

**SAMANDAĞ (HATAY) BİBERİNDEN AFİNİTE
KROMATOĞRAFİSİ İLE KAPSAİSİN
SAFLAŞTIRILMASI**

**CAPSAICIN PURIFICATION FROM SAMANDAG
(HATAY) PEPPER WITH AFFINITY
CHROMATOGRAPHY**

SEZGİN GÜNDÜZ

PROF. DR. LOKMAN UZUN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Kimya Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

Canım oğlum
Ali Rüzgar'a

ÖZET

SAMANDAĞ (HATAY) BİBERİNDEN AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ İLE KAPSAİSİN SAFLAŞTIRILMASI

Sezgin GÜNDÜZ

Yüksek Lisans, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Lokman UZUN

Eş Danışman: Doç. Dr. Mehmet Emin ÇORMAN

Şubat 2021, 94 sayfa

Bu tez çalışması kapsamında özellikle sağlık sektöründe önemli bir yere sahip kapsaisinin yerel bir ürün olan Samandağ (Hatay) biberinden saflaştırılarak elde edilmesi amaçlanmıştır. Endemik bir tür olan Samandağ biberinin kapsaisin içeriği kuru ve yaş halde incelendikten sonra yeşil, dolma ve kapy biber içerikleri ile karşılaştırılmıştır. Kapsaisin tayini Soxhlet ekstraksiyonu ile başlatılmış ve bu amaçla metanol, etanol ve asetonitril olmak üzere üç farklı çözücü seçilmiştir. Ekstraksiyonun optimize hale getirilebilmesi için seçilen her bir çözücüde üç farklı sıcaklık ve üç farklı zaman parametresi çalışılmıştır. Soxhlet ekstraksiyonu sonucu kapsaisin veriminin 1780.9 µg/g ile 80°C'de ve 3 saat metanol çözücüsü kullanılarak elde edildiği tespit edilmiştir. Ekstraksiyon sonucu elde edilen ekstraktlar, kapsaisin içeriklerinin tayini ve saflaştırılması amacıyla önce tek boyutlu HPLC ile analiz edilmiş ve kapsaisinoidlerden

yalnızca kapsaisin ve dihidrokapsaisin tespit edilebildiği görölmüştür. Kurutulmuş kırmızı biberin analizi sonucunda 1780.9 µg/g kapsaisin ve 897.8 µg/g dihidrokapsaisin elde edilebildiği, toplam kapsaisinoid miktarı dikkate alındığında ise acılık değerinin 40185.5 S.Ü. (Scoville Ünitesi) olduğu hesaplanmıştır. Yaş kırmızı biberde ise 105.4 µg/g kapsaisin ile 66.48 µg/g dihidrokapsaisin elde edilebilmiştir. Tek boyutlu HPLC analizi sonucunda dolma ve kapy biberlerde kapsaisinoid tespit edilememiştir. Kapsaisinoidlerin daha yüksek bir verimle eldesi ve saflaştırılması amacıyla iki boyutlu HPLC analizi yapılmış analiz sırasında sentezlenen ve karakterizasyonu yapılan p(HEMA-MATrp) monolitik kolonu ilk kolon olarak kullanılmıştır. Böylelikle hem ön deriştirme yapılmış hem de kolonda tutunan kapsaisinoid miktarı arttırılmıştır. İkinci kolon olarak ticari C-18 kolonu kullanılmış ve analiz sonucunda kapsaisin, dihidrokapsaisin, nordihidro-kapsaisin ve homokapsaisin olmak üzere dört farklı kapsaisinoidin tespit edilebildiği gözlenmiştir. İki boyutlu HPLC analizi sonucunda toplam kapsaisinoid miktarının 3853.7 µg/g'a yükseldiği ortaya konulmuştur. Tez çalışması sonucunda önemli bir biyoaktif molekül olan kapsaisin yerel bir ürün olan Samandağ biberinden saf halde elde edilebildiği kanıtlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Soxhlet ekstraksiyon, kapsaisinoid, kapsaisin, HPLC

ABSTRACT

CAPSAICIN PURIFICATION FROM SAMANDAG (HATAY) PEPPER WITH AFFINITY CHROMATOGRAPHY

Sezgin GÜNDÜZ

Master of Science, Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Lokman UZUN

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mehmet Emin ÇORMAN

February 2021, 94 pages

Within the scope of this thesis, it was aimed to purify capsaicin, which has an important place in the health sector, from Samandağ pepper, a local product. The capsaicin content of Samandağ pepper, which is an endemic species, was examined in dry and wet form and compared with the contents of green, stuffed and capia peppers. Capsaicin determination was started with Soxhlet extraction and three different solvents, methanol, ethanol and acetonitrile, were selected for this purpose. In order to optimize the extraction, three different temperature and three different time parameters were studied in each selected solvent. It was determined that capsaicin yield as a result of Soxhlet extraction was obtained at 1780.9 µg/g at 80°C and by using methanol solvent for 3 hours. The extracts obtained as a result of the extraction were first analyzed by one-dimensional

HPLC for the determination and purification of capsaicin content, and it was observed that only capsaicin and dihydrocapsaicin could be detected among capsaicinoids. As a result of the analysis of dried red pepper, it was calculated that 1780.9 $\mu\text{g/g}$ capsaicin and 897.8 $\mu\text{g/g}$ dihydrocapsaicin could be obtained, and considering the total amount of capsaicinoids, the pungency value was calculated as 40185.5 SU (Scoville Units). In fresh red peppers, 105.4 $\mu\text{g/g}$ capsaicin and 66.48 $\mu\text{g/g}$ dihydrocapsaicin could be obtained. As a result of one-dimensional HPLC analysis, capsaicinoid was not detected in stuffed and capia peppers. In order to obtain and purify capsaicinoids with a higher yield, two-dimensional HPLC analysis was performed and the p(HEMA-MATrp) monolithic column synthesized and characterized during the analysis was used as the first dimensional column. Thus, both preconcentration was made and the amount of capsaicinoid held in the column was increased. Commercial C-18 column was used as the second dimensional column and it was observed that four different capsaicinoids, namely capsaicin, dihydrocapsaicin, nordihydrocapsaicin, and homocapsaicin, could be detected at the end of the analysis. As a result of the two-dimensional HPLC analysis, it was revealed that the total amount of capsaicinoid increased to 3853.7 $\mu\text{g/g}$. As a conclusion of the thesis study, it has been proven that capsaicin, an important bioactive molecule, can be obtained in pure form from Samandağ pepper which is a local product.

Keywords: Soxhlet extraction, capsaicinoid, capsaicin, HPLC

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarım süresince bana her konuda desteğini esirgemeyen, tüm deneyimleriyle bana yol gösteren sayın danışman hocam Prof. Dr. Lokman UZUN'a,

Çalışmalarım süresince bana yardımcı olan, sorularımı yanıtızsız bırakmayan, sayın Danışman hocam Doç. Dr. Mehmet Emin ÇORMAN'a

Tez çalışmam boyunca bana her konuda yardımcı olan arkadaşım Tunca'ya, motivasyonumu sürekli yüksek tutan Miraç'a ve Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı, Biosmart Araştırma Grubu'ndaki tüm arkadaşlarıma,

Tez çalışma sürecimdeki tüm zorlukları benle beraber yaşayan ve kendisine zaman ayırmakta zorlandığım canım oğlum Ali Rüzgar'a, akademik çalışmalar açısından beni sürekli teşvik eden ve yönlendiren değerli ablam Prof. Dr. Hülya GÜNDÜZ ÇEKMECELİOĞLU'na, tüm eğitim ve çalışma hayatım boyunca yanımda duran, bana her türlü desteği sağlayan canım annem ve babama teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FYL-2019-17742 numara ile Lisansüstü Tez Destek Projesi olarak desteklenmiştir. Bu bağlamda; Üniversite Yönetimi'ndeki ve Bilimsel Araştırma Birimi'ndeki tüm hocalarımıza ve çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Sezgin Gündüz

Şubat 2021

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Biyoaktif Bileşiklerin Tanımı ve Tarihi.....	2
2.2. Biyoaktif Bileşiklerin Sentezi ve Sınıflandırılması.....	3
2.3. Kapsaisinoidler ve Kapsinoidler.....	4
2.3.1. Kapsinoidlerin ve Kapsaisinoidlerin Farmakolojik Etkileri.....	7
2.3.1.1. Ağrı Kesici.....	7
2.3.1.2. Kanserden Korunma.....	8
2.3.1.3. Kilo Verdirme.....	10
2.3.1.4. Kardiyovasküler Faydaları.....	11
2.3.1.5. Gastrointestinal Faydaları.....	12
2.3.2. Kapsaisinoidler ve Kapsinoidlerin Çalışma Mekanizmaları.....	13
2.4. Ekstraksiyon Yöntemleri.....	15
2.4.1. Soxhlet Ekstraksiyonu.....	15
2.5. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	18
2.5.1. Afinite Kromatografisi.....	23
2.5.1.1. Monolitik Kolonlar.....	26
2.5.2. İki Boyutlu Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (2D-HPLC).....	27
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	30
3.1. Kimyasal Malzemeler.....	30
3.2. Poli(HEMA-MATrp) Monolitik Kolonunun Sentezi.....	30
3.3. Poli(HEMA-MATrp) Monolitik Kolonunun Karakterizasyonu.....	31
3.3.1. FTIR-ATR ile Yapı Analizi.....	31

3.3.2. Yüzey Morfolojisi.....	31
3.3.3. Termogravimetrik Analiz (TGA).....	31
3.3.4. Yüzey Alanı Ölçümü (BET) Analizi	32
3.4. Poli(HEMA-MATrp) Monolitik Kolonları ile Kapsaisin Adsorpsiyonu	32
3.5. Soxhlet Ekstraksiyonu	33
3.6. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Analizleri.....	33
3.6.1. Kurutulmuş Biber Örneklerinin HPLC Analizi	33
3.6.2. Farklı Biber Örneklerinin HPLC analizi.....	34
3.7. İki Boyutlu Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (2D-HPLC) Analizi	35
3.7.1. Kurutulmuş Biber Örneklerinin 2D-HPLC Analizi.....	35
3.7.2. Farklı Biber Türlerinde Kapsaisinin Ön-Deriştirilmesi ve Saflaştırılması ...	37
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	38
4.1. P(HEMA) ve P(HEMA-MATrp) Monolitik Kolonların Karakterizasyonu	38
4.1.1. FTIR-ATR ile Yapı Analizi.....	38
4.1.2. Yüzey Morfolojisi.....	39
4.1.3. Termogravimetrik Analiz (TGA) Sonuçları	41
4.1.4. Yüzey Alanı Ölçümü (BET) Analizi	42
4.2. Poli(HEMA-MATrp) Monolitik Kolonları ile Kapsaisin Adsorpsiyonu	45
4.3. Soxhlet Ekstraksiyonu Koşullarının Optimizasyonu.....	46
4.4. Tek Boyutlu HPLC Analizleri	50
4.4.1. Kurutulmuş Biber Örneklerinin HPLC Analizi	50
4.4.2. Farklı Biber Örneklerinin HPLC Analizi.....	57
4.5. İki Boyutlu HPLC Sistemi	58
4.5.1. Kapsaisinin Saflaştırılması	58
4.5.2. Farklı Biber Türlerinden Kapsaisinin Ön-Deriştirilmesi ve Saflaştırılması .	60
5. YORUM.....	62
6. KAYNAKLAR	63
EKLER.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
EK 1 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ÖZGEÇMİŞ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Bitkilerdeki biyoaktif bileşiklerin farklı kategorilerinin kimyasal yapıları; alkaloidler (a1 ve a2), monoterenler (b), seskiterpenler (c), triterpenler, saponinler, steroid (d), flavonoid (e), poliasetilenler (f), poliketidler (g) [9].	4
Şekil 2.2. Kapsaisinoid ve kapsinoidlerin kimyasal yapıları.	6
Şekil 2.3. Klasik Soxhlet ekstraksiyon düzeneği [77].....	17
Şekil 2.4. Afinite kromatografisinin şematik gösterimi.	24
Şekil 2.5. (A) Tek boyut ve (B) 2D-HPLC sistemine ait çizimler.	27
Şekil 4.1. Poli(HEMA) ve Poli(HEMA-MATrp) polimerlerine ait FTIR spektrumları.	39
Şekil 4.2. Monolitik kolonların SEM fotoğrafları; (A) P(HEMA), (B) P(HEMATrp)...	40
Şekil 4.3. P(HEMA) ve p(HEMA-MATrp) termogramları.	42
Şekil 4.4. P(HEMA) monolitik kolonuna ait BET yüzey alanı ölçümü azot gazı adsorpsiyon-desorpsiyon grafiği.	43
Şekil 4.5. P(HEMA-MATrp) monolitik kolonuna ait BET yüzey alanı ölçümü azot gazı adsorpsiyon-desorpsiyon grafiği.	44
Şekil 4.6. P(HEMA-MATrp) monolitik kolonda kapsaisin adsorpsiyonuna kapsaisinin başlangıç derişiminin etkisi.	46
Şekil 4.7. Metanol ile ekstrakte edilen kapsaisin miktarı süre-zaman ilişkisi.....	47
Şekil 4.8. Etanol ile ekstrakte edilen kapsaisin miktarı süre-zaman ilişkisi.	48
Şekil 4.9. Asetonitril ile ekstrakte edilen kapsaisin miktarı süre-zaman ilişkisi.....	49
Şekil 4.10. Kurutulmuş biber numunesindeki kapsaisinodilerin HPLC kromatogramları (Metanol: 85°C).....	51
Şekil 4.11. Kurutulmuş biber numunesindeki kapsaisinodilerin HPLC kromatogramları (Metanol: 80°C).....	51
Şekil 4.12. Kurutulmuş biber numunesindeki kapsaisinodilerin HPLC kromatogramları (Metanol: 75°C).....	52
Şekil 4.13. Kurutulmuş biber numunesindeki kapsaisinodilerin HPLC kromatogramları (Etanol: 95°C).....	53
Şekil 4.14. Kurutulmuş biber numunesindeki kapsaisinodilerin HPLC kromatogramları (Etanol: 88°C).....	53

