



BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK DERGİSİ



Bingöl University Health Journal



e-ISSN 2717-7653



BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK HİZMETLERİ MESLEK YÜKSEKOKULU



Yıl/Year: 2021

Cilt/Volume: 02

Sayı/Number: 01

*Bingöl Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu tarafından yayımlanmaktadır.

DERGİ HAKKINDA



Bingöl Üniversitesi Sağlık Dergisi yayın hayatına başlarken...

Ülkemizin güzide şehri Bingöl ve kısa zamanda Bingöl'ün en prestijli kurumu haline gelen Bingöl Üniversitesi'nde sağlık alanında hakemli ulusal akademik bir derginin yayın hayatına başlaması vesilesi ile huzurlarınızdayız.

Bu derginin kuruluşu daha fikir aşamasında iken bizden desteklerini esirgemeyen başta Rektörümüz Prof. Dr. İbrahim ÇAPAK ve Bingöl Üniversitesi'nin tüm senato üyelerine teşekkürü bir borç bilirim. Onların ve okulumuz akademisyenlerinin cesaretlendirmeleri ile çıkılan bu uzun yolda güzel çalışmalar yapabilecek olmanın heyecan ve umudunu taşıyoruz.

Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulumuzun ev sahipliğini yapacağı bu derginin sağlık alanında her kademedeki çalışan ve araştırmacılara kapısı daima açık olacaktır. Dergimiz ulusal hakemli olarak kurulmakta ve gerekli şartları taşıdıktan sonra TR-Dizin ve uluslararası indekslerde taranır hale getirilmesi öncelikli hedefimizdir.

Bilim dünyasında ve Türkiye'mizin akademik hayatında bilim insanları ve meraklıları tarafından tercih edilen bir dergisi olmak için çalışma azmimizin hiç eksilmemesi dileğiyle...

Doç. Dr. Aydın Şükrü BENGÜ
Bingöl Üniversitesi Sağlık Hizmetleri MYO Müdürü

BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK DERGİSİ

Bingöl Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Adına İmtiyaz Sahibi
Doç. Dr. Aydın Şükrü BENGÜ
Bingöl Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Müdürü

Baş Editör
Öğr. Gör. Onur AYDIN

Editör Yardımcıları
Öğr. Gör. Dr. Sümeyra CEYHAN
Öğr. Gör. Mesut DEMİREL
Öğr. Gör. Tülay ÇETKİN

Sorumlu Yazı İşleri Sorumlusu
Öğr. Gör. Onur AYDIN

Teknik Editör & Sekreteryaya
Öğr. Gör. Abdullah SARMAN

YAYIN KURULU

Prof. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ

Dr. Öğr. Üyesi Ramazan GÜNDOĞDU

Prof. Dr. M. Sait KELEŞ

Dr. Öğr. Üyesi Ömer ÇAMUR

Doç. Dr. Aydın Şükrü BENGÜ

Dr. Öğr. Üyesi Ekrem DARENDELİOĞLU

Doç. Dr. İkram ORAK

Dr. Öğr. Üyesi Veysel SÜZERER

Doç. Dr. Yunus ESEN

Dr. Öğr. Üyesi Şükrü ÖZEN

Doç. Dr. Hakan İNCİ

Dr. Öğr. Üyesi Ali AY

Doç. Dr. Abdullah DALAR

Dr. Öğr. Üyesi Sabahattin BOR

Doç. Dr. H. Turan AKKOYUN

Dr. Öğr. Üyesi Mahire BAYRAMOĞLU
AKKOYUN

Doç. Dr. Gökmen KILINÇARSLAN

Öğr. Gör. Dr. Sümeyra CEYHAN

Dr. Öğr. Üyesi Halil ŞİMŞEK

Öğr. Gör. Onur AYDIN

Dr. Öğr. Üyesi Aykut ULUCAN

Öğr. Gör. Onur KESKİN

Dr. Öğr. Üyesi Handan YILMAZ

İÇİNDEKİLER

Derleme Makalesi/ *Review Article*

Sayfa No

Resveratrol Güçlü Bir Antioksidan Mı?

Is Resveratrol a Powerful Antioxidant?

Emine SARMAN, Kanat GÜLLE

.....

57-63

Editöre Mektup/ *Letter to the Editor*

HPLC Tekniği ve Kullanım Alanları

HPLC Technique and Usage Areas

Aydın Şükrü BENGÜ

.....

64-69



Resveratrol Güçlü Bir Antioksidan Mı?

Is Resveratrol a Powerful Antioxidant?

Emine SARMAN¹ , Kanat GÜLLE² 

ÖZ

Serbest radikaller, oksidatif hasara neden olan ve kronik dejeneratif hastalıklara yol açan toksik maddelerdir. Serbest radikal oluşumunu önleyen veya bu radikallerin temizlenmesini sağlayan maddelere "antioksidan" adı verilmektedir. Bir antioksidan olan resveratrol üzüm ve ürünleri başta olmak üzere 70'den fazla bitki çeşidinde bulunan bir fitoaleksindir. Resveratrolün oksidatif stresi azalttığı, kan-beyin bariyerini geçtiği, birçok hastalık üzerine iyileştirici rolünün olduğu görülmüştür. Fakat insan sağlığı üzerinde antioksidan yönüyle kesin bir koruyucu etkisinin olduğunu söyleyebilmek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Serbest Radikal, Oksidatif Stres, Resveratrol, Antioksidan.

ABSTRACT

Free radicals are toxic substances that cause oxidative damage and lead to chronic degenerative diseases. The substances that prevent the free radical formation or scavenge these radicals are called "antioxidants". Resveratrol, an antioxidant, is a phytoalexin found in more than 70 plant varieties, especially grapes and their products. It has been observed that resveratrol reduces oxidative stress, crosses the blood-brain barrier, and has a healing role in many diseases. However, it is thought that further studies are needed to be able to say that it has a definite protective effect as an antioxidant on human health.

Keywords: Free Radical, Oxidative Stress, Resveratrol, Antioxidant.

¹ Doktora Öğrencisi, Emine SARMAN, Histoloji ve Embriyoloji, Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji ABD, esrmn@hotmail.com, ORCID No: 0000-0002-4671-9315

² Doçent Doktor, Kanat GÜLLE, Histoloji ve Embriyoloji, Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji ABD, kanatgulle@sdu.edu.tr, ORCID No: 0000-0002-6337-8962

İletişim/Corresponding Author:

Emine SARMAN

Geliş Tarihi/Received : 15.05.2021

E-posta/E-mail:

esrmn@hotmail.com

Kabul Tarihi/Accepted: 21.05.2021

Yayın Tarihi/Published: 30.06.2021

GİRİŞ

Serbest radikaller, oksidatif hasara neden olan ve kronik dejeneratif hastalıklara yol açan toksik maddelerdir (1). Dış yörüngelerinde eşleşmemiş elektronu bulunur, kararlı olmayan atom ya da moleküllerle reaksiyona girer ve serbest hale geçer. Bu moleküller elektron kaybettiği için kararsız hale geçtiklerinde serbest radikaller oluşur (2). Bu durum, başta kanser olmak üzere, kalp damar ve şeker hastalığı gibi pek çok hastalığa neden olmaktadır (3,4).

Serbest radikal oluşumunu önleyen veya bu radikallerin temizlenmesini sağlayan maddelere “antioksidan” adı verilmektedir. Antioksidanlar endojen (enzimatik ve nonenzimatik) ve ekzojen (vitaminler ve ilaç) kaynaklı olabilir (5). Bitkisel kaynaklı olan bu antioksidanlar serbest radikallerin giderilmesinde önemli rol oynamaktadır (6).

Bir antioksidan olan resveratrol, 1940’lı yıllarda Çin ve Japon tıbbında kullanılmış olup, üzüm ve ürünleri başta olmak üzere 70’den fazla bitki çeşidinde bulunan bir fitoaleksindir (7). Resveratrol, serbest radikaller üzerinde etkisi yüksek bir maddedir. İskemi-reperfüzyonda kalp, beyin ve böbrekte nitrik oksit (NO) sentezini indükleyerek oksidatif stresi azalttığı, siklooksijenaz-2 (COX-2) transkripsiyonunu ve ornitin dekarboksilaz’ı inhibe ederek kanser gelişimini, ilerlemesini (meme, prostat, mide, pankreas ve tiroit kanserini) azalttığı (8), miyokardiyal enfarktüsü önlemede etkili olabilecek trombosit agregasyonu ve in vitro aktivasyonu inhibe ettiği belirlenmiştir (9). Laboratuvar ve hayvan araştırmaları yapılmasına rağmen, resveratrolün insanlarda etkili bir tedavi ajanı olabileceğini gösteren az sayıda klinik kanıt bulunmaktadır (10).

