hızı)

Yüksek sıcaklıkta suyun viskozitesinin azalması ile birlikte bileşiklerin difüzyonu ve kütle transferi artmıştır. Ayrıca azalan viskozite sistem geri basıncını düşürmüş ve yüksek akış hızı kullanımına olanak sağlamıştır. Artan akış hızıyla birlikte analiz süresi kısalmış ve hızlı bir ayırım gerçekleştirilmiştir. Böylece artan sıcaklıkla birlikte suyun fizikokimyasal özellikleri değişmiş ve organik çözücüler olmaksızın iyi bir ayırım elde edilmiştir.

### 4.3 Entalpi ve Entropi Değerlerinin Hesaplanması

Ters faz sıvı kromatografisinde alıkonma faktörüne sıcaklığın etkisi Van't Hoff eşitliği ile açıklanmaktadır. Alıkonma faktörünün ( $k'$ ), entalpi ve entropi ile ilişkisini içeren eşitlik;

$$\ln k = \frac{-\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} + \ln \phi \quad (4.1)$$

şeklinde ifade edilmektedir. Burada  $k$ ; kromatografik alıkonma faktörü,  $\Delta H^\circ$ ; sabit fazdan mobil faza çözünen için standart entalpi,  $\Delta S^\circ$ ; sabit fazdan mobil faza çözünen için standart entropi,  $T$ ; çalışılan sıcaklık ve  $\phi$ ; hacim faz oranı olarak nitelendirilmektedir. Van't Hoff eşitliğine göre  $\ln k$  değerinin  $1/T$  değerine karşı çizilen grafiği doğrusal olmalıdır ve artan sıcaklıkla alıkonma süresi azalmaktadır.  $1/T$  ye karşılık  $\ln k$  grafiğe geçirildiğinde oluşan eğrinin eğimi entalpiyi vermektedir. Ters fazdaki tipik entalpi etkileşimleri küçük moleküller için (-10) ile (-15) arasında iken büyük moleküller için genellikle büyük (negatif) entalpi değerlerindedir. Sıcaklık değişimi büyük  $\Delta H^\circ$ 'lı analitleri küçük  $\Delta H^\circ$ 'lı analitlerden daha çok etkilemekte ve bu nedenle yüksek sıcaklıkta seçicilikte değişiklik olabilmektedir (Greibrokk ve Andersen, 2003; McNeff vd., 2007).

Kumarin ve türevlerinin subkritik su kromatografisi ve farklı kolon türleri kullanılarak yapılan ayırım çalışmalarında Van't Hoff eşitliği kullanılarak  $\ln k$  değerinin  $1/T$  değerine karşı grafiği çizilmiş ve elde edilen grafikler EK.A'da verilmiştir.

Veriler kullanılarak yapılan grafik çizimleri sonucu kumarin ve türevleri için standart entalpi değerleri ve korelasyon katsayıları hesaplanmıştır. Elde edilen veriler Çizelge 4.4'te gösterilmiştir.

**Çizelge 4.4:** Farklı kolon türleri ile kumarin ve türevleri için elde edilen entalpi verileri.

Bileşik	Kumarin Entalpi $\Delta H^\circ$ (kJ/mol)	Korelasyon ( $R^2$ )	Vanilin Entalpi $\Delta H^\circ$ (kJ/mol)	Korelasyon ( $R^2$ )	Etil Vanilin Entalpi $\Delta H^\circ$ (kJ/mol)	Korelasyon ( $R^2$ )
Waters XBridge C18	-35.27	0.9360	-39.46	0.9705	-32.39	0.9856
Waters XTerra MS C18	-22.22	0.9993	-17.97	0.9898	-23.29	1
Zorbax SB Phenyl	-23.83	0.9994	-13.40	0.9873	-18.97	0.9998
Zorbax RRHD Eclipse Plus	-20.04	0.8810	-21.05	0.9068	-19.01	0.9336
Zorbax SB C18	-29.21	0.9944	-5.68	0.8832	-9.56	0.8608

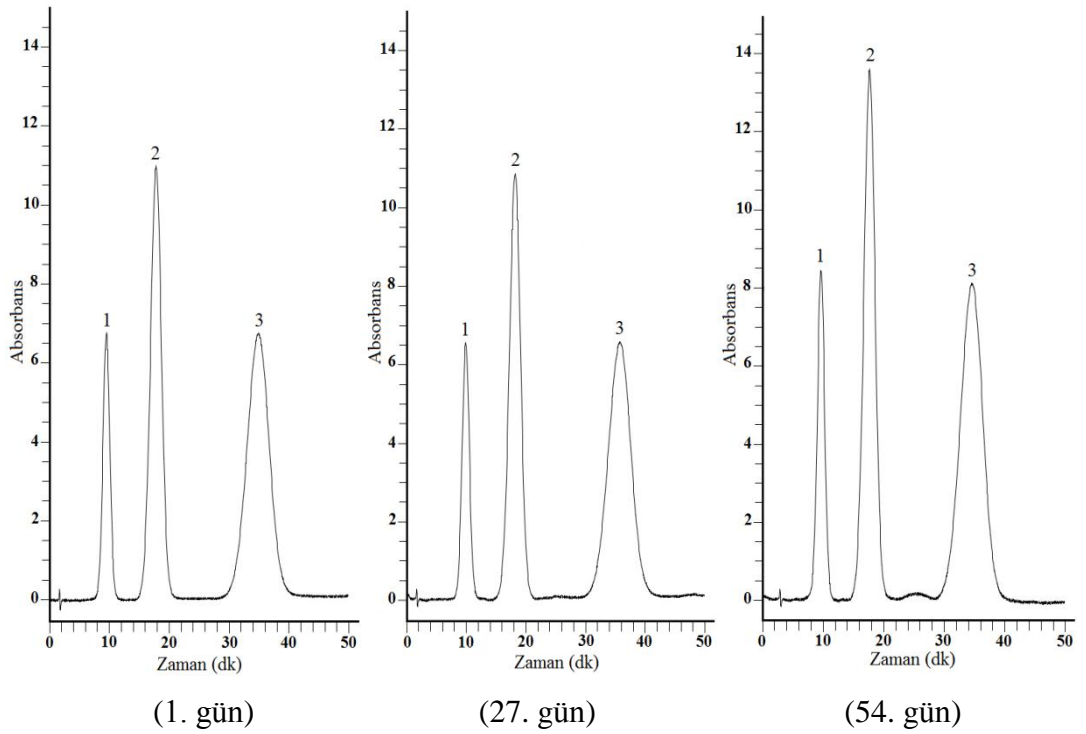
Yapılan kromatografik ayrımlarda bütün şartlarda entalpi değerleri negatif olarak bulunmuştur ve bu sonuç çalışılan kolonlarda bileşiklerin alıkonmalarının ekzotermik bir işlem olduğunu göstermiştir. Artan sıcaklıkla bileşiklerin alıkonma zamanları ve alıkonma faktörleri sistematik bir şekilde azalmıştır. Zorbax RRHD Eclipse Plus kolon hariç diğer kolonlarda bileşenler için çizilen van't Hoff grafiklerinin doğrusal olduğu ve korelasyon katsayılarının yaklaşık olarak  $R^2 = 0.98-0.99$  aralığında değiştiği tespit edilmiştir. Bu da subkritik su kromatografisinde bileşiklerin alıkonma zamanları ile değişen sıcaklık arasında çok hassas bir ilişki olduğunu göstermektedir.

#### 4.4 NA-PHEMAH Kolonun Termal Kararlılığı

Sabit faz olarak kullanılacak olan NA-PHEMAH partiküllerinin kolona doldurulmadan önce 100-200 °C sıcaklık aralığında ısı testine maruz bırakılması ile kararlılıkları ölçülmüş, molekül yapısında herhangi bir değişim olup olmadığı kontrol edilmiş ve ısı testleri sonucunda partiküllerin yapısında herhangi bir bozunma meydana gelmediği tespit edilmiştir. Sentezlenen mikrokürelerin kolona doldurulmasının ardından kromatografik ayrımların yüksek sıcaklıklarda yapılması nedeniyle yeni hazırlanan kolona tekrar termal kararlılık testi uygulanmıştır. NA-PHEMAH kolonunun termal kararlılık çalışmalarında kullanılmasının birinci aşamasında 125-180 °C sıcaklık aralığında çalışılmış ve mobil faz olarak sadece ultra

saf su kullanılmıştır. Mobil faz olarak sadece ultra saf su kullanıldığında çalışılan sıcaklıklarda herhangi bir kromatogram gözlenememiş ve dolayısıyla karışımların ayrılmasında bir başarı elde edilememiştir.