Şekil 4.15. Kurutulmuş biber numunesindeki kapsaisinodilerin HPLC kromatogramları (Etanol: 100°C).....	54
Şekil 4.16. Kurutulmuş biber numunesindeki kapsaisinodilerin HPLC kromatogramları (Asetonitril: 90°C).....	55
Şekil 4.17. Kurutulmuş biber numunesindeki kapsaisinodilerin HPLC kromatogramları (Asetonitril: 95°C).....	55
Şekil 4.18. Kurutulmuş biber numunesindeki kapsaisinodilerin HPLC kromatogramları (Asetonitril: 100°C).....	56
Şekil 4.19. Kurutulmuş biber, yaş kırmızı biber, yaş yeşil biber dolma ve kapy biber HPLC kromatogramları.	57
Şekil 4.20. İki boyutlu HPLC sisteminde p(HEMA-MATrp) monolitik kolonlara adsorbe edilen kapsaisin ve diğer kapsaisinodilerin saflaştırılması.	59
Şekil 4.21. İki boyutlu HPLC sisteminde absorbe edilen kapsaisinoidler.....	60

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Bazı biberlerin acılık değerleri [23].	6
Çizelge 2.2. HPLC sisteminin avantajları ve dezavantajları [21].	20
Çizelge 2.3. Yaygın HPLC dedektörleri ve nitelikleri [21].	23
Çizelge 2.4. Afinite kromatografisinde ve monolitik kolonlarıyla kullanılan ligandlar [95].	25
Çizelge 3.1. Polimerizasyon reçetesi ve polimerizasyon koşulları.	30
Çizelge 3.2. Monolitik kolon HPLC parametreleri	33
Çizelge 3.3. Tek boyutlu HPLC parametreleri.	34
Çizelge 3.4. İki Boyutlu HPLC parametreleri.	36
Çizelge 3.5. 2D-HPLC çözücü gradient programı.	37
Çizelge 4.1. Monolitik kolonlara ait yüzey alanı ölçüm sonuçları.	45
Çizelge 4.2. Metanol çözeltisi ile ekstraksiyon verimi.	48
Çizelge 4.3. Etanol çözeltisi ile ekstraksiyon verimi.	49
Çizelge 4.4. Asetonitril çözeltisi ile ekstraksiyon verimi.	50
Çizelge 4.5. Metanol çözeltisi ile ekstraksiyon verimi.	52
Çizelge 4.6. Etanol çözücüsü ile ekstraksiyon verimi.	54
Çizelge 4.7. Asetonitril çözücüsünde ekstraksiyon verimi.	56
Çizelge 4.8. Farklı biber türlerindeki kapsaisinoid miktarları ve Acılık değerleri.	58
Çizelge 2.1. Bazı biberlerin acılık değerleri [23].	6
Çizelge 2.2. HPLC sisteminin avantajları ve dezavantajları [21].	20
Çizelge 2.3. Yaygın HPLC dedektörleri ve nitelikleri [21].	23
Çizelge 2.4. Afinite kromatografisinde ve monolitik kolonlarıyla kullanılan ligandlar [95].	25
Çizelge 3.1. Polimerizasyon reçetesi ve polimerizasyon koşulları.	30
Çizelge 3.2. Monolitik kolon HPLC parametreleri	33
Çizelge 3.3. Tek boyutlu HPLC parametreleri.	34
Çizelge 3.4. İki Boyutlu HPLC parametreleri.	36
Çizelge 3.5. 2D-HPLC çözücü gradient programı.	37
Çizelge 4.1. Monolitik kolonlara ait yüzey alanı ölçüm sonuçları.	45
Çizelge 4.2. Metanol çözeltisi ile ekstraksiyon verimi.	48

Çizelge 4.3. Etanol çözeltilisi ile ekstraksiyon verimi.....	49
Çizelge 4.4. Asetonitril çözeltilisi ile ekstraksiyon verimi.	50
Çizelge 4.5. Metanol çözeltilisi ile ekstraksiyon verimi.....	52
Çizelge 4.6. Etanol çözücüsü ile ekstraksiyon verimi.	54
Çizelge 4.7. Asetonitril çözücüsünde ekstraksiyon verimi.....	56
Çizelge 4.8. Farklı biber türlerindeki kapsaisinoid miktarları ve Acılık değerleri.	58

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

PC	Pik Kapasitesi
Q	Adsorpsiyon kapasitesi (ng/g)
R_s	Ayırıcılık
t_R	Alıkonma zamanı

Kısaltmalar

1D-HPLC	Tek-Boyutlu Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
2D-HPLC	İki-Boyutlu Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
ACN	Asetonitril
HPLC	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
P(HEMA)	Poli(2-Hidroksietil Metakrilat)
P(HEMA-MATrp)	Poli(2-Hidroksietil Metakrilat-N-Metakriloil-L-Triptofan)
EGDMA	Etilen Glikol Dimetakrilat
KAP	Kapsaisin
DHKAP	Dihidroksapsaisin
N-DHKAP	Nordihidroksapsaisin
HKAP	Homokapsaisin
BET	Yüzey Alanı Ölçümü Analizi
TGA	Termogravimetrik Analiz
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
LOD	Teşhis sınırı
LOQ	Tayin alt sınırı

1. GİRİŞ

Biyoaktif bileşikler tıbbi özelliklerinin zenginliğinden ötürü hastalık tedavisi ve sağlıkta sıklıkla kullanılmaktadır. Biyoaktif bileşikler olan kapsaisinoidler ve kapsinoidler, ilaç ve kozmetik amaçlı kullanım potansiyeline bağlı olarak son yıllarda araştırmacıların büyük ilgisini çekmektedir. Kapsaisinoidlerin ve kapsinoidlerin ağrı kesici, kanser önleyici, kilo kaybettirici, kardiyovasküler ve gastrointestinal hastalıkları iyileştirici özellikleri nedeniyle bu maddelerin biberlerden saflaştırılması ekonomik değeri açısından büyük önem arz etmektedir. Geçmişten günümüze kapsaisinoidlerin saflaştırılması ve etki mekanizmaları üzerinde fazlaca akademik çalışma yapıldığı görülmektedir. Sunulan tez çalışmasında yerel bir ürün olan ve acılığıyla ünlü Hatay ili Samandağ ilçesinde endemik yetişen biber türü ele alınmış ve bu biberden kapsaisinoidlerin en temel bileşeni olan kapsaisinin saf halde elde edilmesi amaçlanmıştır. Biyoaktif bir molekül olan kapsaisinin saflaştırılması için öncelikle Soxhlet ekstraksiyonu kullanılmış bu amaçla uygun çözücü, sıcaklık ve zaman parametreleri optimize edilmiştir. Ekstraktın eldesinden sonra kapsaisin tayini, elde edilme verimi ve saflaştırılması için analizde önemli bir yer edinen yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılmıştır. Kromatografik analizde zaman, deriştirme, çözücü israfının engellenmesi, yüksek ayırıcılık ve verim artırımının sağlanabilmesi, daha ucuz ve tekrarlanabilir bir yöntem ortaya konulabilmesi hedeflenerek tek boyutlu ve iki boyutlu HPLC analizi yapılmıştır. Çalışmada afinite saflaştırma amacıyla kullanılacak birinci boyut kolonu, hidrofobik etkileşimler üzerinden yüksek tutuculuk sağlaması, kapsaisinoid bileşenlerinin birbirinden ayrılarak tayininin yapılabilmesi ve saf halde elde edilebilmesi amaçlanmıştır. Sonuç olarak; endemik yerel bir tür olan biber örneklerinden kapsaisinin ekstraksiyon optimizasyonu, tek boyutlu HPLC ile bileşen analizi ve iki boyutlu HPLC sistemi ile çevrimiçi ön-deriştirme ve saflık analizleri başarıyla gerçekleştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Biyoaktif Bileşiklerin Tanımı ve Tarihi

İnsanlık için kullanılan bitkilerin tarihi, insanlığın başlangıcına kadar uzanmaktadır. Başlangıçta insanlar bitkileri beslenme amacı için kullanmış, ancak tıbbi özelliklerin keşfedilmesinden sonra, bu doğal flora çeşitli insan toplulukları arasında yararlı bir hastalık tedavisi ve sağlığı iyileştirme kaynağı haline gelmiştir [1]. Mısır papirüsleri, kişniş ve hint yağının binlerce tarif aracılığıyla tıbbi uygulamalar, kozmetikler ve koruyucular için yararlı olduğunu göstermiştir [2]. Yunan ve Roma döneminde, bitkilerin binlerce terapötik kullanımı, Hipokrat, Theophrastus, Celsus, Dioscorides ve diğerleri gibi birkaç bilim insanı tarafından tanımlanmıştır [3]. Romanyalılar çok uzun zamandan beri şifalı ot kullanımlarıyla bilinmektedirler. Örneğin Herodot (M.Ö. V. Yüzyıl), yazılarında Tuna nehrinin kuzeyinde yaşayan insanlar tarafından *Leonurus cardiaca* (Aslan otu)'nın kullanıldığını bahsetmiştir. 19. yüzyılda Romanya farmakopesi bitkisel ürünleri tanıtmış ve 1904'te Cluj şehrinde ilk şifalı otlar enstitüsü kurulmuştur [2]. Bitkisel bitkilerin eski zamanlarda kullanılması aslında biyoaktif moleküllerin tarihini göstermektedir. Geçmişte, insanların biyoaktif moleküller hakkında hiçbir fikri olmamasına rağmen, bu bileşikler çeşitli amaçlar doğrultusunda yaygın olarak kullanılmaktaydı.

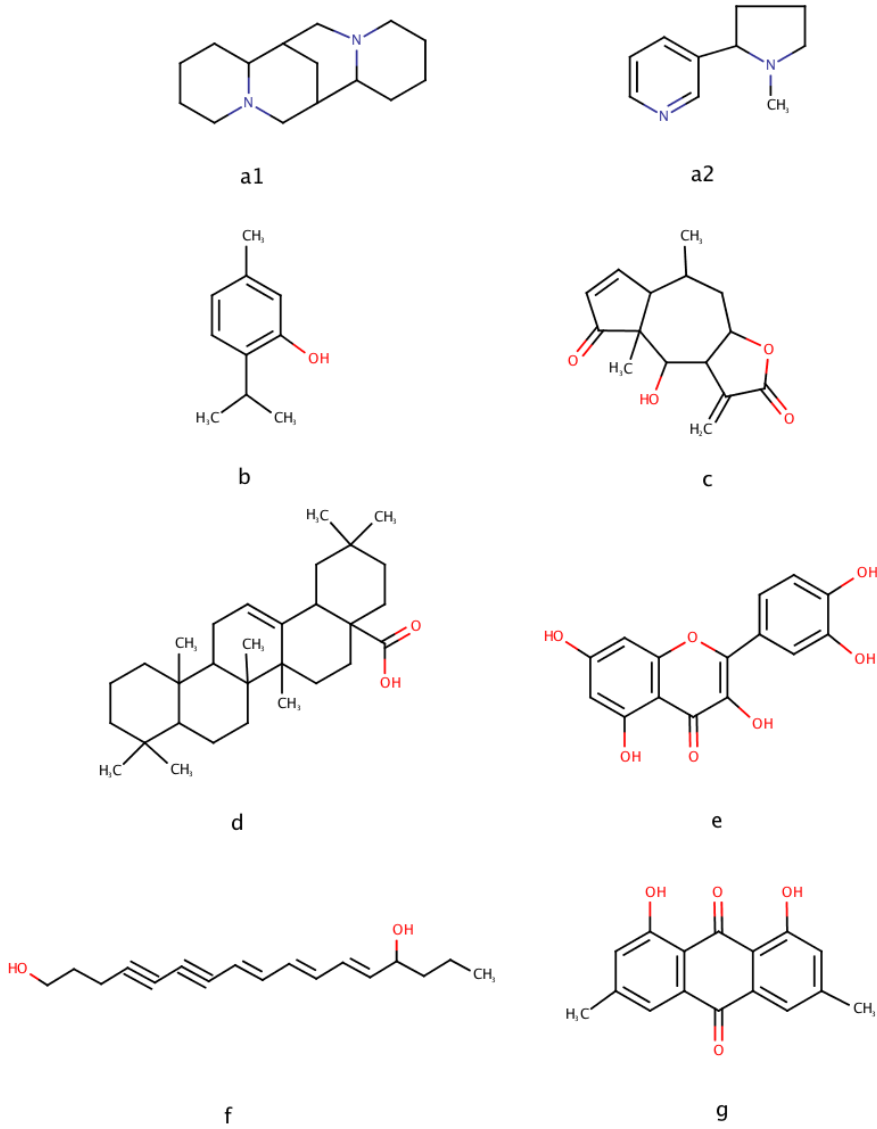
Tipik olarak, bitkilerin biyoaktif bileşikleri ikincil metabolitler olarak üretilirler [4]. Bir bakteriden, milyon hücre bitkisine kadar her canlı vücut, hayatta kalmaları ve yaşamaları için çeşitli kimyasal bileşikler işler [1]. Biyolojik sistemin tüm bileşikleri iki geniş alana bölünebilir. Biri karbonhidratlar, amino asitler, proteinler ve lipitler gibi büyümeyi ve gelişmeyi amaçlayan kimyasal maddeler olan birincil metabolitlerdir. Bir diğeri, bitkilerin çevreleriyle etkileşime girmelerine izin vererek yerel zorlukların üstesinden gelme ve hayatta kalma yeteneklerini artırmaya yardımcı olduğuna inanılan birincil metabolitler dışındaki bir bileşikler grubu olan ikincil metabolitlerdir [4]. Farklı bir deyişle, ikincil metabolitler, genellikle büyümeyi takip eden bir aşamada üretilen, büyümede hiçbir işlevi olmayan (hayatta kalma işlevi olsalar da), belirli sınırlı mikroorganizma taksonomik grupları tarafından üretilen, olağandışı kimyasal yapılarla sahip ve genellikle bir kimyasal ailenin yakından ilişkili üyelerinin karışımları olarak oluşturulan metabolitlerdir [5]. Farklı türlerde ikincil metabolitlerin üretimi, esas olarak değerlendirme süreci ve bu türün özel ihtiyacı ile seçilir. Örneğin, çiçek türleri tarafından

polenleşmeleri ve döllemeleri için böcekleri çekmek için aroma sentezi ve toksik kimyasal sentezi, komşu bitkilerin büyümesini bastırmak için patojenlere ve otçullara doğru evrilmiştir [6]. İkincil metabolitler arasında bu maddelerin bazıları biyoaktif olarak kabul edilen biyolojik sistemler üzerinde etkiye sahiptir. Bu nedenle bitkilerdeki biyoaktif bileşiklerin basit bir tanımını şudur: insan ve hayvanlarda farmakolojik veya toksikolojik etkileri ortaya çıkaran ikincil bitki metabolitleridir [4].

