İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANADOLU ADAÇAYI TÜRLERİNİN VİTAMİN-B_2 İÇERİKLERİNİN KAPİLER ELEKTROFOREZ LAZER İNDÜKLENMİŞ FLORASANS DEDEKTÖR İLE SAPTANMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Görkem GEZEK

Kimya Anabilim Dalı

Kimya Programı

HAZİRAN 2016

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANADOLU ADAÇAYI TÜRLERİNİN VİTAMİN-B_2 İÇERİKLERİNİN KAPİLER ELEKTROFOREZ LAZER İNDÜKLENMİŞ FLORASANS DEDEKTÖR İLE SAPTANMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Görkem GEZEK
(509121067)

Kimya Anabilim Dalı

Kimya Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. F. Bedia ERİM BERKER

HAZİRAN 2016

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 509121067 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi **Görkem GEZEK** , ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "**ANADOLU ADAÇAYI TÜRLERİNİN VİTAMİN-B2 İÇERİKLERİNİN KAPİLER ELEKTROFOREZ LAZER İNDÜKLENMİŞ FLORASANS DEDEKTÖR İLE SAPTANMASI**" başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. F. Bedia ERİM BERKER**

İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Ayşen YARAT**

Marmara Üniversitesi

Doç. Dr. Nevin ÖZTEKİN

İstanbul Teknik Üniversitesi

Araştırma Görevlisi: Merve Arslan

İstanbul Teknik Üniversitesi

Teslim Tarihi : 29 Nisan 2016
Savunma Tarihi : 08 Haziran 2016

Aileme,

ÖNSÖZ

Çalışmam boyunca akademik anlamda her türlü desteğini benden esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Bedia ERİM BERKER' e sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

İTÜ'ye geldiğim andan itibaren yüksek lisans eğitimim süresince benden her konuda yardımını ve desteğini esirgemeyen, akademik bilgisini ve tecrübesini benimle paylaşan canım arkadaşım Arş. Gör. Zeynep Kalaycıoğlu 'na,

Tezimde her an yanımda olan laboratuvarda birlikte çalışmaktan zevk aldığım ve bilgileriyle beni aydınlatan deneysel aşamamda en az benim kadar emeği olan Parya Hashemi' ye,

Ders aşamamdan mezuniyete kadar her zaman yanımda olan, manevi desteklerini esirgememiş ömrümün sonuna kadar sürecek güçlü bir arkadaşlık bağı oluşturduğum, birlikte eğlenip sorunlarla birlikte başa çıktığımız saygı değer arkadaşlarım Pınar BUYUK ve Murat YÜZEROĞLU' na,

Hayatta aldığım tüm önemli kararlarda yanımda olan yüksek lisansa başlamamda etkin rol oynayan ve bu süreç boyunca benden maddi manevi desteğini esirgemeyen arkadaşım, sırdaşım ve benim için çok değerli olan Başak ÖZKAN' a,

Bu zorlu süreçte benden desteğini maddi ve manevi anlamda esirgemeyen, yaşamım boyunca bana duymuş oldukları sonsuz güven, sevgi ve özveriyle bu hayatta benim için en değerli varlıklar olan annem Vesile Nurhan GEZEK, kardeşim Gizem GEZEK ve babam Bayram GEZEK' e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Nisan 2016

Görkem GEZEK
(Kimyager)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ ..... **vii**
ÇİZELGE LİSTESİ ..... **xiii**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **xv**
ÖZET ..... **xvii**
SUMMARY ..... **xix**
1. GİRİŞ **1**
2. KAPİLER ELEKTROFOREZ **3**
2.1 Elektroforetik Mobilite 4
2.2 Elektroosmatik Akış 5
2.2.1 Elektroosmotik akış hızı ve göç süreleri 8
2.2.2 Elektroosmotik akış hızını etkileyen faktörler 8
2.3 Kapiler Elektroforezde Analitik Parametreler 13
2.3.1 Görünen mobilite ve göç süresi 13
2.3.2 Ayırma etkinliği 13
2.3.3 Pik genişlemesi 14
2.3.4 Ayırma gücü (Rezolüsyon) 15
2.4 Kapiler Elektroforezin Temel Kısımları 15
2.4.1 İnjeksiyon 16
2.4.2 Dedektörler 17
2.4.3 Kapiler elektroforez türleri 19
3. ADAÇAYI **21**
3.1 Salvia Türlerinin Coğrafi Dağılımı 21
3.2 İklim Ve Toprak Özellikleri 22
3.3 Botanik Özellikleri 22
3.4 Tıbbi Olarak Değeri 23
3.5 Adaçayının Yapısında Bulunan Kimyasallar 24
4. RİBOFLAVİN (VİTAMİN B_2) **25**
4.1 Riboflavin 25
4.2 Riboflavinin Kimyasal Yapısı 25
4.3 Riboflavinin Vücuttaki İşlevi 26
4.4 Riboflavinin Günlük Gereksinim Miktarları 27
4.5 Riboflavin Eksikliği Ve Belirtileri 27
4.6 Kapiler Elektroforez Yöntemiyle Riboflavin Tayinine İlişkin Literatür İncelemesi 28
5. MATERYAL VE YÖNTEM **33**
5.1 Malzemeler 33
5.2 Standart Çözelti Hazırlanması 33
5.3 Adaçayı Örneklerinin Hazırlanması 33
5.4 Cihazlar Ve Çalışma Koşulları 35

6. SONUÇLAR VE TARTIŞMA 37
6.1 Metod Optimizasyonu 37
6.2 Metod Validasyon 38
6.2.1 Kalibrasyon doğrusu, LOD ve LOQ değerleri 38
6.2.2 Tekrarlanabilirlik 38
6.3 Yöntemin Adaçayı Numunelerine Uygulanması 39
6.3.1 Metodun doğruluğu 42
6.4 Tartışma 43
KAYNAKLAR 45

KISALTMALAR

CZE : Kapiler Zon Elektroforezi
CE : Kapiler Elektroforez
MEKC : Misel Elektrokinetik Kromotografi
IC : İyon Kromatografi
HPLC : Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi
UV : Ultraviole
EOF : Elektroosmotik Akış
HETP : Teorik Plaka Genişliği
LIF : Lazer İndüklenmiş Floresans
FASS : Alan Güçlendirilmiş Örnek Sıkıştırma
SDS : Sodyum Dodesil Sülfat
FAD : Flavin Adenin Dinükleotid
FMN : Flavin MonoNükleotid
PEI : Polietilenimin
RF : Riboflavin
LOD : Belirleme Sınırı
LOQ : Tayin Sınırı

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1: CE'de kullanılan dedektörler ve dedeksiyon limitleri 17
Çizelge 2.2: Lazer türleri 18
Çizelge 2.3: Kapiler elektroforez türleri 19
Çizelge 4.1: Önerilen günlük riboflavin miktarları 27
Çizelge 5.1: Örnekler ve temin edilen yerler. 34
Çizelge 6.1: Kalibrasyon denklemi, LOD ve LOQ değerleri 38
Çizelge 6.2: Tekrarlanabilirlik sonuçları 39
Çizelge 6.3: Adaçayı örneklerinde riboflavin miktarları 40
Çizelge 6.4: Adaçayı örneklerine ait geri kazanım değerleri 42

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : CE'nin şematik gösterimi 4
Şekil 2.3 : EOF'un şematik gösterimi..... 6
Şekil 2.4 : (a) Elektroosmotik düz akış, (b) Basınç ile sağlanan parabolik akış..... 8
Şekil 2.5 : Uygulanan potansiyelin artırılması ile göç zamanının azaltılması..... 9
Şekil 2.6 : Tampon pH'sının etkisi ile elektroosmotik akıştaki değişim..... 10
Şekil 2.7 : Tampon konsantrasyonunun elektroosmotik akış üzerine etkisi..... 11
Şekil 2.8 : Kapiler elektroforez cihazı 15
Şekil 2.9 : Kapiler elektroforezde enjeksiyon sistemleri 17
Şekil 3.1 : Türkiye 'de Salvia türlerinin dağılımı 22
Şekil 4.1 : B_2vitamininin kimyasal yapısı 26
Şekil 6.1 : Standart riboflavin elektroferogramı 41
Şekil 6.2 : Salvia Cryptantha-4207 örneğine ait elektroferogram 41
Şekil 6.3 : A-Salvia Virgara-4172 örneğine ait elektroferogram, B- Salvia Virgata-4172 örneğine ait spike'lı elektroferogram 42

ANADOLU ADAÇAYI TÜRLERİNİN VİTAMİN-B_2 İÇERİKLERİNİN KAPİLER ELEKTROFOREZ LAZER İNDÜKLENMİŞ FLORASANS DEDEKTÖR İLE SAPTANMASI

ÖZET

Lamiaceae familyasının bir cinsi olan *Salvia* L. ya da ülkemizde kullanılan ismiyle adaçayıdünya genelinde yaygın olarak 900 civarında çeşide sahiptir. Eski çağlarda geleneksel tıpta geniş kullanım alanları olmasının yanısıra süs ve tat verici amaçla da kullanılmıştır. Adaçayı bitkisinin içeriklerinin çok sayıda biyoaktif özelliği olduğu bilimsel çalışmalarla gösterilmiştir. Bitkininen güçlü antioksidan içerikleri karnasol, karnosik asit ve rosmarinik asittir. Ayrıca adaçayı türleri çok sayıda bioaktif flavonoid ve terpenoidler içermektedir.Bitkinin farklı bileşenleri antioksidan, anti tümörijenik,anti-enflamatuar, antimiktobiyel özelliktedir. Adaçayının yetiştiği bölgelere göre kimyasal içeriklerinin biyojenik aktivitesi çeşitlenebilir.

Riboflavin, vitamin B_2 olarak bilinen ışığa karşı duyarlı ve suda çözünebilen bir vitamindir. Riboflavin insan metabolizmasında önemli bir yere sahiptir. Flavoenzimlerin yapısında kullanılan öncü bir bileşendir aynı zamanda proteinlerin ve yağ asitlerinin enzimatik proseslerinde de son derece önemli bir yere sahiptir. Ayrıca önemli koenzimler olan flavin mononükleotid (FMN) ve flavin adenin dinükleotid (FAD) yapılarının oluşturulmasında başlıca ihtiyaç duyulan parametredir. Metabolizmada önemli roller üstlenmesine rağmen riboflavin insan vücudunda sentezlenemez ve dışardan alınan besinler aracılığı ile vücuda sağlanması gerekir ancak vitamin B_2 kaynağı olan birçok gıda ürününün vitamin içeriği düşüktür.

Son yıllardaliteratürde kapiler elektroforezin tıbbi bitkilerin analizlerine uygulandığıgörülmektedir. Kapiler elektroforetik yöntemlerin klasik kromatografik yöntemleregöre avantajı reaktif tüketiminde, örnek hazırlama ve analiz süresinde belirgin azalmadır. Tüketilen örnek hacmi her injeksiyonda birkaç nanolitre olduğu için son derece azdır.CE yüksek ayırma gücü nedeniyle özellikle kompleks yapıdakidoğal matriksler içindeki biyoaktif bileşenlerin analizi için uygun bir yöntemdir.

Bu çalışmada 10'u endemik olan, 13 farklı adaçayı türünün riboflavin içeriği kapiler elektroforez yöntemi ve lazer indüklenmiş florasans dedektör (CE-LIF) yardımıyla ilk kez tespit edilmiştir. Geliştirilen yöntem için optimumayırma koşulları, 20 mM borat tamponu pH:9,5 ve 30kV voltaj, optimum enjeksiyon şartı ise 50 mbar da 6sn sürelihidrodinamik enjeksiyon olarak belirlenmiştir.

Riboflavinin doğrusal kalibrasyon aralığı, 0,998 regrasyon ile 0,05-1,00 µg/mL arasındadır.Yöntemin en düşükdedeksiyon sınırı (LOD)8,00 ng/mL olarak tespit edilmiştir.

Yapılan literatür araştırmaları sonucu adaçayı örneklerinde bugüne kadar riboflavin tayini yapılmadığı görülmüştür ve böylece literatüre önemli bir katkı sağlanmıştır.

Validasyonu yapılan yöntem, 13 farklıadaçayının riboflavinmiktarı tayinine başarılı bir şekilde uygulanmıştır.

DETERMINATION OF RİBOFLAVIN CONTENT IN ANATOLIAN SAGE SAMPLES USING CAPILLARY ELECTROPHORESIS LASER INDUCED FLUORESCENCE DETECTOR

SUMMARY

Salvia is the genus of Lamiaceae family, which is commonly called as Sage. In Turkey, sage is known as 'adaçayı' and is commonly consumed as teas, which are also used in Anatolian folk medicine. Sage genus subtends 900 species widespread around the world and from ancient centuries various species of sage have been used for ornamental and flavouring purposes besides their wide use in folk medicine. Essential oil of sage leaves also have gained reputation for several health beneficial effects, including antitumorigenic activity, antioxidant capacity, antimicrobial and anti-inflammatory properties. As the main antioxidant ingredients, carnosol, carnosic acid and rosmarinic acid were considered as the responsible agents for healing properties of sage plant. Sage also contains many bioactive flavonoids and terpenoids. It is important to know that how various environmental conditions may diversify the chemical composition and biological activity of salvia species.

The name of riboflavin is used for vitamin B_2 due to its ribose and flavin moieties. Riboflavin (vitamin B_2) is a photo sensitive and water soluble micronutrient with native fluorescent. It is considered as one of the most crucial substances for flavoenzymes in the human body and also has an important role in proteins and fatty acids enzymatic processes. Moreover, riboflavin is the exclusive source of flavin adenine dinucleotide (FAD) and flavin mononucleotides (FMN) coenzymes in cell. Although riboflavin has a crucial role in human metabolism but human body doesn't have the ability to synthesize it and must provide its riboflavin need by taking from dietary sources like eggs, liver, cheese, cereals and plants. Considering the importance of riboflavin source foods for human body, determination of riboflavin in different types of nutrients is valuable. Generally, foods with riboflavin content have a complex matrix with trace amounts of riboflavin and this brings the necessity of utilizing very accurate and sensitive methods of determination.

There are considerable amounts of studies in literature, on determination of riboflavin contents of different kinds of food stuffs. Various determination techniques especially including chromatographic techniques have been used for selective separation and determination of riboflavin in different matrices. Capillary electrophoresis as one of the recently introduced separation techniques, has gained a great popularity in analysis of medicinal plants in last decades. Capillary electrophoresis has considerable superiorities on previous chromatographic techniques including low cost, low sample and reagent consumption, high resolution, ease of automation and less analysing time. Capillary electrophoresis with strong ability of separation comes as one of the first candidatesfor analysis in complex matrices.

Capillary electrophoresis is a chromatographic separation techniques which was introduced as the simple, rapid, inexpensive and compatible with green chemistry for separation of wide spectrum of components including smallest organic anions to biggest molecules like DNA under high electrical field which was held by applying voltage between to electrode. Analytes in the form of ions migrate through electrolyte solutions in electrical field andcan be separated according to ionic mobility and/or partitioning into an alternate phase via non-covalent interactions.Capillary electrophoresis (CE) has a high separation power. Thus, it is especially suitable for complex matrices. Several modes of capillary electrophoresis are existing which according to the type of matrix and analytes, researchers decide to use one of them. Capillary zone electrophoresis (CZE) is one of the most useful modes of CE. In CZE, the separation is based on differences in electrophoretic mobilities of the separated ions. In capillary zone electrophoresis all ions are introduced to the column from anodic side. Analytes or ions are carried to the cathode electrode where the detector was placed near it, regardless of their charge by strong electroosmotic flow (EOF). In this study we used capillary zone electrophoresis as separation mode for riboflavin determination.

Our study includes very simple, rapid and inexpensive method for determining riboflavin amounts in 13 salvia species from various heights of Turkey which 10 of them are endemic for Turkey. Capillary zone electrophoresis coupled with laser induced fluorescence used for sensitive determination of riboflavin in salvia species. Dried samples of salvia were separated and cleaned from unwanted stalks and wooden parts and then well grinded with mortar and sieved through 500 µm mesh size. Samples are stored at cold and dry place. 100 mg of sample was extracted into 10 ml of boiling water and incubated for 5 minutes, then extract was passed through a 45 µm pore sized microfilters and after appropriate dilution with water injected to the CE-LIF system.