Bu çalışmada bir antioksidan olan resveratrolün genel özellikleri ve etki mekanizması üzerinde durulmuş, bu etki mekanizmasının insan sağlığı üzerindeki iyileştirici rolü literatür kapsamında derlenmiştir.

1. Serbest Radikal Türleri

Oksidatif hasara ve kronik dejeneratif hastalıklara neden olduğu belirtilen serbest radikallerle ilgili yapılan araştırmaların sayısı gün geçtikçe artmaktadır (11,12). Çalışmanın bu bölümünde en fazla araştırılan serbest radikallere ilişkin genel bilgiler paylaşılmıştır.

1.1. Süperoksit Radikali

Süperoksit radikali, eşleşmemiş elektron taşıyan oksidandır. Süperoksit radikalının kendisi direkt olarak zarar vermez. Hidrojen peroksit ve geçiş metal iyonlarını indirgeyici özellikte olması bu radikalın önemli bir özelliğidir. Hem indirgeme hem de yükseltgeme özelliğine sahiptir (13).

1.2. Hidrojen Peroksit

Hidrojen peroksit, oksijenin iki elektron indirgenmesi ya da süperoksitlerin tepkimeleri sonucu oluşan, eşleşmemiş elektrona sahip olmayan ve radikal özellik göstermeyen bir bileşiktir (14). Hücre hasarına neden olan hidrojen peroksit doymamış yağ asitlerine karşı etki gösterir (15).

1.3. Lipit Peroksit Radikali

Yağ asidinin üzerinde bir elektron kalacak şekilde parçalandığında lipit radikali oluşur. Oluşan lipit radikalının oksijen ile reaksiyonu sonucu lipit peroksit radikali meydana gelir (16). Serbest radikaller tarafından oksidasyon reaksiyonları gerçekleşir. Bu durum hücre hasarına yol açar ve ölümüne neden olur. Serbest radikalleri yok etmek ve sonlandırmak için antioksidanlar reaksiyona girer (17).

2. Antioksidan Türleri

Serbest radikallerin meydana gelmesini önleyen özelleşmiş antioksidanlar farklı kaynaklardan elde edilebilir. Endojen ve ekzojen kaynaklı bu maddeler oksidan moleküllerin neden olduğu hasarı, hücre içi ve hücre dışı savunma mekanizmaları ile etkisiz hale getirir (5).

2.1. Enzimatik Antioksidanlar

2.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit Dismutaz (SOD), serbest oksijen radikallerini kullanarak süperoksit'i hidrojen peroksit'e (H_2O_2) çevirir. "Oksidatif strese karşı ilk savunma" olarak da adlandırılan bu sistem sayesinde süperoksit düzeyleri kontrol altında tutulmaktadır (18). Lösemi, respiratuar distres sendromu, böbrek yetmezliği, akciğer enfeksiyonları ve motor nöron hastalıkları gibi hastalıklarda koruyucu rolü olduğu düşünülmektedir (19).

2.1.2. Katalaz

Katalaz (CAT) peroksizomlarda bulunan bir enzimdir. Peroksidazla birlikte H_2O_2 'yi su ve oksijene ayırmaktadır. Kan, kemik iliği, karaciğer, böbrekte yüksek miktarda bulunmaktadır (19).

2.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), sitozollerde bulunan bir enzimdir. Hidrojen peroksit ve organik peroksitlerin indirgenmesiyle oksitlenen glutasyon, glutasyon redüktaz enzimi ve Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat (NADPH) yardımıyla indirgenerek reaksiyonların devamını sağlar. Eritrositlerdeki en kuvvetli antioksidandır (20).

2.2. Nonenzimatik Antioksidanlar

2.2.1. Askorbik Asit (C Vitamini)

Güçlü bir antioksidan olarak bilinen C vitamini, hidroksil radikali ve süperoksit radikali ile reaksiyona girer ve bu radikalleri ortadan kaldırır. Elektronlarını vererek, diğer bileşiklerin okside olmasını engeller. Lipit peroksidasyonunu başlatan radikallerin etkilerini yok ederek, lipitleri oksidasyona karşı korur. E vitamini rejenerasyonunda görev alır (20).

2.2.2. β -Karoten (A vitamini)

Serbest radikalleri direkt olarak yakalar ve zincir kıran bir antioksidan olarak etki ederek peroksit radikallerin oluşumunu önler (21). Karotenoidlerin yeterli miktarda alındıklarında kanserden koruduğunu

gösteren çalışma sonuçları bulunmaktadır (19).

2.2.3. α -Tokoferol (E Vitamini)

E vitamini, hücre membran fosfolipitlerinde bulunan yağ asitlerini serbest radikallerden koruyan zincir kırıcı bir antioksidandır. Serbest radikallere karşı tamamlayıcı etki gösterir ve peroksitlerin sentezini engeller (22).

2.2.4. Doğal Antioksidanlar

Bitkisel kaynaklı olan bu antioksidanlar serbest radikal oluşumunun önlenmesi ve peroksit parçalanmasında önemli rol oynar (6). Doğal antioksidanlar bitkilerin yapraklarında, çiçeklerinde, sebzelerde ve meyvelerde bol miktarda bulunmaktadır. Sebzelerin büyük bir bölümünde özellikle patates, domates, ıspanak, karabuğday, kırmızıbiber gibi sebzelerde antioksidanlar olduğu belirlenmiştir. Özellikle Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'da en çok tüketilen sebzeler arasında brokoli yer almaktadır (23). Meyvelerde bulunan antioksidan bileşiklerle yapılan çalışmalarda, turunçgiller, çilek, kivi, kuru erik ve zeytin gibi meyvelerde önemli miktarda antioksidanların bulunduğu bildirilmiştir (24).

3. Resveratrol ve Etkileri

Resveratrol, birçok bitki çeşidinde bulunan bir fitoaleksindir (7). Resveratrolün DNA tamir geni olarak bilinen sirtuin1 (SIRT1)'i aktive ettiği, hücre yaşam süresini uzattığı bilinmektedir (25). Resveratrol, sirtuin protein ailesinin memeli formlarından biri olan SIRT1'in aktivatörüdür. SIRT1, transkripsiyon faktörleri dahil olmak üzere histon ve nonhiston proteinlerini deasetile eder. Stres direncini, hücre yaşlanmayı, bağışıklık fonksiyonlarını etkiler (26). Preklinik çalışmalarda, hastalıklardaki terapötik etkisi araştırılmıştır. Özellikle kanser hastaları için, geleneksel tedavilerle ilişkili yüksek riskler bulunmaktadır. Özellikle hücre sinyal ağlarındaki karmaşıklıklar, sadece bir ağı hedef alan spesifik inhibitörlerin terapötik başarısını engeller. Fakat resveratrol birçok yolu hedefleyerek kanser üzerinde kemoterapötik etkiye sahip olan, umut verici bir antikanser

ajanıdır (27). Resveratrol, inflamasyona, enfeksiyona karşı immün yanıtı ve uyaranlara karşı hücrel cevabı düzenleyen nükleer faktör κ B (NF- κ B) sinyal yolunu etkiler. Ek olarak, IGF-1R/Akt/Wnt yollarını önemli ölçüde inhibe ettiği belirlenmiştir (28). Resveratrol ayrıca araşidonik asidin prostaglandinlere dönüşmesinden sorumlu olan siklooksijenazları inhibe eder. Bunun yanı sıra, vasküler hücre adezyon moleküllerinin (VCAM) ekspresyonunu inhibe ettiği ve ateroskleroz ve hipertansiyon gelişiminden sorumlu olan vasküler düz kas hücrelerinin aktivitesini etkilediği belirtilmiştir (29). Resveratrol hızlı bir şekilde metabolize olup atıldığı için oral yoldan alınması önerilmektedir (30). Çeşitli araştırmalar yapılmasına rağmen, resveratrolün insanlarda etkili bir tedavi olduğuna dair çalışmalar sınırlıdır (10,31).