2.2. Biyoaktif Bileşiklerin Sentezi ve Sınıflandırılması

Biyoaktif bileşiklerin farklı kategorilerdeki sınıflandırılması hala tutarsızdır, daha ziyade belirli sınıflandırmanın amacına bağlıdır. Buna örnek olarak, farmakolojik sınıflandırmanın kapsamına uymayan biyosentetik yolların açıklamasını basitleştiren biyosentetik sınıflandırmalar verilebilir. Croteau ve ark bitkilerin biyoaktif bileşikleri üç ana kategoriye ayrılır: (a) terpenler ve terpenoidler (yaklaşık 25.000 tip), (b) alkaloidler (yaklaşık 12.000 tip) ve (c) fenolik bileşikler (yaklaşık 8000 tip) [7]. Farklı biyoaktif bileşik kategorilerinin genel yapıları Şekil 2.1’de verilmiştir.

Biyoaktif bileşiklerin çoğunluğu, her biri doğada oluştukları yoldan (biyosentez) kaynaklanan belirli yapısal özelliklere sahip olan birkaç aileden birine aittir. İkincil metabolitlerin veya biyoaktif bileşiklerin sentezi için dört ana yol vardır: (1) Şikimik asit yolu, (2) malonik asit yolu, (3) mevalonik asit yolu ve (4) mevalonat olmayan (MEP) yol [8]. Alkaloidler aromatik amino asitler (şikimik asit yolundan gelir) ve alifatik amino asitler (trikarboksilik asit döngüsünden gelir) tarafından üretilmektedirler. Fenolik bileşikler, şikimik asit yolu ve malonik asit yolu ile sentezlenmektedirler. Mevalonik asit yolu ve MEP yolu ile terpenler üretilmektedirler.



Şekil 2.1. Bitkilerdeki biyoaktif bileşiklerin farklı kategorilerinin kimyasal yapıları; alkaloidler (a1 ve a2), monoterenler (b), seskiterpenler (c), triterpenler, saponinler, steroid (d), flavonoid (e), poliasetilenler (f), poliketidler (g) [9].

2.3. Kapsaisinoidler ve Kapsinoidler

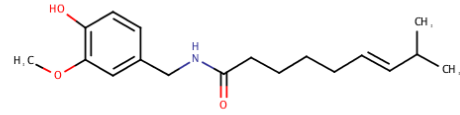
Tatlı biber gibi kırmızı biber bitkilerinin meyveleri (biberler) dünya çapında taze gıda maddesi olarak kullanılırken, işlenmiş ürünleri çeşitli mutfaklara renk ve aromatik tat katan acı biber de dahil olmak üzere baharat yapımında kullanılır. Dahası, biberler geleneksel olarak bazı toplumlar tarafından uyarıcı veya analjezik özellikleri için kullanılmaktadır. Biberlerin uyarıcı özelliklerinden (keskinlik) sorumlu maddeler, bir

grup lipofilik alkaloid olan kapsaisinoidlerdir. Doğadaki en bilinen kapsaisinoid, kapsaisin (KAP)'dir [10]. Kapsaisin, acı biberlerin ana aktif bileşenidir, bunu dihidrokapsaisin, nordihidrokapaisin, homodihidrokapaisin ve homokapsaisin vb. izler (Şekil 2.2) [11, 12]. Kapsaisinoidler, yağ asitlerinin ve vanililaminin kondenzasyonu ile biyosentezlenir ve biberin plasentası, kapsaisinoid biyosentezi için ana bölgedir [13]. Kapsaisinoidler hem polar hem de polar olmayan çözücülerde kararlıdır ve temas ettiği vücutta yanma hissi oluşturur [14]. Kapsinoidler, orijinal olarak acı olmayan, kültür bitkilerinde bulunan özgün bir grup olan kapsinoid benzeri bileşikler (*Capsicum annuum*) temsil eder [15, 16] ve daha sonraki çalışmalar, birçok keskin *Capsicum* türünün kapsinoidleri içerdiğini göstermiştir [17, 18]. Kapsinoidler, vanilil alkolün dallı zincirli bir yağ asidi esteri olarak tanımlanır ve doğada doğal olarak oluşan başlıca kapsinoidler, kapsiat (CST) ve dihidrokapsiat (DCT). Bu türlerin kimyasal yapıları, kapsinoidlerde bir ester bağı ve kapsaisinoidlerde bir amid bağı olan bağlantısı haricinde, başlıca kapsaisinoidlerinkine benzerdir. Kapsinoidler, kapsaisinoid benzeri fizyolojik ve biyolojik özellikleri ve kapsaisinoidlerin zararlı uyarılarından yoksun olmaları nedeniyle dikkatleri üzerine çekmiştir [19, 20].

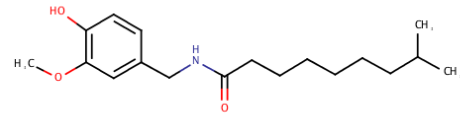
Biberlerde veya acı soslarda "acılık" değerlendirmenin geleneksel yolu, seyreltilmiş numunelerin bir dizi karşılaştırmalı değerlendirmesiyle "Scoville" ölçeği ile ölçülen bir tat panelidir. Tat paneli yöntemi öznel, maliyetli ve zaman alıcıdır. Kapsaisin, HPLC ile doğrudan (türevlendirilmeden) analiz edilebilir. Yöntem kesin ve hızlıdır. Sadece bir damla süzölmüş acı sos gerektirir [21]. Her bir numunenin "acılık" derecesi,

$$ppmH = \frac{[Kapsaisinin Pik Alanı + (0,82 \times Dihidrokapaisin Pik Alanı)]}{Standart Pik Alanı}$$

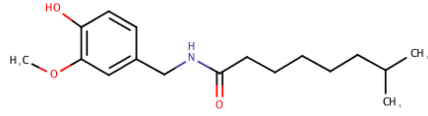
formülünden elde edilen acılık derişiminin (ppmH) değerinin 15 ile çarpılması ile hesaplanabilir [22]. Bazı biberlerin acılık değerleri Çizelge 2.1'de verilmiştir.



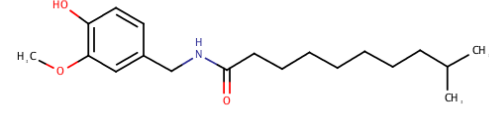
Kapsaisin



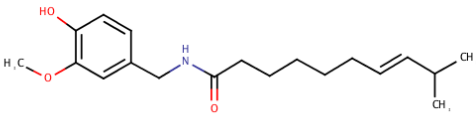
Dihidroapsaisin



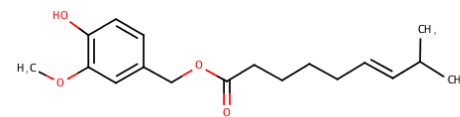
Nordihidroapsaisin



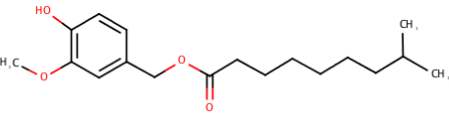
Homodihidroapsaisin



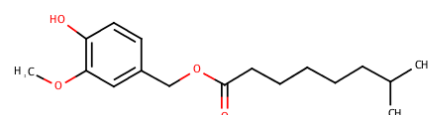
Homokapsaisin



Kapsiat



Dihidroapsiat



Nordihidroapsiat

Şekil 2.2. Kapsaisinoid ve kapsinoidlerin kimyasal yapıları.

Çizelge 2.1. Bazı biberlerin acılık değerleri [23].

Biber	Acılık (Scoville Ünitesi)
Dolmalık Biber	0
Anaheim	250-1400
Jalapeno	3000
Macar Sarı Biber	4000
Japon Acı Biberi	20000-30000
Tabasco	30000-50000
Cayenne	50000-100000
Kuş Gözü	100000-125000
Kumakata	125000-150000
Habanero	300000

2.3.1. Kapsinoidlerin ve Kapsaisinoidlerin Farmakolojik Etkileri

2.3.1.1. Ağrı Kesici

Ağrı kesici için en çok çalışılan kapsaisinoid kapsaisindir. Kapsaisinin, enflamatuvar ısıyı ve zararlı kimyasal hiperanaljeziyi azaltmak veya romatoid artrit veya fibromiyaljiden kaynaklanan ağrıyı azaltmak için oral veya lokal olarak kullanıldığı gösterilmiştir [24]. Kapsaisin, aynı zamanda, cerrahi sonrası ve osteoartrit ağrısını tedavi etmek için uzun etkili bir analjezik olan bir ilaç olan Adlea'daki temel bileşendir [25]. Ağrı kesici olarak kapsaisin, çeşitli popüler reçetesiz kremlere %0,075 veya daha düşük bir konsantrasyonda eklenmektedir [26]. Genel olarak, kapsaisin içeren kremler, kronik ağrı için orta ila zayıf etkiye sahiptir.

Son zamanlarda, kapsaisinin ağrı kesici üzerindeki etkisinden sorumlu olan mekanizmaların anlaşılmasında büyük ilerleme kaydedilmiştir. Kapsaisinin, şu anda vanilloid reseptörü (VR1) veya geçici reseptör potansiyeli vanilloid alt aile üyesi 1 (TRPV1) olarak bilinen kapsaisin reseptörü yoluyla etkiyi uyguladığı iyi bilinmektedir. TRPV1, kimyasal maddeler ve zararlı ısı, proton ve vanilloidler gibi kimyasal faktörler dahil olmak üzere çok çeşitli uyaranlarla aktive edilen seçici olmayan bir katyon kanalıdır [27, 28]. TRPV1'in ağrı duyumundaki önemli rolü, TRPV1 geninin silinmesi (knock-out fareler) veya RNA interferansı ile TRPV1'in "knock-down" olmasıyla doğrulanmıştır [29].

Teorik olarak, ağrının giderilmesinde yeni bir paradigmayı temsil eden TRPV1 antagonistleridir, çünkü TRPV1 antagonistlerinin, TRPV1'i aktive eden ağrılı endojen maddeleri bloke ederek ağrı algısını önlemesi beklenir. Bununla birlikte, zamanla kanıtlanmış TRPV1 agonist bazlı terapiler de ağrı kesici için açık bir potansiyel sergiler [26, 30]. Kapsaisinoidleri (kapsaisin veya dihidrokapsaisin gibi) doğal tahriş edici maddeler arasında benzersiz kılan şey, duyuşal nöronların ilk uyarılmasının ardından kalıcı bir refrakter durumun izlenmesi veya duyarsızlaştırmaya atıfta bulunulmasıdır, bu durum kapsaisinoidlerin analjezik etkisinin altında yatan teorik temeldir [31, 32].

Kapsaisinoidlere benzer şekilde, acı olmayan kapsaisin analogu olan kapsinoidler (kapsiat ve dihidrokapsiat gibi), farelerde TRPV1'i aktive edebilmiş ve arka pençelerine deri altından enjekte edildiğinde nosiseptif tepkileri indükleyebilmiştir [33]. Bunun aksine, kapsiat cilt yüzeyine uygulandığında tahriş edici yanıtlar üretmemiştir. Kapsaisinden farklı olarak kapsiatın yüksek derecede lipofilik olması ve normal sulu ortamlarda kolaylıkla parçalanması kapsiatın en azından kısmen acı olmama özelliğine atfedilmiştir [33]. Yukarıda bahsedildiği gibi, kapsaisinoidlerin analjezik etkisi, duyu nöronlarını duyarsızlaştırma yeteneklerinden kaynaklanmaktadır. Şimdiye kadar, kapsinoidlerin analjezik etkisine ilişkin bir rapor mevcut değildir. Kapsinoidlerin, kapsaisinoidler kadar kararlı olmadıklarından ve bu nedenle kapsinoidler ile TRPV1 arasındaki etkileşimin, duyu nöronları duyarsızlaştıracak kadar uzun sürmediği için analjezik etki üretmediği tahmin edilmektedir [34].

2.3.1.2. Kanserden Korunma

Kapsaisinoidlerin (kapsaisin ve dihidrokapsaisin) antikanser aktivitesi uzun zamandır bilinmektedir [35]. Kapsaisinoidler, antitümör aktivitesini sadece *in vitro* deneylerde değil, aynı zamanda *in vivo* çalışmalarda da göstermiştir. Kültürlenmiş hücrelerde, kapsaisin göğüs kanseri hücre göçünü engelleyebilmiş ve prostat kanseri hücrelerini öldürebilmiştir. Ayrıca, dihidrokapsaisinin, HCT116 insan kolon kanseri hücrelerinde otofajiyi indüklediği bildirilmiştir. Hayvan deneylerinde, ağızdan kapsaisin tüketimi, farelerde MDA-MB231 meme kanseri tümörlerinin boyutunu %50 azaltabilmiş veya pre-neoplastik meme lezyonlarının gelişimini %80'e kadar güçlü bir şekilde engelleyebilmiştir ve doğrudan kapsaisin enjeksiyonu tümörlerin boyutunda %80'e kadar azalmayı sağlamıştır [36]. Klinik çalışmalarda, doğal kapsaisin lösemik hücrelerin büyümesini engellediği gösterilmiştir [37].

Kapsaisinoidlerin antikanser ve kemopreventif etkileri, hücre proliferasyonunu ve göçünü önleme ve hücre apoptozunu indükleme yetenekleri ile yakından ilgilidir. Hücresel proliferasyonun çok aşamalı karsinogenezde önemli bir rol oynadığı ve kanserin önlenmesi için kritik bir ayırıcı özellik olduğu iyi bilinmektedir. Kapsaisinin, dihidrokapsaisin ile birlikte, çeşitli ölümsüzleştirilmiş veya kötü huylu hücre dizilerinin büyümesini, döngü durması, apoptoz, otofaji ve/veya hücresel metabolik aktivasyonun

inhibisyonu yoluyla bastırıldığı bildirilmiştir. Kapsaisin ve dihidrokapsaisin, birçok düşük moleküler ağırlıklı kanserojenin detoksifikasyonunun yanı sıra metabolik aktivasyonunda rol alan bir enzim olan sitokrom P450'nin bir izoformunu inhibe edebildiği de bulunmuştur [38]. Kapsaisin veya dihidrokapsaisin tarafından hücrel apoptoz indüksiyonunun doğrudan (reseptörden bağımsız olan) ve dolaylı yolla (reseptöre bağımlı olan) rol oynadığına dair kanıtlar vardır [39]. Doğrudan yolda, kapsaisin, kaspazlarla, özellikle kaspaz 1 ve 3 ile etkileşime girerek apoptozu indüklemektedir. Dolaylı yolda, kapsaisin, TRPV-1 ile etkileşime ihtiyaç duyar, bu da hücre içi kalsiyum artışına ve dolayısıyla erken gelişmiş ve apoptozun geç unsurlarına yol açmaktadır [39]. İlginç bir şekilde, kapsaisinin normal hücre hatlarının değil, ancak sadece seçici olarak ölümsüzleştirilmiş veya kötü huylu hücre hatlarının apoptozunu indüklediği veya büyümelerini inhibe ettiği görülmüştür [40]. Ancak, bu fenomenin altında yatan mekanizmalar tam olarak anlaşılmamıştır. Yakın tarihli bir rapor, kötü huylu veya normal hücrelerin kapsaisin ile indüklenen endoplazmik retikulum stresine farklı tepkisinin, kapsaisinin kötü huylu hücre apoptozu üzerindeki seçici etkisini en azından kısmen açıklayabileceğini öne sürmüştür [41].