Agilent 1600 capillary electrophoresis system (Waldbronn, Germany) equipped with a ZETALIF 2000 laser-induced fluorescence detector (Picometrics, Montlaur, France) was used for the determination of riboflavin in salvia samples. The excitation was made by a 488 Ar-ion laser and emission at 520 nm.

The fused silica capillary with effective length of 50 cm and 75 µm I.D. with the total length of 65cm was used for separation.

Optimum condition for separation was obtained first by choosing background electrolyte. Considering the basic pKa= 9,6 for riboflavin, at borate buffer, riboflavin turns to its negative form and can migrate easily and fast through anode. Considering the aforementioned information, we tested borate buffer as the first candidate for background electrolyte and found that in borate natural pH value there is not any interfering compound signal for riboflavin. Borate buffer with its natural pH= 9,5 value was used as back ground electrolyte. Different concentrations of borate were tested at 5, 10, 15 and 20 mM and and desirable signals in terms of symmetry and height was obtained at 20 mM borate as background electrolyte. Sample solutions were injected hydrodynamically at 50 mbar for 6 s and voltage was set at 30 kV. Temperature was 25 Celsius.

The linearity of the method for the riboflavin standards were between 0,05-1 µg/mL. The repeatability was calculated for standards of riboflavin by consecutive injections in the same day (n = 7) and in three different non-consecutive days (n = 21). The intraday RSD of riboflavin according to corrected peak areas was 2,19% and the

inter-day RSD was 3.04%. The limit of detection (LOD) as three times of the average noise taken for three different baseline areas was 8 ng/mL. Consequently, 10 times the average signal to noise ratio was taken as the limit of quantification (LOQ), and it was 27 ng/mL. Riboflavin amount for various species of salvia samples from different heights of Turkey were between 1,65-11,90 µg/g. The lowest riboflavin content was belonging to the *Salvia aucheri var. aucheri* and *Salvia hypergia* with 1,65 and 1,85 µg/g respectively. Moreover, highest concentration of riboflavin was detected in *Salvia limbata* and *Salvia sclarea* with 11,87 and 11,90 µg/g respectively. Our results show that salvia can be considered as one of the rich sources for riboflavin.

1. GİRİŞ

Kapiler elektroforez (CE), klasik elektroforez tekniğine dayanan, ayırma işleminin temelinde elektrolit çözeltisiyle doldurulmuş dar bir kapiler kolonda elektrotlara uygulanan yüksek voltaj olan ve analitlerin yük/büyüklük oranlarına göre göç etmesiyle analiz edildiği önemli bir tekniktir. Ayırmada kullanılan kapiler kolonlar bu cihaz için özel tasarlanmış olup diğer kromotografik kolonlara göre çok daha ucuzdur. Analizi gerçekleştirilmek istenilen numunenin uzun ön işlemlerden geçirilmeden, az miktarda injeksiyonlar ile yapılabilmesi ve analizlerin hızlı ve bu esnada sarf edilen kimyasal miktarının az olması bu kromotografik teknik için en önemli avantajlardır [1].

CE'nin sahip olduğu ve geliştirilmiş otomasyon tekniği sayesinde analitik olarak ayrımı zor olan birçok örnek kolayca analiz edilebilir. Elektroosmotik akışın düz bir profile sahip olması ona yüksek ayrım etkinliği ve seçicilikte önemli avantajlar sunar. Bu sayede inorganik anyon ve katyonlar gibi küçük moleküllerden, vitamin, karbonhidrat, aminoasit ve polinükleotid gibi büyük moleküllere kadar geniş yelpazeli bir ayrım sıkalasına sahiptir [2].

Genellikle vitamin B_2 diye anılan riboflavin (RF) suda çözünebilen bir vitamindir. Bu vitamin ısıya duyarlı olmasına karşın ışığa karşı oldukça hassastır. RF bir florasans madde olan izoalloksazin türevidir ve bu yüzden kendiliğinden florofordur. Bu özellik analizi için birçok yöntem geliştirilebilmesine ışık tutmuştur. RF insan metabolizmasında önemli bir yer tutar özellikle enzimatik işlemlerin bir parçasıdır. Flavoenzimler için birincil bileşendir. Proteinlerin ve yağ asitlerinin enzimatik proseslerinde son derece önemli bir kaynaktır. Ayrıca önemli koenzimler olan flavin mononükleotid (FMN) ve flavin adenin dinükleotid (FAD) yapılarının oluşturulmasında başlıca ihtiyaç olan parametredir. Metabolizmada önemli roller üstlenmesine rağmen RF insan vücudunda sentezlenemez ve dışardan alınan besinler aracılığı ile vücuda sağlanır. Özellikle süt ve süt ürünleri, yumurta ve koyu yeşil renkli bitkilerde mevcuttur.

RF eksikliğinde vücutta karşılaşılacak başlıca belirtiler büyümede yavaşlama, yorgunluk, ağız köşelerinde çatlaklar ve yaralar, sindirim problemleri ve dilde, dudaklarda ağrılardır. Fazla miktarda alındığında ise vücuda hiçbir zararı yoktur idrar yolu ile vücuttan kolayca uzaklaştırılır.RF insan metabolizmasında bu kadar önemli bir yere sahipken bu vitaminin dışardan temin edilirken bunun doğru miktar tayininin yapılması oldukça önemlidir ve bir o kadar zordur. Çünkü genellikle RF 'in bulunduğu gıda maddeleri karmaşık matrikslere sahiptirler ve bunların bünyesinde son derece düşük konsantrasyonlarda bulunur [3-4].

RF sentezi için genelde tercih edilen teknik yüksek performanslı sıvı kromotografisi (HPLC)'dir. Ancak bu yöntem için valide edilmiş bir metod hazırlamak oldukça zordur ve uzun analiz süreleri, mobil faz olarak kullanılan solventlerin fazla tüketimi bu tekniğin en büyük dez avantajlarıdır. CE 'de ise HPLC 'nin aksine kısa analiz süresi, düşük örnek hacmi, az solvent kullanımı, otomasyonkullanım kolaylığı, yüksek ayırma verimliliği ve esnek uygulamalara sahip olması onu son yıllarda daha çok tercih edilir kılmıştır. Böylece oldukça çeşitli komponentlerin tayin edilmesinde CE çok yönlü bir analitik araç haline gelmiştir. Yapılan çalışmalarda RF tayini için birçok yeni metod literatüre kazandırılmıştır [3-5-6-7].

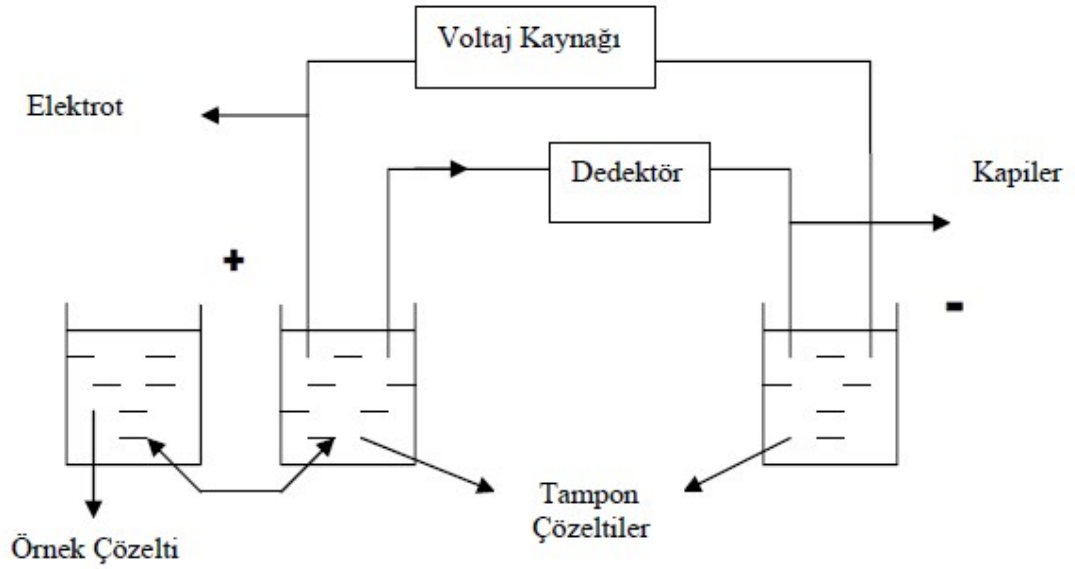
Bu tez çalışmasında, RF ayrımı ve miktar tayini için lazer indüklenmiş floresans dedektör kullanılarak yeni bir kapiler elektroforez yöntemi geliştirilmiştir.Analiz yönteminin validasyonu yapılmış, yöntem çeşitli *Salvia* türleri üzerinde RF tayinine başarı ile uygulanmıştır.

2.KAPİLER ELEKTROFOREZ

İsveçli bilim adamı Arne Tiselius tarafından 1937 yılında geliştirilmiş olan elektroforez yöntemi, elektriksel bir alanın etkisi altında yüklü taneciklerin tampon çözeltideki bağıl göç hızına dayanan bir ayırma yöntemidir. Bu teknik uzun yıllar makro moleküllerin(proteinler, nükleik asitler, amino asitler ve karbonhidratlar gibi) ayrımı ve tanımlanmasında kullanılmıştır [8]. Elektroforez uzun yıllar kağıt veya jel ortamlarında uygulanmasına rağmen şimdilerde teknolojideki ilerlemeler ile birlikte üretilen dar bir kolon olan kapilerde gerçekleşmektedir.

Elektroforez tarihindeki en önemli gelişmeler şöyle özetlenebilir. 1967 yılında Hjerten 1-3 mm iç çaplı kolonlarda proteinler, virüsler, organik ve inorganik iyonlar gibi pek çok analitin ayırabilmiştir [9]. Ardından 1974 yılında Virtanen ve Mikkers kapiler çapını 200 μm'ye indirerek ısı kaybının neden olduğu problemleri ortadan kaldırmıştır [10-13]. 1981 yılında Jorgenson ve Lukacs kapiler çapını 75 μm'ye indirerek 30 kV ayırma voltajı ile çalışıltırmayı başarmışlardır [13]. 1989 yılında ilk ticari kapiler elektroforez sistemi Beckman Coulter tarafından üretilmesiyle kapiler elektroforez, adli tıp, genetik, gıda, biyokimya ve mikrobiyoloji gibi pek çok alanda geniş bir kullanım alanına sahip olmuştur [14].

Kapiler elektroforez yönteminde analitlerin ayrılması tampon çözeltisi ile dolu özel bir kolon olan kapiler kolonda gerçekleşir. Bu özel kolonlar gaz kromotografisinde ya da sıvı kromotografisinde kullanılanların aksine yüksek elektrik dirence sahiptir ve yüksek elektrik alanlar (100'den 500 V/cm' ye kadar) uygulanabilir ve aynı zamanda uygulanan yüksek voltaj sonucu oluşan ısıyı da geniş yüzey alanı sayesinde dağıtır. Voltajın yüksek miktarlarda uygulanabilmesi analiz süresini kısaltmada, teorik tabaka sayısını arttırmada ve ayırma gücünün iyi olmasında çok önemli bir yer tutar. Genel çalışma prensibi olarak kullanılan kolonun uçları çözelti kaplarına daldırılması ve kolona enjekte edilen analitlerin, bu kaplarda bulunan elektrotlara uygulananyüksek voltajile farklı göç zamanlarında dedektöre ulaşması ve tayin edilmesi söylenebilir. Sistemin genel görünümü Şekil 2.1' de verilmektedir [15-16].



Şekil 2.1 : CE'nin şematik gösterimi[32].

2.1 Elektroforetik Mobilite

Elektroforez yönteminde ayırım, elektrik alan altında analizi yapılacak maddelerin farklı hızlardaki hareketine dayanmaktadır. Taneciğin mobilitesi ortamdaki elektrik kuvvetinden ve sürtünme kuvvetinden etkilenir [8].

Elektroforetik ayrım, iyonların mobiliteleri farklarıyla oluşmaktadır.

$$v = \mu_e E \quad \textbf{(2.1)}$$

$$v = \mu_e V L^{-1} \quad \textbf{(2.2)}$$

Gösterilen denklemlerde,

v = iyonun hızı,

μ_e = elektroforetik mobilite

E = elektrik alan

V = uygulanan voltaj

L = kapiler uzunluğu

Elektrik kuvveti,

$$F_E = qE \quad \textbf{(2.3)}$$

Bir iyonun sürtünme kuvveti,

$$F_F = - 6\pi\eta r v \quad \textbf{(2.4)}$$

denklemi ile sağlanır.

q = iyon yükü

η = çözelti viskozitesi

r = iyon yarıçapı

v = iyon hızı

Elektroforez işlemi sırasında sürtünme kuvveti ile elektrik kuvveti dengededir.

$$F_F = - 6\pi\eta r v \quad \textbf{(2.5)}$$

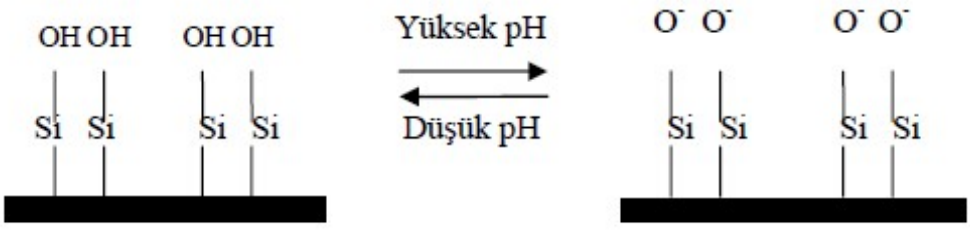
$$qE = 6\pi\eta r v \quad \textbf{(2.6)}$$

$$\mu_e = q/6\pi\eta r \quad \textbf{(2.7)}$$

Elektroforez işlemi sırasında viskozite sabittir bu yüzden elektroforetik mobilite (μe) taneciklerin yük bölü büyüklük oranlarıyla (q/r) ilişkilidir. Bu sebepten dolayı analitler farklı zamanlarda dedektöre ulaşırlar. Yarıçapları küçük ve yük oranı yüksek taneciklerin mobilitesi yüksek, aksi halde mobilitesi düşüktür. Tamponun pH değerinin değişmesi moleküllerin yükünü değiştirir ve bundan dolayı analitlerin elektroforetik mobiliteleri de değişir.

2.2Elektroosmatik Akış

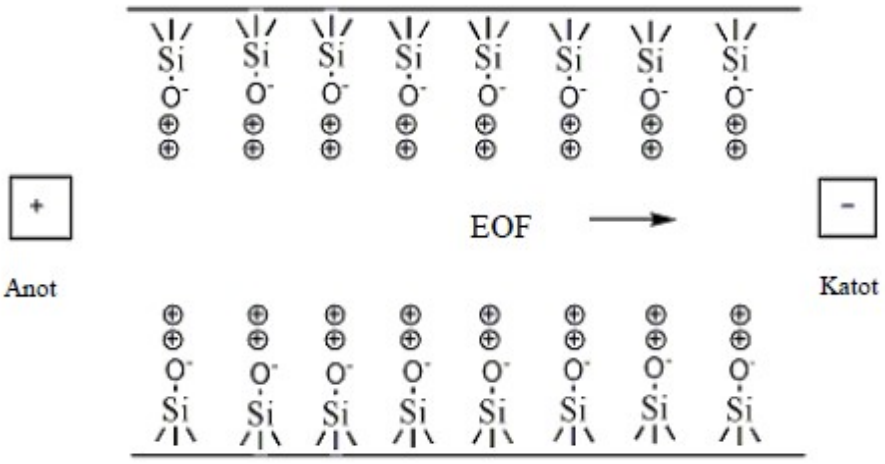
Kapiler elektroforezde, elektriksel alan etkisiyle çoğu zaman çalışma tamponu da kapiler kolon içinde ilerler. Bu olaya elektroosmotik akış denir. Eritilmiş silika kapilerin iç yüzeyi silanol grupları (SiOH) ile kaplıdır ve pH 3,0'ın üzerinde SiO^-'ya iyonize olurlar. Bu da Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil2.2 : Kapiler duvarında silanor gruplarının ayrışması[17].