3.1. Resveratrolün Bazı Kanser Türlerindeki Etkisi

Yapılan çalışmalar resveratrolün, tümör proliferasyonuna yol açan AKT, mitojenle etkinleşen protein kinaz (MAPK) ve NF- κ B sinyal yollarını regüle eden COX'leri hedeflediğini ve tümör oluşumunu önlediğini göstermiştir (32). Klinik çalışmalar, kanser tipi ve tedavi süresinin resveratrolün hücre içindeki etkisinde önemli olduğunu ortaya koymaktadır. Aynı kanser türlerinde bile uygulama sonrasında farklı sonuçlar elde edilebilir. Örneğin, prostat kanseri üzerinde yapılan bir çalışmada, resveratrolün kanser nüksünü geciktirmek için kullanılabileceği belirlenmiştir (33). Resveratrolün androjen üretimini azalttığı ve androjen reseptör aktivitesini modüle ettiğini gösteren klinik öncesi çalışmalara rağmen, Kjaer ve ark. (2015), resveratrolün PSA düzeylerini etkilemediği için prostat kanseri üzerinde tedavi edici etkisinin bulunmadığını belirtmiştir (34). Aynı çalışmada, resveratrolün prostat kanseri üzerinde etkili bir yöntem olduğunu belirtmek için daha fazla klinik çalışma yapılmasına gerek olduğu ifade edilmiştir. Benzer şekilde, kolorektal kanserli hastalarda resveratrol kullanılarak yapılan klinik çalışmalar ümit vericidir. İn vitro çalışmalar, resveratrolün kolon kanser

hücrelerinde büyümeyi engellediğini göstermektedir (35). Resveratrol ile yapılan bir-iki haftalık tedaviden sonra, hastaların ilgili reseptör konsantrasyon ölçümlerinin, ana kolorektal dokudaki metabolitleri, prelinik çalışmalarda kullanılan etkili resveratrol konsantrasyonlarına benzer şekilde düzenlediği belirtilmektedir. Ek olarak resveratrol metabolitlerinin antikanserojenik etkisi henüz doğrulanmamıştır. Bu nedenle kolon kanseri için bir tedavi olarak kullanılıp kullanılmayacağı hala belirsizliğini korumaktadır (36). Resveratrolün multiple miyelom hücre dizilerinde sitotoksositeye neden olduğu belirtilmiştir (37). Multiple miyelomlu hastaların tedavisinde kullanılabileceğini gösteren klinik öncesi çalışmalar olsa da, bazı çalışmalarda, böbrek yetmezliği olan hastalarda ciddi yan etkilere neden olduğu belirlenmiştir (38). Meme kanserindeki etkinliğini belirlemek üzere yapılan bir çalışmada, hastalara 12 hafta boyunca resveratrol uygulanmıştır. Resveratrolün kan serum konsantrasyonunun zaman içerisinde giderek arttığı, meme kanseri ile ilişkili bir geni etkilediği ve bu etkinin dolaşımdaki resveratrol seviyeleri ile anlamlı düzeyde bir ilişkisinin olduğu belirtilmiştir (39). Bu klinik çalışmaların, resveratrolün belirli kanser türleri üzerindeki etkinliğini göstermesi bakımından önemli olduğu düşünülmektedir.

3.2. Resveratrolün Nörolojik Bozukluklardaki Etkisi

Alzheimer hastalığı gibi birçok nörolojik bozukluğun merkezi sinir sisteminde meydana gelen oksidatif hasarın bir sonucu olduğu düşünülmektedir. Resveratrolün anti-oksidatif etkisi nedeniyle nörolojik bozukluklar için faydalı sonuçları olabileceği belirtilmiştir (40). Alzheimer hastalığı her ne kadar oksidatif hasar oluşumuyla ilişkilendirilse de patofizyolojisi kesin olarak bilinmemektedir. Fakat hastalığın tedavisinde birçok biyobelirteç tanımlanmıştır. Örneğin, amiloid beta prekürsör proteini (APP) ve apolipoprotein E (APOE) genetik mutasyonlarının neden olduğu amiloid- β (A β) plak birikiminin ve oksidatif hasarın

artmasının bu hastalıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir (41). Bu etkiyi belirlemeye yönelik yapılan klinik çalışmalarda, hastalara bir yıl boyunca resveratrol uygulanmış, plasebo grubundaki hastalar ile karşılaştırıldığında, resveratrolün kan-beyin bariyerini geçtiğini gösteren metabolitler olduğu belirlenmiştir (42,43). Ayrıca resveratrol uygulanan hastaların, alzheimer/nörodejenerasyonla ilişkili hücre dışı matriksin bileşenlerini bozan bir matriks metalloproteinaz (MMP) olan MMP-9 seviyelerinin azaldığı belirlenmiştir (44). Bu sonuçlar, resveratrolün Alzheimer hastalarında güvenle kullanılabileceğini düşündürmektedir.

3.3. Resveratrolün Kardiyovasküler Hastalıklardaki Etkisi

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'ye göre kardiyovasküler hastalıklar her yıl milyonlarca kişinin ölümüne neden olmaktadır (45). Resveratrolün, ateroskleroz ve koroner arter hastalığını önlemeye yardımcı olabilecek endotel fonksiyonunu desteklediği kanıtlanmıştır. Ateroskleroz, arterlerde lipid birikmesi ile karakterize olup, tıkanmalara ve trombus oluşumuna neden olmaktadır. Magyar ve ark. (2012), resveratrol ile yapılan tedavinin sol ventrikül sistolik ve diyastolik fonksiyonlarını iyileştirdiğini

belirtmiştir (46). Resveratrolün, yüksek ateroskleroz riski taşımayan hastalarda inflamasyonu azalttığı kanıtlanmıştır (47). Kardiyovasküler hastalık riski yüksek olan hastalarda yapılan bir çalışmada üzüm tüketiminin iyileştirici etkisi olduğu belirlenmiştir (48). Biesinger ve ark. (2016), tarafından yapılan çalışmada resveratrolün diğer fitokimyasallarla birlikte diyastolik kan basıncını etkili bir şekilde azalttığı belirtilmiştir (49). Bo ve ark. (2013), resveratrol ile yapılan tedavinin, hastaların solunum yollarında sistemik etkiyi ve karaciğerden salınan yüksek C-reaktif protein (CRP) düzeyini azalttığını belirlemiştir (50).

Her ne kadar çalışmalarda resveratrolün olumlu etkileri olduğu belirtilse de, bazı çalışmalarda beklenen etkinin görülmediği ve olumsuz sonuçlar elde edildiği belirtilmiştir. Örneğin Zortea ve ark. (2016), resveratrol ile tedavi edilen hastaların kolesterol düzeylerinin arttığını belirlemiştir (51). Van der Made, Plat ve Mensink (2015), resveratrolün aşırı kilolu hastalarda yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) düzeyleri üzerinde bir etkisi olmadığını belirlemiştir (52). Genel olarak değerlendirildiğinde ise resveratrolün çeşitli kardiyovasküler hastalıklarda olumlu etkileri olduğu belirtilmektedir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Serbest radikaller, nükleik asit, protein ve lipidlerde oksidatif hasara neden olan ve kronik dejeneratif hastalıklara yol açan toksik maddelerdir. Bitkilerin yapraklarında, çiçeklerinde, sebzelerde ve meyvelerde bulunan antioksidan maddeler serbest radikallerin meydana gelmesini engellemekte ve oluşturduğu zararlı etkileri azaltmaktadır. Bir antioksidan olan resveratrol, üzüm ve bundan meydana gelen ürünlerde bol miktarda bulunan önemli bir fitoaleksindir. Resveratrolün serbest radikaller üzerindeki