Kapsaisinoidler ile karşılaştırıldığında, kapsinoidlerin antikanser aktivitesi ile ilgili de literatür mevcuttur. Erken bir çalışma, kapsiat ve dihidrokapsiatın, atimik farelerde tümörogenezi önleyebildiğini ve kapsinoidlerin kanseri önleme aktivitesini desteklediğini göstermiştir [42]. Diğer çalışmalar, kapsiatın, reaktif oksijen türlerinin üretimini artırarak ve bunu takiben mitokondri transmembran potansiyelinin kaybıyla tümör hücre hatlarında apoptozu indüklediğini göstermiştir [46]. Bir *in vitro* çalışmada, kapsiat ve dihidrokapsiatın vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ile indüklenen çoğalmayı, kemotaktik motiliteyi ve birincil kültürlenmiş insan endotel hücrelerinin kapiler benzeri tüp oluşumunu inhibe ettiği bildirilmiştir [43]. Ayrıca, her iki bileşik de VEGF'nin neden olduğu endotelial geçirgenliği bloke etmiştir. Bu sonuçlar, kapsiat ve dihidrokapsiatın potansiyel antitümör aktivitesini güçlü bir şekilde destekler çünkü VEGF, tümör vaskülatürünün oluşumunun ana indükleyicisidir.

Kapsaisinoidlerin antikanser aktivitesi iyi bilinmesine rağmen, kanserin önlenmesi üzerindeki yararlı etkileri konusunda çelişkili veriler vardır. Kapsaisin veya acı biber

özlerinin aynı zamanda ko-kanserojen veya tümör destekleyici olarak da hareket edebildiğine dair kanıtlar bulunmaktadır [44]. Epidemiyolojik çalışmalar, büyük miktarlarda acı biber tüketenlerin, tüketici olmayanlara göre mide kanseri riski daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, kapsaisinin metabolitleri (reaktif fenoksi radikalleri gibi) DNA'ya saldırabilir ve mutajenite ve habis dönüşümü tetikleyebilir [45]. Bu nedenle, kapsaisin, hem kanserojen hem de kemopreventif özelliklere sahip “iki ucu keskin kılıç” olarak düşünülmüştür ve nadiren anjiyogenez ile ilgili hastalıkları tedavi ettiği düşünülmektedir. Son zamanlarda, kırmızı biber CH-19 Sweet'in tahriş edici olmayan kapsinoidleri olan kapsiat ve dihidrokapsiatın, kapsaisine benzer antikanser ve kemo-önleyici aktiviteyi, acı özelliği olmadan koruduğu bulunmuştur [43]. Bunlar, kapsaisinin yerine ideal bir alternatif olabilir ve kanserin önlenmesinde önemli bir potansiyele sahiptir.

2.3.1.3. Kilo Verdirme

Küresel obezite yayılımı son yıllarda önemli ölçüde artmıştır ve halk sağlığı için büyük bir tehdit oluşturmaktadır. Kilo kaybı ve bakımı için araçlar ve stratejiler dünya çapında büyük ilgi görmektedir. Acı biberler, yenildiklerinde ısı hissi üretme ve enerji tüketimini artırma yetenekleriyle bilinir. Termojenez ve enerji metabolizması obezitenin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığından, kırmızı biber obezite yönetimi için potansiyel yiyecekler olarak düşünülmektedir. Kapsaisinoidlerin obezite önleyici özelliklere sahip olduğuna dair birçok kanıt bulunmaktadır. Kapsaisin veya dihidrokapsaisinin, hayvan deneylerinde ve klinik çalışmalarda enerji tüketimini artırarak ve vücut yağ birikimini azaltarak obeziteyi engellediği bildirilmiştir [46, 47]. Kapsaisinin anti-obezite etkisinden sorumlu olan moleküler mekanizmaları aydınlatmak için Joo ve ark son zamanlarda kapsaisin tedavisine yanıt olarak sıçanların beyaz yağ dokusundaki protein değişikliklerini analiz etmek için farklı proteomik yaklaşım kullanmışlardır [48]. Sonuçlar termojenez ve lipid metabolizması ile ilgili proteinlerin kapsaisin tedavisi üzerine belirgin bir şekilde değiştiğini ve enerji metabolizmasının düzenlenmesinde kapsaisinin önemli rolünü desteklediğini göstermiştir. Kapsaisinin anti-obezite etkileri olmasına rağmen, potansiyel yan etkileri klinikte uygulanmasını sınırlamaktadır.

Yukarıda belirtildiği gibi, acı biber (kapsaisinoidlerin ana kaynağı) güçlü bir acılığa sahiptir ve herkes kilo kaybı için büyük miktarlarda acı biber yiyemez. Bu nedenle acı olmayan CH-19 tatlı biber (kapsinoidlerin ana kaynağı) çekici bir seçenek olabilir. Tek bir CH-19 tatlı biber dozunun vücut ısısını ve oksijen tüketimini artırabileceği, tekrarlanan CH-19 tatlı biber alımının ise vücut ağırlığını azaltabileceği ve yağ oksidasyonunu artırabileceği gösterilmiştir [46]. Daha önce bahsedildiği gibi, CH-19 tatlı biberindeki ana kapsinoidler kapsiat, dihidrokapsiat ve nordihidrokapsiatır. Kapsaisine benzer şekilde kapsiate enerji tüketimini artırabilir ve çekirdek sıcaklığı yükseltebilir [49]. Akut kapsiat uygulaması sempatik sinir aktivitesini ve termojenezi artırabilirken, kronik kapsiat tedavisi vücut yağ birikimini baskılayabilir. Aslında kapsiat, en azından Japonya ve ABD’de kilo vermek için piyasada bulunan bir üründür. Daha ileri çalışmalar, kapsinoidlerin vahşi tip farelerde enerji metabolizmasını arttırdığını, ancak TRPV1’e sahip olmayan farelerde artmadığını bulmuştur, bu da kapsinoidlerin enerji metabolizması üzerindeki etkisinin TRPV1’de yer aldığını düşündürmektedir [50].

2.3.1.4. Kardiyovasküler Faydaları

Koroner kalp hastalığı, miyokardiyal enfarktüs, hipertansiyon ve ateroskleroz, insan sağlığına potansiyel tehdit oluşturan başlıca kardiyovasküler hastalıklardır. Kapsaisinoidlerin kardiyovasküler sistem üzerinde potansiyel yararlı etkileri olduğuna dair kanıtlar vardır [51, 52]. Kardiyovasküler sistem, CGRP, bileşik P ve diğerleri gibi çoklu nörotransmitterlerin salımı vasıtasıyla kardiyovasküler fonksiyonların düzenlenmesinde önemli rol oynayan kapsaisine duyarlı sinirlerce zengindir [52, 53]. Birçok çalışma, CGRP’nin kardiyovasküler fonksiyon üzerinde koruyucu etki yaptığını defalarca göstermiştir. Kapsaisinin, TRPV1’i aktive ederek CGRP salınımını uyarabildiği ve bu nedenle kardiyovasküler fonksiyon üzerinde potansiyel faydaları olduğu gösterilmiştir [52]. Gerçekte, kapsaisinin akut uygulaması, seçici CGRP reseptör antagonisti olan CGRP-(8-37) tarafından bloke edilen iskemik ön koşullama benzeri kardiyak korumayı taklit edebilmektedir. Bununla birlikte, yüksek dozda kapsaisin tedavisinin sinir uçlarındaki CGRP’yi tüketeceğinden ve zararlı etkileri göstereceğinden bahsedilmelidir [54, 55].

Son zamanlarda, kapsaisin ve dihidrokapsaisinin, kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi ve görülme sıklığını azaltacak bir özelliği olarak trombosit agregasyonunu ve pıhtılaşma faktörleri VIII ve IX'un aktivitesini inhibe ettiği bildirilmiştir [56]. Kapsaisinoidlerin trombosit agregasyonu üzerindeki etkisinden sorumlu mekanizmalar iyi anlaşılmamıştır. Kapsaisinin, trombositlerin plazma zarına girebildiği ve zar akışkanlığını ve/veya iyonik geçirgenliği değiştirebildiği öne sürülmüştür [57]. Bununla birlikte, son zamanlarda, TRPV1'in insan trombositlerinde mevcut olduğu bulunmuştur, bu sayede kapsaisin, hücre içi trombosit depolarından Ca(II) iyon salımını indükleyebilmiş ve ardından ADP ve trombin ile indüklenen trombosit aktivasyonuna katkıda bulunmuştur [58]. Bu nedenle, kapsaisinoidlerin "anti-hemostatik" özelliğini ve kesin mekanizmaları doğrulamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Kapsaisinoidlerin antioksidan özelliği, aynı zamanda kardiyovasküler sistem üzerindeki yararlı etkilerine de katkıda bulunmaktadır. Düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonunun, aterosklerozun gelişmesi ve ilerlemesi için başlatıcı faktör olduğuna inanılmaktadır. *In vitro* koşullarda yapılan incelemelerde biber özleri, kapsaisin ve dihidrokapsaisinin, oksidasyonun başlamasını geciktirerek ve/veya oksidasyon hızını yavaşlatarak LDL'nin oksidasyona direncini artırabildiği bildirilmiştir [59]. *In vivo* koşullarda yapılan incelemelerde ise kapsaisin tedavisi diyetle yüksek yağla beslenen sıçanlarda serum toplam kolesterolü ve lipid peroksit seviyesini düşürmüştür [60]. Dört hafta boyunca düzenli biber tüketiminin, yetişkin erkeklerde ve kadınlarda serum lipoproteinlerinin oksidasyona karşı direncini arttırdığı bulunmuştur [61]. Bu raporlar, kapsaisinoidlerin antioksidan özelliğini ve özellikle ateroskleroz ve koroner kalp hastalığı gibi kardiyovasküler hastalıkların önlenmesindeki potansiyel klinik değerini desteklemektedir.

2.3.1.5. Gastrointestinal Faydaları

Kardiyovasküler sistem gibi, gastrointestinal sistem de, zararlı müdahalelere karşı gastrointestinal mukoza bütünlüğünün korunmasında önemli bir rol oynadığına inanılan kapsaisine duyarlı duyu sinirleri açısından zengindir [52]. Acı biber gibi baharatlı yiyecekler genellikle peptik ülser için yüksek risk faktörü olarak kabul edilir. Bununla birlikte, Singapur'da yapılan epidemiyolojik bir araştırma, mide ülserlerinin "Çinliler" de daha fazla kırmızı biber tüketme alışkanlığı olan Malezyalılar ve Hintliler arasında

olduğundan üç kat daha yaygın olduğunu göstermiştir [62]. Kapsaisinoidlerin mide koruyucu etkileri, aynı zamanda, TRPV1 veya CGRP antagonistlerinin varlıklarıyla azaltıldıklarına inanılan, hidroklorik asit, amonyak, etanol, aspirin veya indometasinin neden olduğu mide mukozal hasarı için farklı hayvan modellerinde de gösterilmiştir [63, 64]. Aslında, kapsaisinoidler, ilaç tedavisinin dozu ve/veya süresine bağlı olarak gastrointestinal mukoza üzerinde yararlı veya zararlı etkiler gösterir. Daha önce belirtildiği gibi, yüksek dozda kapsaisinoidlerin genellikle nörotransmitterlerin tükenmesine ve kapsaisine duyarlı duyu sinirlerinin zarar görmesine yol açarak gastrointestinal sistemler üzerinde zararlı etkileri olabilmektedir [65]. Bununla birlikte, düşük dozda kapsaisinoidler, bazal mide mukozal kan akışını ve mide mukus salgılanmasını artırabilmekte ve gastrointestinal savunmaya faydalı olan mide epitelinin yenilenmesini kolaylaştırabilmektedir [66]. Kapsaisinin duyu sinirlerindeki ikili özellikleri nedeniyle (hassaslaştırmak veya duyarsızlaştırmak), gastrointestinal fizyoloji, patoloji veya farmakolojide bir araştırma aracı olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır, ancak klinikte yalnızca sınırlı bir uygulama alanı bulunmaktadır [63].

Kapsinoidlerin toksisitesini değerlendirmek için sıçanlarda seri çalışmalar yapılmıştır. Onüç hafta süreyle 100 veya 300 mg/kg/gün gavaj yoluyla dihidrokapsiatın uygulanmasının klinik belirtilerde, vücut ağırlığında, besin tüketiminde, su alımında, oftalmolojisinde, idrar tahlilinde, hematolojide veya kan kimyasında önemli bir değişiklik görmediği gösterilmiştir [67]. Karaciğerde gözlemlenen toksik etki sadece yüksek dozda (1000 mg/kg) meydana gelmiştir. Buna karşılık, önceki çalışmada, 50 mg/kg'lık tek bir dozda kapsaisin ile ön tedavinin, rutaekarpinin (TRPV1'in potansiyel bir agonisti) asetilsalisilik asit kaynaklı mide mukozal hasarı üzerindeki koruyucu etkilerini hafifletebileceğini bulmuştur [65].

2.3.2. Kapsaisinoidler ve Kapsinoidlerin Çalışma Mekanizmaları

Kapsaisinoidlerin etkilerini TRPV1'i aktive ederek gösterdikleri kabul edilmektedir. Bugüne kadar memelilerde bildirilen en az 6 TRPV kanalı vardır [68]. Sekans homolojisi ve fonksiyonel benzerliğe dayalı olarak, 6 TRPV kanalı, grup 1 (TRPV1, TRPV2, TRPV3 ve TRPV4) ve grup 2 (TRPV5 ve TRPV6) olarak ayrılır [69]. TRPV'ler (1 ila 4) birbirleriyle heteromerler oluşturabilir ve termal ve kimyasal uyarıcıların dönüştürücüleri

olarak işlev gören iletici ağrı reseptörlerde ve ağrı algılayıcı nöronlarda ifade edilirler [70]. Şaşırtıcı bir şekilde, sadece TRPV1'in kapsaisinoidler tarafından aktive edildiği rapor edilmiş ve bu da kapsaisinoidler için TRPV1'de spesifik bağlanma bölgeleri olabileceğini göstermektedir. TRPV5 ve TRPV6, kalsiyum iyonu için seçici kanallardır ve esas olarak böbrek ve bağırsakta ifade (*İng. expresion*) edilir [68]. Daha önce belirtildiği gibi, kapsaisinoidlerin gastrointestinal sistem üzerindeki etkisi, kapsaisine duyarlı duyu sinirlerinde bulunan TRPV1'in aktivasyonu ile yakından ilgilidir. TRPV5 ve TRPV6 bağırsakta bulunduğundan, bağırsakta kapsaisinoidlerin etkisine de dahil olmaları mümkündür. T-tipi Ca(II) iyon kanallarının akut ve kronik ağrı durumlarında yeni pronosiseptif hedefler olduğu düşünülmektedir ve ağrı transdüksiyon sinyallemede önemli bir rol oynamaktadırlar [71]. Son zamanlarda, yama-kıskaç (*İng. patch-clamp*) yaklaşımını kullanarak, kapsaisinoidlerin (kapsaisin ve dihidrokapsaisin), T-tipi gerilime bağımlı Ca(II) iyon kanallarının akımlarını tersine çevirdiği gösterilmiştir, bu da kapsaisinoidlerin ağrı üzerindeki rahatlama etkisinin ayrıca T-tipi Ca(II) iyon kanallarının inhibisyonu ile ilgili olabileceğini düşündürmektedir [72].