Elektroosmotik akışın sebebi, kapiler kolonun iç çeperinde çalışma tamponu ile SiO^- grupları arasında elektriksel çift tabaka oluşmasıdır. Şekil 2.3'de kapiler içinde

oluşan elektriksel çift tabaka ve elektroosmotik akış gösterilmiştir. Kapilerin içindeki silanol grupları negatif yüklü silanoat gruplarına dönüşürler. Bu negatif yüklü gruplar sabit ve hareketli fazları oluşturmak üzere tampondaki pozitif yüklü katyonlar ile etkileşirler.



Şekil 2.3 :EOF'un şematik gösterimi[18].

Seçilen tampondaki pozitif yüklü iyonlar, kapiler çeperine yaklaşırlar. Cidara çok yakın olan katyonlar hareketsizdir. Ancak cidardan uzaklaştıkça, yüzey ile pozitif yüklü iyonlar arasındaki elektrostatik etkileşim azalır, kapilere uygulanan elektriksel alanın iyonlar üzerindeki kuvveti yüksek olduğundan bu pozitif yüklü iyonlar topluca negatif yüklü elektroda (katot) doğru göç ederler. Bu toplu göç, kapiler içindeki tamponun katoda doğru ilerlemesine neden olur. Bu ilerleyişe EOF denir.

Elektroosmotik akış hızı (υEOF), formül 2.8'de gösterilmiştir.

$$\upsilon_{EOF} = E \cdot \mu_{EOF} \qquad \textbf{(2.8)}$$

υ_{EOF}: Elektroosmotik akış hızı;

μ_{EOF} : Elektroosmotik mobilite;

E : Elektriksel alan kuvveti

Kapiler çeperine yakın olan hareketsiz kısım ile merkeze yakın olan hareketli kısımın meydana getirdiği çift tabaka arasında oluşan potansiyele zeta potansiyeli (ξ) adı verilir ve formül 2.9 ile gösterilir.

$$\xi = 4 \pi \delta e / \varepsilon \qquad \textbf{(2.9)}$$

δ: Difüzyon tabakası kalınlığı,

e: Yüzey alana düşen yük,

ε: Tamponun dielektrik sabiti

Elektroosmotik akış hızı hızı olan (υ_{EOF}) en basit haliyle Helmholtz eşitliğinden formül 2.10 ile açıklanabilir.

$$\upsilon_{EOF} = \varepsilon \, \xi \, E / 4 \, \pi \, \eta \qquad \textbf{(2.10)}$$

η: Tamponun viskozitesi

2.10 eşitliğinde de görüldüğü üzere, υ_{EOF} elektrolit viskozitesi ile ters orantılı, dielektrik sabiti, uygulanan elektrik alan ve zeta-potansiyeli ile doğru orantılıdır. Kuvarst kapileriçin υ_{EOF}, organik malzemelerin ilavesi ile azalırken, pH değeri ile artan yüzeydeki silanol gruplarının iyonlaşmaları ile de yükselir [19,21].

Elektriksel alan altında tampon içindeki elektriksel yüklü maddeler elektroforetik hızla hareket ederler. Elektroforetik hız (υ_{EP}) formül 2.11'e göre hesaplanır.

$$\upsilon_{EP} = E \, \mu_{EP} \qquad \textbf{(2.11)}$$

υ_{EP}: Elektroforetik hız,

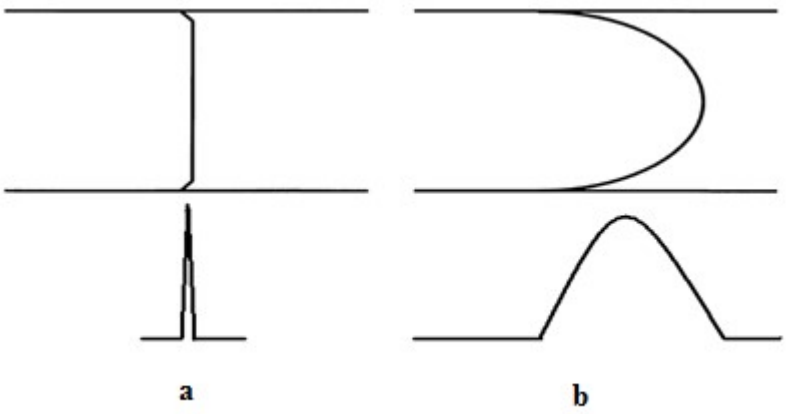
μ_{EP}: Elektroforetik hareketlilik

Moleküller kapiler içine değişik hızlarda hareket ederler ve ayırım burada gerçekleşir.

Elektroforetik hareketlilik formül 2.12'de gösterilmiştir.

$$\mu_{EP} = q / 6 \, \pi \, \eta r \qquad \textbf{(2.12)}$$

Kapilerin içinde her tarafında EOF' a etkiyen kuvvet eşittir ve basınç değişmediği için düz bir akış oluşur (Şekil 2.4a). Bu akış, kapilerin içinde hareket eden analitlerin dağılmasını engeller ve dik, simetrik pikler elde edilmiş olur. Sıvı kromotografisinde ise analitleri hareket ettiren güç dış basınçtır ve bu yüzden parabolik kesitli bir akış söz konusudur ve piklerde genişlemeye neden olur (Şekil 2.4b). CE'de akış düz olduğu için ayırım etkinliği çok yüksektir [21-23].



Şekil 2.4 : (a) Elektroosmotik düz akış, (b) Basınç ile sağlanan parabolik akış [18].

2.2.1 Elektroosmotik akış hızı ve göç süreleri

Elektroosmotik akış (EOA) hızı eşitlik 2.1'dekine benzer şekilde;

$$v = \mu eo.E \qquad \textbf{(2.13)}$$

tanımlanır.

EOA'nın başladığı anda, analitlerin her birinin hızları, onların elektroforetik hızları ve elektroosmatik akış hızlarının bileşimidir. Böylece;

$$v = (\mu eo \pm \mu e)\, E \qquad \textbf{(2.14)}$$

olur.

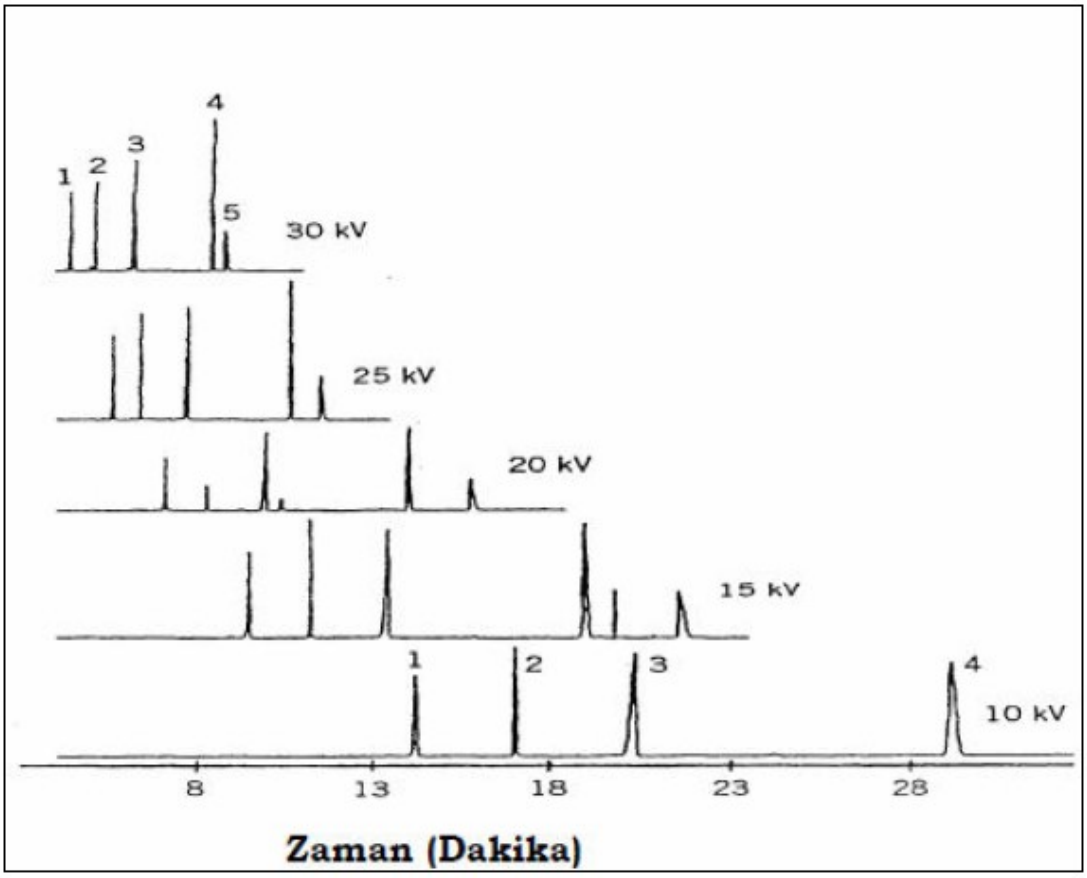
Katotta bullunan detektörden ilk analiz edilen analitler elektroforetik mobilitesi EOA yönünde olan katyonlardır. Daha sonra nötral moleküller ulaşır bunun sebebi bu moleküllerin kendi elektroforetik mobiliteleri olmamasıdır ve bu yüzden sadece EOA ile hareket edebilirler. Arkasından gelen anyonların elektroforetik mobiliteleri EOA'a zıt yönde olduğundan en son dedektöre varırlar.

2.2.2 Elektroosmotik akış hızını etkileyen faktörler

Her analizde olduğu gibi kullanılan şartların optimize edilmesi önemlidir. Elektroosmotik akış hızıda bu şartlardan biridir. Elektroosmotik akışa etki eden faktörler aşağıdaki başlıklar altında toplanabilir.

2.2.2.1 Elektrik alan

Elektrik alan arttırıldığında EOA da artar. Potansiyeldeki artış elektroosmotik akışı artırır ve göç sürelerini azaltır böylece analiz süresindeki zaman azalmış olur (Şekil 2.5) . Potansiyelin arttırılması sonucu etkinlikte artar ancak normal şartlarda yüksek voltaj ile çalışmak istenilmez. Voltajın yükselmesi akımın artmasına neden olur bunun sonucunda da Joule ısısında artış meydana gelir. Çalışma potansiyeli olarak 5-30 kV arası voltaj tercih edilir. 40 kV üzerindeki voltaj kıvılcımlarlar elektrik boşalmasına ve bununla birlikte kapilerin kırılmasına neden olabileceği için tercih edilmez [24].



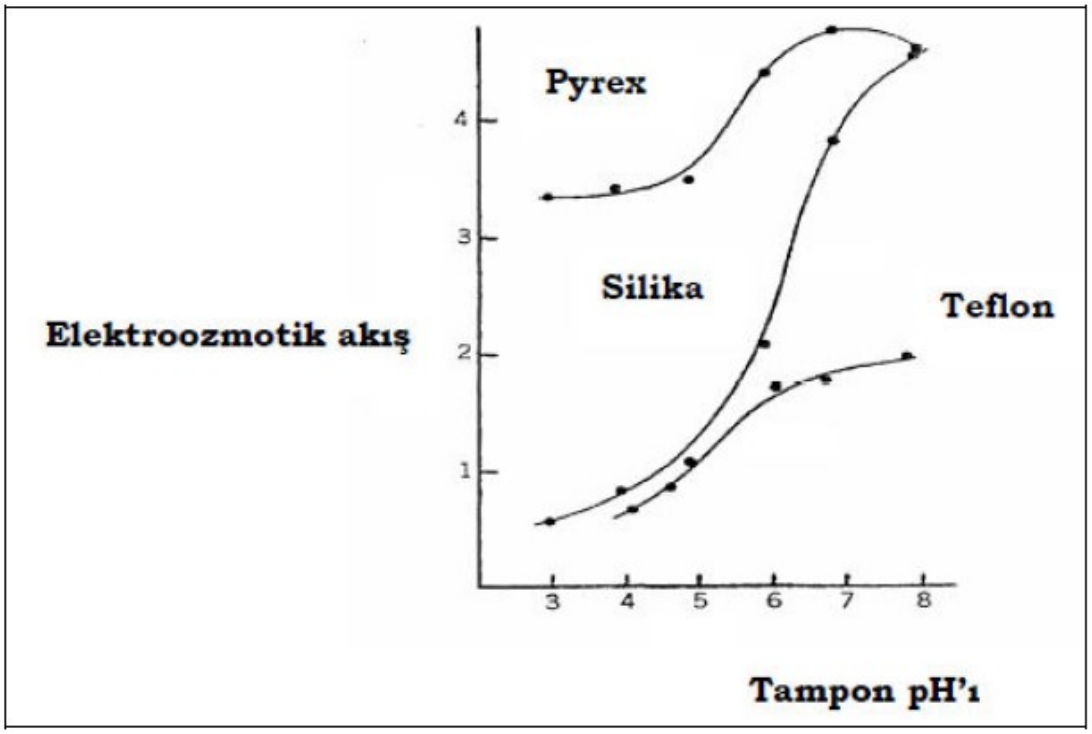
Şekil 2.5 : Uygulanan potansiyelin artırılması ile göç zamanının azaltılması[24].

Yüksek potansiyel yüksek akımı doğurur ve yüksek akımda kapilerde ısınma meydana getirir. Kapiler ısındıkça tamponun viskozitesinde azalma oluşacaktır ve akımın daha fazla geçmesine olanak sağlayacaktır bu yüzden bu ısında hızlı bir biçimde azaltılmalıdır. Kapiler içindeki ısının artışı geniş piklere, tekrar edilemeyen alıkonma zamanına, örneğin bozulmasına ve hatta kapilerden elektriksel devamsızlığın sonucu elektroforetik sistemin kapanmasına neden olabilir. Bu ısınmayı kontrol altına almak ve deneydeki tekrarlanabilirliği sağlamak için

termostatlı sistemler kullanılır. Çalışmanın şartlarına ve kullanılan cihazın kalitesine göre maksimum seviyede potansiyel kullanılmalıdır. Maksimum seviye potansiyel çalışmada daha kısa analiz zamanı ve daha dar pikler oluşumunu sağlar.Maksimum potansiyel, tampon niteliğine, konsantrasyonuna ve pH'sına bağlıdır.Aynı zamanda maksimum potansiyel, kapiler uzunluğuna ve iç çapına da bağlıdır [24-27].

2.2.2.2 Tamponun pH değeri

Tampon pH ' si Zeta potansiyeli ile yakından ilişkilidir ve bu yüzden elektroosmotik akışı da etkiler. Sekil 2.6 'de pyreks, silika ve teflon kapilerler için pH 'nın bir fonksiyonu olarak elektroosmotik mobilite gösterilmiştir. pH' daki artış sonucunda iç kapiler duvarındaki Si-OH , Si–O- ya daha fazla ayrıldığı için elektroosmotik akış da artmaktadır. Kapiler yüzeyindeki yük değişimi Zeta potansiyelinide etkiler. Yüksek pH 'da, daha fazla yüklü Si-O- grupları ve bunun yanında büyük bir zeta potansiyeli ile elektroosmotik hızda bir artış olacaktır. Aksi durumda, düşük pH'da, daha az yüzey iyonizasyonu ve daha düşük bir zeta potansiyeli meydana gelir. pH yaklaşık olarak 2'nin altında olduğunda, silanol gruplarının pek çoğu protone oldukları için silika kapileri içinde elektroosmotik akış meydana gelmez [28].



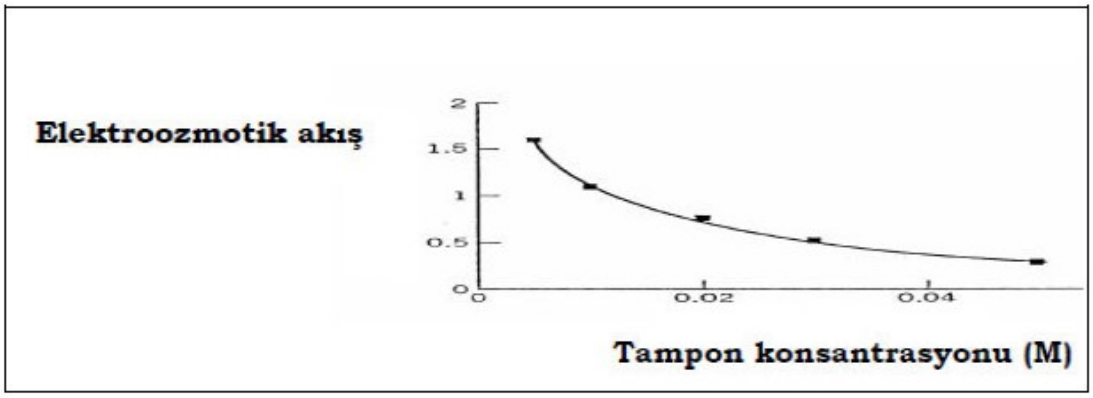
Şekil 2.6 : Tampon pH'sının etkisi ile elektroosmotik akıştaki değişim[28].