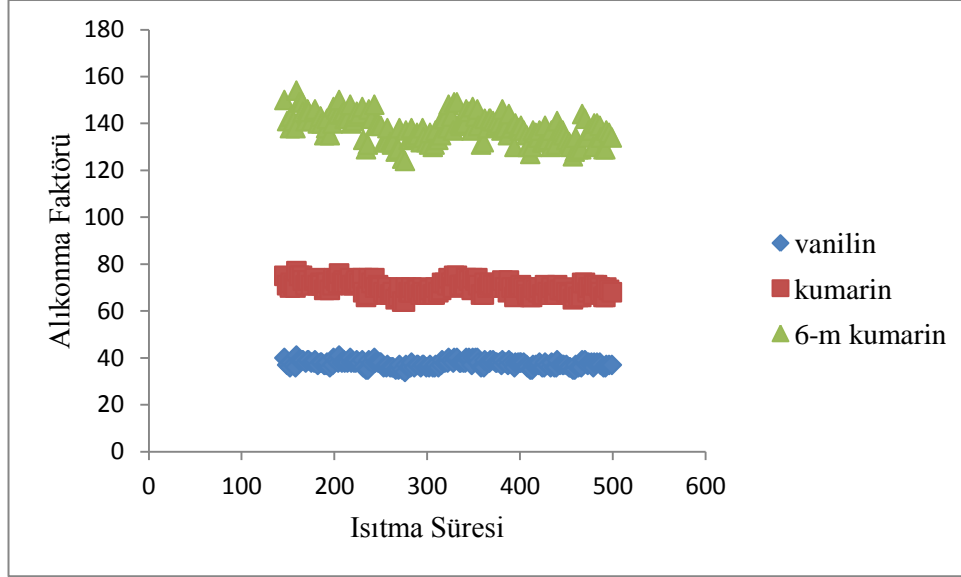
İkinci aşamada suyun elüsyon gücünü artırmak için sıcaklığa alternatif olarak mobil faza organik çözücü eklenmiştir ve termal kararlılık çalışmalarında mobil faz olarak %2 metanol- %1 formik asit- %97 ultra saf su kullanılmıştır. Ayrımlar 150 °C sıcaklıkta ve 1.5 mL/dk mobil faz akış hızında, test karışımı olarak vanilin, kumarin ve 6-metil kumarin kullanılarak ve bileşenlerin konsantrasyonu sırasıyla 20: 30 ve 40 ppm olacak şekilde hazırlanarak gerçekleştirilmiştir. Karışımların ayrılmasında, kolon 150 °C'ye şartlandırılmış ve sonrasında her 2- 3 saatte bir enjeksiyon yapılarak günde 8 saat olmak üzere toplamda 500 saat çalıştırılmıştır. Çalışmalar sonucunda elde edilen kromatogramlardan bazıları Şekil 4.8'de gösterilmiştir.



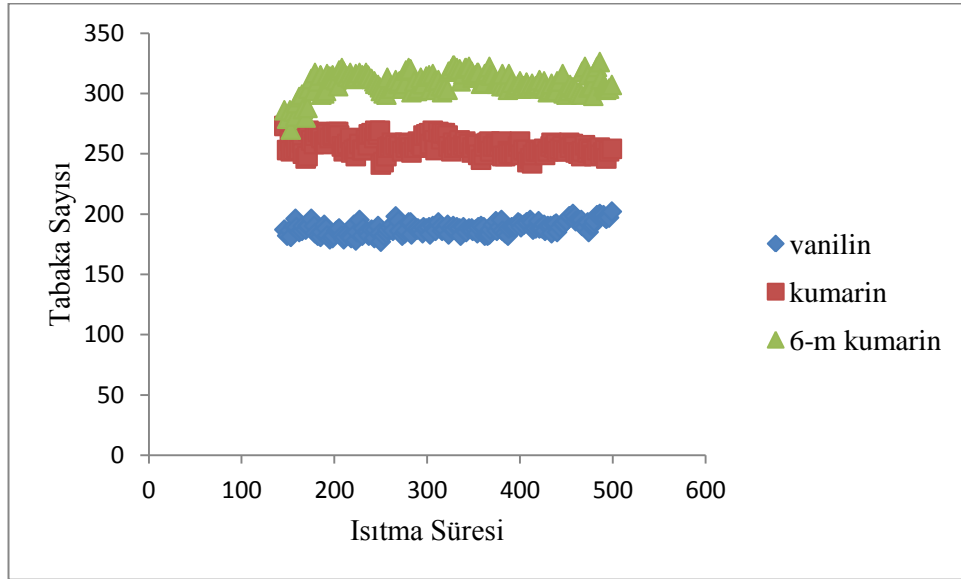
**Şekil 4.8:** Kumarin ve türevlerinin naftilamin-PHEMA sabit fazlı kolonda gerçekleştirilen termal kararlılık kromatogramları (1. Vanilin (20 ppm), 2. Kumarin (30 ppm), 3. (6)-Metil Kumarin (40 ppm)).

Şekil 4.8'deki kromatogramlar incelendiğinde iyi bir ayrımın gerçekleştiği tespit edilmiştir. Ayrım süresince kolonda ve pik karakterinde herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Sıcaklığın 150 °C'de sabit tutulmasına rağmen bileşenlerin

çözünürlükleri artmış ve pik simetrisi gelişmiştir. Bu gelişmelerin ısıtma süresinin uzun tutulmasından kaynaklandığı düşünülmüştür ve bu süre içinde teorik tabaka sayısı ve alıkonma faktörünün kolon verimliliğini açıklamada kullanılan önemli parametreler olduğu Şekil 4.9 ve Şekil 4.10’da çizilen grafiklerde gösterilmiştir.



**Şekil 4.9:** SBWC’de ısıtma süresinin alıkonma faktörü üzerine etkisi.



**Şekil 4.10:** SBWC’de ısıtma süresinin tabaka sayısı üzerine etkisi.

Kromatografik ayrımlarda kolon, sabit sıcaklıkta uzun süre çalıştığı için bileşenlerin alıkonma süreleri ve pik genişlikleri zamanla azalmıştır. Buna bağlı olarak kolonun teorik tabaka yüksekliği azalmış ve kolon verimi artmıştır. Şekil 4.9 incelendiğinde 6- metil kumarin hariç diğer bileşenlerin alıkonma faktörleri değişmemiştir. 6- metil kumarinin tekrarlanabilirliği düşük olsa da tüm bileşenlerin kolon etkinliği artmıştır.

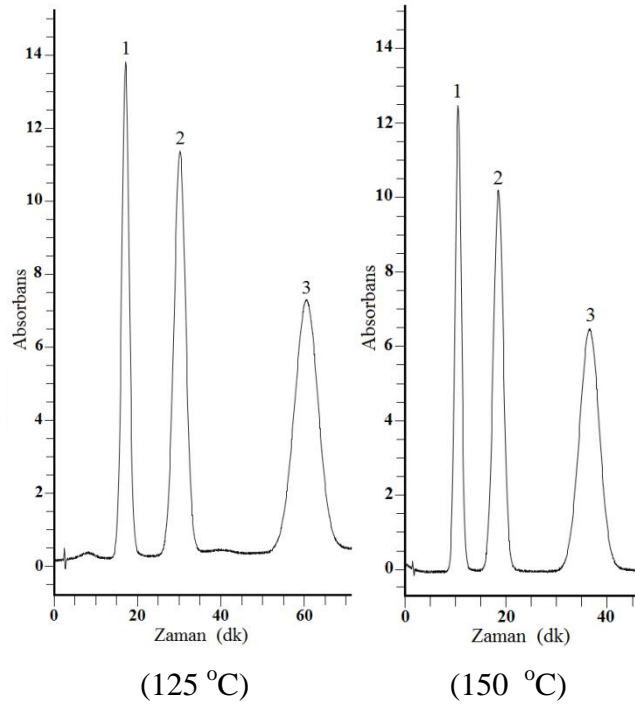
Çalışılan 500 saat boyunca partiküllerin yapısında herhangi bir bozunma meydana gelmemiş ve kolonun çalışma şartlarında oldukça kararlı olduğu tespit edilmiştir.

#### **4.5 NA-PHEMAH Mikrokürelerinin Sabit Faz Olarak Kullanıldığı**

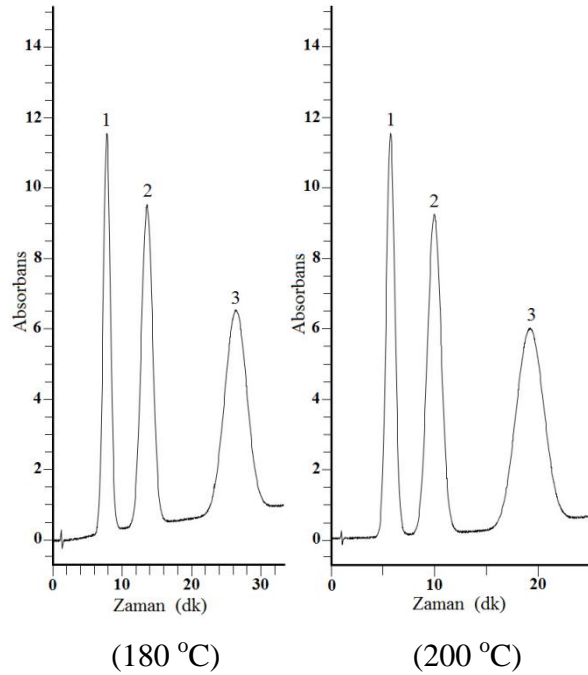
##### **Kromatografik Ayrımlar**

NA-PHEMAH kolon ile yüksek sıcaklıklarda daha iyi kromatografik ayrımlar gerçekleştirebilmek için bu aşamada yüksek sıcaklık sıvı kromatografisi (HTLC) kullanılmıştır. NA-PHEMAH kolon ile kumarin ve türevlerinin kromatografik çalışmalarında sadece ultra saf su kullanıldığında çalışılan sıcaklıklarda karışımların ayrılmasında bir başarı elde edilemediği için saf suyun elüsyon gücünü artırmak amacıyla yüksek sıcaklığa alternatif olarak mobil fazda su yanında organik çözücü yer almıştır ve ayrımlarda %2 metanol- %1 formik asit- %97 ultra saf su ve %5 metanol- %1 formik asit- %94 ultra saf su karışımları mobil faz olarak kullanılmıştır.