Kapsaisine benzer şekilde, kapsinoidler TRPV1'i aktive edebilir. Kapsaisinoidlerden yapısal farklılıklar nedeniyle, kapsinoidler ağız boşluğunda bulunan TRPV1'e ulaşamazlar ve ağızda bir yanma hissi oluşturmazlar [73]. TRPV1 haricinde, şu ana kadar diğer TRPV'lerin (2 ila 6) kapsinoidlerin etkisine dahil olduğunu gösteren mevcut veri yoktur. Bununla birlikte, TRPV1'in yanı sıra başka mekanizmaların da kapsinoidlerin etkisinde rol oynadığına dair kanıtlar vardır. Hem kapsiat hem de dihidrokapsiatın, en azından kısmen kapsinoidlerin antitümör özelliğini açıkladığına inanılan Src kinazın aktivasyonunu ve aşağıya dönük substratlarının fosforilasyonunu doğrudan inhibe edebildiği gösterilmiştir [43].

Sonuçta, kapsaisinoidler (kapsaisin gibi) kapsamlı bir şekilde araştırılmış olsa da bunların klinik uygulamaları, düşük seçicilik ve yüksek toksisite özellikleri nedeniyle şimdiye kadar hala çok sınırlıdır. Kapsaisinoidlerin TRPV1 agonisti olduğu kabul edilmektedir. Bununla birlikte, kapsaisinoidler ve TRPV1 arasındaki etkileşim için kesin mekanizmalar hala tam olarak anlaşılmamıştır. Bu bağlamda yapılan ilerleme, kapsaisinoidlerin kimyasal yapısının modifiye edilmesine ve halihazırda mevcut olan kapsaisinoidlerin

dezavantajlarının üstesinden gelinmesine yardımcı olabilir. Kapsinoidlere gelince (kapsiat gibi), şimdiye kadarki mevcut veriler, düşük toksisite özelliği nedeniyle klinik açıdan kapsaisinoidlere göre avantajlara sahip olduklarını göstermektedir. Bununla birlikte, kapsinoidlerin normal sulu koşullarda kolaylıkla parçalandığı bulunmuştur.

2.4. Ekstraksiyon Yöntemleri

Ekstraksiyon, bir bileşenin bulunduğu matristen kimyasal yöntemlerle ayrılması prosesidir. Bileşenlerin beslemeden çözücüye transferi ilgili aşamadaki her bileşenin çözünürlük davranışı ile kontrol edilir. Ekstraksiyon teknikleri, sulu ortamda, sıvı-sıvı ekstraksiyon, katı faz ekstraksiyonu, katı faz mikroekstraksiyonu ve katı örneklerde içerisinde Soxhlet ekstraksiyonunun da bulunduğu katı-sıvı ekstraksiyonu, basınçlı sıvı ekstraksiyonu, mikrodalga destekli ekstraksiyonu, matris katı faz dispersiyon ve süperkritik akışkan ekstraksiyonu içerir [74].

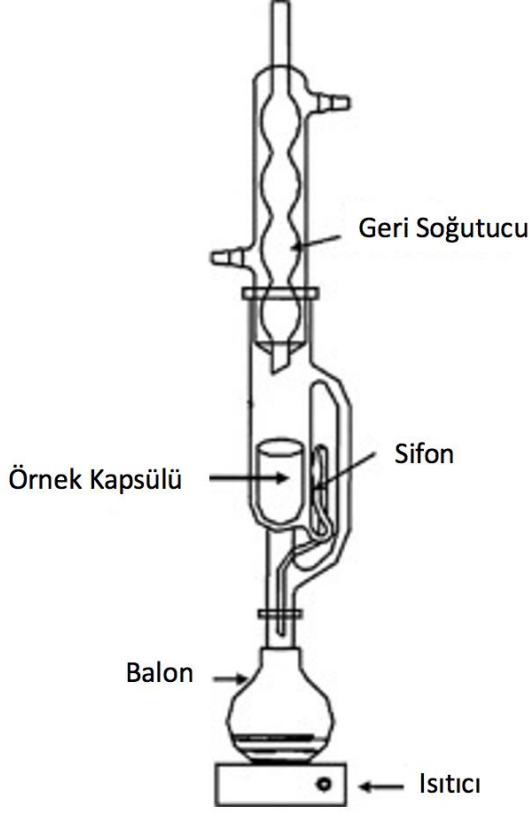
Biyoaktif bileşiklerin daha fazla ayrılması, tanımlanması, karakterizasyonu, yalnızca ardından uygun bir ekstraksiyon işlemi gerçekleştirerek mümkündür. Çeşitli doğal kaynaklardan ekstraksiyon seçiciliğini anlamak için farklı koşullarda farklı ekstraksiyon teknikleri kullanılmalıdır. Çoğu yüzlerce yıl boyunca neredeyse aynı kalır farklı teknikler, biyoaktif bileşikleri ekstrakte için de kullanılabilir. Tüm bu tekniklerin bazı ortak amaçları vardır: (a) karmaşık bitki örneğinden hedeflenen biyoaktif bileşikleri ekstrakte etmek, (b) analitik yöntemlerin seçiciliğini artırmak, (c) hedeflenen bileşiklerin konsantrasyonunu artırarak biyoanalizin duyarlılığını artırmak, (d) biyoaktif bileşikleri saptama ve ayırma için daha uygun bir forma dönüştürmek ve (e) numune matrisindeki varyasyonlardan bağımsız olan güçlü ve tekrarlanabilir bir yöntem sağlamak [75].

2.4.1. Soxhlet Ekstraksiyonu

Bitki matrislerinden nutrasötiklerin çözücü ekstraksiyonu için klasik teknikler, ısı ve/veya çalkalama kullanımı ile birleştirilmiş çözücü seçimine dayanmaktadır. Bitkilerden nutrasötikler elde etmek için kullanılan mevcut klasik teknikler şunları içerir: Soxhlet, hidrostilasyon ve alkol-su karışımı veya sıcak yağ ile maserasyon [76].

Uzun süredir kullanılan Soxhlet, standart bir tekniktir ve diğer katı-sıvı ekstraksiyon (veya liç / *İng.* leach) yöntemlerinin performansını değerlendirmek için ana referanstır. Soxhlet ekstraksiyonu, sınırlı uygulama alanı dışında, ısıl kararsız bileşiklerin ekstraksiyonu haricindeki diğer geleneksel ekstraksiyon tekniklerini performans açısından geride bırakan genel ve sağlam bir tekniktir [77].

Şekil 2.3'te gösterildiği gibi geleneksel bir Soxhlet sisteminde, bitki materyali şilifli bir tutucuya yerleştirilir ve bir damıtma balonundan buharlaşan taze çözücünün yoğunlaştırılması ile doldurulur. Sıvı taşma seviyesine ulaştığında, bir sifon çözgeni aspire eder ve bunu damıtma şişesine geri yükleyerek ekstrakte edilen çözünen maddeleri sıvıya taşır. Çözgen, şişede bırakılır ve taze çözücü, bitki katı yatağına geri döner. İşlem, tam ekstraksiyon elde edilene kadar tekrar edilir. Soxhlet ekstraksiyonu sırasında, çözücü genellikle buharlaştırma ile geri kazanılır. Ekstraksiyon ve buharlaşma sıcaklıklarının nihai ürünlerin kalitesi üzerinde önemli bir etkisi vardır. Mamidipally ve Liu, d-limonenle ekstrakte edilen pirinç kepeği yağının, muhtemelen d-limonen solvent ekstraksiyonu sırasında kullanılan daha yüksek ekstraksiyon ve buharlaşma sıcaklıklarından dolayı, hekzan ekstrakte edilmiş yağa kıyasla biraz daha koyu olduğunu bulmuştur [78]. Çözücünün geri kazanılması için yüksek kaynama sıcaklığı, çözücüü geri kazanmak için vakum veya membranla ayırma kullanılarak düşürülebilir.



Şekil 2.3. Klasik Soxhlet ekstraksiyon düzeneği [77].

Geleneksel Soxhlet ekstraksiyonunun bazı çekici avantajları vardır. Numune, transfer dengesinin yer değiştirmesini kolaylaştıran taze özütleyici kısımları ile tekrar tekrar temas ettirilir. Ayrıca sistem, damıtma şişesine uygulanan ısının bir dereceye kadar ekstraksiyon boşluğuna ulaşmasının etkisiyle nispeten yüksek bir sıcaklıkta kalır. Ek olarak, süzülükten sonra filtreleme gerekmez ve paralel olarak birkaç eşzamanlı ekstraksiyon gerçekleştirilerek numune verimi artırılabilir, bu da temel ekipmanın düşük maliyeti ile kolaylaştırılır. Dahası, Soxhlet ekstraksiyonu çok az eğitim gerektiren çok basit bir metodolojidir, yeni alternatiflerin çoğundan (mikrodalga destekli ekstraksiyon, süperkritik sıvı ekstraksiyonu, vb.) daha fazla numune kütlesi elde edebilir ve görünüşte matris etkisine maruz kalmaz [79].

Geleneksel Soxhlet ekstraksiyonunun ana dezavantajları arasında (1) ekstraksiyon süresinin uzun olması, (2) çok miktarda çözücü kullanılması, (3) işlemi hızlandırmak için Soxhlet cihazında çalkalama sağlanamaması, (4) kullanılan büyük miktardaki çözücü bir

buharlaştırma/konsantrasyon prosedürünü gerektirmesi ve (5) özütleme genellikle çözücünün kaynama noktasında uzun bir süre meydana geldiğinden, hedef bileşiklerin termal ayrışma olasılığı göz ardı edilememesi sayılabilir. Uzun süre gerekliliği ve büyük miktarlarda çözücü gereksinimi, geleneksel Soxhlet özütleme yönteminin geniş eleştirilerine yol açar [77].

Soxhlet ekstraksiyonu genellikle iyi bilinen bir tekniktir. Geniş endüstriyel uygulamalar, daha iyi yeniden üretilebilirlik ve verimlilik ve daha az ekstrakt manipülasyonu, Soxhlet ekstraksiyonunun ultrason destekli, mikrodalga destekli, süper kritik sıvı veya hızlandırılmış solvent ekstraksiyonları gibi diğer yeni ekstraksiyon yöntemlerine göre avantajlarıdır. Bununla birlikte, yeni hızlı ekstraksiyon teknikleriyle karşılaştırıldığında, Soxhlet eski moda, zaman ve solvent tüketen bir ekstraksiyon tekniğidir. Geleneksel Soxhlet'te kullanılan bazı çözücüler, toksisiteleri nedeniyle sorgulanmaktadır [76].

Soxhlet ekstraksiyonu için, numunenin tamamı boyunca taze çözücü teması, filtrasyon prosedürü olmaması ve basit manipülasyon gibi avantajlar korunmalıdır. Bu arada, bir vakum pompası, bir membran ayırma ünitesi, bir ultrason ve mikrodalga kaynağı ve süper kritik sıvılar gibi yardımcı özellikler ve performansını iyileştirmek için geleneksel Soxhlet yöntemine dahil edilebilir. Süper kritik CO₂ ve su gibi toksik olmayan özütleme çözücülerinin kullanımı daha fazla araştırılabilir [76].

2.5. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Sıvı kromatografisi (LC), sıvı fazda gerçekleştirilen fiziksel bir ayırma tekniğidir. Bir numune, mobil faz (akan bir sıvı) ile sabit bir faz (bir kolon içinde paketlenmiş emici maddeler) arasında dağıtılmak suretiyle bileşen bileşenlerine (veya analitlere) ayrılır. Örneğin, akan sıvı hekzan gibi bir organik çözücü olabilir ve sabit faz bir kolon içinde paketlenmiş gözenekli silika parçacıkları olabilir. HPLC, mobil fazın yüksek basınçta pompalandığı küçük parçacıklı kolonlar kullanan modern bir LC biçimidir [21].

“Renkli yazı” anlamına gelen kromatografi terimi olan klasik LC, ilk olarak 1903 yılında, cam sütunlara paketlenmiş tebeşir (kalsiyum karbonat, CaCO₃) üzerinde bitki

pigmentlerini ayıran bir Rus botanikçi olan Mikhail Tswett tarafından keşfedildi [80]. 1930'lardan beri kimyagerler, yerçekimi beslemeli silika kolonları organik malzemeleri, iyon değişim reçinesi kolonları ise iyonik bileşikleri ve radyonüklitleri ayırmak için kullandı. İngiliz araştırmacılar Martin ve arkadaşları tarafından 1952'de gaz kromatografisinin (GC) icadı ve başarılı uygulamaları, hem teorik temeli hem de LC'nin geliştirilmesi için teşvik sağlamıştır. 1960'ların sonlarında LC, yüksek basınçlı pompalar gerektiren küçük parçacıklı kolonların kullanımıyla "yüksek performans" dönmüştür. İlk nesil yüksek performanslı sıvı kromatograflar, Horvath, Kirkland ve Huber dahil olmak üzere 1960'larda araştırmacılar tarafından geliştirilmiştir. Sıralı dedektörlerin ve güvenilir enjektörlerin ticari gelişimi, HPLC'nin hassas ve kantitatif bir teknik haline gelmesine ve uygulamaların büyümesine yol açtı [80]. 1980'lerde, HPLC'nin çok yönlülüğü ve hassasiyeti, onu ilaçlarda ve çeşitli endüstrilerde neredeyse vazgeçilmez hale getirmiştir.