etkisinin yüksek olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada resveratrolün bazı kanser türlerindeki, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklardaki etkisiyle ilgili literatür incelenmiştir. Sonuç olarak resveratrolün, oksidatif stresi azalttığı, kan-beyin bariyerini geçtiği, birçok hastalık üzerine iyileştirici rolünün olduğu görülmüştür. Fakat insan sağlığı üzerinde kesin bir koruyucu etkisinin olduğunu söyleyebilmek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Sroka, Z., & Cisowski, W. (2003). Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food and Chemical Toxicology*, 41(6), 753–758. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00329-0](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00329-0)
2. Prior, R. L., & Cao, G. (2000). Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables: Diet and health implications. *HortScience*, 35(4), 588–592. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.35.4.588>
3. Bonnefont-Rousselot, D., Beaudoux, J.-L., Thérond, P., Peynet, J., Legrand, A., & Delattre, J. (2004). Diabetes mellitus, oxidative stress and advanced glycation endproducts. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 62(3), 147–157. [https://doi.org/10.1016/s0003-4509\(04\)94297-6](https://doi.org/10.1016/s0003-4509(04)94297-6)
4. Moe, G. W., Marin-Garcia, J., König, A., Goldenthal, M., Lu, X., & Feng, Q. (2004). In vivo TNF-alpha inhibition ameliorates cardiac mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and apoptosis in experimental heart failure. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 287(4), H1813-20. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00036.2004>
5. Aydemir, B., & Sarı, E. K. (2009). Antioksidanlar ve büyüme faktörleri ile ilişkisi. *Kocatepe Veteriner Dergisi*, 2(2), 56–60.
6. Larson, R. A. (1988). The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, 27(4), 969–978. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(88\)80254-1](https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)80254-1)
7. Aggarwal, B. B., Bhardwaj, A., Aggarwal, R. S., Seeram, N. P., Shishodia, S., & Takada, Y. (2004). Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: Preclinical and clinical studies. *Anticancer Research*, 24(5A), 2783–2840.
8. Walle, T. (2011). Bioavailability of resveratrol. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1215, 9–15. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05842.x>
9. Walle, T., Hsieh, F., DeLegge, M. H., Oatis, J. E. J., & Walle, U. K. (2004). High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metabolism and Disposition*, 32(12), 1377–1382. <https://doi.org/10.1124/dmd.104.000885>
10. Cai, H., Scott, E., Kholghi, A., Andreadi, C., Rufini, A., Karmokar, A., ... Brown, K. (2015). Cancer chemoprevention: Evidence of a nonlinear dose response for the protective effects of resveratrol in humans and mice. *Science Translational Medicine*, 7(298), 298ra117. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa7619>
11. Chung-man Ho, J., Zheng, S., Comhair, S. A., Farver, C., & Erzurum, S. C. (2001). Differential expression of manganese superoxide dismutase and catalase in lung cancer. *Cancer Research*, 61(23), 8578–8585.
12. Gromadzinska, J., Wasowicz, W., Ryzdowski, K., & Szeszenia-Dabrowska, N. (2003). Oxidative-stress markers in blood of lung cancer patients occupationally exposed to carcinogens. *Biological Trace Element Research*, 91(3), 203–215. <https://doi.org/10.1385/BTER:91:3:203>
13. Lee, J., Koo, N., & Min, D. B. (2004). Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3(1), 21–33. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2004.tb00058.x>
14. Turna, G., Kılıç, N., Yıldırım, Z., & Sarı, S. (2011). Ehrlich asit solid tümör modeli oluşturulmuş farelerde Thymus sipleus ve SOD aktivitesine etkileri. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 31(5), 1153–1159.
15. Balcı, N. (2007). *Sürekli gürlütiye maruz kalan bazı iş kollarında çalışan kişilerde serum total sialik asit ksantin oksidaz malondialdehit nitrik oksit arginaz ve ornitin değerleri.* (Yayımlanmamış yüksek lisans tezi). Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Kahramanmaraş.
16. Günaydın, B., & Çelebi, H. (2003). Genel anesteziğin serbest radikaller ve antioksidanlarla ilişkisi. *Anestezî Dergisi*, 11(2), 87–98.
17. German, J. B. (1999). Food processing and lipid oxidation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 459, 23–50. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4853-9_3
18. Besler, H. T., & Comoğlu, S. (2003). Lipoprotein oxidation, plasma total antioxidant capacity and homocysteine level in patients with multiple sclerosis. *Nutritional Neuroscience*, 6(3), 189–196. <https://doi.org/10.1080/1028415031000115945>
19. Scandalios, J. G. (2002). The rise of ROS. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(9), 483–486. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(02\)02170-9](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(02)02170-9)
20. Şengül, C. A. (2010). *Obez olgularda İnsülin direnci, metabolik sendrom ile total oksidan ve antioksidan düzeyleri ilişkisi.* (Tıpta uzmanlık tezi). Gaziantep Üniversitesi, Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı, Gaziantep.
21. Guidetti, M., Sforzini, A., Bersani, G., Corsini, C., Grossi, G., Zolezzi, C., ... Pironi, L. (2008). Vitamin A and vitamin E isoforms stability and peroxidation potential of all-in-one admixtures for parenteral nutrition. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 78(3), 156–166. <https://doi.org/10.1024/0300-9831.78.3.156>
22. Anım, Y. (2009). *Pediyatrik obezite ile ilişkili yağlı karaciğer hastalığında metabolik, oksidan ve antioksidan sistemik belirteçlerin değerlendirilmesi.* (Yayımlanmamış yüksek lisans tezi). Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Ana Bilim Dalı, İzmir.
23. Özata, M., Yılmaz, M. İ., Mergen, M., Öktenli, C., & Aydın, A. (2003). Erkek obezitesinde bozulmuş antioksidan kapasite ve hipokinkonemi. *Turkish Journal of Endocrinology and Metabolism, Suppl. 2*, 47–51.
24. Khan, N. I., Naz, L., & Yasmeen, G. (2006). Obesity: An independent risk factor for systemic oxidative stress. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 19(1), 62–65.
25. Valenzano, D. R., & Cellerino, A. (2006). Resveratrol and the pharmacology of aging: A new vertebrate model to validate an old molecule. *Cell Cycle*, 5(10), 1027–1032. <https://doi.org/10.4161/cc.5.10.2739>
26. Chung, S., Yao, H., Caito, S., Hwang, J.-W., Arunachalam, G., & Rahman, I. (2010). Regulation of SIRT1 in cellular functions: Role of polyphenols. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501(1), 79–90. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.05.003>
27. Sarkar, F. H., Li, Y., Wang, Z., & Kong, D. (2009). Cellular signaling perturbation by natural products. *Cellular Signalling*, 21(11), 1541–1547. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.03.009>
28. Vanamala, J., Reddivari, L., Radhakrishnan, S., & Tarver, C. (2010). Resveratrol suppresses IGF-1 induced human colon cancer cell proliferation and elevates apoptosis via suppression of IGF-1R/Wnt and activation of p53 signaling pathways. *BMC Cancer*, 10, 238. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-238>
29. Alayev, A., Salamon, R. S., Schwartz, N. S., Berman, A. Y., Wiener, S. L., & Holz, M. K. (2017). Combination of rapamycin and resveratrol for treatment of bladder cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 232(2), 436–446. <https://doi.org/10.1002/jcp.25443>
30. Howells, L. M., Berry, D. P., Elliott, P. J., Jacobson, E. W., Hoffmann, E., Hegarty, B., ... Gescher, A. J. (2011). Phase I randomized, double-blind pilot study of micronized resveratrol (SRT501) in patients with hepatic metastases-safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *Cancer Prevention Research*, 4(9), 1419–1425. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-11-0148>
31. Tomé-Carneiro, J., Larrosa, M., González-Sarrías, A., Tomás-Barberán, F. A., García-Conesa, M. T., & Espín, J. C. (2013). Resveratrol and clinical trials: the crossroad from in vitro studies to human evidence. *Current Pharmaceutical Design*, 19(34), 6064–6093. <https://doi.org/10.2174/13816128113199990407>
32. Kulkarni, S. S., & Cantó, C. (2015). The molecular targets of resveratrol. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1852(6), 1114–1123. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.10.005>
33. Paller, C. J., Rudek, M. A., Zhou, X. C., Wagner, W. D., Hudson, T. S., Anders, N., ... Carducci, M. A. (2015). A phase I study of muscadine grape skin extract in men with biochemically recurrent prostate cancer: Safety, tolerability, and dose determination. *The Prostate*, 75(14), 1518–1525. <https://doi.org/10.1002/pros.23024>
34. Kjaer, T. N., Ornstrup, M. J., Poulsen, M. M., Jørgensen, J. O. L., Hougaard, D. M., Cohen, A. S., ... Pedersen, S. B. (2015). Resveratrol reduces the levels of circulating androgen precursors but has no effect on, testosterone, dihydrotestosterone, PSA levels or prostate volume. A 4-month randomised trial in middle-aged men. *The Prostate*, 75(12), 1255–1263. <https://doi.org/10.1002/pros.23006>