Mobil faz olarak %2 metanol- %1 formik asit- %97 ultra saf su kullanıldığında, mobil faz akış hızı 1.0-2.5 mL/dk aralığında ve 125-200 °C sıcaklık aralığında karışımların ayrımı gerçekleştirilmiştir. Ayrım çalışmaları için iki farklı karışım sistemi kullanılmıştır. Birinci karışım sistemi vanilin, kumarin ve 6- metil kumarin bileşiklerinden oluşurken, ikinci karışım sistemi vanilin, etil vanilin ve 7- metil kumarin bileşenlerinden oluşturulmuştur. Elde edilen kromatogramlar Şekil 4.11a ve Şekil 4.11b'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.11a:** Kumarin ve karışımlarının naftilamin-PHEMAH sabit fazlı kolonda gerçekleştirilen ayırım kromatogramları (1. Vanilin (20 ppm), 2. Kumarin (30 ppm), 3. (6)-Metil Kumarin (40 ppm)).

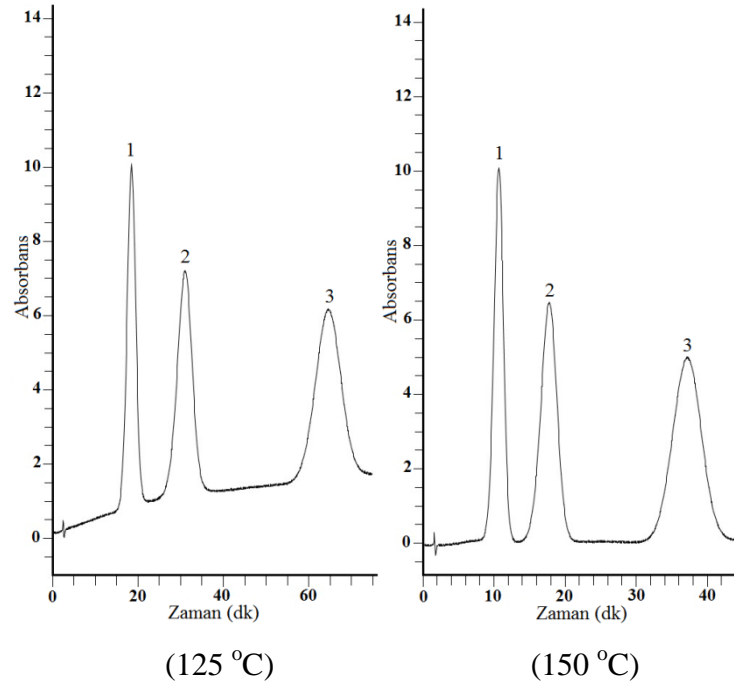


**Şekil 4.11b:** Kumarin ve karışımlarının naftilamin-PHEMAH sabit fazlı kolonda gerçekleştirilen ayırım kromatogramları (1. Vanilin (20 ppm), 2. Kumarin (30 ppm), 3. (6)-Metil Kumarin (40 ppm)).

Şekil 4.11'deki kromatogramlar incelendiğinde çalışılan bütün sıcaklıklarda iyi bir ayırımın gerçekleştiği gözlemlenmiştir. 125 °C kolon sıcaklığında bileşikler toplamda

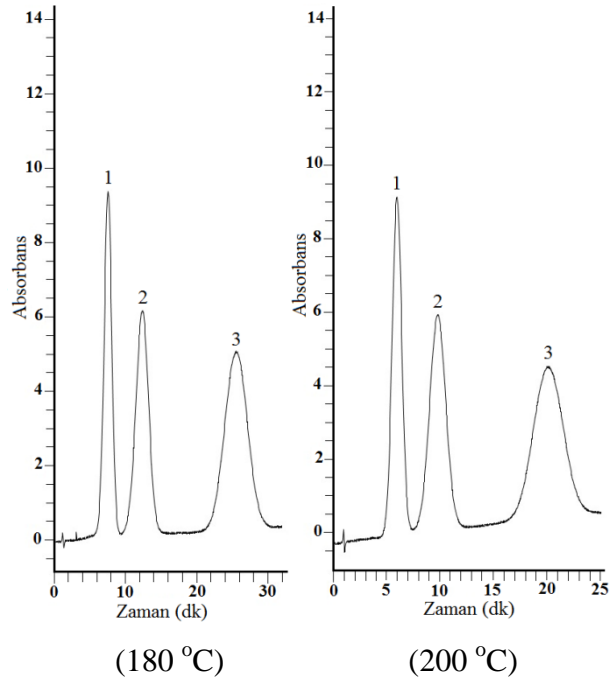
70 dakika gibi oldukça uzun bir alıkonma süresi sonunda ayrılırken, sıcaklığın 200 °C'ye yükseltilmesi ile birlikte alıkonma süresi toplamda 25 dakika olarak belirlenmiş ve vanilin, kumarin ve 6-metil kumarin bileşiklerinin ayrılması gerçekleştirilmiştir. Artan sıcaklıkla bileşenlerin alıkonma sürelerinin azalması yanında pik simetrisinin de arttığı gözlemlenmiştir.

İkinci karışım sistemini oluşturan vanilin, etil vanilin ve 7-metil kumarin bileşenlerinin ayrılmasında mobil faz olarak %2 metanol- %1 formik asit- %97 ultra saf su karışımı kullanılmış, mobil faz akış hızı 1.0-2.5 mL/dk aralığında olacak şekilde ve 125-200 °C sıcaklık aralığında karışımların ayırım çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen kromatogramlar Şekil 4.12a ve 4.12b'de gösterilmiştir.



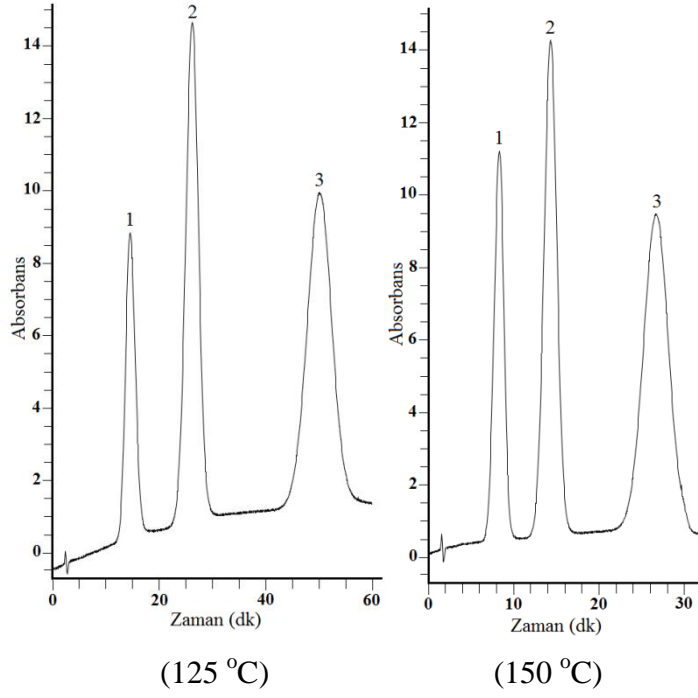
**Şekil 4.12a:** Kumarin ve karışımlarının naftilamin-PHEMAH sabit fazlı kolonda gerçekleştirilen ayırım kromatogramları (1. Vanilin (20 ppm), 2. Etil Vanilin (30 ppm), 3. (7)-Metil Kumarin (40 ppm)).



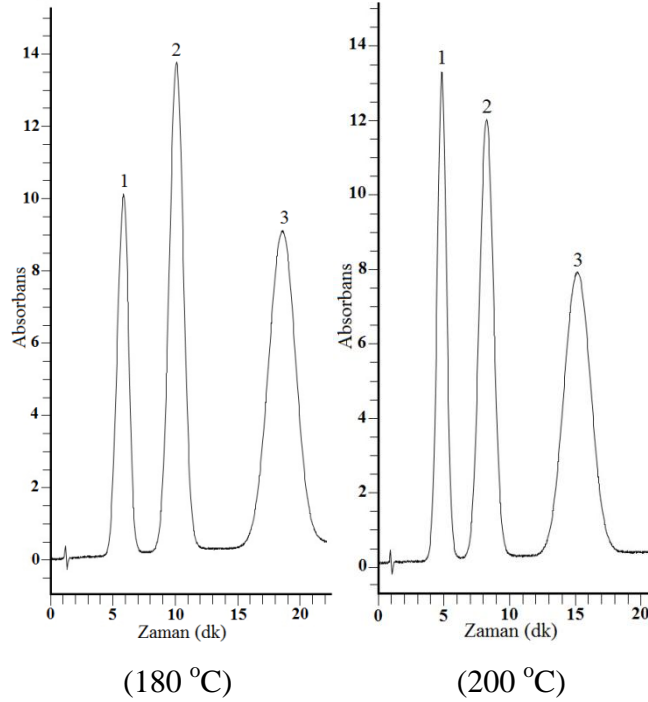


**Şekil 4.12b:** Kumarin ve karışımlarının naftilamin-PHEMAH sabit fazlı kolonda gerçekleştirilen ayırım kromatogramları (1.Vanilin (20 ppm), 2.Etil Vanilin (30 ppm), 3. (7)-Metil Kumarin (40 ppm)).

Şekil 4.12'deki kromatogramlar incelendiğinde çalışılan bütün sıcaklıklarda yine iyi bir ayırımın gerçekleştiği gözlemlenmektedir. Sıcaklığın arttırılmasıyla bileşiklerin alıkonma süreleri kısalmış ancak pik karakterlerinde bir değişiklik olmamıştır. Mobil faz olarak %5 metanol- %1 formik asit- %94 ultra saf su kullanıldığında, mobil faz akış hızı 1.0-2.5 mL/dk aralığında ve 125-200 °C sıcaklık aralığında karışımların ayırımları gerçekleştirilmiştir. Birinci karışım sistemi için elde edilen kromatogramlar Şekil 4.13a ve 4.13b'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.13a:** Kumarin ve karışımlarının naftilamin-PHEMAH sabit fazlı kolonda gerçekleştirilen ayırım kromatogramları (1.Vanilin (20 ppm), 2.Kumarin (30 ppm), 3.(6)-Metil Kumarin (40 ppm)).