Anyonik çözünen maddelerin hareketliliği, yüksek pH' da baskın olarak negatif yüklü formlar olduğu için, pH arttıkça artar. Düşük pH'da negatif yüklerin çoğu, nötralize olurlar ve hareketlilikleri azalır [29]. Görüldüğü üzere çözünen maddelerin iyonizasyonundaki değişiminden ve elektroforetik hareketliliğnden tampon pH 'sı etkilenmektedir. Genellikle çalışma tamponu, optimum elektroosmotik hızın sağlanması için değil ayrımın net ve iyi olabilmesi için seçilir.

2.2.2.3 Tampon konsantrasyonu ve iyonik şiddet

Analitlerin ayrıldığı ortamın iyonik şiddeti elektroforetik ve elektroosmotik mobiliteler ile ters orantılıdır [30].

Kapiler sıcaklığı kontrol edildiği zaman, tamponun iyonik gücündeki veya konsantrasyonundaki artış, zeta potansiyelini düşürdüğü için, elektroosmotik akışta da azalma meydana getirecektir ve bu durum sekil 2.7'de görülmektedir. Sıcaklık kontrol edilmediği takdirde, iyonik şiddet veya konsantrasyondaki artıştan dolayı akım artar ve joule ısısı oluşur buda ayrım için büyük bir dezavantajdır.



Şekil 2.7 : Tampon konsantrasyonunun elektroosmotik akış üzerine etkisi .

Elektroosmotik akışın iyonik şiddetin doğal logaritmasına karşı grafiği inorganik ve organik tamponlar için verilen bir pH'da doğrusaldır. Daha düşük bir tampon konsantrasyonu daha kısa analiz zamanı sağlarken, çok düşük konsantrasyonlarda da çalışılması pek doğru değildir. İyonik şiddetin çok azalmasıyla duvar adsorbsiyonu artar ve bunun sonucunda broad (geniş ve yayvan) pikler oluşur. Eğer tampon konsantrasyonu örnek konsantrasyonunun üstünde aşırı bir konsantrasyonda değilse, elektrik alanda bir bozulmaya neden olan, çözünen madde ve etrafındaki tampon arasında iletkenlikte farklılıklar olabilir. Bu bozulma, geniş ve eğri pikler meydana

getirir. Genel bir kural olarak, hareketli tampon konsantrasyonu örneğin konsantrasyonundan 100 kez daha yüksek olmalıdır [22].

2.2.2.4 Çalışma sıcaklığı

Sıcaklık artışı sonucu tamponun viskozitesi azalacağından elektroosmotik akışta artış söz konusu olacaktır. Örneğin, sıcaklıktaki 1 °C'lik bir artış, suyun viskozitesini % 2,4 oranında düşürecektir. Benzer bir biçimde elektroosmotik akışta da bir artış beklenir.

Sıcaklıktaki artış, aynı zamanda dielektrik sabitinde azalma meydana getir ve bu yüzden elektroosmotik akışta düşme gözlenebilir. Daha önce bahsedilen viskozitedeki azalmanın meydana getirdiği etkiye terstir ve dolayısıyla bu iki zıtlaşan etki birbirini dengeler. Su için dielektrik sabitindeki azalma sadece yaklaşık % 0,5 oranındadır ki bu değer viskozitede meydana gelen değişiklikten daha azdır. Dolayısıyla sıcaklıktaki bir artısın bütün sonuçları elektroosmotik akışta bir artış demektir. Sıcaklığın yükseltilmesi bant genişlemesine, örnek bozulmasına veya tamponda kaynamaya neden olduğu için, daima sıcaklık kontrol edilmelidir [23].

2.2.2.5 Organik çözücü ilavesi

Tamponun içine organik çözücü ilavesiyle viskozite, dielektrik sabiti ve zeta potansiyeli gibi birçok değişken değişebileceği için bunun etkilerini tahmin etmek zordur. Buna ek olarak, tampona bir organik çözücünün eklenmesiyle meydana gelebilecek etkiler, organik çözücünün ne olduğu ve bunun miktarına bağlıdır. Organik çözücülere ihtiyaç duyulması halinde kimyasal yapısı ve tampon içindeki tavrına göre seçim yapılır. Örneğin etil alkol, metil alkol gibi suyla karışabilen organik çözücülerin ilavesi, zeta potansiyeli ve viskoziteyi, dolayısıyla elektroosmotik akış hızını etkiler. Genellikle organik çözücülerin ilave edilmesiyle EOA yavaşlar [19] .

2.2.2.6 Kapiler duvarında yapılan kimyasal modifikasyonlar

Elektroosmotik akış, kapiler duvarı bir kimyasal ile kovalent bağ yaptığında veya kapiler kolonunun içi polimerik bir madde ile (polietilenimin, polietilenglikol, poliakrilamid vb.)kaplandığında büyük bir biçimde azalabilir, ortadan kalkabilir veya tersine çevrilebilir. Bu kimyasallar zeta potansiyelini düşürerek kapiler

duvardaki yükleri bloke ederler bununlar birlikte elektroosmotik akışı düşürebilir veya ortadan kaldırabilirler [31].

2.2.2.7 Yüzey aktif madde ilavesi

Kapiler yüzeyinde adsorplanan yüzey aktif maddeler EOA'ı değiştirirler. Anyonik yüzey aktif maddeler EOA'ı arttırırken, katyonik yüzey aktif maddeler EOA'yi azaltır veya EOA'ın yönünü tamamen değiştirebilir. Ayrıca yüzey aktif maddeler seçimliliği büyük ölçüde etkilerler [31].

2.3Kapiler Elektroforezde Analitik Parametreler

2.3.1 Görünen mobilite ve göç süresi

Analizi yapılan moleküllerin detektöre ulaşana kadar kapiler kolonda geçirdiği süreye göç süresi (t) denir. Analitin görünen mobilitesi göç süresine ve diğer parametrelere bağlı olduğu için hesaplanırken bunlarda işin içine katılır [32].

$$\mu_g = l/(tE) = lL/(tV) \quad \textbf{(2.15)}$$

$$\mu_g = \mu_e + \mu_{EOF} \quad \textbf{(2.16)}$$

V: Uygulanan voltaj

l: Kapilerin etkin uzunluğu

L: Kapilerin toplam uzunluğu

t: Göç süresi

E: Elektrik alan

Görünen mobilite (μ_a), elektroosmotik akış etkisinde ölçülen mobilitedir. Elektroforetik mobilite (μ_e), EOF hızına doğrudan bağlıdır. EOF'u ölçmek için nötral işaretleyiciler (formamid, aseton, mesitil oksit gibi) kullanılır bilindiği üzere nötral moleküllerin dedektöre geliş süreleri EOF'a eşittir ayrıca bu moleküller kullanılar kolon ile reaksiyon vermemeleri gerektiğinden seçiminde dikkatli olunmalıdır. Kapilerin injeksiyon yapılan kısmından dedektöre kadar olan uzaklık kapilerin etkin uzunluğu olarak bilinir.

2.3.2 Ayırma etkinliği

Teorik tabaka sayısı (N) birçok ayırma sisteminde olduğu gibi kapiler elektroforezde de ayırma etkinliğini belirler.

Teorik tabaka sayısı göç zamanı ve pik genişliğine bağlıdır. Pikin tabanından başlanarak pik genişliğinin ölçülmesi ve göç zamanına bağlı olarak teorik tabaka sayısı hesaplanabilir.

$$N = 16\,(Tg/w)^2 \qquad \textbf{(2,17)}$$

N: Teorik tabaka sayısı

Tg: Göç zamanı

w: Pik genişliği

Elektroforetik hareketlilik, difüzyon katsayısı ve uygulanan potansiyel göz önüne alındığında verim aşağıdaki gibi hesaplanabilir.

$$N = (\mu_{EP} + \mu_{EOF})\,V / 2D \qquad \textbf{(2.18)}$$

N: Teorik tabaka sayısı

μ_e: Maddenin elektroforetik hareketliliği

V: Uygulanan voltaj

D: Maddenin difüzyon katsayısı

Denklemden de görüleceği üzere, uygulanan potansiyeldeki (V) artış ile ayırma etkinliği artırılabilir ancak görüldüğü üzere difüzyon katsayısı (D) ile arasında ters bir orantı vardır [8].

2.3.3 Pik genişlemesi

Ayrımı yapılmak istenilen maddeler dedektöre ulaşıncaya kadar bantlarında genişleme olması istenmez. Pik genişlemesinin başlıca sebepleri şunlardır;

a)Boyuna difüzyon

b)Joule ısınması

c)Enjeksiyon süresi

d)Duvar adsorbsiyonu

e)Elektro dispersiyon

Boyuna difüzyon pik genişleme nedenlerinde diğerlerine göre daha önemli bir yer tutar. Düşük pik genişlemesine sahip analitlerin ortak özelliği göç sürelerinin kısa olması ve difüzyon katsayılarının düşük olmasıdır. Göç süresini etkileyen önemli bir parametre olan voltajdaki artış sayesinde analitlerin dedektöre ulaşma süreleri azalır böylece kapiler kolonda geçirilen süre minumuma indirilmiş olup difüzyona uğramaması sağlanır [18, 21, 2, 23].

2.3.4 Ayırma gücü (Rezolüsyon)

Analitlerin birbirinden ayrılması ve iyi bir analiz için detektörden alınan cevapların farklılığı büyük önem teşkil etmektedir. Bu farklılığı da rezolüsyon sağlar.

Rezolüsyon aşağıdaki gibi gösterilir;

$$R=2(t2-t1)/(w1+w2)=(t2-t1) / 4\,\sigma \qquad \textbf{(2.19)}$$

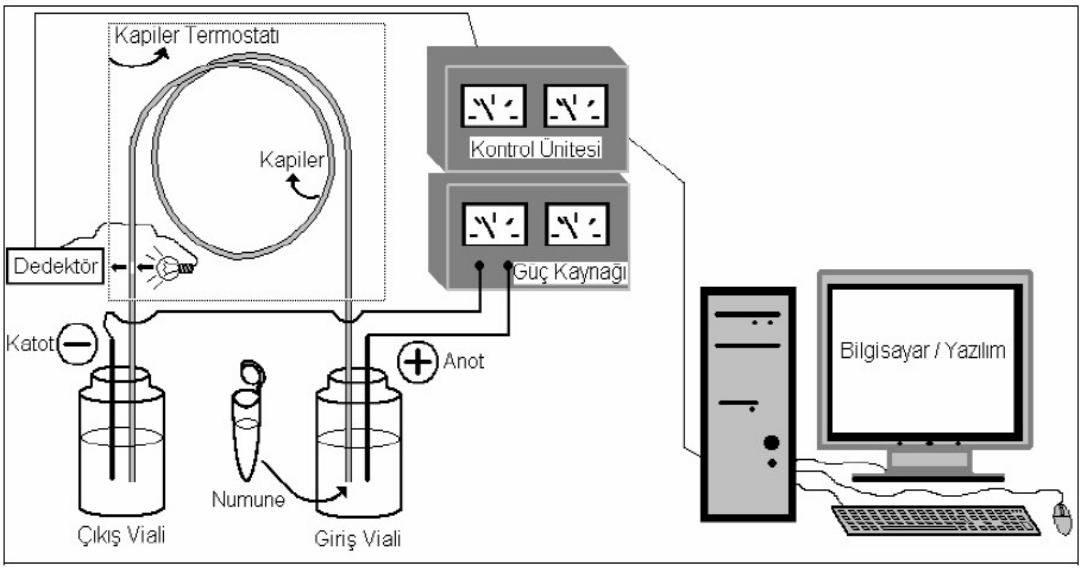
t = göç süresi

w = pikin taban genişliği (zaman cinsinden)

σ = standart sapma (zamana bağlı)

2.4 Kapiler Elektroforezin Temel Kısımları

Bir CE sistemi; bir örnek viali, kaynak ve hedef vialleri, kapiler, dedektör, yüksek akım destekleyicisi ve bilgisayardan oluşmaktadır. Şekil 2.8 'de bir kapilerelektroforez sistemi görülmektedir.



Şekil 2.8 : Kapiler elektroforez cihazı.

Birçok sistemde kapilerdeki ısınmayı soğutmak ve kapiler sıcaklığını kontrol etmek için termostat bulunmaktadır. Bir CE analizinin temel adımları; kapilerin ön yıkaması, kapiler ile giriş ve çıkış viallerinin çalışma tamponu ile doldurulması, kapilerin tampon ile şartlandırılması, örneğin kapilere enjeksiyonu ve elektriksel alan uygulanmasını içerir [33-35].

2.4.1 İnjeksiyon

Numune injeksiyonu numuneyi kapiler içerisine almak amacıyla yapılır. Numuneler genellikle birkaç µL 'den birkaç mL 'ye kadar hacme sahip olan numune viallerine doldurulur. Kapiler elektroforezde tipik injeksiyon hacmi 1-50 nL'dir. Kapiler içine numune injeksiyonu hidrodinamik veya elektrokinetik olarak yapılabilir.

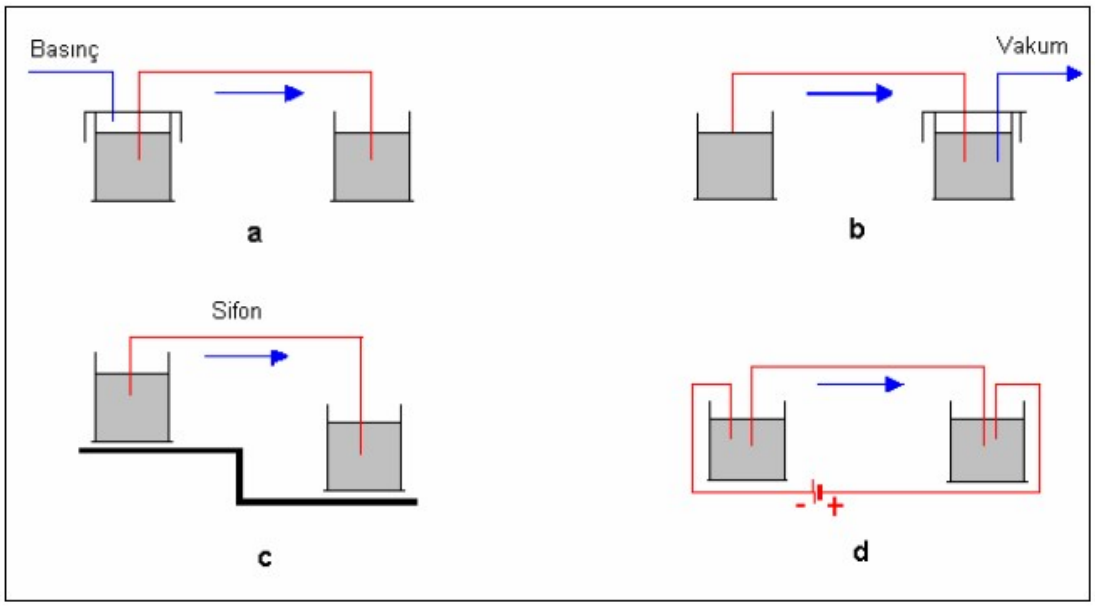
2.4.1.1 Hidrodinamik injeksiyon

Hidrodinamik injeksiyon en çok kullanılan injeksiyon yöntemidir. Bu işlem üç şekilde yapılabilir (Sekil 2.9-a,b,c). Bunlardan birincisi, kapilerin giriş tarafına konulan numune vialine basınç uygulanmasıdır. Genelde 50 mbar civarında 1-5 saniye arası basınç uygulanır. Ardından numune viali çıkarılıp çalışma tamponu viali takılır ve voltaj uygulanarak analize devam edilir. Hidrodinamik injeksiyonun ikinci yolu, numune viali kapilerin giriş kısmındayken, çıkış kısmındaki tampon vialine vakum uygulanmasıdır. Uygulanan vakumla istenen miktardaki numune kapilere girince vakum kesilir, numune viali çıkarılıp çalışma tamponu viali takılır ve voltaj uygulanarak analize devam edilir. Üçüncü hidrodinamik injeksiyon yönteminde, sifon etkisinden yararlanılır. Kapilerin giriş kısmına takılan numune viali, çıkıştaki tampon vialinden daha yükseğe yerleştirilir. Yerçekiminin etkisiyle, numune kapilerin içine girer. Ardından numune viali çıkarılıp çalışma tamponu viali takılır ve voltaj uygulanarak analize devam edilir.