35. Schneider, Y., Vincent, F., Duranton, B., Badolo, L., Gossé, F., Bergmann, C., ... Raul, F. (2000). Anti-proliferative effect of resveratrol, a natural component of grapes and wine, on human colonic cancer cells. *Cancer Letters*, 158(1), 85–91. [https://doi.org/10.1016/s0304-3835\(00\)00511-5](https://doi.org/10.1016/s0304-3835(00)00511-5)
36. Patel, K. R., Brown, V. A., Jones, D. J. L., Britton, R. G., Hemingway, D., Miller, A. S., ... Brown, K. (2010). Clinical pharmacology of resveratrol and its metabolites in colorectal cancer patients. *Cancer Research*, 70(19), 7392–7399. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2027>
37. Jazirehi, A. R., & Bonavida, B. (2004). Resveratrol modifies the expression of apoptotic regulatory proteins and sensitizes non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma cell lines to paclitaxel-induced apoptosis. *Molecular Cancer Therapeutics*, 3(1), 71–84.
38. Sale, S., Tunstall, R. G., Ruparella, K. C., Potter, G. A., Steward, W. P., & Gescher, A. J. (2005). Comparison of the effects of the chemopreventive agent resveratrol and its synthetic analog trans 3,4,5,4'-tetramethoxystilbene (DMU-212) on adenoma development in the Apc(Min+) mouse and cyclooxygenase-2 in human-derived colon cancer cells. *International Journal of Cancer*, 115(2), 194–201. <https://doi.org/10.1002/ijc.20884>
39. Zhu, W., Qin, W., Zhang, K., Rottinghaus, G. E., Chen, Y.-C., Kliethermes, B., & Sauter, E. R. (2012). Trans-resveratrol alters mammary promoter hypermethylation in women at increased risk for breast cancer. *Nutrition and Cancer*, 64(3), 393–400. <https://doi.org/10.1080/01635581.2012.654926>
40. Pasinetti, G. M., Wang, J., Ho, L., Zhao, W., & Dubner, L. (2015). Roles of resveratrol and other grape-derived polyphenols in Alzheimer's disease prevention and treatment. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1852(6), 1202–1208. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.10.006>
41. Huang, Y., & Mucke, L. (2012). Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell*, 148(6), 1204–1222. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.040>
42. Moussa, C., Hebron, M., Huang, X., Ahn, J., Rissman, R. A., Aisen, P. S., & Turner, R. S. (2017). Resveratrol regulates neuro-inflammation and induces adaptive immunity in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*, 14(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0779-0>
43. Turner, R. S., Thomas, R. G., Craft, S., van Dyck, C. H., Mintzer, J., Reynolds, B. A., ... Aisen, P. S. (2015). A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of resveratrol for Alzheimer disease. *Neurology*, 85(16), 1383–1391. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002035>
44. Thordardottir, S., Kinhult Ståhlbom, A., Almkvist, O., Thonberg, H., Eriksdotter, M., Zetterberg, H., ... Graff, C. (2017). The effects of different familial Alzheimer's disease mutations on APP processing in vivo. *Alzheimer's Research & Therapy*, 9(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s13195-017-0234-1>
45. World Health Organisation. (2017). Cardiovascular diseases (CVDs). Retrieved from World Health Organisation website: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
46. Magyar, K., Halmosi, R., Palfi, A., Feher, G., Czopf, L., Fulop, A., ... Szabados, E. (2012). Cardioprotection by resveratrol: A human clinical trial in patients with stable coronary artery disease. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 50(3), 179–187. <https://doi.org/10.3233/CH-2011-1424>
47. Agarwal, B., Campen, M. J., Channell, M. M., Wherry, S. J., Varamini, B., Davis, J. G., ... Smoliga, J. M. (2013). Resveratrol for primary prevention of atherosclerosis: Clinical trial evidence for improved gene expression in vascular endothelium. *International Journal of Cardiology*, 166(1), 246–248. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2012.09.027>
48. Tomé-Carneiro, J., González, M., Larrosa, M., García-Almagro, F. J., Avilés-Plaza, F., Parra, S., ... Espín, J. C. (2012). Consumption of a grape extract supplement containing resveratrol decreases oxidized LDL and ApoB in patients undergoing primary prevention of cardiovascular disease: a triple-blind, 6-month follow-up, placebo-controlled, randomized trial. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56(5), 810–821. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201100673>
49. Biesinger, S., Michaels, H. A., Quadros, A. S., Qian, Y., Rabovsky, A. B., Badger, R. S., & Jalili, T. (2016). A combination of isolated phytochemicals and botanical extracts lowers diastolic blood pressure in a randomized controlled trial of hypertensive subjects. *European Journal of Clinical Nutrition*, 70(1), 10–16. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2015.88>
50. Bo, S., Ciccone, G., Castiglione, A., Gambino, R., De Michieli, F., Villosio, P., ... Cassader, M. (2013). Anti-inflammatory and antioxidant effects of resveratrol in healthy smokers a randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over trial. *Current Medicinal Chemistry*, 20(10), 1323–1331. <https://doi.org/10.2174/0929867311320100009>
51. Zortea, K., Franco, V. C., Francesconi, L. P., Cereser, K. M. M., Lobato, M. I. R., & Belmonte-de-Abreu, P. S. (2016). Resveratrol supplementation in schizophrenia patients: A randomized clinical trial evaluating serum glucose and cardiovascular risk factors. *Nutrients*, 8(2), 73. <https://doi.org/10.3390/nu8020073>
52. van der Made, S. M., Plat, J., & Mensink, R. P. (2015). Resveratrol does not influence metabolic risk markers related to cardiovascular health in overweight and slightly obese subjects: A randomized, placebo-controlled crossover trial. *PloS One*, 10(3), e0118393. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118393>



HPLC Tekniği ve Kullanım Alanları

HPLC Technique and Usage Areas

Aydın Şükrü BENGÜ¹ 

ÖZ

Sıvı kromatografinin yaygın kullanılan bir çeşidi olan HPLC sağlık ve fen alanında geniş kullanım alanlarına sahiptir. Son dönemde geliştirilen UHPLC tekniğinin birçok avantajı olmakla beraber pahalı olması kullanımını sınırlamaktadır. Bu derleme ile yeni başlayanlar için kullanıma yönelik pratik laboratuvar bilgileri verilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: HPLC, Metod seçimi Sıvı kromatografi, UHPLC.

ABSTRACT

HPLC, a widely used type of liquid chromatography, has a wide range of uses in health and science fields. Although the recently developed UHPLC technique has many advantages, it limits its use because it is expensive. With this review, it is aimed to give practical laboratory information for use for beginners.

Keywords: HPLC, Method selection, Liquid chromatography, UHPLC.

¹ Doçent Doktor, Aydın Şükrü BENGÜ, Biyokimya, Bingöl Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, abengu@bingol.edu.tr, ORCID No: 0000-0002-7635-4855

İletişim/Corresponding Author:
E-posta/E-mail:

Aydın Şükrü BENGÜ
abengu@bingol.edu.tr

Geliş Tarihi/Received : 10.05.2021
Kabul Tarihi/Accepted: 24.06.2021
Yayın Tarihi/Published: 30.06.2021

GİRİŞ

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi veya Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi olarak tanınan HPLC tekniği; sağlıktan ziraata kadar fen bilimlerinin birçok dalında kullanılan gelişmiş bir kromatografi tekniğidir. Bu derleme teknik bilgiden çok kullanım esnasında karşılaşılan sorunların aşılması, okunan bir makalenin daha iyi anlaşılabilmesi ve yeni kullanıcılara rehber olması amacıyla hazırlanmıştır.