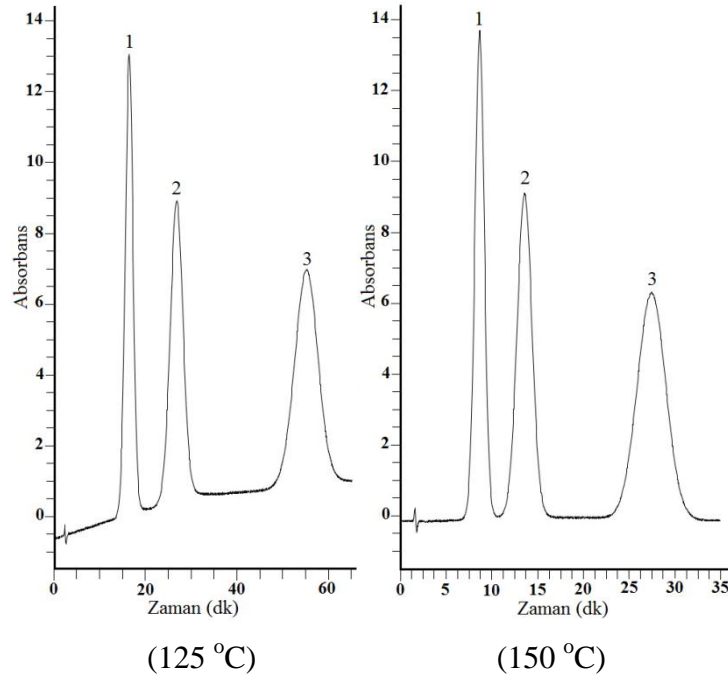


**Şekil 4.13b:** Kumarin ve karışımlarının naftilamin-PHEMAH sabit fazlı kolonda gerçekleştirilen ayırım kromatogramları (1.Vanilin (20 ppm), 2.Kumarin (30 ppm), 3.(6)-Metil Kumarin (40 ppm)).

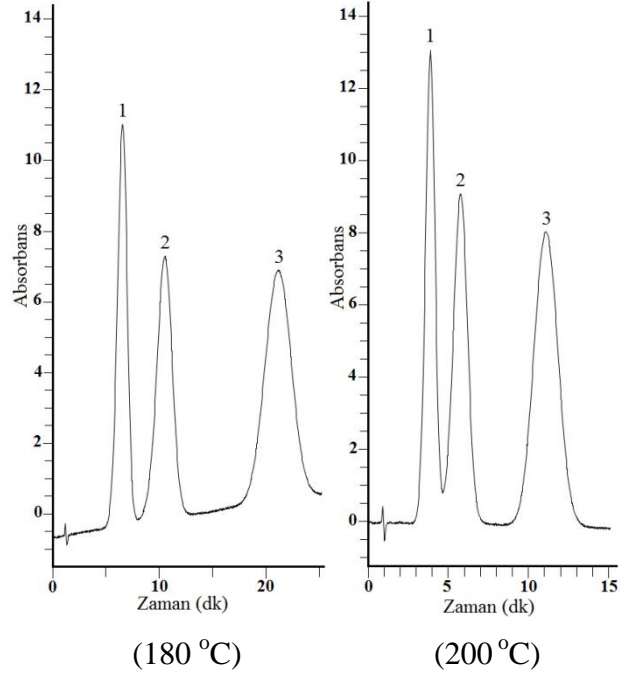
Şekil 4.13'teki kromatogramlar incelendiğinde çalışmalar sonucunda iyi bir ayırımı gerçekleştirildiği belirtilmiştir. Sıcaklığın artması ile bileşiklerin alıkonma sürelerinde

azalma ve çözünürlüklerindeki artıştan kaynaklanan pik yüksekliği gözlemlenmiştir. Mobil faz karışımındaki metanol oranının %2'den %5'e yükseltilmesi ile bileşiklerin ayrımının daha kısa alıkonma sürelerinde gerçekleştiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte mümkün olan en az organik çözücü miktarını kullanmak amacıyla ve kullanılan metanol yüzdelerinde de iyi bir ayrımın gerçekleştirilmiş olması nedeniyle, mobil faz içindeki metanol oranı en fazla %5 olacak şekilde sabit tutulmuştur.

İkinci karışım sistemini oluşturan vanilin, etil vanilin ve 7-metil kumarin bileşenlerinin kromatografik çalışmalarında mobil faz olarak %5 metanol- %1 formik asit- %94 ultra saf su karışımı kullanılmış, mobil faz akış hızı 1.0-2.5 mL/dk aralığında olacak şekilde ayarlanmış ve 125-200 °C sıcaklık aralığında karışımların ayrımları yapılmıştır. Elde edilen kromatogramlar Şekil 4.14a ve Şekil 4.14b'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.14a:** Kumarin ve karışımlarının naftilamin-PHEMAH sabit fazlı kolonda gerçekleştirilen ayırım kromatogramları (1. Vanilin (20 ppm), 2. Etil Vanilin (30 ppm), 3. (7)-Metil Kumarin (40 ppm)).



**Şekil 4.14b:** Kumarin ve karışımlarının naftilamin-PHEMAH sabit fazlı kolonda gerçekleştirilen ayırım kromatogramları (1. Vanilin (20 ppm), 2. Etil Vanilin (30 ppm), 3. (7)-Metil Kumarin (40 ppm)).

Şekil 4.14'teki kromatogramlar incelendiğinde çalışılan bütün sıcaklıklarda iyi bir ayırımın gerçekleştiği gözlemlenmiştir. 125 °C kolon sıcaklığında bileşikler toplamda 60 dakika gibi oldukça uzun bir alıkonma süresi sonunda ayrılırken, sıcaklığın 200 °C'ye yükseltilmesi ile birlikte alıkonma süresi toplamda 15 dakika olarak belirlenmiş ve vanilin, etil vanilin ve 7-metil kumarin bileşiklerinin iyi bir ayırımı gerçekleştirilmiştir. Sıcaklığın yanında mobil faz bileşiminde yer alan metanol oranının da %2'den %5'e yükselmesi ile kromatografik ayırımın daha kısa alıkonma sürelerinde gerçekleştiği ve gelişen pik simetrisiyle sonuçlandığı tespit edilmiştir.

Kumarin ve türevlerinin NA-PHEMAH mikrokürelerinin sabit faz olarak kullanıldığı subkritik su şartlarında gerçekleştirilen ayırma çalışmalarında, bileşiklerin kromatografik parametrelerine sıcaklığın etkisi Çizelge 4.5'te gösterilmiştir.

**Çizelge 4.5:** Kumarin ve türevlerinin kromatografik parametrelerinin sıcaklığa bağlı olarak değişmesi (Sabit faz: NA-PHEMAH).

PHEMA Kolon - %2 Metanol							
Sıcaklık	Akış hızı	Bileşikler	Alıkonma Zamanı	Alıkonma Faktörü	Asimetri Faktörü	Pik Genişliği	Tabaka Sayısı
125 °C	1.0	Vanilin	17.2	67	0.93	1.98	419
		Kumarin	30.2	119	1.00	2.84	627
		6-m kumarin	60.5	241	0.91	4.99	816
150 °C	1.5	Vanilin	10.6	41	0.96	1.51	273
		Kumarin	18.5	73	1.01	1.97	489
		6-m kumarin	36.5	145	0.92	3.42	632
180 °C	2.0	Vanilin	7.8	30	0.93	1.23	223
		Kumarin	13.6	53	1.00	1.55	427
		6-m kumarin	26.4	105	0.99	2.57	586
200 °C	2.5	Vanilin	5.7	22	1.01	1.01	177
		Kumarin	9.9	41	1.02	1.25	348
		6-m kumarin	19.2	76	1.04	1.92	555
PHEMA Kolon - %2 Metanol							
Sıcaklık	Akış hızı	Bileşikler	Alıkonma Zamanı	Alıkonma Faktörü	Asimetri Faktörü	Pik Genişliği	Tabaka Sayısı
125 °C	1.0	Vanilin	18.2	72	0.93	1.96	478
		Etil Vanilin	30.3	120	1.03	2.81	645
		7-m kumarin	64.6	255	1.01	5.12	883
150 °C	1.5	Vanilin	10.7	42	0.99	1.57	258
		Etil Vanilin	17.8	70	0.97	1.92	477
		7-m kumarin	37.1	147	1.04	3.44	645
180 °C	2.0	Vanilin	7.5	29	1.01	1.20	217
		Etil Vanilin	12.4	49	1.02	1.53	364
		7-m kumarin	25.5	101	1.04	2.50	577
200 °C	2.5	Vanilin	5.9	23	1.01	1.01	189
		Etil Vanilin	9.8	38	1.03	1.24	347
		7-m kumarin	20.1	79	1.07	1.99	566

**Çizelge 4.5 (devam):** Kumarin ve türevlerinin kromatografik parametrelerinin sıcaklığa bağlı olarak değişmesi (Sabit faz: NA-PHEMAH).