2.4.1.2 Elektrokinetik injeksiyon

Elektrokinetik injeksiyonda kapilerin giriş kısmına numune viali yerleştirildikten sonra, numune vialiyle çıkış kısmındaki çalışma tamponu viali arasına voltaj uygulanır. Oluşan elektrik alanın etkisiyle numunedeki iyonlar kapiler içine göç

etmeye baslar. Bu voltajın uygulanmasından sonra numune viali çıkarılıp tampon viali takılır ve voltaj uygulanarak analize devam edilir [36].



Şekil 2.9 : Kapiler elektroforezde enjeksiyon sistemleri a, b, c) Hidrodinamik enjeksiyon, d) Elektrokinetik enjeksiyon [2].

2.4.2 Dedektörler

Kapiler elektroforezde kullanılan dedektörler ve dedeksiyon limitleri Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1: CE'de kullanılan dedektörler ve dedeksiyon limitleri [23].

Dedektörler	**Dedeksiyon Limiti (mol/L)**
UV absorpsiyon	10^{-7} - 10^{-4}
Floresans	10^{-9} - 10^{-4}
Lazer indüklenmiş floresans	10^{-13} - 10^{-7}
Amperometrik dedektör	10^{-8} - 10^{-6}
İletkenlik dedektörü	10^{-7} - 10^{-5}
Potansiyometrik dedektör	10^{-8}
Kütle spektrometre dedektörü	10^{-8}

2.4.2.1 Lazer indüklenmiş floresans dedektör

Lazer indüklenmiş floresans (LIF) lazer ışınları ile moleküllerin uyarılmasından sonra yayılan floresansı ölçen spektroskopik bir yöntemdir. Tanecikler uyarılmış halden temel hale dönerken uyarıldıkları dalga boyundan yüksek bir dalga boyunda ışıma yaparlar (emüsyon) ve ölçülen bu ışımada floresanstır.

LIF ile tayinin absorbsiyon spektroskopi üzerine birçok avantajı vardır. Bunlardan en önemlisi floresans sinyalinin gürültü sinyaline oranının büyük olmasıdır. Bu durum hassasiyetin fazla olmasını sağlar.

Lazer ışının üç boyutlu özelliklere sahip olması CE ile başarılı bir şekilde çalışmasını sağlar. Lazer uygulamalarında karşılaşılan en genel sorun ucuz lazerlerin dalga boyunun ayarlanabilir olmamasıdır. Bu sebeple ayırma yapılırken analitin özelliklerine göre lazer seçilmelidir. CE ve HPLC uygulamalarında sıkça kullanılan lazer tipleri Çizelge 2.2'de listelenmiştir [37].

Çizelge 2.2 : Lazer türleri [37].

Lazer	**Dalga boyu (nm)**
HeNe	543,632
Ar+	488,514
Diyot	645,480

Floresans veya absorbans dedeksiyonun dezavantajı, tüm analitlerin UV-VIS (180-800 nm) bölgede floresans veya absorbans yapan kromofor grup içermemesidir. Böyle moleküller direkt olarak tayin edilemez ancak belirli işlemler ile bu özellikler kazandırılabilir. Bu işlemlerin en geneli kromofor grup içeren bir bileşik ile türevlendirilmesidir. Ancak analite bu özellikler yüklenemiyorsa başka bir dedeksiyon yönteminin kullanılması ya da dolaylı dedeksiyon ile analiz etmek mümkün olacaktır.

2.4.3 Kapiler elektroforez türleri

Çizelge 2.3: Kapiler elektroforez türleri [2] .

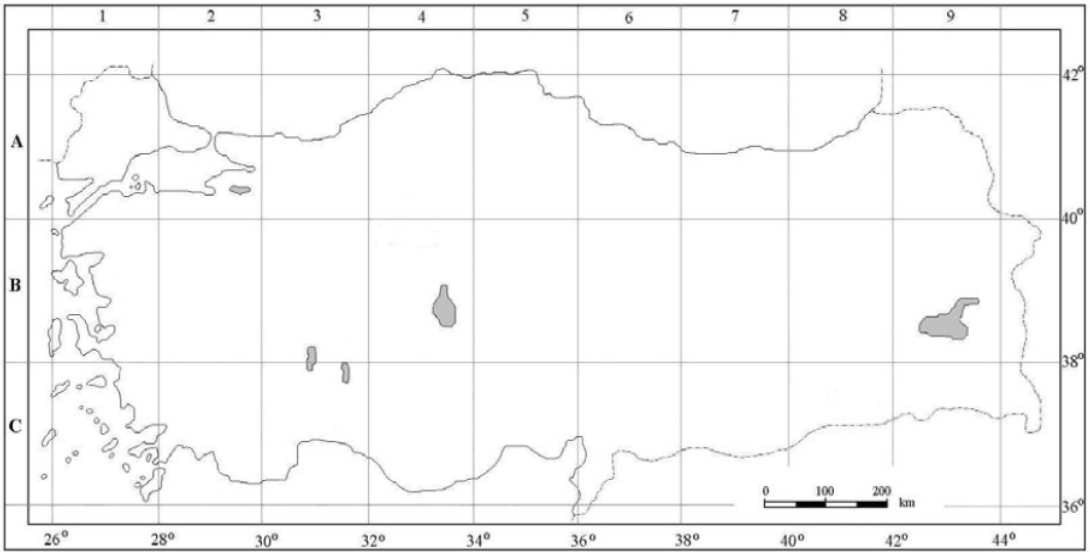
Yöntem	Ayırmanın Temeli
Kapiler Zon Elektroforez	Analitlerin yük/büyüklük oranlarının farklılıkları
Elektrokinetik Kromatografi	Analitlerin ayırma tamponuna ilave edilen katkı maddesi ile farklı etkileşimi
Misel Elektrokinetik Kromatografi	Analitlerin misel ile farklı hidrofilik-hidrofobik etkileşimi
Kapiler Jel Elektroforez	Analitlerin büyüklük farklılıklarına göre jel gözeneklerinden geçişi
İzoelektrik odaklanma	Analitlerin izoelektrik nokta farklılıkları
İzotakoforez	Analitlerin yük/büyüklük oranlarının farklılıklarının farklı moblitedeki iki tampon arasında gerçekleşmesi
Elektrokromatografi	Analitlerin kapiler içine doldurulan sabit faz ile sıvı faz arasındaki dağılım farkı

3. ADAÇAYI

Adaçayı (*Salvia*) genelde hoş kokulu bitkilerin bulunduğu ve 45 cins ile temsil edilen *Lamiaceae* (ballıbabagiller) familyası üyelerinden biridir. *Lamiaceae* (ballıbabagiller) familyası üyeleri uçucu vearomatik yağ içermelerinden dolayı farmakolojive parfümeri sanayinde önemli bir yer tutarlar.Bu familyada kekik, nane, lavanta, fesleğen ve mercanköşk gibi hoş kokulu bitki cinsleri de yer almaktadır. Bu türlerdeneterik yağ elde edilir, baharat olarak kullanılır vesüs bitkisi olarak yetiştirilirler [38].

3.1Salvia Türlerinin Coğrafi Dağılımı

Bu güne kadar dünyada saptanan yaklaşık 900 *Salvia* türü olup bunların çoğu Amerika ve Güney-Batı Asya kıtalarında yayılış göstermektedir. *Salvia* cinsi İran'da 70, Avrupa kıtasında 36 ve eski Sovyetler birliği sınırları içinde ise 75 tür içerdiği bilinmektedir. Türkiye'de ise 97 tür, 4 alttür ve 8 varyete bulunmaktadır. Bu türlerden 51 tanesi endemik olup, endemizim oranı (%52,5) oldukça yüksektir. Türkiye'de yetişen 97 türün 58 tanesi (%59,7)'si İran-Turan, 27 tanesi (%27,8) Akdeniz, 5 tanesi (%5) Avrupa-Sibirya fitocoğrafik bölgede, diğer kalan 7 tanesi de (%7) birden fazla fitocoğrafik bölgede yayılış göstermektedir. Aşağıdaki Şekil 3.1 'de Türkiye'de yetişen Salvia türlerinin coğrafi karelere göre genel dağılımı gösterilmektedir.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	14* 0 2	15 1 1	19 9 9	24 9 9	20 4 4	19 4 4	19 3 3	23 3 3	20 2 2	
B	11 1 2	17 6 6	23 11 11	23 11 11	27 11 11	32 16 16	37 17 17	25 3 3	28 4 4	10 0 0
C	7 1 3	24 9 10	24 8 9	29 14 14	30 11 12	30 8 9	12 0 0	13 0 0	21 0 1	13 0 0

Şekil 3.1 : Türkiye ‘de Salvia türlerinin dağılımı [38] .

*Her karedeki ilk rakam o karede bulunan *Salvia* tür sayısını, ikinci sıradaki rakam endemik tür sayısını, üçüncü sıradaki ise tehlike altında bulunan *Salvia*’ların tür sayısını belirtmektedir.

3.2 İklim Ve Toprak Özellikleri

Adaçayı sıcağı seven çok yıllık bir bitkidir. Kurak topraklara dayanıklıdır ancak su oranı daha iyi olan topraklarda daha iyi verim vermektedir. İlk ekildiği devrede yüksek oranda can suyuna ihtiyaç duyar. Daha sonra büyüme evreleri geçtikçe kuraklığa ilk baştakine oranla daha fazla dayanıklıdır. Toprak türü olarak kireçli, kumlu-tınlı topraklarda verimi daha yüksektir [39].

3.3 Botanik Özellikleri

Adaçayı türleri kışlara dayanıklı yapraklarını dökmeyen ve boyları büyüdüğünde 30 cm ile 75 cm arasında değişebilen otsu bitkilerdir. Çiçekleri yaz aylarında özellikle Haziran – Temmuz aylarında olgunlaşır. Ekildikten büyümeye başladığı ana kadar kare kesitli tüylü olan gövdesi iki yıl sonra odunsulaşır. Yaprakları yoğun bir kokuya

sahiptir ve genellikle gri-yeşil renktedir ancak bazı türlerinde alacalı hatta kırmızı ve mor renklerde gözlenebilir. Çiçekleri ise çift dudaklı ve derin haznelidir genel olarak mor-mavi renktedir, seyrek olarak beyaz yada pembe renkli açan türleride bulunur. Tohumuyla kendiliğinden çoğalabilir, istenirse gövde çelikleriyle de çoğaltılabilir [40].

3.4 Tıbbi Olarak Değeri

Adaçayı yapısında aromatik yağlar ihtiva eder. Bu yağlar terlemeyi azaltır ve dezenfektan bir özellik kazandırır. Bu özellikte tıbbi amaçla kullanılar diğer bitkilerden adaçayını farklı kılan bir özelliktir. Laboratuvar çalışmalarında, adaçayı yağının gram-negatif ve gram pozitif bakterilere karşı kullanılabileceği, ayrıca *Candida albicans* gibi ipliksi mantarlar ve mayalara karşı etkili olduğu da tespit edilmiştir [41].

Adaçayı içerisinde bulundurduğu uçucu yağlar sindirimi uyarıcı ve gaz giderici özelliğe sahiptir bu üzden sindirimi düzenlemede önemli rol oynar. Ayrıca içeriğinde bulunan bir takım bileşikler sayesinde mide salgılarının arttırılması, bağırsak hareketliliği, safra salgısı ve pankreas fonksiyonları gibi çeşitli sindirim faaliyetlerinin düzenlenmesine yardımcı olur.

Adaçayının diğer yararlı özellikleri de şunlardır. Gece uyurken metobolizmayı dinlendirir ve terlemeyi azaltır. Boşaltım sistemine yardımcı olur. Kadınlarda rahim kaslarını uyarır. Mukoza zarlarına etkisi büyüktür özellikle ağı, dişeti ve dildeki yaralarla boğaz ve bademcik iltihaplarını iyileştirici bir özelliğe sahiptir. Dişleri beyazlaştırır ve sağlamlaştırır. Tüm bedeni güçlendirir ve kalp krizi riskini azaltır. Kan temizleyici etkisi vardır. Solunum organlarını ve mideyi balgamsı salgılardan temizler. Tüm ruh ve sinir hastalıklarının tedavisinde sakinleştirici olarak kullanılabilmektedir. Hormonal bozuklukları düzene sokar. Karaciğer yağlanmalarında, beyin ve kalp damarları tıkanıklıkları, damar sertliklerinde ve daralmalarında olumlu etkileri görülmektedir. Kramp, omurilik rahatsızlıkları, beze hastalıkları ve organ titrekliklerinde başarı ile kullanılır. Karaciğer hastalıklarında faydalıdır, vücuttaki toksini atar. Mide sularının düzenli çalışmasını sağlar. Antiseptiktir, ateşi düşürür ve vücudu dinlendirir [42].

3.5 Adaçayının Yapısında Bulunan Kimyasallar

Salvia türlerinin halk arasında çok kullanılması, kolay erişilebilinmesi ve özellikle tıbbi özellikleri nedeniyle özündeki aktif kimyasalların izole edilmesi ve tanımlanması için literatürde birçok yayın oluşturulmuş ve bu konu hakkında araştırmalara hala devam edilmektedir. *Salvia* özündeki kimyasal gruplar genel olarak fenolik asitler, flavonoidler ve trepenler-terpenoidler olmak üzere üç grupta sıralanabilir.

Lu ve Foo tarafından 2002 yılında Salvia türlerinin fenolik asit ve flavonoid içeriklerini içeren bir makale literatüre kazandırılmıştır [43]. Yayınlanan bu detaylı içerikte 2002 yılında kadar tanımlanan *Salvia* türlerinden elde edilmiş 162 adet fenolik asit ve flavonoidden bahsedilmektedir. Salvia türlerindeki asıl kapsamlı çalışmların çoğu diterpenoidlerin üzerine yoğunlaşmaktadır. Bu konu içerikleri hakkında makaleler yayınlanmıştır [44-51].

Türkiyede yetişen *Salvia* türlerinin kimyasal içeriklerinin aydınlatılması konusunda

İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesinden bir grubun çok kapsamlı çalışmaları mevcuttur (Ulubelen, Topçu). Bu grup Türkiyede yetişen 97 *Salvia* türünün 46 sını incelemiş ve toplam 282 adet bileşik izole ederek tanımlanmıştır.

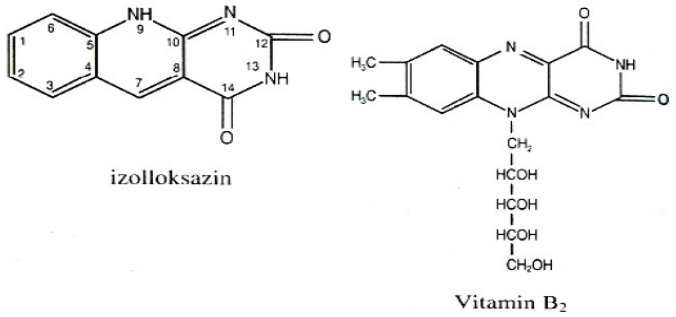
4. RİBOFLAVİN (VİTAMİN B_2)

4.1 Riboflavin

1933'te bir Alman araştırma grubu, Khun ve arkadaşları, sütten B_2 vitaminini elde ettiklerini ve bunun riboflavin olduğunu öne sürmüşlerdir. Bu araştırma grubu gerçekten de riboflavini keşfetmiştir. Molekül yapısı bir şeker olan ribose' a benzediği için 'ribo' ön ekini, kristalize halde sarı renkte olduğu için 'flavin' (flavus = sarı) ekini almıştır. Riboflavini keşfeden Haldelbergli Khun iki yıl sonrada riboflavini sentezlemeyi başarmıştır. Sistematik olarak 7,8-dimetil-10-ribitol-isoalloksazin olarak adlandırılır. Riboflavin suda çözünebilir bir vitamin türü olmakla birlikte çeşitli besin kaynaklarının yapısında bulunur. Bütün bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından sentezlenebildiği halde hayvansal organizmalar tarafından sentezlenememektedir. Riboflavinin bir dizi katılma reaksiyonu sonucu oluşan en önemli biyolojik aktif formları olan flavin adenin dinükleotid (FAD) ve flavin mononükleotid (FMN) aerobik hücrelerin işlevselliğinde anahtar görevindedir [52].