Çizelge 2.2, HPLC'nin avantajlarını ve dezavantajlarını vurgulamaktadır. HPLC, gerçek numunelerin ve karmaşık karışımların çok bileşenli analizini yapabilen birinci sınıf bir ayırma tekniğidir [21]. Çok yönlülüğü ve $0,5$ bağıl standart sapma (RSD) hassasiyetiyle birkaç teknik eşleşebilir. HPLC, gözetimsiz analiz ve rapor oluşturma için gelişmiş otomatik örnekleyiciler ve veri sistemleri kullanarak son derece otomatik analizler yapılmasına olanak sağlar [21]. Çok sayıda hassas ve özel dedektör, algılama sınırlarını nanogram, pikogram ve hatta femtogram seviyelerine kadar genişletmektedir. Hazırlayıcı bir teknik olarak, birçok kararsız bileşenin miligramdan kilograma kadar niceliksel olarak geri kazanılmasını sağlar. En önemlisi, HPLC, GC için yaklaşık %15'e karşılık, mevcut tüm bileşiklerin %60 ila %80'ine uygundur.

Çizelge 2.2. HPLC sisteminin avantajları ve dezavantajları [21].

Avantajlar	Dezavantajlar
Hızlı ve kesin kantitatif analiz	Evrensel dedektör eksikliği
Otomatik operasyon	Kapiler GC'den daha az ayırma verimliliği
Yüksek hassasiyetli algılama	Acemiler için daha zor
Kantitatif numune geri kazanımı	
Çeşitli örneklerle uygun	

HPLC bazı sınırlamalardan muzdariptir. Birincisi, GC'deki alev iyonizasyon dedektörünün eşdeğerliği gibi evrensel bir dedektör yoktur, bu nedenle analit UV ışınları absorbe etmezse veya kütle spektrometrik tayin için kolayca iyonize edilemiyorsa tespit daha problemlidir. İkinci olarak, ayırma verimliliği, kapiler GC'ninkinden önemli ölçüde daha azdır, bu nedenle, karmaşık karışımların analizi daha zordur. Son olarak, HPLC'nin birçok işletim parametresi vardır ve yeni başlayan kullanıcı için daha zordur. Bu sınırlamalar araçal ve kolon geliştirmeleriyle büyük ölçüde en aza indirilmiştir [21].

HPLC'de başlıca 4 ayırma yöntemi bulunmaktadır. Sıvı-katı kromatografi veya adsorpsiyon kromatografisi olarak da bilinen normal faz kromatografisi (NPC), analitin polar bir sabit faz (tipik olarak silika veya alümina) üzerine adsorpsiyon/desorpsiyonuna dayanan geleneksel ayırma modudur [81]. NPC, özellikle polar olmayan bileşikler ve izomerlerin yanı sıra, karmaşık numunelerin fonksiyonel gruplara göre fraksiyonlanması veya numune temizliği için kullanışlıdır. Bu modun önemli bir dezavantajı, polar yüzeylerin numune bileşenleri tarafından kolay kirlenmesidir. Bu problem, amino- veya siyano- gibi polar fonksiyonel grupların silanol gruplarına bağlanmasıyla kısmen azaltılır.

Bir diğer yöntem olan ters faz kromatografisinde (RPC) ayırma, analitlerin bir polar mobil faz ile bir hidrofobik (polar olmayan) sabit faz arasındaki bölme katsayılarına dayanmaktadır. En erken sabit fazlar polar olmayan sıvılarla kaplı katı parçacıklardır. Bunların yerini, silika destek üzerindeki oktadesil (C18) bağlı gruplar gibi daha kalıcı şekilde bağlanan hidrofobik gruplar almıştır. Burada polar analitler ilk önce ayrışırken polar olmayan analitler, katı silika desteğin etrafında "sıvı benzeri" bir katman oluşturan

hidrofobik C18 gruplarıyla daha güçlü etkileşime girerler. Bu “polar birinci ve polar olmayan son” elüsyon sırası, NPC’de gözlemlenenin tersidir ve dolayısıyla “ters fazlı kromatografi” terimi kullanılmaktadır. RPC tipik olarak su ile metanol veya asetonitril karışımı gibi polar bir mobil faz kullanır. Ayrılma mekanizması öncelikle solvofobik veya hidrofobik etkileşime atfedilir [82, 83]. RPC, en popüler HPLC modudur ve tüm HPLC analizlerinin %70’inden fazlasında kullanılır [84]. Polar (suda çözünür), orta polarite ve bazı polar olmayan analitlerin analizi için uygundur.

İyon değişim kromatografisinde (IEC), ayırma modu, katı desteğe bağlı iyonik grupların karşı iyonları ile iyonik analitlerin değişimine dayanır [81]. Tipik sabit fazlar, polimerik veya silika malzemelere bağlanan katyonik değişim (sülfonat) veya anyonik değişim (kuaterner amonyum) gruplarıdır. Mobil fazlar, analitlerin göçünü zorlamak için genellikle artan iyonik kuvvete sahip tamponlardan oluşur. Yaygın uygulamalar, amino asitler, proteinler/peptitler ve polinükleotitler gibi iyonların ve biyolojik bileşenlerin analizidir. Amino asitler UV veya görünür bölgede güçlü bir şekilde absorbe edilmediğinden, 550 nm’de saptamayı artırmak için bir renk türevi oluşturmak için bir kolon sonrası reaksiyon tekniği kullanılır. İyon kromatografisi, genellikle özel bir iletkenlik detektörüne sahip yüksek performanslı bir iyon değişim kolonu kullanılarak düşük katyon veya anyon konsantrasyonlarının analizine ilişkin bir IEC segmentidir [85].

Boyut dışlama kromatografisi (SEC), yalnızca analitin moleküler boyutuna dayalı bir ayırma modudur [86]. Büyük bir molekülün gözeneklerden dışlandığını ve hızlı bir şekilde yer değiştirdiğini gösterirken, küçük bir molekül gözeneklere nüfuz edebilir ve kolonda daha yavaş hareket edebilir. Organik polimerlerin moleküler ağırlıklarının belirlenmesi için kullanıldığında genellikle jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) ve suda çözünür biyolojik materyallerin ayrıştırılmasında kullanıldığında jel filtrasyon kromatografisi (GFC) olarak adlandırılır. GPC’de kolon, kontrollü gözenek boyutlarına sahip çapraz bağlı polistiren boncuklarla paketlenir ve toluen ve tetrahidrofuran gibi yaygın mobil fazlarla elute edilir. Bir kırılma indisi detektörü ile tespit tipiktir.

Dört ana HPLC ayırma yönteminin yanı sıra, HPLC’de veya ilgili tekniklerde sıklıkla karşılaşılan birkaç tane daha yöntem vardır. Bunlardan ilki afinite kromatografisidir.

Afinite kromatografisi, katı destekler üzerindeki hareketsizleştirilmiş ligandların (enzimler, antijenler veya hormonlar) bir karışımdan seçilen bileşenleri izole etmek için kullanıldığı bir reseptör/ligand etkileşimine dayanır [87]. Bir diğer yöntem kiral kromatografi, kiral-spesifik bir sabit faz kullanılarak enantiyomerlerin ayrılması içindir. Hem NPC hem de RPC kiral kolonları mevcuttur [88]. Hidrofilik etkileşim kromatografisi (HILIC) ise, silika veya iyon değişim malzemeleri gibi polar bir sabit faz kullanan, ancak organik çözücülerin ve sulu tamponların polar hareketli fazları ile elüe edilen normal faz kromatografisine biraz benzer bir yöntemdir. En yaygın olarak polar analitleri ve hidrofilik peptitleri ayırmak için kullanılmaktadır [87]. Hidrofobik etkileşim kromatografisi, RPC’de kullanılan yüksek konsantrasyonlarda organik çözücülerle mobil fazlar tarafından kolayca denatüre edilebilen proteinlerin ayrılması için düşük organik çözücü içeriğine ve yüksek tuz konsantrasyonlarına sahip mobil fazların kullanılması dışında RPC’ye benzemektedir [84]. Elektrokromatografi, doldurulmuş bir kapiler HPLC kolonuna sahip kapiler elektroforez (CE) ekipmanı kullanır. Mobil faz, mekanik bir pompanın aksine bir yüksek voltaj kaynağından gelen elektromotor kuvvet tarafından tahrik edilmektedir [89]. Çok yüksek verime sahiptir. Süper kritik akışkan kromatografisi (SFC), doldurulmuş HPLC kolonları ve basınçlı süper kritik akışkanları (yani, bir polar organik çözücü ile modifiye edilmiş karbon dioksit) hareketli faz olarak kullanılmaktadır [90]. Polar olmayan analitler ve saflaştırılmış malzemelerin karbondioksiti buharlaştırarak kolayca geri kazanılabildiği preparatif uygulamalar için kullanışlıdır. HPLC pompaları ve GC tipi dedektörler sıklıkla kullanılmaktadır.

Bir HPLC detektörü, UV absorbansı gibi doğal özelliklerinden birini izleyerek ayrıştırılan analitlerin konsantrasyonunu (veya kütlesini) ölçer [84]. Bir dedektör, tüm analitlere “evrensel” veya belirli analit sınıflarına “özel” olabilir. Ortak dedektörler ve nitelikleri Çizelge 2.3’te listelenmiştir. İlk HPLC dedektörleri, küçük akış hücreleriyle donatılmış spektrometrelerdir; ancak modern birimlerin çoğu kompakttır ve yalnızca HPLC için tasarlanmıştır. Her yerde bulunan UV/görünür değişken dalga boyu absorbansı ve fotodiyot dizi dedektörleri (PDA) yaygın olarak kullanılmaktadır. Kütle spektrometreleri (MS) ve nükleer manyetik rezonans spektrometrelerinin (NMR) kullanıldığı sistemler ise eşleştirilmiş sistemler olarak bilinmektedir.

Çizelge 2.3. Yaygın HPLC dedektörleri ve nitelikleri [21].

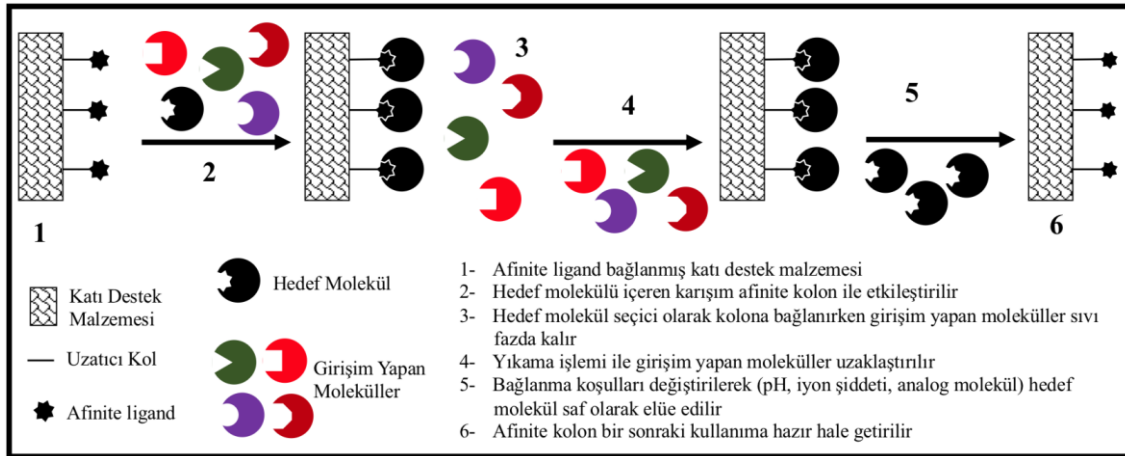
Dedektör	Nitelik	Hassasiyet
UV-Görünür Bölge Absorbans (UV/Vis) Fotodiyot Array (PDA)	UV kromoforlu bileşiklere spesifik UV-Görünür bölge dedektörüne benzer, ayrıca UV spektra sağlar	ng-pg
Floresans (FI)	Floresan özellikteki bileşiklere spesifik	fg-pg
Kırılma İndisi (RI)	Polimerler, şekerler, trigliseridler, organik asitler	0,1-10 µg
Evaporatif Işık Saçılımı (ELSD)	Uçucu olmayan veya yarı uçucu bileşikler, gradient analiz için uygun	10 ng
Şarjlı Aerosol Dedektörü (CAD)	ELSD gibi nebulizör teknolojisini ve yüksek voltajlı bir korona telinin neden olduğu yüklerin tespitini kullanır	ng
Kemilüminesans Azot (CLND)	Pirokemilüminesans temelli olarak azot içeren bileşiklere spesifik	<0,1 ng
Elektrokimyasal İletkenlik	Elektro-aktif bileşiklere spesifik Anyon, katyon, organik asitler ve yüzey aktif maddelere spesifik	pg ng ya da ppm-ppb
Radyoaktivite	Radyoaktif olarak işaretlenmiş bileşiklere spesifik	Düşük seviye
Kütle spektrometresi (MS, MS/MS)	Evrensel	ng-fg
Nükleer manyetik rezonans (NMR)	Evrensel	mg-ng

2.5.1. Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisi, durağan faz olarak biyolojik ya da ilişkili bir ajanı kullanan sıvı kromatografik bir tekniktir. Bu yöntemde çözünen maddelerin tutulması, bir enzimin bir substratla veya bir antikorun antijenle bağlanması gibi biyolojik sistemlerde bulunan spesifik, tersinir etkileşimlere dayanmaktadır. Bu etkileşimlerden afinite

kromatografisinde, bir çift etkileşen maddeden birini bir destek üzerine sabitleyerek veya adsorbe ederek ve bunu sabit bir faz olarak kullanarak yararlanılmaktadır. Bu immobilize edilmiş bağlanma ajanı, afinite ligandı olarak anılmaktadır [91, 92].

Şekil 2.4, afinite kolonlarından çözünenlerin uygulanması ve ayrıştırılması için bazı yaygın prosedürleri göstermektedir. Bu şemaların her birinde, uygulama tamponu olarak bilinen bir mobil fazda afinite sütununa bir örnek uygulanır; bu çözelti genellikle immobilize ligandın hedefine bağlanmasına izin verirken diğer numune bileşenleri çok az veya hiç tutulmadan geçerken seçilir. Tutulan hedef daha sonra birkaç rotadan biriyle elüte edilir. Bu bileşik yalnızca zayıf veya orta düzeyde bir afinite ile bağlıysa (yani, 10^6 l/M veya daha az ligand için bir ilişki denge sabitine sahipse) ve izokratik koşullar altında uygulama tamponundaki hedefi elüe etmek mümkündür. Bu teknik, zayıf afinite kromatografisi veya dinamik afinite kromatografisi [93] olarak bilinir ve kiral ayırmaları içeren afinite sütunlarının uygulamalarında veya çözünen protein bağlama çalışmalarında yaygındır [94].