PHEMA Kolon - %5 Metanol							
Sıcaklık	Akış hızı	Bileşikler	Alıkonma Zamanı	Alıkonma Faktörü	Asimetri Faktörü	Pik Genişliği	Tabaka Sayısı
125 °C	1.0	Vanilin	14.5	57	0.80	1.85	341
		Kumarin	26.2	104	0.72	2.68	530
		6-m kumarin	50.1	199	0.86	4.60	658
150 °C	1.5	Vanilin	8.3	32	1.00	1.21	261
		Kumarin	14.3	56	0.99	1.83	339
		6-m kumarin	26.7	106	0.82	2.51	628
180 °C	2.0	Vanilin	5.8	22	1.04	1.07	163
		Kumarin	10.1	39	1.04	1.51	248
		6-m kumarin	18.6	73	0.91	1.86	555
200 °C	2.5	Vanilin	4.8	18	1.03	0.90	158
		Kumarin	8.3	32	0.92	1.38	201
		6-m kumarin	15.2	59	0.95	1.68	454
PHEMA Kolon - %5 Metanol							
Sıcaklık	Akış hızı	Bileşikler	Alıkonma Zamanı	Alıkonma Faktörü	Asimetri Faktörü	Pik Genişliği	Tabaka Sayısı
125 °C	1.0	Vanilin	16.2	64	1.02	1.82	440
		Etil Vanilin	26.0	103	1.04	2.75	496
		7-m kumarin	55.0	219	1.01	4.48	836
150 °C	1.5	Vanilin	8.7	34	1.01	1.16	312
		Etil Vanilin	13.6	53	1.02	1.77	328
		7-m kumarin	27.4	109	1.06	2.56	636
180 °C	2.0	Vanilin	6.6	25	0.94	1.03	223
		Etil Vanilin	10.5	41	0.99	1.49	276
		7-m kumarin	21.1	84	1.04	1.98	630
200 °C	2.5	Vanilin	3.9	15	1.05	0.68	182
		Etil Vanilin	5.8	22	1.03	0.98	194
		7-m kumarin	11.1	43	0.97	1.41	344

Yüksek sıcaklıkta suyun elüsyon gücünü artırmak için sıcaklığa alternatif olarak mobil fazda su yanında organik çözücü yer almıştır. Çizelge 4.5 incelendiğinde, artan sıcaklık ve metanol oranıyla birlikte kumarin ve türevlerinin alıkonma sürelerinin kısaldığı gözlemlenmiştir. Mobil faz sıcaklığının artması sonucu suyun dielektrik sabiti, viskozitesi ve yüzey geriliminin azalmasıyla birlikte polaritesinin de azalması, suyun apolar yapıdaki molekülleri çözebilme gücünü arttırmıştır.

Yüksek sıcaklıkta azalan viskozite sonucu bileşenlerin difüzyon hızının ve kütle transferinin artmasıyla birlikte sistemin geri basıncı düşürülmüş ve bu sayede maksimum kolon basıncına kadar yüksek akış hızı uygulanabilmiştir. Bütün bu fizikokimyasal etkilerin birleşmesi ile kromatografik çalışmalarda yüksek sıcaklıkla birlikte yüksek akış hızının kullanılması sonucu analiz süresi kısalmış ve iyi ayrımlar gerçekleştirilmiştir. Hızlı ayırım sonucu bileşiklerin alıkonma sürelerinin yanında pik genişliklerinin de azalması ile yüksek sıcaklıkta bileşiklerin pik simetrileri geliştirilmiştir ve bu parametrelerin teorik tabaka sayısını da etkileyeceği belirtilmiştir. Ancak bu parametreler yanında artan sıcaklık ve azalan viskozite sayesinde mobil fazın yüksek doğrusal hızda kullanılması sonucu tabaka yüksekliğinin azalması ile teorik tabaka sayısının yani kolon veriminin artması beklenirken aksine azaldığı gözlemlenmiştir. Bu durum kolonun yüksek sıcaklıklara dayanıklı olmasına rağmen zamanla kolon etkinliğini kaybettiğini göstermiştir.

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Kumarin, birçok bitki türünde ve özellikle tarçında bulunan, doğal uçuculuğa sahip fitokimyasal sınıfta bir organik bileşiktir. Kumarin ve türevleri, gıda katkı maddesi ve parfüm bileşeni olarak geniş çaplı kullanım alanına sahiptir ve Avrupa'daki marketlerde satılan deodorantların %57-73'ünde kumarinler bileşen olarak bulunmaktadır. Bununla birlikte kan inceltici, anti-fungisidal, bronşiyal dilatör, anti-inflamatuar ve analjezik özelliklerinden dolayı tıpta kullanım alanlarına sahiptir. Kumarinler, ayrıca diğer kimyasallar ile etkileştirilerek antikoagülan ve kemirgenlerin yok edilmesinde zehirleyici madde olarak da kullanım alanına sahiptir. Kumarinlerin kromatografik olarak ayrılması ile ilgili literatürde birçok analiz metodu kullanılmaktadır. Bunlar sırasıyla ince tabaka kromatografisi (TLC), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), gaz kromatografisi- kütle spektrometresi (GC/MS), sıvı kromatografisi- kütle spektrometresi (LC/MS), yüksek hızlı karşıt akımlı kromatografisi (HSCCC)'dir. Belirtilen ayırma teknikleri arasında en çok yüksek performanslı sıvı kromatografisi kullanılmaktadır. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile yapılan ayırmalarda mobil faz olarak su- asetonitril karışımı kullanılmakta ve her bir analiz için toplam alıkonma zamanı 45 dakika olarak belirlenmekle birlikte yapılan analizde 24,5 mL asetonitril tüketilmekte ve sonucunda 24,5 mL asetonitril atık olarak dışarı verilmektedir.

Bu çalışmada kumarin ve türevlerinin kromatografik ayrımları subkritik su kromatografisi ve yüksek sıcaklık sıvı kromatografisi kullanılarak, iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Birinci aşamada elüent olarak saf su ve ticari olarak mevcut beş farklı HPLC kolonu kullanarak ayrımlar yapılmıştır. Bu kolonlar sırasıyla Waters XTerra MS C18, Waters XBridge C18, Zorbax RRHD Eclipse Plus, Zorbax SB Phenyl, Zorbax SB C18 marka kolonlardır. Çalışmalarda bu kolonların seçilmesinin nedenleri yeni nesil kolon dolgu maddesine sahip olmaları ve yüksek sıcaklıkta diğer kolonlara göre daha fazla kararlılık göstermeleri şeklinde belirtilmektedir.



Subkritik su kromatografisi kullanılarak gerçekleştirilen ayrımlar sonucunda elde edilen veriler değerlendirildiğinde, beş farklı HPLC kolonunda yapılan çalışmalarda Waters XTerra MS C18 kolon ile 200 °C’de ve 1,0 mL/dk akış hızında toplam 6.38 dakika, Waters XBridge C18 kolon ile 200 °C’de ve 2,5 mL/dk akış hızında toplam 4,44 dakika, Zorbax RRHD Eclipse Plus kolon ile 200 °C’de ve 1,5 mL/dk akış hızında toplam 1,61 dakika, Zorbax SB C18 kolon ile 200 °C’de ve 1,0 mL/dk akış hızında toplam 3,20 dakika ve Zorbax SB Phenyl kolon ile 200 °C’de ve 1,0 mL/dk akış hızında toplam 7,53 dakika alıkonma zamanları ile ayrımlar gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kromatogramlar incelendiğinde bileşiklerin ayrılmasında en kullanışlı kolonların Zorbax SB Phenyl, Zorbax SB C18, Waters XBridge C18 ve Waters XTerra MS C18 kolonları olduğu tespit edilirken, Zorbax RRHD Eclipse Plus kolonda bileşiklerin ayrımında iyi sonuçlar elde edilmesine rağmen, analiz sonrasında kromatogramlar incelendiğinde bileşenlerin kromatogramlarından farklı olarak, parçalanma ürünü olduğu tahmin edilen bir pik gözlenmiştir. Pik karakterindeki değişimlerin nedeni olarak yüksek sıcaklıklarda kolon dolgu maddesinin yapısında meydana gelen değişmelerin etkin olabileceği belirtilmiştir. Bileşiklerin kromatografik ayrımlarında çalışma sıcaklığının ayrımlar üzerine etkisi incelendiğinde, sıcaklığın artırılması ile birlikte suyun dielektrik sabitinin azalması sonucu davranışının polardan apolara doğru değişmesi yani suyun organik çözücü davranışı göstermesi nedeniyle, organik bileşiklerin çözünürlüğünde artış meydana gelmiş ve bu sayede hızlı bir ayrımın gerçekleşmesi ile birlikte bileşenlerin alıkonma süreleri oldukça kısalmıştır.

Çalışmanın ikinci aşamasında, sabit faz olarak sentezlenen Naftilamin takılı PHEMAH mikrokürelerinin, kumarin ve türevlerinin kromatografik ayrımında kullanılması literatürde ilk defa gerçekleştirilen bir çalışmadır. PHEMAH mikroküreleri proteinlerin saflaştırılmasında afinite kromatografisinde oldukça geniş kullanım alanına sahipken, ters faz sıvı kromatografisi tekniği ile yüksek sıcaklık sıvı kromatografisinde kullanım alanı çalışmaları ilk defa bu proje kapsamında yapılmış ve çok olumlu sonuçlar alınmıştır. NA-PHEMAH mikroküreleri kullanılarak gerçekleştirilen subkritik su kromatografisi çalışmalarında saf suyun elüent olarak kullanılması ile herhangi bir sonuç elde edilememiştir. Bununla birlikte kromatografik ayrımlarda yüksek sıcaklık sıvı kromatografisi ile mobil fazda %2 ve %5 metanol kullanılması sonucu bileşikler başarılı bir şekilde ayrılmıştır. Vanilin,

kumarin ve 6-metil kumarin bileşiklerinin ayrımı mobil faz olarak %2 metanol- %1 formik asit- %97 ultra saf su kullanıldığı zaman 200 °C'de ve 2.5 mL/dk akış hızında toplam 19.2 dakikada, %5 metanol- %1 formik asit- %94 ultra saf su kullanıldığı zaman 200 °C'de ve 2.5 mL/dk akış hızında toplam 15.2 dakikada gerçekleştirilmiştir. Vanilin, etil vanilin ve 7-metil kumarin bileşiklerinin ayrılması mobil faz olarak %2 metanol- %1 formik asit- %97 ultra saf su kullanıldığı zaman 200 °C'de ve 2.5 mL/dk akış hızında toplam 20.1 dakikada, %5 metanol- %1 formik asit- %94 ultra saf su kullanıldığı zaman 200 °C'de ve 2.5 mL/dk akış hızında toplam 11.1 dakikada tamamlanmıştır.