4.2 Riboflavinin Kimyasal Yapısı

Riboflavin, izoalloksazinin metilleşmiş türevi ile ribitol alkolünün bileşiğinden oluşmaktadır. Molekülünde ribitol alkolü izoalloksazinin dokuzuncu sırasında yerleşmiş azot atomu ile bağlantılı durumdadır. Bu da Şekil 4.1' de gösterilmektedir. Riboflavin eğer alkali bir ortamda ultraviyole ışınlarına maruz kalırsa onun sarı renkli türevi olan lumiflavine dönüşür. Aynı şekilde yine riboflavin asidik bir ortamda irradiasyona uğrarsa mavi floresans veren lumikrom meydana gelir.



Şekil 4.1:B_2 vitamininin kimyasal yapısı [53] .

4.3 Riboflavinin Vücuttaki İşlevi

B_2 vitamini canlı hücrenin oksidasyon reaksiyonlarında rol oynar [55]. Kalp ritminin ve solunumun normal gelişiminde riboflavinin rolü büyüktür. Riboflavin vücutta yağların benimsenilmesinde ve endojen sentezinde normalleştirici etki göstermektedir. Riboflavin tiaminin biyolojik etkisini arttırmaktadır. B_2 vitamini karaciğer hücrelerinin insüline karşı hassaslığını arttırır ve mide altı bezini etkileyerek insülinin oluşumunu hızlandırır [53]. B_2 vitamini hem bitkisel hem de hayvansal besinlerde çok yaygın olarak yer alsa da miktar olarak fazla değildir. Nükleotidlerle birleşerek organizmada oksidasyon redüksiyon zincirlerinin enzim sistemlerine koenzim olarak katılır ve bu enzim sistemlerinin işlerliğe kavuşmasını sağlar.

4.4 Riboflavinin Günlük Gereksinim Miktarları

Çizelge 4.1:Önerilen günlük riboflavin miktarları [55] .

Yaşam ve evre grupları	B_2 (mg)
Bebekler	
0-6 Aylık	0,3
7-12 Aylık	0,4
Çocuklar	
1-3 Yaş	0,5
4-8 Yaş	0,6
9-13 yaş	0,7
Erkekler	
9-13 Yaş	0,9
14-70 Yaş	1,3
>70 Yaş	1,3
Kadınlar	
9-13 Yaş	0,9
14-70 Yaş	1,1
>70 Yaş	1,1
Gebelik	
14-18 Yaş	1,4
19-30 Yaş	1,4
31-50 Yaş	1,4
Emzirme	
14-18 Yaş	1,6
19-30 Yaş	1,6
31-50 Yaş	1,6

4.5 Riboflavin Eksikliği Ve Belirtileri

Dilde kızarma, yanma hissi, ağız çevresi ve dudakta tahriş ve çatlaklar oluşur. Gözlerde kaşıntı, yanma hissi ve iltihaplanma aynı zamanda ışığa hassasiyet. Deride kepeklenme ve saç dökülmesi. Büyümenin yavaşlaması. Sindirim sorunları. Karpal tünel sendromu (ellerde ağrı ve uyuşma) en belirgin eksiklik semptomlarıdır.

Ayrıca riboflavin suda çözünen bir molekül olduğu için vücuda fazla alınması durumunda idrar yoluyla vücuttan uzaklaştırılır ve zararlı bir etki oluşturmaz [56].

4.6 Kapiler Elektroforez Yöntemiyle Riboflavin Tayinine İlişkin Literatür İncelemesi

Cataldi ve grubu [57] riboflavin, FMN ve FAD 'ın miktar tayininde yeni bir metod geliştirmişlerdir. Flavin vitaminlerinin ayrılması ve dedekte edilmesi için bir çok parametre (pH (5,5-10,5), konsantrasyon, ayırma tamponu (fosfat,borat ve karbonat), voltaj (15-30Kv), sıcaklık(15-30˚C) ve enjeksiyon süresi) incelenmiştir. Optimum koşullar pH:9,8, 30Mm fosfat ayırma tamponu, 15˚C sıcaklık ve 30kV voltaj olarak belirlenmiştir. Dedektör olarak kullanılan LIF'in içeriği He-Cd lazer kaynak, uyarılma dalga boyu 442nm ve $\lambda \geq 515$nm' dir. Riboflavin 0,5-350 µg/L konsantrasyon aralığında LOD değeri 0,5 µg/L olarak saptanmıştır. FAD ve FMN 'in LOD değerleri sırasıyla 6 ve 4 µg/L olarak saptanmıştır. Bu geliştirilmiş yöntem süt, yoğurt ve şarap gibi yiyecek ve içeceklere uygulanmıştır. Örneklerin analizleri sonucu; inek sütünde 112±2 µg/L, yumurtanın sarısında310±20µg/L, yumurta beyazında 380±60 µg/L, beyaz şarapta 130±20 µg/L riboflavin tayin edilmiştir.

Cheng-Huang Lin ve grubu [58], kapiler elektroforez ve mavi LED kaynaklı floresans dedektör ile on-line kombine edilmiş konsantrasyon tekniğinden yararlanarak farklı bira örneklerinde riboflavin tayin etmişlerdir. Bu dedeksiyon sisteminde misel elektrokinetik kromotografi, sıkıştırılmış misel elektrokinetik kromotografi, dinamik pH enjeksiyon tekniğiyle ve geniş kapsamlı pH enjeksiyon modu denemişlerdir. Dinamik pH enjeksiyon modunda $3,8x10^4$ teorik plaka sayısına ulaşılmışken geniş kapsamlı pH enjeksiyon moduyla $3,2x10^6$ teorik tabaka sayısına ulaşılmıştır. Ancak geniş kapsamlı enjeksiyon daha dik pikler vermesine rağmen analiz süresi uzun olduğu için tercih edilmemiştir. Normal MEKC sisteminde tampon çözeltisi olarak sodyum dodesil sülfat ve sodyum borat kullanılmıştır ve LOD değeri 480 ng/mL olarak belirlenmiştir. Sıkıştırılmış MEKC sisteminde tampon çözelti olarak SDS ve sodyum borat kullanılmış bunun yanında örnek matriksinde de sodyum borat kullanılmıştır ve LOD değeri 20 ng/mL olarak belirlenmiştir. Dinamik pH injeksiyon yöntemiyle de tampon olarak sodyum borat ve pH=8,2 değeri için fosforik asit ten yardım alınmıştır örnek matriksin de ise sodyum fosfat tuz pH=5,9 olarak kullanılmıştır ve LOD değeri 1 ng/mL olarak belirtilmiştir. İncelenen 12 farklı ticari bira örneklerinde riboflavin miktarları 130-280 ng/mL olarak tespit edilmiştir.

R.I. Cataldi ve arkadaşları [59], ıspanak, marul, kabak, lahana, roka, fesleğen, hindiba, karnabahar gibi sebze örnekleri ve yumuşak buğday unu, mısır unu ve durum-buğday unu gibi karmaşık matrislerde basit bir ekstraksiyon yöntemi yardımıyla CE-LIF 'te hızlı ve hassas bir metod geliştirerek riboflavin, FAD ve FMN tayin yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemde örnekler metanol/diklorometan (9:10 v/v) karışımıyla harmanlanıyor daha sonra karışım içine amonyum asetat eklenerek pH:6 'da 20dk santrifüj ediliyor ve daha sonra ekstraksiyon solüsyonu suyla seyreltilip mikro filtreden geçirilerek analize hazır hale getiriliyor. Ayırma koşulları olarak fosfat tamponunda pH:9,8'de çalışılmıştır. Optimum koşul olarak voltaj, sıcaklık ve akım sırasıyla 30kV, 15 ˚C ve 60µA'dir. Lazer dedektör özellikleri He-Cd kaynaklı uyarılma dalga boyu 442nm ve λ≥515nm' dir. Marul, lahana, ıspanak, rok, fesleğen, hinduba ve kabak için riboflavin değerleri, sırasıyla 60±3, 34±2, 61±3, 87±4, 167±5, 43±2, 47±2 ve 48±2 µg/100 g olarak verilmiştir.Yumuşak buğday unu, mısır unu ve durum-buğday unu için sırasıyla tayin edilen riboflavin içerikleri 26,5±0.5 , 35,4±0,5 ve 50,2±0,7 µg/100 g'dır.

Dan Xiao ve grubu [3]; Kapiler elektrofrez cihazına bağlı kolon içi optik fiber lazer indüklenmiş floresans dedektör kullanarak içecek (Tang (alkolsüz içecek) ve Zhuyeqing (yeşil çay)), yeşil çay ve idrar örnekleri içerisinde riboflavin tayini için bir yöntem geliştirmişlerdir. İçecek örnekleri yerel marketlerden temin edilmiş olup örnek hazırlanmasında2g'ını 50mL saf suda çözüp önce santrifüj daha sonrada mikro filtreden süzerek analize hazır hale getirmişlerdir. Yeşil çay örnekleri için 10g yeşil çayı 100mL kaynar suda 10 dk demleyip mikro filtreden geçirerek direk analiz etmişlerdir. İdrar örnekleri 50kg ağırlığında olan bayan gönüllülerden temin edilmiştir. İdrar örneklerinde riboflavin tayini için gönüllülere 20mg (4 tablet) riboflavin verilmiş olup deney esnasında analiz bitene kadar (5 gün) riboflavin içerikli hiçbir besinle beslenmemeleri kontrollü bir şekilde sağlanmıştır. İdrar örnekleri temin edildikten sonra 4 ˚C'de buz dolabında saklanmış ve analiz için santr 15dk 8000 rpm de santrifüj edildikten sonra süzülüp suyla seyreltilerek direk analize hazır hale getirilmiştir. Ayırma koşulları olarak optimum koşullar borat tamponu pH:9,6, 18kV, 60µA ve hidrodinamik enjeksiyon (20cm , her 10sn) belirlenmiştir. İdrar örnekleri analizinde matrisin kalabalık olmasından ve bunu örtmek için tampona su-asetonitril (9/1, v/v) eklenmiştir. Yöntem 0,05 ile 20 µM arasında lineer olup r^2 =0,998'dir. LOD değeri 3,0 nM olarak bulunmuştur. Örneklerin analizi

sonucunda riboflavin değerleri meşrubat , yeşil çay ve idrarda sırasıyla 2,81±0,05, 1,58±0,06 ve 7,01±0,32 µM±SD tayin edilmiştir.

Piotr Kowalski ve arkadaşları [60], on-line önderiştirme yaparak özel bir örnek sıkıştırma metodu (FASS) ile Paraguay çayı ve bakteri kürü ortamında CE-UV dedeksiyon (200nm) ile riboflavin tayini yapmışlardır. Bu tayin yapılırken matriks çok karmaşık olduğu için iç standart olarak Baclefon kullanmışlardır. Paraguay çayı yerel marketlerden temin edilmiştir. Bakteri kürü için E. Coli ve S. Aureus bakterileri kullanılmış ve bu bakterileri uygun ortamda kuluçka ortamında çoğaltmışlardır. Çoğaltılan bakteri ortamını filtreleyip -20 ˚C'de buzdolabında saklamışlardır. Analizden önce 5dk santrifüj edip NaH_2PO_4 ile seyreltip 10mM konsantrasyona getirmişlerdir. Paraguay çayını 0,1g örnek alınarak 50 mL su içersinde 45 dk manyetik karıştırıcıyla karıştırıp çözelti kısmı alınmış ve santrifüj edilip NaH_2PO_4 ile son konsantrasyon 10 mM olacak şekilde seyreltmişlerdir. Her iki örnek için 100 µL için 1 µL iç standart kullanmışlardır. Yöntem için en uygun koşullar olarak tampon çözeltisi 10 mM NaH_2PO_4 ve 80 mM SDS (pH:7,25), örnek matriksi 10 mM NaH2PO4 (pH:4,6), 10s ve 30 senjeksiyon süresi, 3,45kPa, 22kV ve 22 ˚C olarak belirlenmiştir. B_2 vitamini için 30s, 10s ve CZE yöntemleriyle elde edilen LOD değerleri sırasıyla 0,10, 0,3 ve 2,00 µg /L olarak tayin edilmiştir. Ayrıca bu yöntemle endüstriyel biyoreaktörlerde vitamin B_2 seviyesini izlemek için uygulanabilir olduğu belirtilmiştir.

Chen, Sun ve grubu [4], çeşitli tahıl örneklerinde CE-LIF on-line konsantrasyon metodu olan ters yöndeki miselleri sıkıştırma tekniği kullanarak riboflavin tayini yapmışlardır. Kullanılan pirinç, siyah pirinç, darı, mısır, yulaf ve buğday örnekleri yerel marketlerden, kepekli buğday, buğday ve çavdar örnekleri ise üniversitesi bünyesinden temin edilmiştir. Optimum koşullar; tampon çözelti 20 mM fosforik asid ve 140 mM SDS, hidrodinamik injeksiyon 30 s ve -18 kV voltaj belirlenmiştir. Ayrıca örnek matrislerindeki tuzlar yüzünden standar ekleme metodu kullanmışlardır. Örneklerden riboflavin ekstraksiyon ile çıkarılmıştır Bunun için 250 mL erlen içine 25 mL 0,1 M HCl ve 2,5 g örnek konularak iyice karıştırıldıktan sonra 30 dk kaynar suyun içinde bekletilmiştir. Daha sonra soğutulup pH : 4.5 olana kadar 2.5 M sodyum asetat eklenmiştrir. Hazırlanan çözelti 18 saat özel bir fırında 37 ˚C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra 50 mL 'ye seyreltilerek filtre edilmiş ve analizi

gerçekleştirilmiştir. Uygulanan metod 0,5-500 ng/mL arası lineer olup r^2: 0,9990 'dur. LOD değeri 0,29 ng/mL olarak belirlenmiş olup %RSD değeri %4,1'in altında kalmıştır.

5. MATERYAL VE YÖNTEM

5.1 Malzemeler

Sodyum hidroksit, sodyum tetraborat dekahidrat Merk marka (Darmstadt, Almanya) ve standart riboflavin Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) markadır. Tüm çözeltiler Elga Purelab Option-7-15 model sistemi ile elde edilen deiyonize su ile hazırlanmıştır. Çalışmada kullanılan örnekler ve lokaliteleri Çizelge 5.1'de gösterilmiştir. Örnekler belirtilen bölgelerden Balıkesir Üniversite'si Biyoloji Öğretmenliği Ana Bilim Dalı öğretim üyesiDoç.Dr. Tuncay Dirmenci tarafından temin edilmiştir.Çalışılan örneklerden 10 tanesi Türkiye'ye özgüdür yani endemik bitkidir. Bu türler sırasıyla örnek ismi ve takson numarası ile:*Salvia Virgata* (4172), *Salvia divaricata*(4175),*Salvia rosifolia*(4180), *Salvia huberi*(4190), *Salvia adenocaulon*(4205), *Salvia blepharochlaena*(4207), *Salvia hypergia*(4208-a), *Salvia heldreichiana*(4208-b) ve *Salvia aucheri* var. *aucheri*(4240) 'dir. Endemik olmaya türler ise sırası ile örnek ismi ve takson numarası ile: *Salvia euphratica* var. *euphratica*(4174), *Salvia sclarea*(4177) ve *Salvia limbata*(4192-a) 'dir.

5.2 Standart Çözelti Hazırlanması

Stok riboflavin çözeltisi 20 mM olacak şekilde deiyonize suda hazırlanmış ve 4 ˚C'de karanlıkta buzdolabında muhafaza edilmiştir. Kalibrasyon çözeltisi bu ana çözeltiden deiyonize su ile seyreltilerek hazırlanmıştır. Kalibrasyon çözeltileri günlük olarak hazırlanmıştır ve ilk gün kullanılan standart ile karşılaştırılıp kullanılmıştır.