Şekil 2.4. Afinite kromatografisinin şematik gösterimi.

Daha güçlü tutulan maddeler, mobil faz veya kolon koşullarının değiştirilmesiyle ayrıştırılabilmektedir. pH, iyonik şiddeti, polarite veya analog moleküllerin numune uygulaması sırasında kullanılan koşullardan değiştirildiği ayrı bir elüsyon tamponu kullanılarak gerçekleştirilebilir. Bu yaklaşım, spesifik olmayan elüsyon olarak bilinir [91, 93]. Biyospesifik elüsyon olarak bilinen daha seçici bir elüsyon tekniğini kullanmak da

mümkündür. Bu durumda, elüsyon için uygulama tamponu ile aynı pH, iyonik kuvvet ve polariteye sahip bir tampon kullanılır, ancak artık tutulan hedefi veya immobilize ligandı bağlayabilen bir rakip ajan eklenir. Bu rakip ajanın bağlanması, hedefin ligand ile etkileşimlerini önlemek için kullanılır, bu da hedefin mobil fazda daha fazla zaman harcamasına ve kütle hareketi yoluyla kolondan ayrılmasına neden olmaktadır.

Herhangi bir afinite ayırımının başarısını belirlemede anahtar faktör, kolon içinde kullanılan ligand tipidir. Çizelge 2.4, afinite kromatografisinde yaygın olarak kullanılan ve afinite monolitlerinde [91] kullanılmış birkaç ligandı göstermektedir. Bu ligandların çoğu, antikorlar, lektinler ve protein A veya protein G gibi immünoglobulin bağlayıcı maddeler gibi biyolojik kökenlidir. Bununla birlikte, sentetik moleküller veya inorganik maddeler de afinite ligandları olarak kullanılabilir. Bu son grubun örnekleri metal şelatlar ve triazin boyalardır.

Çizelge 2.4. Afinite kromatografisinde ve monolitik kolonlarıyla kullanılan ligandlar [95].

	Ligandlar	Alıkonulan Analitler
Biyolojik Ligandlar	Antibadiler	Antijenler (ilaçlar, hormonlar, peptitler, proteinler, virüsler, hücre bileşenleri)
	Antijenler	Antibadiler
	İnhibitörler, substratlar, kofaktörler, koenzimler	Enzimler
	Lektinler	Şekerler, glikoproteinler ve glikolipitler
	Protein A ve Protein G	İmmünoglobulinler (Antibadiler)
Biyolojik Olmayan Ligandlar	Triazin Boyalar	Nükleotid bağlayan proteinler ve enzimler
	Metal-İyon Şelatlar	Metal bağlayan amino asitler, peptitler, proteinler

2.5.1.1. Monolitik Kolonlar

Monolitler, gözenekli bir malzemenin tek ve sürekli bir parçasından oluşan desteklerdir [96, 97]. 1967’de boyut dışlama kromatografisi için monolitik bir jel, 2-hidroksietil metakrilat ve etilen dimetakrilat (EGDMA) içeren sulu bir çözelti içinde serbest radikal bazlı polimerizasyon kullanılarak hazırlandığında ortaya çıkmıştır. Monolitlerin yapımındaki diğer erken çalışmalar, açık gözenekli poliüretan köpüklerin yerinde hazırlanmasını içeriyordu [98]; ancak bu malzemeler, düşük geçirgenlik veya yumuşaklık ve bazı çözücülerdeki aşırı şişme ile sınırlıydı, bu da bunların HPLC veya GC’de başarılı bir şekilde kullanılmasını engelledi. Monolitik sütunlar daha sonra makro gözenekli diskler ve membranlar veya sıkıştırılmış poliakrilamid jeller kullanılarak oluşturuldu [99]. Bununla birlikte, bu makro gözenekli membranlar ve diskler sınırlı numune kapasitelerine sahipti ve sıkıştırılmış jeller, düzgün çalışma için belirli çözücülerin kullanılmasını gerektiriyordu [100].

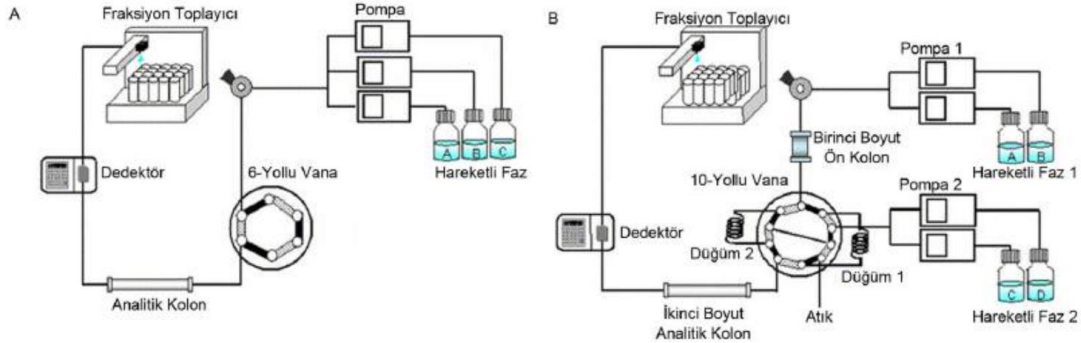
1990’ların başında başka bir monolit kategorisi ortaya çıktı. Bu yeni kategori, nihai polimerde gözenekler oluşturmaya yardımcı olan belirli çözücülerin varlığında monomerlerin polimerleştirilmesiyle oluşturulmuştur [100]. Bu çözücüler artık gözenek oluşturucu (porojen) olarak bilinmektedir. Böyle bir monolitin son gözenek yapısı, oluşumu sırasında kullanılan porojenlere oldukça bağlıdır. Bu çözücüler daha sonra çıkarıldığında, geriye kalan, monolit boyunca çözücü akışı için yollar sağlayan bir dizi birbirine bağlı gözeneklerdir. Porojenlerin ve organik polimerlerin kullanımının yanı sıra, silika monolit kolonların [101] geliştirilmesine yol açan gözenekli inorganik malzemelere [102] dayalı HPLC için monolitler oluşturmaya yönelik son çalışmalar da yapılmıştır.

Monolitlerin kromatografik kolonlarda kullanımı son yıllarda önemli ölçüde artmıştır. Bu, kromatografide ve ilgili yöntemlerde monolitik desteklere sahip afinite ligandlarının kullanımını açıklayan 50’den fazla raporu içermektedir. HPLC ve afinite kromatografisinde monolitik desteklerin artan popüleritesinin birkaç nedeni vardır. İlk olarak, monolitler çeşitli şekillerde yapılabilir ve kolonlar, kılcal damarlar veya mikroakışkan cihazlar içinde hazırlanabilir [103]. İkincisi, birçok monolitin düşük geri basınçları, hızlı ayırmalar ve kısa analiz süreleri sağlamak için yüksek akış hızlarında kullanılmasına izin verir [104]. Üçüncüsü, monolitler hızlı kütle transferinin meydana

gelmesine izin vererek bant genişlemesini azaltmaya yardımcı olur ve afinite ligandları ile çalışırken verimli ayırmalar sağlar [105]. Son olarak, monolitlerin modifikasyonu için kullanılabilir çeşitli reaksiyon şemaları vardır.

2.5.2. İki Boyutlu Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (2D-HPLC)

Geleneksel HPLC sistemleri tek başına özütleme, derişim ve kantitatif analiz şeklindeki aşamaların üçünü aynı anda gerçekleştirmesi mümkün değildir. 2D-HPLC bu eksikliğı gidermek için geliştirilmiş bir sistemdir. Bu yöntemle özütleme, derişim ve kantitatif analiz aşamaları tek bir cihazla otomasyonu sağlanarak çevrimiçi (online) olarak tamamlanır. Bu sistem geleneksel HPLC cihazlarına entegre edilerek, yüksek hassasiyette derişim tayini sorunu olan ve eser miktardaki maddelerin analizinin gerçekleştirilmesi mümkün olacaktır. İki boyutlu HPLC sistemleri, tek boyutlu sistemlere göre pik kapasitesini iki katına çıkararak daha yüksek hassasiyette kromatografik ayırma sağlarlar [106].



Şekil 2.5. (A) Tek boyut ve (B) 2D-HPLC sistemine ait çizimler.

İyon değişim modu/ters faz modu veya büyüklükçe ayırma modu/ters faz modu sıklıkla proteomik çalışmalardaki peptit karışımlarının 2D ayırımlarının gerçekleştirilmesi için kombine edilmiştir. İyon-değişim modu yüksek akış hızlarında etkili ayırmayı sağlayamadığından 2D ayırımın gerçekleştirilmesi nispeten uzun zaman alır [107]. Geleneksel ve kapsamlı 2D-HPLC sistemlerine ait görseller Şekil 2.4’de verilmektedir. Birinci boyut, ilk ayırmanın ve/veya enzimatik sindirimin gerçekleştiğı ön kolon; ikinci boyut ise, yüksek çözünürlükte ayırmanın gerçekleştiğı analitik kolondur. Geleneksel tek

boyut-HPLC sistemi (Şekil 2.4A), bir pompa, bir enjektör, bir detektör, bir 6 yollu vana ve bir fraksiyon toplayıcı içermektedir. Kapsamlı 2Boyut-HPLC sistemi (Şekil 2.4B) ise; birinci boyuta ek olarak bir 10 yollu vana ve ikinci pompa bulundurmaktadır.

2D-HPLC Sisteminin Avantajları

Geleneksel HPLC sistemleri farklı miktarlardaki çeşitli bileşikleri ihtiva eden kompleks karışımlarını ve eser miktardaki maddelerin analizlerini gerçekleştirmede yetersiz kalmaktadırlar. Düşük seviyedeki safsızlıkların analizinin önemli olduğu alanlarda safsızlık kontrolünün sıkı bir şekilde yapılması gerekmektedir. Bununla birlikte eser miktardaki analitlerin analizi çok zordur, çok düşük derişimlerde bulunmalarından dolayı tayin edilmeleri neredeyse imkansızdır. Bunlar “çevrimdışı / kesikli (off-line)” prosedürlerdir ve genellikle örnek ön-işleme (ön-derişirme) ihtiyaç duyar. Bu problemin üstesinden gelebilmek ve saflaştırma etkinliğini artırmak için, ekstraksiyon gibi ön-işlem prosedürlerinin kullanımı gerekir. Tek-boyutlu HPLC’de tayin edilmeden önce bir ön işlem gerektirmektedir. Katı-faz ekstraksiyon (SPE), sıvı-sıvı ekstraksiyon gibi genel saflaştırma prosedürleri bu amaçla kullanılır. Ancak bu prosedürler genellikle çok büyük miktarda çözücü, zaman, işgücüne ihtiyaç duyar ve ürün verimliliğini olumsuz etkilemektedir. Bundan dolayı iki-boyutlu HPLC sistemini kapsayan “çevrimiçi / sürekli (on-line)” saflaştırma metotları popüler hale gelmiştir. 2D-HPLC sistemi ile eser miktardaki maddelerin analizleri kolaylıkla ve başarılı bir şekilde yapılmaktadır.

Kapiler elektroforez (CE) yüksek ayrıştırma gücü, mükemmel hassasiyet ve düşük miktarda madde miktarından dolayı umut vadetmektedir. CE saf maddeler için iyi bir metottur, ancak bitki özütleri gibi doğal maddelerin kompleks doğası ana sorun oluşturmaktadır. Kütle spektrometrik tayin analit tayininde diğer çok önemli tekniklerden birisidir [108]. GC-MS tayin için çok iyi bilinen bir tekniktir. Buna karşın, GC’de kullanılmak üzere örnek türevlendirmeye ve büyük ölçüde örnek saflaştırmaya ihtiyaç duyar. LC-MS/MS ve GC- MS/MS güvenilir tekniklerdir fakat örneklerin LC-MS/MS ve GC-MS/MS ile analizinden önce SPE kolonları ile saflaştırılması gerekmektedir. Sonuç olarak, ön saflaştırmadan sonra daha düşük özgül tayinlik ve seçicilik elde edilebilir fakat yöntemler pahalıdır.

İki-boyutlu HPLC sisteminde analizden önce ön-işlem prosedürü gerekmez, aynı anda iki farklı kolon kullanılarak bu sorunun üstesinden gelinmektedir. İlk kolon SPE kolon olarak kullanılmakta, ikinci kolon ise analitik kolon olarak kullanılmaktadır. On-line sistemde aynı anda ilk kolondan istenilen madde ayrılır ve daha sonrasında analitik kolonda tayin edilir. İki-boyutlu HPLC sisteminin diğer bir avantajı ise benzer yapılara sahip molekülleri çok rahat bir şekilde ayırabilmesidir. Geleneksel HPLC sisteminde bu işlem çok zordur; fakat 2D-HPLC sisteminde ilk kolonda tutulan tüm moleküller ikinci kolonda farklı bölgelerde pik vererek hem kalitatif hem de kantitatif analiz gerçekleştirilmektedir.

Bu şekilde İki-boyutlu HPLC sistemi, hem ön-işlem prosedürü elimine edilerek eser miktardaki maddelerin daha verimli ayırımını gerçekleştirmekte hem de benzer yapılara sahip molekülleri ayırarak istenilen hedef molekül seçici olarak analiz edilmektedir.

Partikül dolgu kolonlar yüksek akış hızlarında etkili olamadıklarından, 2D ayırmalar için monolit kullanımı 2D-HPLC'ye olanak sağlamıştır [109]. Monolitler sıvı kromatografisinde 1980'lerin sonları ile 1990'ların başlarında geleneksel dolgu kolonlardaki bazı sınırlamaları ortadan kaldırma vaadiyle kullanılmaya başlanmıştır [110]. Dolgu kolonlar ile karşılaştırıldığında, monolitler sürekli çubuk görünümünden dolayı boş hacimlerin oluşumuna izin vermez. Bu, mobil fazın akışı için açık gözeneklerin çoğunun kullanılabilmesi anlamına gelir ve yüksek geçirgenlik sağlar [111, 112]. Monolitler ayırma performansının yanı sıra; çeşitli ön kolon ve analitik kolon kombinasyonları ile çevrimiçi analizleri mümkün kılmaktadır. Ön kolon olarak ilk ayırma yapılabilen iyon değişim, immobilize metal afinite, hidrofilik ve ters faz kolonlar kullanılabildiği gibi; yüksek seçicilikte ayırma yapılabilen afinite kolonları da kullanılabilmektedir [113].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kimyasal Malzemeler

Poli (HEMA-MATrp) kolununun sentezinde kullanılmış olan 2-hidroksietil metakrilat (HEMA), etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) ve potasyum persülfat (KPS), ve kapsaisin standartı Sigma (St. Louis, ABD)'dan temin edilmiştir. Soxhlet ekstraksiyonunda kullanılan çözücüler metanol, etanol ve asetonitril Merck (Darmstadt, Almanya)'den temin edilmiştir. HPLC mobil fazında Puris expert serisi ters ozmoz sistemi kullanılarak saflaştırılan ultrasaf su kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıktadır.