NA-PHEMAH mikrokürelerinin sabit faz olarak kullanıldığı kromatografik ayrımlar, ticari olarak mevcut sıvı kromatografi kolonları ile gerçekleştirilen ayrımlarla karşılaştırıldığında, NA-PHEMAH mikrokürelerinin 200 °C sıcaklıkta dahi kararlılıklarını sürdürmeleri ve yapılarında herhangi bir bozunma meydana gelmemesi sentezlenen molekülleri üstün kılmaktadır. Ayrıca NA-PHEMAH içerikli kolonda elde edilen kromatogramlar ticari olarak satılan kolonlara göre daha iyi çözünürlük göstermektedir.

Sonuç olarak, endüstriyel boyutta oldukça geniş kullanım alanına sahip kimyasal bileşiklerin kromatografik analizlerinde ters faz sıvı kromatografisi günümüzde en yaygın kullanılan tekniklerin başında gelmektedir. Kromatografik ayrımlarda kullanılan organik çözücüler, çalışmalar esnasında göstermiş olduğu yanıcı ve toksik özelliklerinin yanında çalışmalar sonrasında meydana getirdiği atıkların giderilmesinde de oldukça maliyetli olmaktadır. SBWC, mobil faz bileşeni olarak yüksek sıcaklıklı su kullanılan yeni bir RPLC tekniğidir. Organik çözücüler olmaksızın iyi ayrımlar gerçekleştirilmesinin yanında hem çevreyle dost hemde ekonomik açıdan fayda sağlamaktadır. Dolayısıyla organik çözücüler yerine çevre dostu suyun, kullanılmasının ülke ekonomisine katkısı göz ardı edilemeyecek düzeydedir. Ticari olarak satılan ve kromatografik ayrımlarda kullanılan sıvı kromatografi kolonları, subkritik su şartlarında uzun süre çalıştırıldıklarında kullanım süreleri zamanla azalmaktadır. Bu nedenle, yüksek sıcaklıkta kullanılacak termal ve kimyasal olarak kararlı yeni tip kolon dolgu materyallerinin sentezlenmesi ve subkritik su kromatografi sistemi ile kombine edilmesi sonucu birçok organik bileşimin analizi mümkün olacaktır.

## KAYNAKLAR

- Allmon, S.D. ve Dorsey, J.G., 2009. Retention mechanism in subcritical water reversed-phase chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1216, 26, 5106-5111.
- Ayano, E., Okada, Y., Sakamoto, C., Kanazawa, H., Kikuchi, A. ve Okano, T., 2006. Aqueous chromatography system using pH-and temperature-responsive stationary phase with ion-exchange groups, *Journal of Chromatography A*, 1119, 1-2, 58-65.
- Bruckner, C.A., Ecker, S.T. ve Synovec, R.E., 1997. Simultaneous flame ionization and absorbance detection of volatile and nonvolatile compounds by reversed phase liquid chromatography with a water mobile phase, *Analytical Chemistry*, 69, 7, 3465-3470.
- Cafferena, E.R. ve Grigera, J.R., 2004. On the hydrogen bond structure of water at different densities, *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, 342, 1-2, 34-39.
- Carr, G.A., Mammucari, R. ve Foster, N.R., 2011. A review of subcritical water as a solvent and its utilisation for the processing of hydrophobic organic compounds, *Chemical Engineering Journal*, 172, 1, 1-17.
- Chienthavorn, O., Smith, R.M., Saha, S., Wilson, I.D., Wright, B., Taylor, S.D. ve Lenz, E.M., 2004. Superheated water chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectrometry of vitamins, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 36, 3, 477-482.
- Christie, R. M. ve Lui, C. H., 1999. Studies of fluorescent dyes: Part 1. An investigation of the electronic spectral properties of substituted coumarins. *Dyes and Pigments*, 42, 1, 85-93.
- Demirelli, K., Coşkun, M. ve Kaya, E., 2001. A detailed study of thermal degradation of poly (2-hydroxyethyl methacrylate), *Polymer Degradation and Stability*, 72, 1, 75-80.
- Fields, S.F., Ye, C.Q., Zhang, D.D., Branch, B.R., Zhang, X.J. ve Okafo, N., 2001. Super-heated water as eluent in high-temperature high-performance liquid chromatographic separation of steroids on a polymer-coated zirconia column, *Journal of Chromatography A*, 913, 1-2, 197-204.
- Georgieva I., Kostova I., Trendafilova N., Rastogı V. ve Kiefer W., 2010. DFT, IR, Raman and NMR study of the coordination ability of coumarin-3-carboxylic acid to Pr(III). *Journal of Molecular Structure*, 979, 1-3, 115-121.

- Greibrokk, T. ve Andersen, T., 2003. High-temperature liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1000, 1-2, 743–755.
- Guenther, E., 1975. *The Essential Oils*, Vol.II, D.Von Nostrand Ltd., New York, USA.
- Guillamme, D., Heinisch, S. ve Rocca, J.L., 2004. Effect of temperature in reversed phase liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1052, 1-2, 39-51.
- Hartonen, K. Ve Riekkola, M.L., 2008. Liquid chromatography elevated temperatures with pure water as the mobile phase, *Trends in Analytical Chemistry*, 27, 1, 1-14.
- Heinisch, S. ve Rocca, J.-L., 2009. Sense and nonsense of high-temperature liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1216, 4, 642–658.
- Kanazawa, H., Ayano, E., Sakamoto, C., Yoda, R., Kikuchi, A. ve Okano, T., 2006. Temperature-responsive stationary phase utilizing a polymer of proline derivate for hydrophobic interaction chromatography using an aqueous mobile phase, *Journal of Chromatography A*, 1106, 1-2, 152-158.
- Karaliota, A., Kretsi, O., ve Tzougraki, C., 2001. Synthesis and characterization of a binuclear coumarin-3-carboxylate copper(II) complex, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 84, 1-2, 33-37.
- Kephart, T.S. ve Dasgupta, P.K., 2002. Superheated water eluent capillary liquid chromatography, *Talanta*, 56, 6, 977-987.
- Kondo, T., Yang, Y. ve Lamm., L., 2002. Separation of non-polar analytes using dimethylsulfoxide-modifies subcritical water, *Analytica Chimica Acta*, 460, 2, 185-191.
- Kozyra K. A.,Heldt J. R. ve Diehl H.A., 2002. Electronic energy transfer efficiency of mixed solutions of the donor-acceptor pairs: Coumarin dervatives-acridine orange, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 152, 1, 199-205.
- Lavine, B.K., Ritter, J.P. ve Peterson, S. 2002. Enhancement of selectivity in reversed-phase liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 946, 1-2, 83–90.
- Liu, Y., Grinberg, N., Thompson, K.C., Wenslow, R.M., Neue, U.D., Morrison, D., Walter, T.H., O’Gara, J.E. ve Wyndham, K.D., 2005. Evaluation of a C18 hybrid stationary phase using high-temperature chromatography, *Analytica Chimica Acta*, 554, 1-2, 144-151.
- Maggi, F., Barboni, L., Caprioli, G., Ricciutelli, M., Sagratini, G. ve Vittori, S., 2011. HPLC quantification of coumarin in bastard balm (*Melittis melissophyllum* L.,Lamiaceae), *Fitoterapia*, 82, 8, 1215-1221.

- McNeff, C.V., Yan, B., Stoll, D.R. ve Henry, R.A., 2007. Practice and theory of high temperature liquid chromatography, *Journal of Separation Science*, 30, 11, 1672–1685.
- Miller, D.J. ve Hawthorne, S.B., 1998. Method for determining the solubilities of hydrophobic organics in subcritical water, *Analytical Chemistry*, 70, 8, 1618-1621.
- Miller, D.J., Hawthorne, S.B., Gizir, A.M. ve Clifford, A.A., 1998. Solubility of polycyclic aromatic hydrocarbons in subcritical water from 298 K to 498 K., *Journal of Chemical & Engineering Data*, 213, 6, 1043-1047.
- Nakahara, M., Matubayasi, N., Wakai, C. ve Tsujino, Y., 2001. Structure and dynamics of water: from ambient to supercritical, *Journal of Molecular Liquids*, 90, 1-3, 75-83.
- Nemkovich, N. A., Reis, H. ve Baumann, W., 1997. Ground and excited state dipole moments of coumarin laser dye: Investigation by electro-optical absorption and emission methods, *Journal of Luminescence*, 71, 4, 255-263.
- Nezbeda, I. ve Pavlicek, J., 1996. Application of primitive models of association; a simple theoretical equation of state of water, *Fluid Phase Equilibria*, 116, 1-2, 530-536.
- O’Kennedy, R., Thordes, R.D., 1997. Coumarins biology, applications and mode of action, John Wiley & Sons Ltd., England, 1-336.
- Orbey, M.T., Göger, N.G., Ertaş, N., Yılmaz, Ş., Berkkan, A., Basan, H., Şatana, E. ve Alp, O., 2012. Analitik Kimya Pratikleri, Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları No:3, Ankara.
- Özcan, A., 2010. Kromatografik Yöntemler ve Uygulamaları, pp.262-293, Ersöz, A. (Editör), Aletli Analiz, Anadolu Üniversitesi Yayınları, Eskişehir.
- Özcimder, M. ve Demirci, A., 2004. Gaz ve Sıvı Kromatografileri, Bilim Yayıncılık, Ankara.
- Pereira, L., Aspey, S. ve Ritchie, H., 2007. High temperature to increase throughput in liquid chromatography and liquid chromatography–mass spectrometry with a porous graphitic carbon stationary phase, *Journal of Separation Science*, 30, 8, 1115–1124.
- Prini, R.J.F., Corti, H.R. ve Japas, M.L., 1992. High temperature aqueous solutions: Thermodynamic properties, CRC Pres, Boca Raton, FL, USA.
- Prini, R.F., 1997. Release on the static dielectric constant of ordinary water substance for temperatures from 238 K to 873 K and pressures up to 1000 MPa, The International Association for the Properties of Water and Steam (IAPWS), Erlangen, Germany.
- Rodrigues, F.R., Tashima, A.K., Pereira, M.S.R., Mohamed R.S. ve Cabral, F.A., 2008. Coumarin solubility and extraction from emburana (*Torresea cearensis*)