5.3 Adaçayı Örneklerinin Hazırlanması

Önceden kurutulmuş adaçayı numunelerinin öncelikle yaprakları ile dalları birbirinden ayrılmıştır. Ayrılan yapraklar el blendırında parçalandıktan sonra havanda iyice ezilmiştir ve homojenlik sağlanmaya çalışılmıştır. Bu işlemler sırasıyla

her bir örnek için tekrarlanmıştır. Hazırlanan örneklerden 0,1 g numune alınarak 10 mL kaynar suya (100 ˚C) eklenmiştir ve 5 dk vortex cihazında karıştırılmıştır, karıştırılan numuneler 5 dk demlenmeye bırakıldıktan sonra Whatman No: 41 filtre kâğıdından geçirilmiştir.

Çizelge 5.1 : Örnekler ve temin edilen yerler .

Örnek çeşidi	Takson No	Lokalite	Yükseklik	Tarih
Salvia virgata	4172	Erzincan, İliç, Bağıştaş Köyü karşısı, kayalık yamaçlar	1020 m	27.06.2014
Salvia euphratica var. *euphratica*	4174	İliç - Refahiye arası, Refahiye'ye 3 km kala	1310 m	27.06.2014
Salvia divaricata	4175	İliç - Refahiye arası,	1310 m	27.06.2014
Salvia sclarea	4177	Giresun : Alucra - Şebinkarahisar arası 20. km	1280 m	28.06.2014
Salvia rosifolia	4180	Erzurum : Bayburt - Pazaryolu arası	1540 m	28.06.2014
Salvia huberi	4190	Erzurum : Uzundere - Yusufeli arası 21. km	1100 m	29.06.2014
Salvia limbata	4192-a	Tortum - Uzundere arası 4-5. km, marnlı tepeler	1550 m	29.06.2014
Salvia adenocaulon	4205	Karaman ; Karaman - Mut arası 16. km	1600-1700 m	09.07.2014
Salvia blepharochlaena	4206	Karaman : Karaman - Mut arası 16. km	1600-1700 m	09.07.2014
Salvia cryptantha	4207	Karaman : Karaman - Mut arası 16. km	1600-1700 m	09.07.2014
Salvia hypergia	4208-a	Karaman : Karaman - Mut arası 16. km	1600-1700 m	09.07.2014
Salvia heldreichiana	4208-b	Karaman : Karaman - Mut arası 16. km	1600-1700 m	09.07.2014
Salvia aucheri var. *aucheri*	4240	Adana : Pozantı - Horozlu Köyü yolu	1109 m	13.08.2014

5.4 Cihazlar Ve Çalışma Koşulları

Ayırımlar Agilent kapiler elektroforez sisteminde (Waldbronn, Almanya) gerçekleştirilmiş ve ZETALIF 2.000 lazer indüklenmiş floresans dedektörde (Picometrics, Montlaur, Fransa) dedekte edilmiştir. 488 nm'de Ar-iyon lazer ile uyarılmıştır. Veri eldesi ve değerlendirmesi Agilent ChemStation programında yapılmıştır. Ayırım 30 kV potansiyel uygulanarak 25 ˚C'de, enjeksiyonlar 50 mbar basınçta hidrodinamik enjeksiyon ile 6 saniyede gerçekleştirilmiştir.

Kullanılan silika kapiler kolon 75 µm iç çapına sahiptir ve Polymicro Technologies"den (Phoenix, AZ, Amerika) temin edilmiştir. Toplam uzunluğu 65 cm ve etkin uzunluğu 50 cm'dir. Yeni silika kapiler ilk kullanımda 1 M NaOH ile 30 dakika, su ile 10 dakika süreyle muamele edilmiştir. Gün başlarında kapiler kolon 1 M NaOH ile 15 dakika, su ile 2 dakika ve tampon çözelti ile 5 dakika süreyle yıkanmıştır. Enjeksiyon aralarında 2 dakika 0,1 M NaOH ve su, 5 dakika süreyle tampon çözelti ile yıkama yapılmıştır.

6.SONUÇLAR VE TARTIŞMA

6.1 Metod Optimizasyonu

Riboflavin bazik çözeltilerde kolayca negatif yüklü bir yapıya dönüşebilen kendinden florofor, suda çözünen ve pKa değeri 9,69 olan bir moleküldür. Riboflavin molekülünün analizi için kapiler zone elektroforez tekniği kullanılacağı ve bu teknikte analiz edilen moleküllerin yüklü moleküller olacağından dolayı riboflavin için negatif yüklü davranacağı bazik tamponlar seçilmelidir. Ayırma tamponu olarak bazik olan fosfat, karbonat ve borat tamponları denenmeye karar verilmiştir. Borat tamponunun pKa değeri 9,14 olduğundan ve riboflavinin pKa değeri ile uyuştuğundan borat tamponu ilk olarak denenmiştir. Yapılan denemelerde riboflavin analizi için arzu edilen pik yüksekliğine, şekline ve simetrisine ulaşıldığından fosfat ve karbonat tamponlarını denemeye gerek duyulmamıştır. Borat tamponun optimizasyonunda, tampon konsantrasyonu 5 mM, 10 mM, 15 mM ve 20 mM olarak denenmiştir ve 20 mM analiz için en uygun konsantrasyon olarak belirlenmiştir. Ekstraksiyon zamanı için 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 dk lık inkübasyon değerleri denenmiştir. Optimum ekstraksiyon zamanı olarak geri kazanım değerleri karşılaştırılıp en yüksek kazanım en düşük zaman çerçevesinde 5 dk seçilmiştir. Ekstraksiyon hacmi değeri için 1, 2, 5, 10 ve 15 mL denenmiş olup en uygun ekstraksiyon değeri geri kazanım değerlerine göre belirlenmiş olup en yüksek geri kazanımın sağlandığı 10 mL değeri seçilmiştir. Örnek miktarı için 0,05, 0,1, 0,2, 0,4 ve 0,7 g denenmiş olup istenilen pik yüksekliği, şekli ve simetrisi en uygun olan 0,1 g örnek miktarı ile çalışılınmasına karar verilmiştir.

6.2 Metod Validasyonu

6.2.1 Kalibrasyon doğrusu, LOD ve LOQ değerleri

Çizelge 6.1 : Kalibrasyon denklemi, LOD ve LOQ değerleri .

PARAMETRE	**RİBOFLAVİN**
R^2	0,998
Kalibrasyon denklemi	0,00146428x-0,0000393
LOD (ng/mL)	8
LOQ (ng/mL)	27
Lineer aralık (µg/mL)	0,05-1

* LOD (dedeksiyon sınırı) değeri 2 farklı baseline alanından alınan ortalama gürültünün üç katı, LOQ (tayin sınırı) değeri ise on katı olarak hesaplanmıştır.

6.2.2 Tekrarlanabilirlik

Yöntemin kesinliği riboflavin standardının aynı gün içinde ardı arda yedi kez enjeksiyonu ile kontrol edilmiştir. Günler arası tekrarlana bilirlik için ise aynı standart üç farklı günde ardı arda yedi kez injekte edilmiştir. Gün içi ve günler arası tekrarlana bilirlik değerleri düzeltilmiş pik alanları ve gelme zamanlarına göre Çizelge 6.2 ’de verilmiştir.

Çizelge 6.2 : Tekrarlanabilirlik sonuçları .

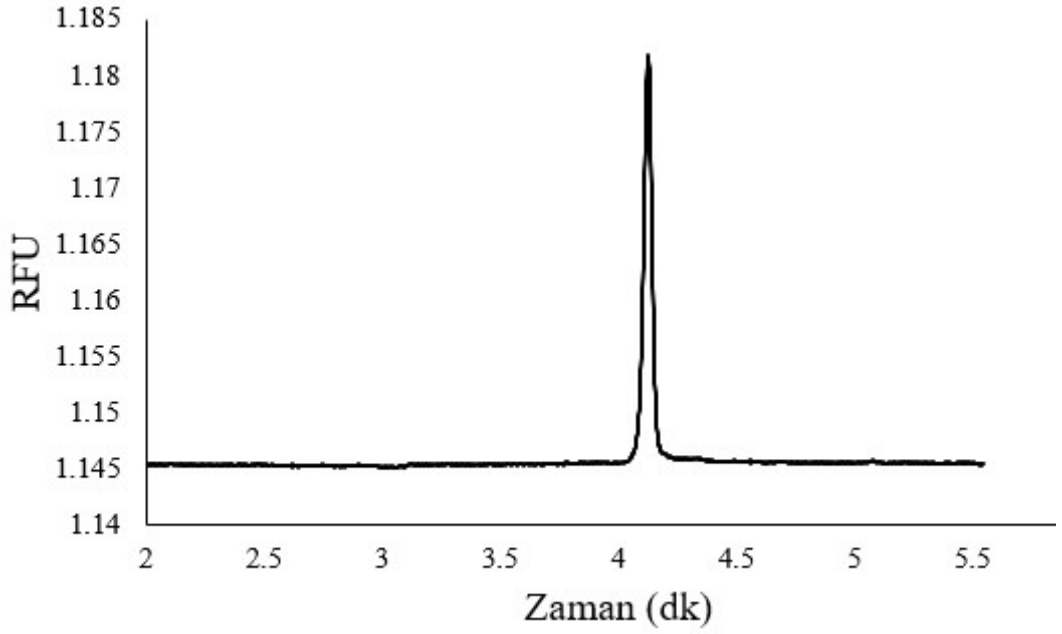
Riboflavin tekrarlanabilirliği 0,1 µg/mL (n=7)					
İlk gün (A/t)		İkinci gün (A/t)		Üçüncü gün (A/t)	
0,0062		0,0065		0,0063	
0,0063		0,0065		0,0064	
0,0063		0,0067		0,0064	
0,0063		0,0067		0,0066	
0,0063		0,0064		0,0068	
0,0065		0,0067		0,0067	
0,0066		0,0069		0,0067	
Ort.	0,0064	Ort.	0,0066	Ort.	0,0066
SD	0,0001	SD	0,0002	SD	0,0002
RSD	2,1980	RSD	2,5712	RSD	2,9012
RSD (n= 3x7)			3,0426		

6.3 Yöntemin Adaçayı Numunelerine Uygulanması

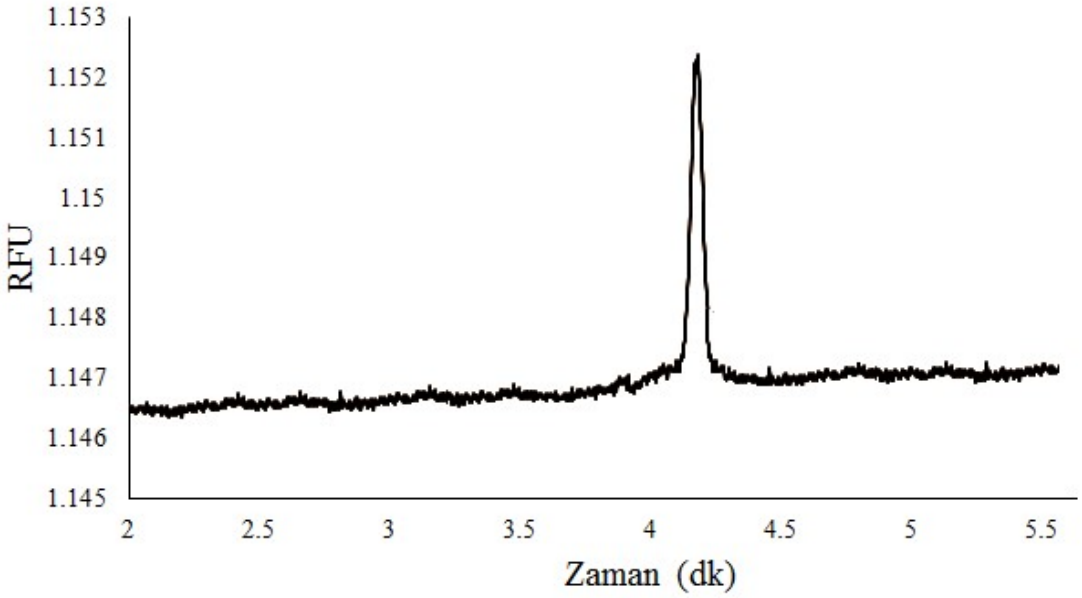
Adaçayı örnekleri Bölüm 5.3'de anlatıldığı şekilde hazırlandıktan sonra 0,45 µm çapındaki mikro filtrelerden geçirilerek direkt olarak sisteme enjekte edilmiştir. Adaçayı örneklerindeki riboflavin miktarları Çizelge 6.3'te verilmiştir.Şekil 6.1'de standart 1 ppm riboflavin çözeltisine ait elektroferogram, Şekil 6.2' de Salvia Cryptantha-4207 örneğine ait elektroferogram ve Şekil 6.3'te Salvia Virgata-4172 örneğine ait zenginleştirilmiş (spike) örneğe ait elektroferogram verilmiştir.

Çizelge 6.3 : Adaçayı örneklerinde riboflavin miktarları .

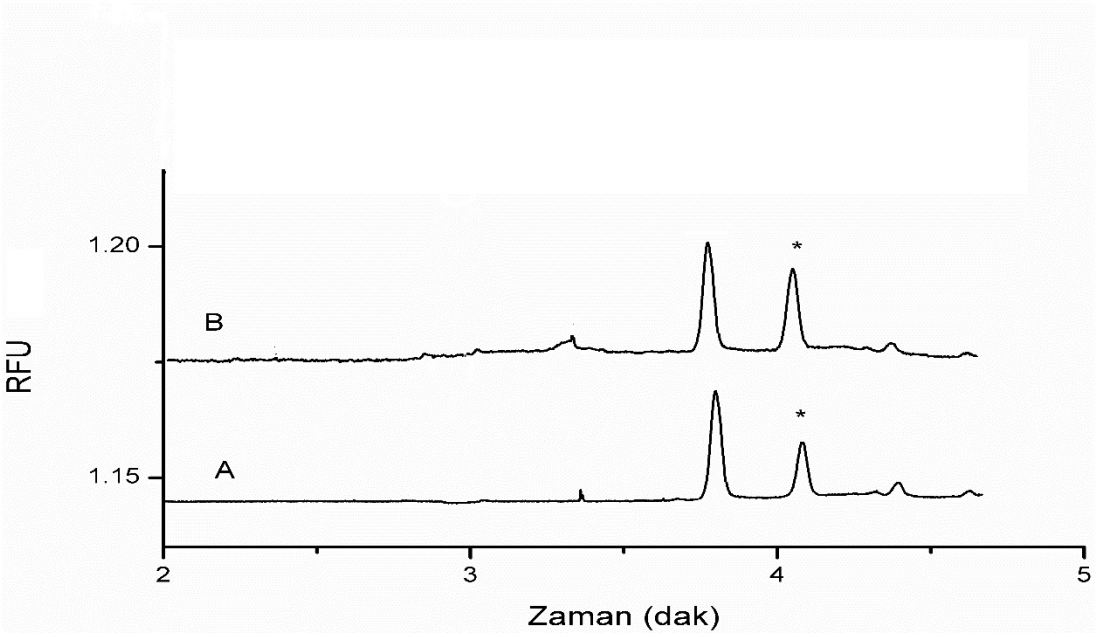
ÖRNEKLER	**Riboflavin İçeriği (µg/g) n=1**	**Riboflavin İçeriği (µg/g) n=2**	**Riboflavin İçeriği (µg/g) n=3**	**Ortalama Riboflavin İçeriği (µg/g) ± SD**
Salvia virgata	10,94	10,82	10,73	10,83 ± 0,11
Salvia euphratica var. *euphratica*	7	7,3	7,1	7,13 ± 0,15
Salvia divaricata	7,62	7,73	7,99	7,78 ± 0,19
Salvia sclarea	11,45	11,95	12,3	1190 ± 0,43
Salvia rosifolia	4,77	4,67	4,73	4,72 ± 0,05
Salvia huberi	6,75	6,79	6,8	6,78 ± 0,03
Salvia limbata	11,7	11,9	12	11.87 ± 0,15
Salvia adenocaulon	3,29	3,21	3,24	3,25 ± 0,04
Salvia blepharochlaena	2,51	2,39	2,41	2,44 ± 0,06
Salvia cryptantha	7,28	7,2	7,29	7,26 ± 0,05
Salvia hypergia	1,73	1,88	1,94	1,85 ± 0,11
Salvia heldreichiana	6,5	6,24	6,11	6,28 ± 0,20
Salvia aucheri var. *aucheri*	1,7	1,64	1,6	1,65 ± 0,05



Şekil 6.1: Standart riboflavin elektroferogramı Tampon: 20 mM Na_2HBO_4, pH:9,5 İnjeksiyon: 50 mbar, 6 s .