Çözünür forma geçebilen tüm bileşikler (aminoasitler, şekerler, vitaminler, antibiyotikler, pestisitler, gıda tatlandırıcıları ve renklendiricileri ve bunların türevleri vb.) bu teknik ile kantitatif olarak hızlı ve güvenilir şekilde tespit edilebilmektedir. HPLC cihazını oluşturan başlıca bileşenler; mobil faz, pompa, kolon ve kolon fırını, degazör, otoörnekleyici ve enjektör, dedektörlerden oluşur. Bu elemanları kısaca açıklayalım.

Mobil faz; kullanılacak olan çözücüyü içeren hareketli fazdır. Hazırlanması basit gibi görünse de kolay bir örnekle hassasiyetini vurgulayalım. Örneğin mobil fazımız metanol/su (50:50) olsun. Bundan 1 litre hazırlayacak isek önce 500 mL metanol ile 500 mL saf suyu karıştırırsak son hacmin 1 litre değil 970 mL olduğunu fark ederiz. İşte bu karışımı mezürde birini ötekinin üzerine ilave ederek son hacmi ayarlamaya çalışarak yaparsak sonuç yanlış olacaktır. Ayrıca kullanılan suyun kalitesi mutlaka ultra saf su olmalı, karışım ultrasonik banyoda kabarcıklar bitene kadar bekletilmelidir. Pompa; mobil fazı örnekle beraber kolona ve dedektöre taşıyan sistemdir ve HPLC'nin kalbi diyebiliriz. Çünkü akışı istenilen sabit basınçta yapması lazım bunun içinde kullanıcının pompa bakımını ihmal etmemesi gereklidir. Tampon çözelti içeren mobil fazların kullanımından sonra pompanın temizlenmesi için 30-45 dakika saf çözücü geçirilmesi tavsiye edilir. Aksi takdirde bir sonraki kullanımda pompa tıkanacak ve sökölüp temizlenmesi kaçınılmaz olacaktır. Bu da zaman kaybı demektir.

Kolon; ayırımın gerçekleştiği esas yerdir ve seçimi bu yüzden önem taşır. Eğer sistemimizde kolon fırını da varsa sıcaklığı da kontrol edebiliriz ki bu çalışmamızın hassasiyetini arttıracaktır. Her yeni kolon ilk takıldığında üreticinin tavsiye ettiği gibi bir mobil faz geçirilerek şartlandırılmalıdır. Bu işlem yaklaşık 30-45 dakikadır. Ayrıca kolon değişimi yaparken de sökülen kolonlar uygun çözücü ile yıkanıp, her iki ucu kapatılıp saklanabilir.

Degazör; mobil fazın kolona gelene kadar sistemde oluşabilecek hava kabarcıklarının atılması görevini görür.

Oto örnekleyici ve enjektörler; örnekten istenilen miktarda çekilerek mobil fazla beraber kolona verilmesini sağlar. Eski HPLC cihazlarında manuel enjeksiyon kullanılıyordu, bu hem hata payını arttırıyordu hem de kullanıcının cihaz başında beklemesini mecbur bırakıyordu. Oysa oto örnekleyiciye (otosampler) sahip bir HPLC sisteminde 90 örneğe kadar yükleme yapıp çalıştırılabilir, burada sadece mobil fazın çalışma esnasında bitmeyeceğinden emin olmamız lazım. Hatta sisteme kapanma saatini ayarlayıp gitme imkanımız bile yazılımsal olarak mümkündür.

Dedektörler; örnekteki analitleri ölçülebilir sinyallere çevirerek kantitatif analize imkan sağlar. Absorbans (UV, DAD) dedektör, floresans dedektör, kırılma indisi dedektörü (RID), elektrokimyasal dedektör ve iletkenlik dedektörü gibi çeşitleri vardır. Hatta son zamanlarda HPLC ye kütle dedektörü (MS) bile eşzamanlı olarak entegre edilebilmektedir. HPLC sistemine takılı olunan dedektör yapmak istenilen çalışma için sınırlayıcı özelliكتedir. Mesela şekerli bileşikler (glukoz, früktoz, sakkaroz gibi) çalışabilmek için mutlaka RID dedektör gereklidir. Ama fenolik bileşikler, antibiyotik, pestisit gibi çalışmalar için UV veya DAD dedektör kullanılabilir. DAD dedektörün UV den daha hassas olduğunu vurgulamakta fayda var.

Mobil faz polar ve kullanılan kolon apolar ise **ters faz kromatografi** adını alır ki en sık kullanılan türü budur. Eğer mobil faz apolar ve kolon polar ise **normal faz kromatografi** adını alır.

Mobil faz tek çeşit ise izokrotik akış modu kullanılacaktır, ayrımı kolay olan bileşiklerde tercih edilir. Mobil fazdan birden fazla ve 2-4 arasında ise low pressure gradient veya high pressure gradient modu kullanılacaktır, ayrımı daha zor olan bileşiklerde tercih edilir. Low pressure gradientte karışım pompadan önce olurken high pressure gradientte pompadan sonra olmaktadır.

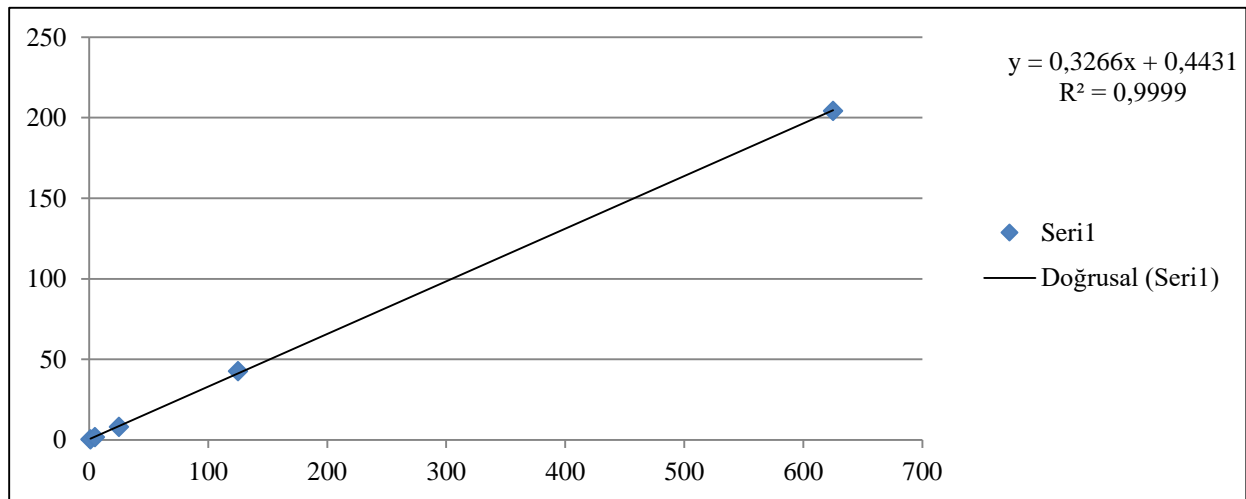
Kromatografide ayırım kolonda olduğu için kolon seçimi hayati öneme sahiptir. Piyasada çeşitli amaçlar için üretilmiş çok sayıda kolon mevcuttur. C8, C18, C amin, kiral kolon vb. Kolonların uzunluğu, genişliği ve dolgu maddesinin por çapı da değişkendir.

HPLC ye verilecek tüm örnekler hava kabarcığı ve partikül içermemelidir. Bu kolonun ömrü ve analizin hassasiyeti açısından önemlidir. Unutmayalım ki bir kolon ile 10 analizde yapılabilir, 500 analiz de yapmak mümkündür. Örnek hazırlamadaki gösterilen hassasiyet kolonun ömrünü belirleyecektir. Mobil faz içerisindeki hava kabarcığını ultrasonik banyoda gidermek ve örnekteki gözle görülemeyen partiküllerin giderilmesi için

0.22 veya 0.45 mikron enjektör ucu filtre kullanılması elzemdir.