- seeds with supercritical carbon dioxide, *The Journal of Supercritical Fluids*, 43, 3, 375-382.
- Saha, S., Smith, R.M., Lenz, E. ve Wilson, I.D., 2003. Analysis of ginger extract by high performance liquid chromatography coupled nuclear magnetic resonance spectroscopy using superheated deuterium oxide as the mobil phase, *Journal of Chromatography A*, 991, 1, 143-150.
- Sanagi, M.M., See, H.H., Ibrahim, W.A.W. ve Naim, A.A., 2004. High temperature liquid chromatography of triazole fungicides on polybutadiene coated zirconia stationary phase, *Journal of Chromatography A*, 1059, 1-2, 95-101.
- Sanagi M.M. ve Hong H.S., 2005. High temperature liquid chromatography on a poly(styrene-divinylbenzene) stationary phase, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 28, 19, 3065-3076.
- Sethna, S.M. ve Shah, N.M., 1945. *The Chemistry of Coumarins*, *Chemical Reviews*, 36, 1, 1- 62.
- Shen,S., Lee, H., McCaffrey,J., Yee., N., Senanayake, C., Grinberg, N. ve Clark,J., 2006. High temperature high performance liquid chromatography of substituted anilines using a C-18 hybrid stationary phase, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 29, 19, 2823-2834.
- Skoog, D.A., Holler, E.J. ve Nieman, T.A., 1998. *Principles of Instrumental Analysis*, Fifth Edition, Saunders College Publishing, Harcourt Brace & Company, Philadelphia, USA.
- Smith, R.M., 2002. Extractions with superheated water, *Journal of Chromatography A*, 975, 1, 31–46.
- Smith, R.M., 2008. Superheated water chromatography--a green technology for the future, *Journal of Chromatography A*, 1184, 1-2, 441–455.
- Şener, B. ve Mutlugil, A., 1987. Naturally occurring coumarins and their biological activities, *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12, 4, 99-114.
- Tajuddin, R. ve Smith, R.M., 2002. On-line coupled superheated water extraction (SWE) and superheated water chromatography (SWC), *Analyst*, 127, 7, 883–885.
- Teutenberg, T., Lerch, O., Gotze, H.J. ve Zinn, P., 2001. Separation of selected anticancer drugs using superheated water as the mobile phase, *Analytical Chemistry*, 73, 16, 3896-3899.
- Teutenberg, T., Tuerk, J., Holzhauser, M. ve Kiffmeyer, T.K., 2006. Evaluation of coloumn bleed by using an ultraviolet and charged aerosol detector coupled to a high-temperature liquid chromatography system, *Journal of Chromatography A*, 1119, 1-2, 197-201.
- Teutenberg, T., 2009. Potential of high temperature liquid chromatography for the improvement of separation efficiency--a review, *Analytica Chimica Acta*, 643, 1-2, 1–12.

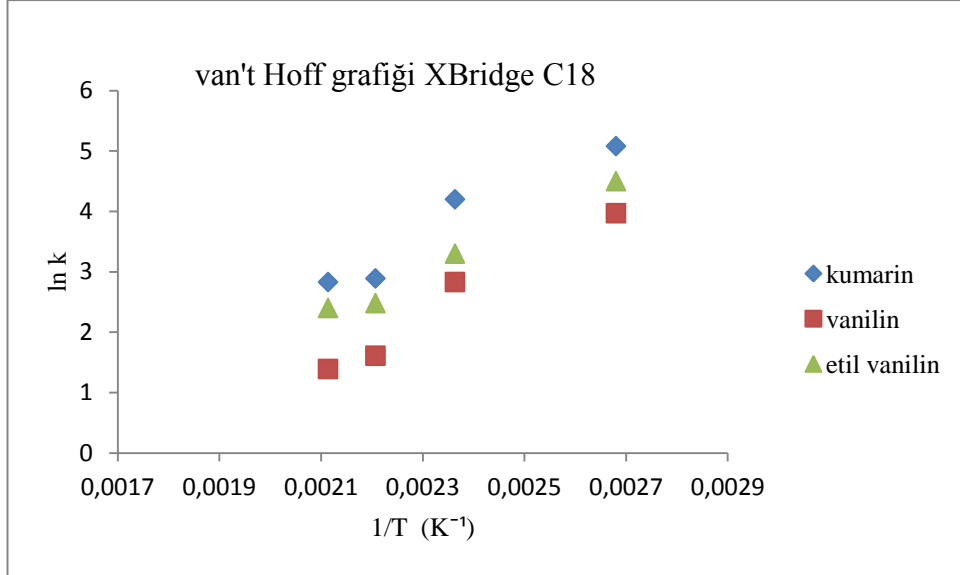
- Tiihonen, J., Peuha, E.L., Lavta-Kokko, M., Silander, S. ve Paaters, E., 2005. Subcritical water as a eluent for chromatographic separation of carbohydrates using cation-exchange resins, *Separation and Purification Technology*, 44, 2, 166-174.
- Vanhoenacker, G., Dos Santos Pereira, A., Kotsuka, T., Cabooter, D., Desmet, G. Ve Sandra, P., 2010. Evaluation of a new polymeric stationary phase with reversed phase properties for high temperature liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1217, 19, 3217–3222.
- Veuthey, J.L., Nguyen, D.T.T., Guillaume, D., Heinisch, S., Barrioulet, M.P., Rocca, J.L. ve Rudaz, S., 2007. High throughput liquid chromatography with sub-2 microm particles at high pressure and high temperature, *Journal of Chromatography A*, 1167, 1, 76–84.
- URL-1 < [www.kimyasanal.net/yukle/kromatografi.doc](http://www.kimyasanal.net/yukle/kromatografi.doc) >, alındığı tarih: 09.12.2014.
- Wenclawiak, B. W., Giegold, S. ve Teutenberg, T., 2008. High-Temperature Liquid Chromatography, *Analytical Letters*, 41, 7, 1097–1105.
- Wilson, I.D., 2000. Investigation of a range of stationary phases for the separation of model drugs by HPLC using superheated water as the mobile phase, *Chromatographia*, 52, 1, 28-34.
- Yan, B., Zhao, J., Brown, J.S., Blackwell, J. ve Carr, P.W., 2000. High-Temperature Ultrafast Liquid Chromatography, *Analytical Chemistry*, 72, 6, 1253-1262.
- Yang, Y., Belghazi, M, Lagadec, A., Miller, D.J. ve Hawthorne, S.B., 1998. Elution of organic solutes from different polarity sorbents using subcritical water, *Journal of Chromatography A*, 810, 1-2, 149-159.
- Yang, Y., Jones, A.D. ve Eaton, C.D., 1999. Retention behavior of phenols, anilines and alkylbenzenes in liquid chromatography separations using subcritical water as the mobile phase, *Analytical Chemistry*, 71, 7, 3808-3813.
- Yang, Y., Jones, A.D, Mathis, J.A. ve Francis, M.A., 2002. Flame ionization detection after splitting the water effluent in subcritical water chromatography, *Journal of Chromatography A*, 942, 1-2, 231-236.
- Yang, Y. ve He, P., 2003. Studies on the long-term thermal stability of stationary phases in subcritical water chromatography, *Journal of Chromatography A*, 989, 1, 55-63.
- Yang, Y., 2006. A model for temperature effect on column efficiency in high-temperature liquid chromatography, *Analytica Chimica Acta*, 558, 1-2, 7–10.
- Yang, Y., 2007. Subcritical water chromatography: A green approach to high-temperature liquid chromatography, *Journal of Separation Science*, 30, 8, 1131-1140.

- Yang, Y., Kayan, B., Bozer, N., Pate, B., Baker, C. ve Gizir A.M., 2007. Terpene degradation and extraction from basil and oregano leaves using subcritical water, *Journal of Chromatography A*, 1152, 1-2, 262-267.
- Yang, Y. ve Kapalavavi, B., 2011. Subcritical Water Chromatography-An Economical and Green Separation Technique, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd., 1–23.
- Yang, Y., Strickland, Z., Kapalavavi, B., Marple, R. ve Gamsky, C., 2011. Industrial application of green chromatography-I. Separation and analysis of niacinamide in skincare creams using pure water as the mobile phase, *Talanta*, 84, 1, 169-174.
- Yarita, T., Nakajima, R. ve Shibukawa, M., 2003. Superheated water chromatography of phenols using poly(styrene-divinylbenzene) packings as a stationary phase, *Analytical Sciences* 19, 2, 269-272.
- Zhang, Y., Luo, H. ve Carr, P. W., 2012. Silica-based, hyper-crosslinked acid stable stationary phases for high performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1228, 21, 110–124.
- Zhou, X., Li, M., Wang, X.B., Wang, T. ve Kong, L.Y., 2010. Synthesis of benzofuran derivatives via rearrangement and their inhibitory activity on acetylcholinesterase, *Molecules*, 15, 12, 8593–601.