Şekil 6.2: Salvia Cryptantha-4207 örneğine ait elektroferogram. Tampon: 20 mM Na_2HBO_4, pH:9,5 , İnjeksiyon: 50 mbar, 6 s .



Şekil 6.3: A-Salvia Virgara-4172 örneğine ait elektroferogram, B- Salvia Virgata-4172 örneğine ait spikeli elektroferogram. Tampon: 20 mM Na_2HBO_4, pH:9,5, İnjeksiyon: 50 mbar, 6 s .

6.3.1 Metodun doğruluğu

Geri kazanım çalışmaları, adaçayı örneklerine üç farklı konsantrasyonda riboflavin standardı eklenerek yapılmıştır. Geri kazanım sonuçları fiziksel olarak farklı görüntüsü nedeniyle seçilen üç farklı adaçayı örneği için toplu olarak Çizelge 6.4'te görüldüğü gibidir.

Çizelge 6.4: Adaçayı örneklerine ait geri kazanım değerleri .

Örnek	Örnek bileşeni (µg/mL)	Eklenen miktar (µg/mL)	% Geri kazanım
Salvia hypergia	1,83		
		0,9	109
		1,8	101,6
		3,6	83,2
Salvia sclarea	11,87		
		6	103,5
		12	94,3
		24	108
Salvia virgata	10,83		
		5,5	99,5
		11	101,5
		22	107,3

6.4 Tartışma

Bu çalışmada, büyük bir çoğunluğu Türkiye'ye özgü (endemik) *Salvia* (Adaçayı) türlerinde riboflavinin ayrımı ve kantitatif tayini için yeni bir metot geliştirilmiştir. Bilindiği üzere RF insan vücudu tarafından üretilemez ve besinler ile ya da B_2 vitamin tabletleri ile vücuda alınmalıdır. Geliştirdiğimiz yöntem ile Türkiye'deki adaçayı türlerinde kayda değer miktarda RF olduğu saptanmış olup, insan vücudu için önemli bir RF kaynağı olduğu görülmüştür. Ayrıca yeni doğal ilaç kaynaklarına gereksinim duyulan son günlerde *Salvia* türlerinin bu tür çalışmalara katkı sağlayabileceği aşikârdır. Ancak bitkisel ilaçlardaki kalite-kontrol eksikliği, diğer farmosotikler gibi etiketlerinde içeriklerinin yazmaması önemli bir sorun teşkil etmektedir. Bu yüzden bu tür içeriklerde miktar tayini önemlidir. Geliştirdiğimiz metod ile RF'in hızlı, güvenilir, basit ve hassas tayini yapılabilmektedir. Ayrıca yürüttüğümüz bu çalışma ilk defa adaçayı örneklerinde uygulanmış olup, sonuçlarıliteratüre kazandırılmıştır. Yöntem gıda kalite-kontrol laboratuvarlarında, rutin analizlerde diğer gıda ürünlerine de kolaylıkla uygulanabilir.

KAYNAKLAR

[1]**Erim, F. B.,**(2006). "Gıda Analizlerinde Yeni Bir Analitik Yöntem: Kapiler Elektroforez," Türkiye 9. Gıda Kongresi, 24-26 Mayıs 2006, Bolu.

[2] **Skoog, D.A., Holler, F.J.,** and **Nieman, T.A., (**1998). A Principles of Instrumentation analysis 5th Edition Thomson Learning.

[3] **Dan Xiao, Li Hu, X. Yang, C. Wang, H. Yuan.,** (2007), "Determination of riboflavin in urine and beverages by capillary electrophoresis with in-column optical fiber laser-induced fluorescence detection " Journal of Chromatography B, **856**, 245–251

[4] **Jie Chen, Jianzhi Sun, S. Liu.,**(2013). "Determınatıon of rıboflavın ın cereal graıns by capıllary electrophoresıs wıth laser-ınduced fluorescence detectıon wıth on-lıne concentratıon" Analytical Letters, **46**, 887–899

[5**] B.M. Philip, J.M. Michal, I. Takashi, M. Keiko, N. Takaaki, T. Shigeru.**, (2003). Anal. Biochem. 313 89.

[6] **A.K. Su, C.H. Lin, J.,**(2003). Chromatogr. B 785 39.

[7] **J.H. Qin, Y.S. Fung, D.R. Zhu, B.C. Lin.,** (2004). J. Chromatogr. A 1027 223.

[8] **Özden, S., Ertan, R., Akı-Şener, E. ve Yalçın, İ.,**(2004). Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Pratikleri 1-2.

[9]**Hijerten, S.** (1967).*Chromatographic Reviews*, **9**, 122-219.

[10] **Mikkers, F. E. P., Everaerts, F. M. ve Verheggen, T. P. E. M.,**(1979). *Journal of Chromatography*, **169**, 11-20.

[11] **Virtanen, R.** (1974)*Acta Polytechnica Scandinavica - Chemical Technology Series*, **123**,1-67.

[12] **Mikkers, F. E. P., Everaerts, F. M. ve Verheggen, T. P. E. M.,** (1979).*Journal of Chromatography*, **169,** 1-10.

[13] **Jorgenson, J. W. and Lukacs, K. D,.** (1981). *Analytical Chemistry*, **53,** 1298-1302.

[14] **Lee, I. S. L.,**(2012). Development of Capillary Electrophoresis for the Analysis of Phenolics and Glucoraphanin in Brassica oleracea, Doktora Tezi, Edith Cowan University, Faculty of Computing, Health and Science School of Natural Sciences, Australia.

[15] **NutkuM. S., (**1998). İnorganik anyonların, organik asitlerin ve DNA parçalarının kapiler elektroforez ile ayrımında polielektrolit kullanımı, Doktoro Tezi, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul

[16] **Alemdar, İ., (**1997). Fenollerin sulu çözeltilerden organo kil üzerinde adsorpsiyon ile zenginleştirilmesi ve kapiler elektroforez yöntemi ile tayini, *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[17] **Altria, K. D., (**1998). Analysis of Pharmaceuticals by Capillary Electrophoresis, Vieweg Press, London.

[18] **Uzaşçı, S.,**(2011). Misel Elektrokinetik Kromatografi-LIF Yöntemiyle Şarap ve Nar Ekşisi Örneklerinde Biyojenik Amin Tayini, Yüksek Lisans Tezi

[19] **Heiger, D.,** (2000). High Performance Capillary Electrophoresis An Introduction, Agilent Technologies, Germany.

[20**] Landers J.P.,**(1994). Handbook of Capillary Electrophoresis, CRC Press, USA.

[21] **Li, S.F.Y.,**(1992). Capillary Electrophoresis Principles, Practice and Applications, Elsevier Science Publishers, Amsterdam

[22] **Frost, N.W. Jing, M. Bowser, M.T.,** (2010). Capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*, **82** (12), 4682-4698.

[23] **Heiger, D.,** (2000). High Performance Capillary Electrophoresis, CRC Press, USA.

[24] **Poppe H., (**1997). Some reflection on speed and efficiency of modern chromatographic methods. J Chromatogr A; **778**: 3-21

[25] **Nemutlu E, Kır S.,**(2003). Method development and validation for analysis of meloxicam in tablets by CZE. J Pharm Biomed Anal; **31**: 393-400

[26] **Nemutlu E, Özaltın N, Altınöz S.,** (2004). Determination of rofecoxib in the presence of its photodegradation product in pharmaceutical preparations by micellar electrokinetic capillary chromatography. Anal Bioanal Chem; **378**: 504-509

[27] **Rabanal B, De Paz E, Walser N, et al.,** (2001). Operating parameter effects in capillary zone electrophoresis (CZE): Analysis of pentamidine, hydroxystilbamidine, propamidine, dapi, and stilbamidine in body fluids. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies; **22**: (1): 29-45

[28] **Gürsoy E.,** (2007). Kapiler Elektroforez ve Potansiyometrik Belirleme, Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun: 69

[29] **Altria K.D.,**(1998). Current applications in the analysis of pharmaceuticals by capillary electrophoresis. Trends in Analytical Chemistry; **17**: 204-214 (eski 25)

[30]**Kok., W.Th.,** (1994).Principles of CE, in CE *Amsterdam Summercourse*, pp.3 43, university of Amsterdam, Amsterdam.

[31] **Palmer, C. P.,**(1997).Micelle polymers, polymer surfactans and dendrimers as pseudo stationary phases in micellar electrokinetic chromotography, *J.Chromatogr.* A, **792**, 105-124.

[32] **Alonso, M. C. B. ve Prego, R.,**(2000). "Determination of silicate, simultaneously with other nutrients (nitrite, nitrate and phosphate), in

river waters by capillary electrophoresis," *Analytica Chimica Acta,* **416***,* 21-27.

[33] **Stachowiak T.B, Svec F, Frachet J.M.J.,** (2004). Chip electrochromatography. J Chromatogr A; **1044**: 97-111

[34] **Cazes J.,** (2005). Ewing's Analytical Instrumentation Handbook (3 rd ed). CRC Pres, New York: 803-826

[35] **Tagliaro F, Manetto G, Crivellente F, et al.,**(1997). A brief introduction to capillary electrophoresis. Forensic Sci Int; **92**: 75-88

[36] **Holland L.A, Chetwyn N.P, Perkins M.D, et al.,** (1997). Capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis. Pharm Research; **14**: (4): 372-387

[37] **Zare, R. N.,** (2012). "My Life with LIF: A Personal Account of Developing Laser Induced Fluorescence". *Annual Review of Analytical Chemistry* **5**: 1–14.

[38] **Tarla bitkileri merkez araştırma enstitüsü dergisi,** (2010). 19 (1-2): 30-35 derleme

[39**] Bayram E. , Sönmez Ç.,** (2006). Adaçayı yetiştiriciliği 48 ,ISSN1300-3518

[40] **Ceylan, A.,** (1996). Tıbbi Bitkiler-II (Uçucu Yağ Bitkileri) E.Ü.Z.F. Yayınları No:481, Bornova, İzmir, ISBN:975-483-362-1, S.225-240.

[41] **Baricevic, D., Sosa, S., Della Loggia, R.,Tubaro, A., Simonovska, B., Krasna, A., Zupancic A.,**(2001).Tropical Anti-inflammatory activity of Salvia officinalis L. Leaves: the Relevance of Ursolic Acid. J. Ethnopharmacol.,**75** (2-3): 125-132.

[42]**Url-1**<http://www.bitkicaylarininfaydalari.com/adacayinin-faydalari/> 4.03.2016

[43] **Lu Y. , Foo L.Y.,** (2001). Polyphenolics of Salvia-a rewiev *Photochemistry*, **59**, 117-140.

[44] **Chang, H.M.,Cheng, K.P., Choang, T.F., Chow, H.F., Chui, K.Y., Hon, P.M.,Lau Tan, F.W., Yang, Y., Zhong, Z.P., Lee, C.M.,Sham, H.M., Chan, C.F.,Cui, Y.X.,Wong, H.N.C.,** (1990). Structure Elucadation and TotalSynthesis of New Tanshinones Isolated from *Salvia miltiorrhiza* Bunge*Journal Of Organic Chemistry* , **55,** 3537-3543.

[45] **Zhang, K.Q., Bao, Y., Wu, P., Rosen, R.T. ,Ho**, **C.T.,** (1990). Anti-oxidative Components of Tanshen (*Salvia* miltiorrhiza) .*Journal of Agricultural andFood Chemistry*, **38**, 1194-1197.

[46] **Propokenko, S. A., Litkivenko, V.L.,** (1980). Biogically Active Compounds from plants of the *Salvia* Genus. *Farmatsevtichhnii Zhurnall* (Kiev), 67-68.

[47] **Kong, D.,** (1989). Chemical Constituents of *Salvia miltiorrhiza .Zhongguo Yiyao Gongye Zashi*, **20**, 279-285.

[48] **Tang, W., Eisenbrand**, **G.,** (1992). Chinese Drugs of Plants Origin. Chemistry, Pharmacology, and Use in Traditional and Modern Medicine. *Springer-Verlag* Berlin, Heiderlbeg, 891-902.

[49] **Al-Hazimi, H.M.C., Miana**, **G.A.,** (1994). The Diterpenoids of *Salvia* Species. Part II .*Journal Of Chemical Society of Pakistan*, **16**, 46-63.

[50] **Rodriguez-Hahn L., Esquivel B., CardenasJ.,** (1995). Neo-clerodane Diterpenoids from American *Salvia* Species.*Recent Advances in Photochemistry*, **29**, 311-332.

[51] **Ulubelen A., Topcu G.,** (1998). Chemical and Biological investigations of *Salvia* Species Growing in Turkey. *Studies in Natural Products Chemistry*, **20**, 659-718.

[52] **Powers H.J.,**(2003). Centre for Human Nutrition Am J Clin Nutrition **77** (6), 1352-60

[53] **Mammadov, R.,** (2002). Vitaminler. Nobel yayınları: 338 s, Ankara.

[54] **Cemeroğlu, B.,** (2010). Gıda Analizleri. B. Cemeroğlu (ed.), İkinci baskı. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları: 34, Ankara.

[55] **Institute of Medicine. Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes, (**1998). Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. Washington, DC: National Academy Press

[56] **Rivlin, R.S., Pinto, J.T.,**(2001).Riboflavin (Vitamin B2), in *Handbook of Vitamins*, 3rd ed. (R.B. Rucker, J.W. Suttie, D.B. McCormick, L.J. Machlin, eds.), Marcel Dekker, New York

[57] **Tommaso R.I. Cataldi, D. Nardiello, G. E. De Benedetto, S. A. Bufo.,** (2002). "Optimizing separation conditions for riboflavin, flavin mononucleotide and flavin adenine dinucleotide in capillary zone electrophoresis with laser-induced fluorescence detection" Journal of Chromatography A, **968** , 229–239

[58] **Cheng-Huang Lin, An-Kai Su, Yen-Sheng Chang.,**(2004). "Analysis of riboflavin in beer by capillary electrophoresis/blue light emitting diode (LED)-induced fluorescence detection combined with a dynamic pH junction technique" Talanta , **64**,970–974

[59] **R.I. Cataldi, D. Nardiello, V. Carrara, R. Ciriello, E. De Benedetto.,**(2003). "Assessment of riboflavin and flavin content in common food samples by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection" Food Chemistry, **82** ,309–314

[60] **Piotr Kowalski, S. Dziomba, T. Baczek.,** (2012). "Field-amplified sample stacking–sweeping of vitamins B determination in capillary electrophoresis" Journal of Chromatography A, **1267**, 224– 2

ÖZGEÇMİŞ



Ad Soyad : Görkem GEZEK

Doğum Yeri ve Tarihi : Kırklareli, 20.08.1990

E-posta : gezekg@itu.edu.tr

Yüksek Lisans : Kimya, İstanbul Teknik Üniversitesi, 2016

Lisans : Uludağ Üniversitesi, 2012

Projeler :

- ✓ **Anadolu Adaçayı Türlerinin vitamin-B2 içeriklerinin kapiler elektroforez yöntemi ile saptanması,** Yüksek Lisans Projesi, İTU, BAP, Ekim 2015 - Haziran 2016
- ✓ **Simetrik Olmayan Metallic-Ftalosiyaninlerle Etkinleştirilmiş TiO2 Kullanarak Görünür Işıkla Kalıcı Organic Kirleticilerin Fotokatalitik Olarak Parçalanması** (1 Mart 2015- 1 Mart 2016, ITU, TUBİTAK PROJE NO:114R117)

Tebliğler:

- ✓ **Kloroflorokarbonlar**I.Ulusal Kimya Öğrenci Kongresi/ Bursa (7-10 Nisan 2010)
- ✓ **Cips Ve Sakız Örneklerinde BHT(Bütillendirilmiş Hidroksi Toluen-E224) HPLC İle Belirlenmesi** II.Ulusal Kimya Öğrenci Kongresi/ Bolu (14-17 Haziran 2011)
- ✓ **Adaçayi Örneklerinde Kapiler Elektroforez-Lazer İndüklenmiş Floresans Dedektör İle Riboflavin Tayini** 27.Ulusal Kimya Kongresi/ Çanakkale (23-28 Ağustos 2015)

Görevler:

- ✓ **Uludağ Kimya Topluluğu(UKİT) Başkan'lığı** (2011-2012)
- ✓ **World Cess Olympiad 2012 Officer/Transportation**(27 August-10 September)