İlgilendiğimiz bir bileşiği HPLC de analiz edebilmek için, o bileşiğe ait dalga boyu, akış hızı, kolonun cinsi, sıcaklık ve dedektör bilgilerine ihtiyaç vardır. Sayılan tüm bilgilere sahip isek ve laboratuvarımızdaki HPLC konfigürasyonu buna (dedektör, pompa, kolon açısından) uygun ise bu analiz yapabilir anlamına gelir. Bunun için aranan maddenin standardından en az 5 noktalı standart grafik çizmek gerekir. Standartlar ile aranan maddenin alıkonma zamanı (retention time- Rt) öğrenilir ve daha sonra aynı koşullar altında aynı dakikada gelen pik için aranan bileşik denilebilir. Son olarak örnekleri bu standart grafiğe karşı kıyaslayarak kantitatif olarak tespit edilir.

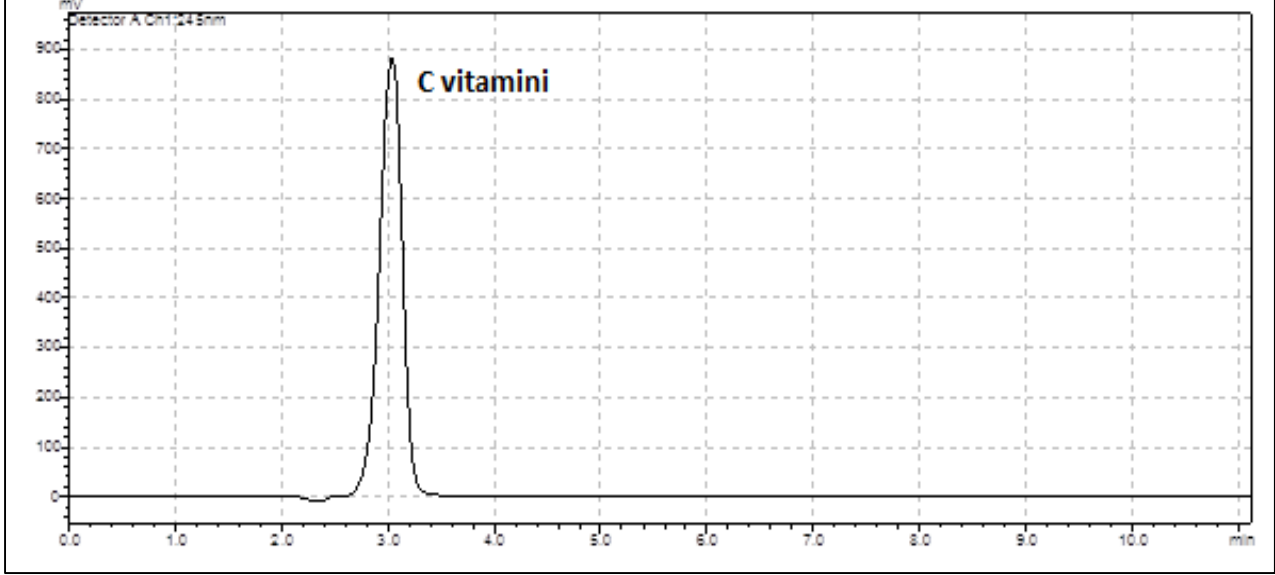
Örneğin 1, 5, 25, 125 ve 625 ppm lik C vitamini standartlarına karşılık gelen absorbans değerleri sırasıyla 0.36, 1.74, 8.21, 42.68 ve 204.33 olan bir çalışma verilerinin standart grafiği aşağıdaki gibi excelden çizdirilip R^2 değeri (0.9999) ve ilgili formül ($Y=0.3266X+0.4431$) elde edilebilir. Her ne kadar günümüz teknolojisinde bu grafikleri cihazların yazılımları tarafından çizdirilse de öğrenilmesinde fayda vardır. Daha sonra içerisinde C vitamini değeri aranan numunenin absorbans değeri bu formül kullanılarak hesaplanılır. Eğer çalışmanın ön hazırlık aşamasında seyreltme yapıldıysa seyreltme faktörü ile çarpılarak nihai sonuç ppm cinsinden elde edilir.



Şekil 1. Örnek bir standart grafik çizimi ve formül hesaplama

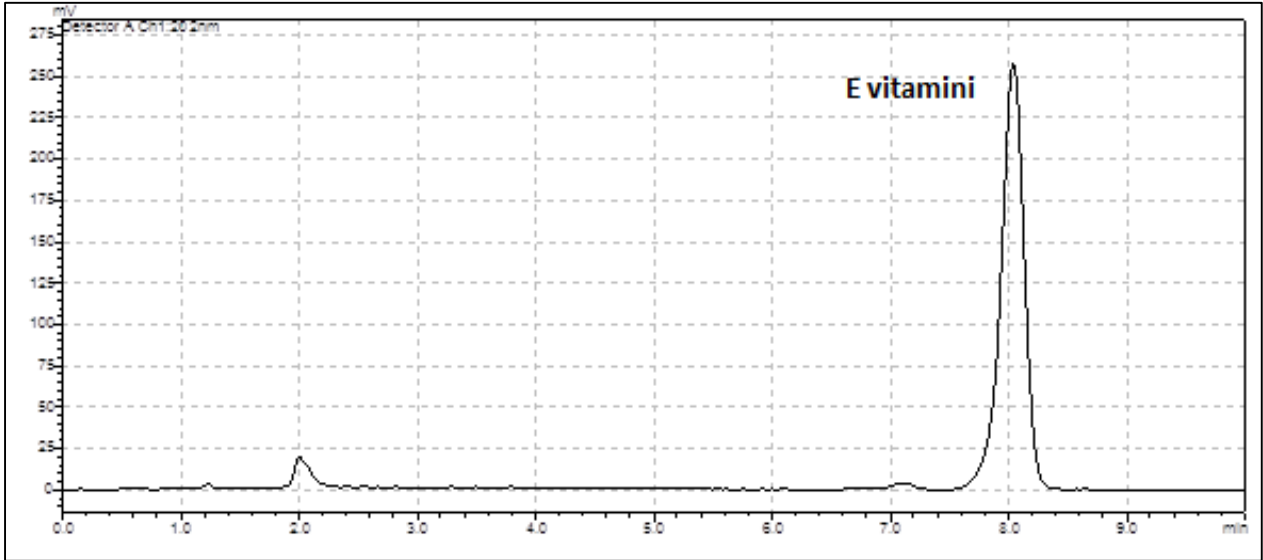
Aşağıda vitamin analizinde kullanılan HPLC koşulları ve kromatogramlarından bazı örnekler verilmiştir. Tüm örnekler C18 kolon 25 cm x 4.6 mm x 5.0, ters faz kolonu ile çalışılmıştır.

C vitamini için; dalga boyu 245 nm, akış hızı 1 mL/ dakika, kolon sıcaklığı 30 °C, mobil faz % 0.5 formik asit.

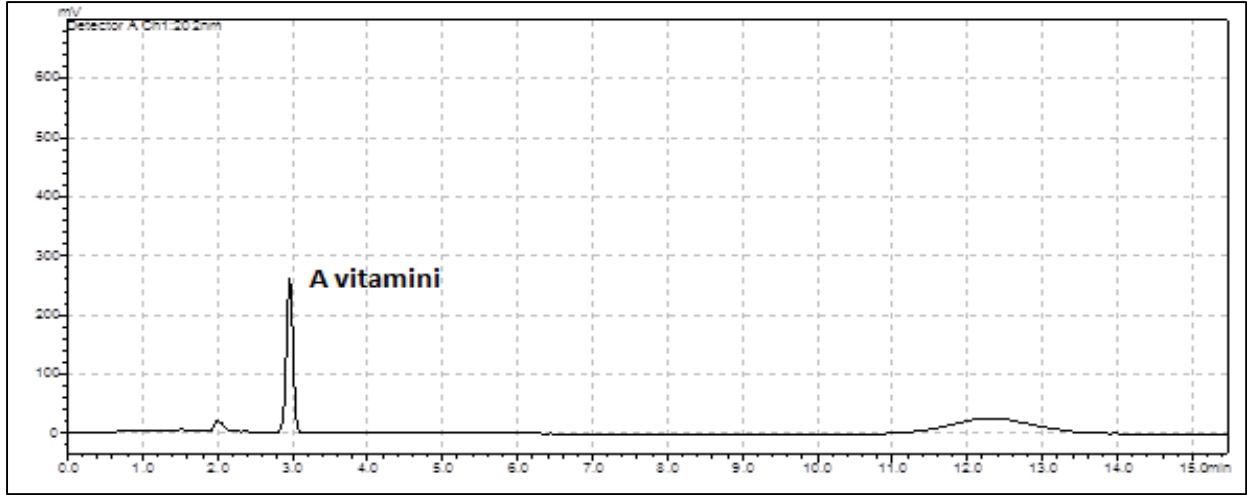


Şekil 2. C vitaminine ait HPLC kromatogramı

A ve E vitamini için; dalga boyu 202 nm, akış hızı 1 mL/ dakika, kolon sıcaklığı 30 °C, mobil faz % 75 acetonitril / %25 metanol.