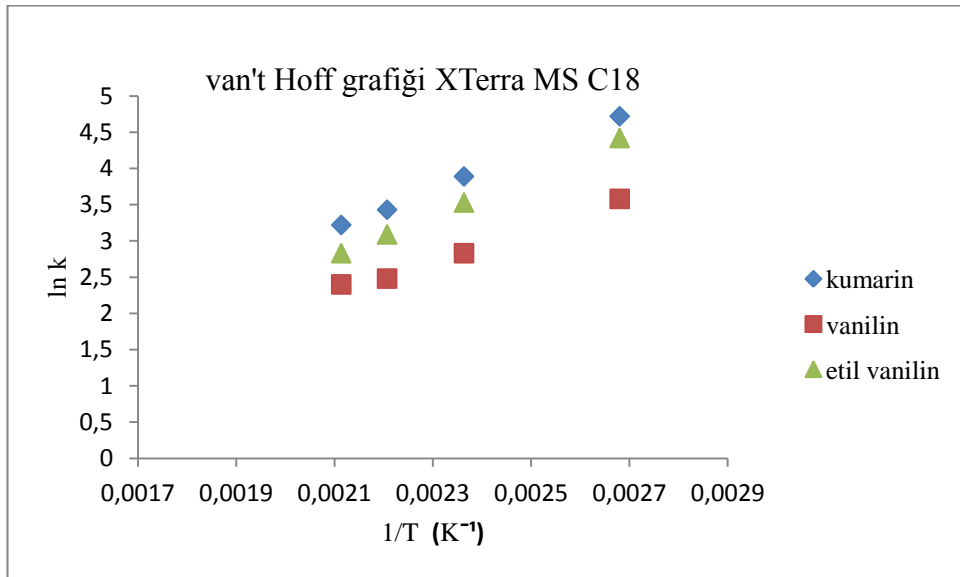


## EKLER

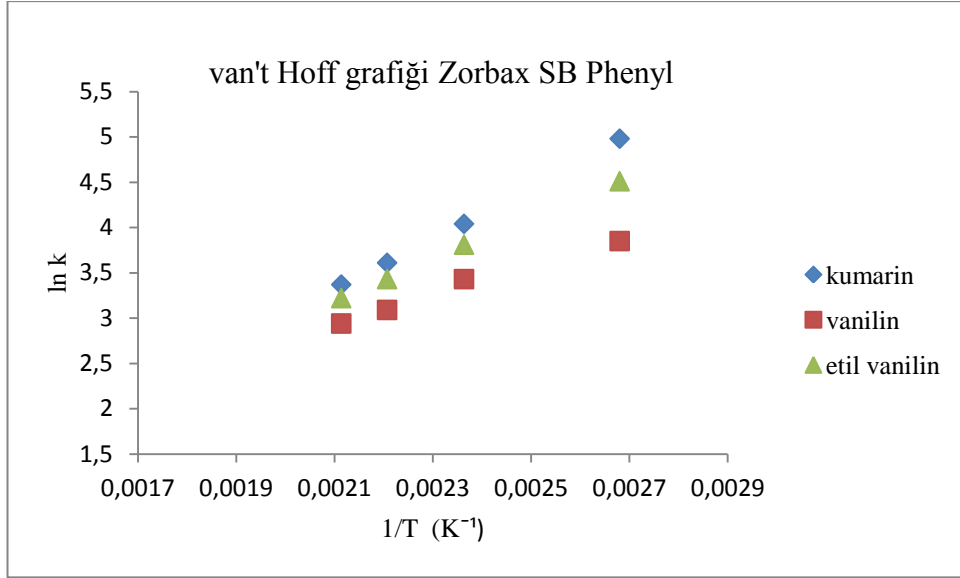
### EK.A Farklı kolon türleri kullanılarak Van't Hoff eşitliğine göre çizilen grafikler



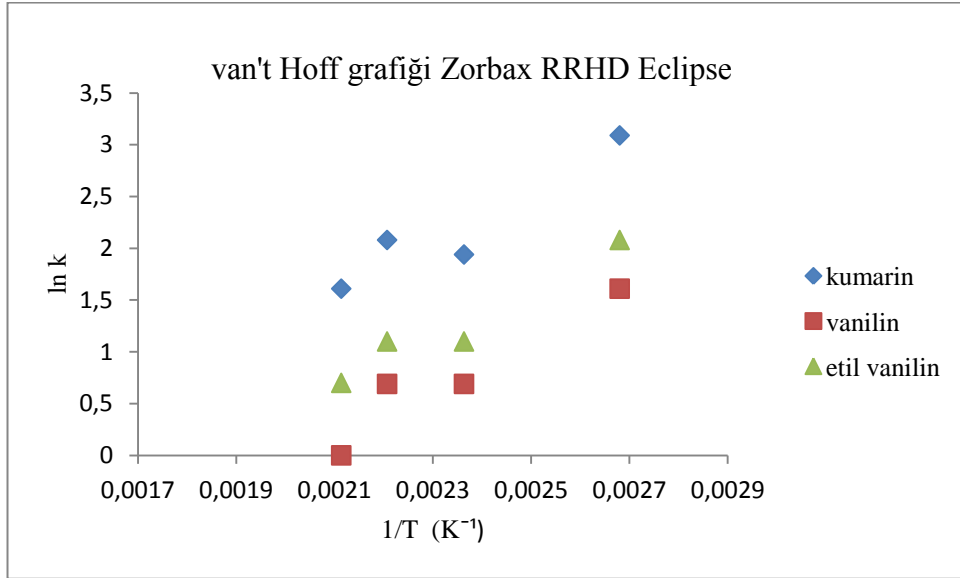
Şekil A.4a: XBridge C18 kolonun van't Hoff grafiği.



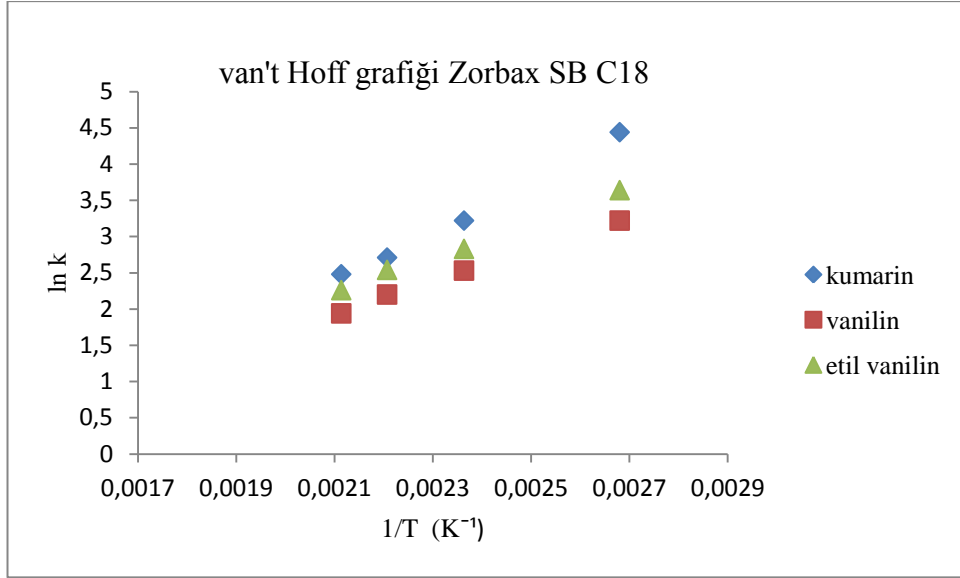
Şekil A.4b: XTerra MS C18 kolonun van't Hoff grafiği.



Şekil A.4c: Zorbax SB Phenyl kolonun van't Hoff grafiği.



Şekil A.4d: Zorbax RRHD Eclipse Plus kolonun van't Hoff grafiği.



Şekil A.4e: Zorbax SB C18 kolonun van't Hoff grafiği.

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı ve Soyadı** : Sema AKAY  
**Doğum Tarihi ve Yeri:** 23.06.1991 - AKSARAY  
**E-posta adresi** : sema.akay7@gmail.com

### EĞİTİM BİLGİLERİ (Kurum ve Yıl)

**Lisans** : Aksaray Üniversitesi, 2009-2013  
**Yüksek Lisans** : Aksaray Üniversitesi, 2013-

### MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLERİ

1. Mercedes Benz-Türk Aksaray Kamyon Fabrikası / Yaz Stajı

### TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER

1. Kayan, B., Odabaşı, M., **Akay, S.**, Şener, M., “New Stationary Phase for Separation of Coumarin Derivates by Using HTLC” Pittcon 2014, 2-6 March 2014 Chicago, IL, USA.
2. Kayan, B., Odabaşı, M., **Akay, S.**, “Separation of Coumarin, Vanilin and Ethyl Vanilin by Using Subcritical Water Chromatography” Pittcon 2014, 2-6 March 2014 Chicago, IL, USA.
3. Kayan, B., **Akay, S.**, Şener, M., Kumarinlerin Subkritik Su Kromatografisi ile Ayrılması, Ulusal Kromatografi 2013 Kongresi, 19-22 Haziran 2013, Bursa.
4. Kayan, B., **Akay, S.**, Güner H., Öz E., El Kremindeki Kumarinin Subkritik Su Kromatografisi ile Ayrılması, IV. Kozmetik Kimyası, Üretimi Standartizasyonu, 14-16 Şubat 2014, Antalya.