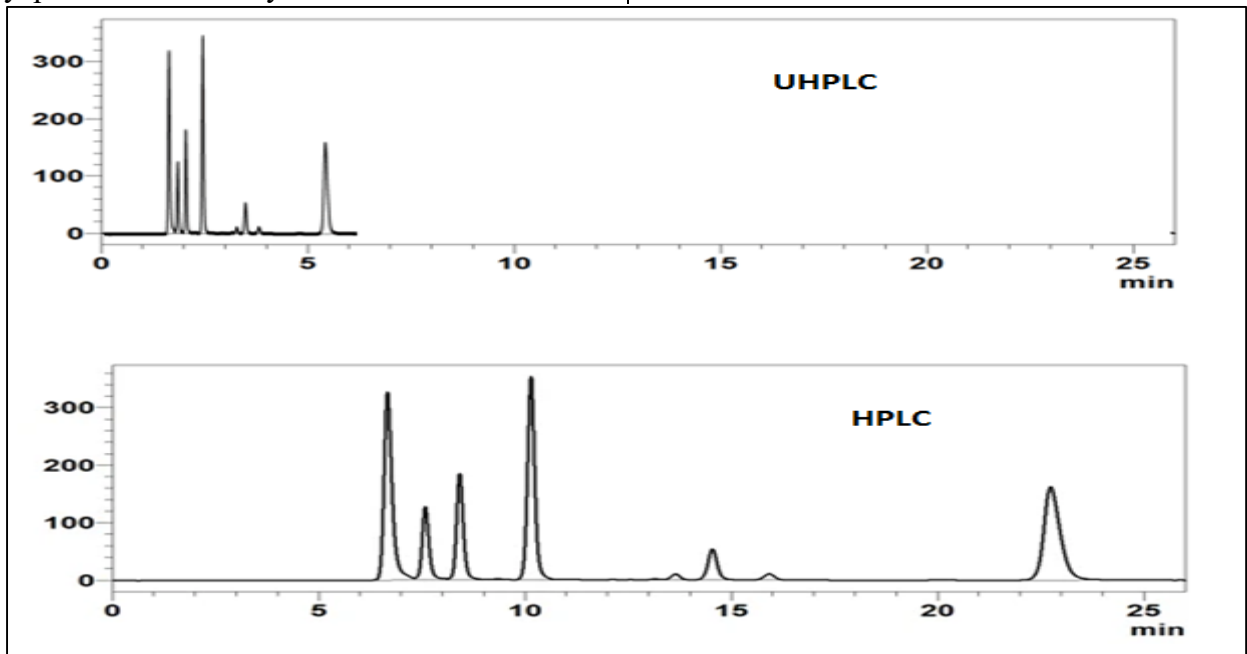
Şekil 3. E vitaminine ait HPLC kromatogramı



Şekil 4. A vitaminine ait HPLC kromatogramı

Son yıllarda HPLC cihazının pompasının daha güçlendirilerek, kolon ve bağlantı parçalarının da daha dayanıklı malzemeler ile güçlendirilmesi sayesinde UHPLC (ultra yüksek performanslı sıvı kromatografi) cihazları üretilebilmiştir. HPLC ile aynı prensiple çalışan UHPLC cihazları çok daha hızlı sonuç verdiği ve dolayısı ile çok daha az mobil faz harcadığı için gün geçtikçe popüler hale gelmektedir. Çünkü çok sayıda numune sahip çalışmalarda zaman daha da önem kazanmaktadır. Mesela HPLC ile 25 dakikalık bir analiz süresi ve 150 numune varsa UHPLC ile yaklaşık 6 dakikaya düşecektir (1). $25 \times 150 = 3750$ dakikalık bir analiz süresi $6 \times 150 = 900$ dakikaya düşecektir. Zamandan yapılan tasarrufun aynı oranda mobil fazdan

da yapıldığını ve dolayısı ile çok daha az kimyasal çözücünün kullanılarak analiz maliyetinin de düşeceğini belirtmekte fayda vardır. Burada daha az mobil faz giderinin beraberinde mobil faz şişesinin boşaldığında tekrar tekrar hazırlanıp, degazörden gazının kaçırılması işlemlerinden ötürü iş gücü ve zaman tasarrufu da olduğunu belirtmekte fayda görüyorum. Ayrıca UHPLC sisteminde numune injeksiyon hacmi de daha düşük olacağından numune miktarı az olan çalışmalar için avantaj sağlayacaktır. Aşağıdaki şekilde aynı numunenin UHPLC ve HPLC kromatogramları görülmektedir. Bazı analizlerde sistemin 10 kata kadar zamanı kısalttığı da olabilmektedir.



Şekil 5. UHPLC ile HPLC ayırımının farkını gösteren örnek bir analiz

UHPLC sisteminin tek dezavantajı pahalı olmasıdır. Birçok üniversite laboratuvarları, resmi kurum ve özel laboratuvarlar bu yüzden hala HPLC sistemlerini kullanmaya devam etmektedirler.

HLPC veya UHPLC sistemlerinin kullanımı sağlık ve fen bilimleri alanlarında oldukça yaygındır. Suda veya diğer çözücülerde (alkol ve türevleri gibi)

çözünebilen tüm bileşiklere bakılabilmektedir. Çeşitli proteinler, protein yapısındaki hormonlar, amino asitler ve türevleri, şekerler, vitaminler, kısa zincirli yağ asitleri, gıdalara katılan tatlandırıcı ve koruyucular, organik asitler, antibiyotik ve pestisitlerin bir kısmı hızlı ve hassas bir şekilde analizi yapılan ve ilk akla gelen örneklerdir.

SONUÇ

Sıvı kromatografinin en yaygın kullanılan ve güvenilen çeşidi olan HPLC ve onun yeni versiyonu diyebileceğimiz UHPLC hem araştırma hemde ticari laboratuvar analizlerinde geçerliliğini korumaktadır. Hızlı ve güvenilir olması sebebiyle geçmişte spektrofotometrik olarak yapılabilen bir çok analiz önce HPLC ye sonra da kademeli olarak UHPLC ye taşınmaktadır.

Son olarak kromatografi ve HPLC konusunda yeni araştırmacılar, beğenilen bir çalışmanın metodunu kendi imkanlarınız ile tekrar edebilmeniz için şu bilgilere ihtiyaç vardır; dedektör çeşidi, dalga boyu, kolon ve mobil faz. Ayrıca piklerin ayırım gücü ve

kalitesi için de sıcaklık ve akış hızı bilgileri gereklidir.

Örneğin balda glukoz/fruktoz tayini için RID dedektörlü HPLC sistemi gereklidir. Bu analizi diğer dedektörler ile yapamayız. Fakat RAD dedektörlü analizler UV dedektör ile kısmen yapılabilir.

İyi bir HPLC kullanıcısı günün birinde laboratuvarına UHPLC gelirse yeni sisteme çok hızlı adapte olabilir ve mevcut metodlarını yeni sisteme uyarlayabilir. İnternette cihaz ve kolon üretici firmalarının bu konudaki doküman ve linklerini bulmak mümkündür.

KAYNAKLAR

1. <https://www.ssi.shimadzu.com/products/liquid-chromatography/knowledge-base/hplc-vs-uhplc.html> erişim tarihi: 10.05.2021