3.2. Poli(HEMA-MATrp) Monolitik Kolonunun Sentezi

Poli(HEMA-MATrp) monolitik kolon, yığın polimerizasyonu ile N-Metakriloil-L-triptofan (MATrp) [114], 2-hidroksietil metakrilat (HEMA), çapraz bağlayıcı etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) ve başlatıcı potasyum persülfat (KPS) varlığında paslanmaz çelik HPLC kolonu içerisinde *in situ* olarak hazırlanmıştır. Toluen polimerizasyon ortamında gözenek oluşturucu olarak kullanılmıştır. Polimerizasyon sonucunda reaksiyona girmeyen monomerler ve diğer kimyasallar su ve etanol yıkaması ile uzaklaştırılmıştır. Tablo 3.1'te polimerizasyon reçetesi ve koşulları verilmiştir.

Çizelge 3.1. Polimerizasyon reçetesi ve polimerizasyon koşulları.

Polimer Karışımı	Polimerizasyon Koşulları
30 mg MATrp	Kolon Hacmi: 1,6 mL
1 mL HEMA	Sıcaklık: 75°C
0,25 mL EGDMA	Zaman: 3,5 saat
0,5 mL Toluen	
0,5 mL HEPES (%0,9)	
17 mg KPS	

Monolitik oluşturacak polimerizasyon paslanmaz çelik kolonlar içerisinde sentezlenmiştir. Buna göre, monomerler 1 mL HEMA, 0,25 mL EGDMA ve 17 mg KPS, 0,5 mL toluen içerisinde çözünmüştür. 30 mg MATrp ise 0,5 mL %0,9'luk HEPES

içerisinde çözünmüştür. 15 dakika azot atmosferinde bekletilen karışımlar, 20 cm uzunluğunda ve 5 mm iç çapındaki çelik kolona alınmış ve polimerizasyonları 75°C'deki su banyosunda 3,5 saat sonunda tamamlanmıştır. Reaksiyona girmemiş monomerler ve diğer kimyasallar su ve etanol yıkamasıyla ortamdan uzaklaştırılmış. Elde edilen monolitik kolon deneysel kullanıma kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.3. Poli(HEMA-MATrp) Monolitik Kolonunun Karakterizasyonu

3.3.1. FTIR-ATR ile Yapı Analizi

Sentezlenen monolitler karakterizasyon öncesinde liyofilizatörde (Christ Freeze Dryer-Alpha 1-2 LD, Maryland, Amerika) dondurarak kurutulmuştur. Kurutulan örnekler bir havanda öğütülüp toz haline getirilmiştir. Poli(HEMA-MATrp) monotinin yapısı FTIR-ATR (PerkinElmer Spektrum one, IR Waltham, Massachusetts, ABD) kullanılarak aydınlatılmıştır. Bunun için toz halindeki 10 mg örnek cihazdaki elmas kristal üzerine yerleştirilmiştir. 4000-400 cm⁻¹ dalga sayısı aralığındaki spektrum kaydedilmiştir.

3.3.2. Yüzey Morfolojisi

Liyofilizatörde dondurularak kurutulan yekpare monolitlerin yüzey morfolojisi, taramalı elektron mikroskopu ile (SEM) (TESCAN GAIA 3, Brno-Kohoutovice, Çek Cumhuriyeti) aydınlatılmıştır. Örnekler püskürtmeli kaplayıcı ile altın kaplanmış ve otomatik numune alıcıya yerleştirilmiştir. Yüzey morfolojisi görüntüleri elde edilmiştir.

3.3.3. Termogravimetrik Analiz (TGA)

Hazırlanan tabaka örneklerinin TGA (Perkin Elmer Pyris1 TGA, Massachusetts, ABD) analizleri yapılmıştır. Örnekler yaklaşık 10 mg ağırlığında tartılmış olup azot gazı atmosferinde 20°C'den 550°C'ye 10°C/dakika hız ile ısıtılarak polimere MATrp katkısının polimerin bozunma sıcaklıklarını nasıl etkilediği incelenmiştir.

3.3.4. Yüzey Alanı Ölçümü (BET) Analizi

Poli(HEMA-MATrp) molitinin spesifik yüzey alanı belirlenmiştir. Bu amaçla, Brunauer-Emmett-Teller (BET) (Quantochrome SI, Automated Surface Area and Pore Size Analyzer, Quantochrome, ABD) cihazı kullanılmıştır. Örneklerin gazı azot atmosferinde 90°C sıcaklık ortamında 12 saat süresinde alınmıştır. Gaz adsorpsiyonu -210°C'da ve desorpsiyonu oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Desorpsiyon basamağında elde edilen sonuçlar, spesifik yüzey alanı hesaplamalarında kullanılmıştır.

3.4. Poli(HEMA-MATrp) Monolitik Kolonları ile Kapsaisin Adsorpsiyonu

Metanol içerisindeki kapsaisin monolitik kolon kullanarak kromatografik ayırımı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) sistemi ile analiz edilmiştir (Shimadzu Corp., Kyoto, Japonya). Kullanılan sistemde CBM-20A Lite model sistem kontrol ünitesi, LPGE ünitesi içeren LC-20AT model pompa, FCV-20AH2 model çok yönlü vana, SIL-20AHT model otomatik enjeksiyon ünitesi, CTO- 10ASVP model kolon fırını, SPD-M30A model diyot array dedektör sistemi bulunmaktadır. MATrp monomeri içeren poli(HEMA-MATrp) monolitik kolonunun, kapsaisin tayini için performansı incelenmiştir. HPLC'nin A ve B hareketli fazları sırasıyla H₂O ve %100 metanol ile hazırlanmıştır. %40'lık B hareketli fazı ile başlangıcın ardından, B hareketli fazının miktarı %40'dan %80'e kadar 8 dakika içerisinde doğrusal gradientli olarak arttırılmıştır. Daha sonra B hareketli fazının miktarı %80'den %99'a 2 dakika içerisinde gradient olarak arttırılmıştır. %99'luk B hareketli fazı 3 dakika süreyle uygulandıktan sonra B hareketli fazının miktarı %99'dan %40'a kadar 7 dakika içerisinde doğrusal gradientli olarak azaltılmıştır. Akış hızı 0,5 mL/dakika, kolon sıcaklığı 40°C ve enjeksiyon hacmi 50 µL'dir. Kapsaisin belirlendiği dalga boyu ise 280 nm'dir.

Çizelge 3.2. Monolitik kolon HPLC parametreleri

Monolitik Kolon için Tek Boyutlu HPLC Parametreleri	
Mobil Faz A	Su
Mobil Faz B	Metanol
Kolon	Poli(HEMA-MATrp) monolitik kolon
Enjeksiyon Hacmi	50 µL
Akış Hızı	0,5 mL/dakika
Çözücü Gradient Programı	8,00 dk, %40B→%80B, 10,00 dk, %80B→%99B, 3 dk. %99'da sabit 13,00 dk., %99B→%40, 20,00 dk., %40
Dedektör	280 nm
Kolon Fırın Sıcaklığı	40°C

3.5. Soxhlet Ekstraksiyonu

Hatay Samandağ biberinden kapsaisin ekstraksiyonu için Soxhlet yöntemi kullanılmıştır. Bu bağlamda, biberler güneşte kurutulmuş ve öğütülmüştür. Kurutulmuş ve öğütülmüş Hatay Samandağ biberlerinden birer gram tartılmış ve metanol, etanol ve asetonitril çözücülerinde ekstraksiyonları yapılmıştır. Her bir ekstraksiyon için çözücülerin hacmi 100 mL olarak belirlenmiştir. Ayrıca her bir çözgüde zaman parametreleri 2, 3 ve 4 saat olarak çalışılmıştır. Sıcaklık parametreleri ise metanol için 75°C, 80°C ve 85°C, etanol için 88°C, 95°C, 100°C, asetonitril için ise 90°C, 95°C ve 100°C olarak belirlenmiştir. Ekstraksiyon sonucunda elde edilen çözeltilerin çözücülerini döner buharlaştırıcı (Heidolph Hei-VAP Gold 1, Schwabach, Almanya) ile uçurulmuştur. Elde edilen katılar tartılmış ve toplam ekstraksiyon verimi belirlenmiştir.

3.6. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Analizleri

3.6.1. Kurutulmuş Biber Örneklerinin HPLC Analizi

Kurutulmuş biberlerin ekstraksiyonu sonucu saflaştırılan kapsaisin miktarı, ters faz hidrofobik analitik kolon (Kromasil 100-5-C18 4.6 x 150 mm) yardımı ile HPLC ile denenmiştir. HPLC'nin A ve B hareketli fazları sırasıyla H₂O ve %100 metanol ile hazırlanmıştır. %40'luk B hareketli fazı ile başlangıcın ardından, B hareketli fazının

miktarı %40'dan %80'e kadar 8 dakika içerisinde doğrusal gradientli olarak arttırılmıştır. Daha sonra B hareketli fazının miktarı %80'den %99'a 2 dakika içerisinde gradient olarak arttırılmıştır. %99'luk B hareketli fazı 3 dakika süreyle uygulandıktan sonra B hareketli fazının miktarı %99'dan %40'a kadar 7 dakika içerisinde doğrusal gradientli olarak azaltılmıştır. Akış hızı 0,5 mL/dakika, kolon sıcaklığı 40°C ve enjeksiyon hacmi 50 µL'dir. Kapsaisin belirlendiği dalga boyu ise 280 nm'dir.

Çizelge 3.3. Tek boyutlu HPLC parametreleri.

C18 Kolon için Tek Boyutlu HPLC Parametreleri	
Mobil Faz A	Su
Mobil Faz B	Metanol
Kolon	Kromasil 100-5-C18 4.6 x 150 mm
Enjeksiyon Hacmi	50 µL
Akış Hızı	0,5 mL/dakika
Çözücü Gradient Programı	8,00 dk, %40B→%80B, 10,00 dk, %80B→%99B, 3 dk. %99'da sabit 13,00 dk., %99B→%40, 20,00 dk., %40
Dedektör	280 nm
Kolon Fırın Sıcaklığı	40°C

3.6.2. Farklı Biber Örneklerinin HPLC analizi

Hatay Samandağ biberinin kapsaisin içeriği farklı biber örneklerden beş farklı numunenin (kurutulmuş biber, yaş kırmızı biber, yaş yeşil biber, dolma ve kapyra) en yüksek ekstraksiyon veriminin elde edildiği parametreler kullanılarak elde edilmiş ekstraksiyon çözeltileri ile karşılaştırılmıştır. Bu işlem tek boyutlu HPLC'de yukarıda verilen kromatografik koşullar kullanılarak araştırılmıştır.

3.7. İki Boyutlu Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (2D-HPLC) Analizi

3.7.1. Kurutulmuş Biber Örneklerinin 2D-HPLC Analizi

Ekstrakte edilmiş kapsaisinlerin analizlerinde tek boyutlu HPLC sisteminde elde edilen verimleri üst seviyelere çıkarmak için iki boyutlu HPLC sistemi kullanılmıştır. Bu kapsamda hidrofobik özelliğe sahip fonksiyonel bir monomer ile hazırlanan Poli(HEMA-MATrp) kolonu birinci boyut olarak kullanılmıştır. İkinci boyut olarak Kromasil 100-5-C18 4.6 x 150 mm HPLC kolonu tercih edilmiştir.

Tek boyutlu HPLC sisteminde elde edilen kapsaisin derişim, sıcaklık, akış hızı, enjeksiyon hacmi gibi optimizasyon koşulları iki boyutlu HPLC sisteminin nasıl gerçekleştirilmesi hakkında bilgi vermektedir. Yöntemin ayrıntıları Çizelge 3.4'de verilmiştir. İki boyutlu HPLC sistemini kullanmanın nedenlerinden en önemlileri; ilk olarak ön-işlem prosedürü olmaması bu da zaman, maliyet ve iş gücü gibi avantajlar sağlamaktadır. İkinci olarak ise tek boyutlu sistemde ayırımı gerçekleştirilen maddenin pik kapasitesini artırarak kapsaisin analizinde seçici ve spesifik analiz sağlamasıdır.

Çizelge 3.4. İki Boyutlu HPLC parametreleri.

2D-HPLC Parametreleri	
İlk Kolon	Poli(HEMA-MATrp) Monolitik Kolon
İkinci Kolon	Kromasil 100-5-C18 4.6 x 150 mm
Pompa A	
Mobil Faz A	Su
Mobil Faz B	%100 Metanol
Pompa B	
Mobil Faz A	Su
Mobil Faz B	%100 Metanol
Enjeksiyon Hacmi	50 µL
Akış Hızı	Pompa A: 0,6 mL/dk (%60B); Pompa B: 0,5 mL/dk
Dedektör	280 nm
Kolon Fırın Sıcaklığı	40°C

Çizelge 3.5. 2D-HPLC çözücü gradient programı.

Zaman	Modül	Komut	Değer
4,00	Pompa	SV (Pompa B)	A
4,10	Pompa	SV (Pompa B)	B
8,49	Pompa	B Akış	0,5
8,50	Pompa	B çözücü derişimi	60
8,51	Kontrol	Olay	2
8,54	Pompa	SV (Pompa B)	B
13,50	Pompa	B çözücü derişimi	80
19,00	Pompa	B çözücü derişimi	80
20,00	Pompa	B çözücü derişimi	90
34,00	Pompa	B çözücü derişimi	90
34,10	Pompa	B çözücü derişimi	60
34,20	Pompa	B Akış	0,2
34,20	Kontrol	Olay	0
34,30	Pompa	B Akış	0,8
34,30	Pompa	SV (Pompa B)	A
39,00	Pompa	B Akış	0,8
39,10	Pompa	B Akış	0,5
42,00	Kontrol	Bitiş	

3.7.2. Farklı Biber Türlerinde Kapsaisinın Ön-Deriştirilmesi ve Saflaştırılması

Kurutulmuş biberlerle tek boyutlu HPLC’de karşılaştırılan beş farklı numune (kurutulmuş biber, yaş kırmızı biber, yaş yeşil biber, dolma ve kapyra) yukarıda verilen kromatografik koşullarda poli(HEMA-MATrp)’de ön -deriştirilmiş ve elde edilen yüksek saflıktaki sonuçlar tekrar karşılaştırılmıştır.

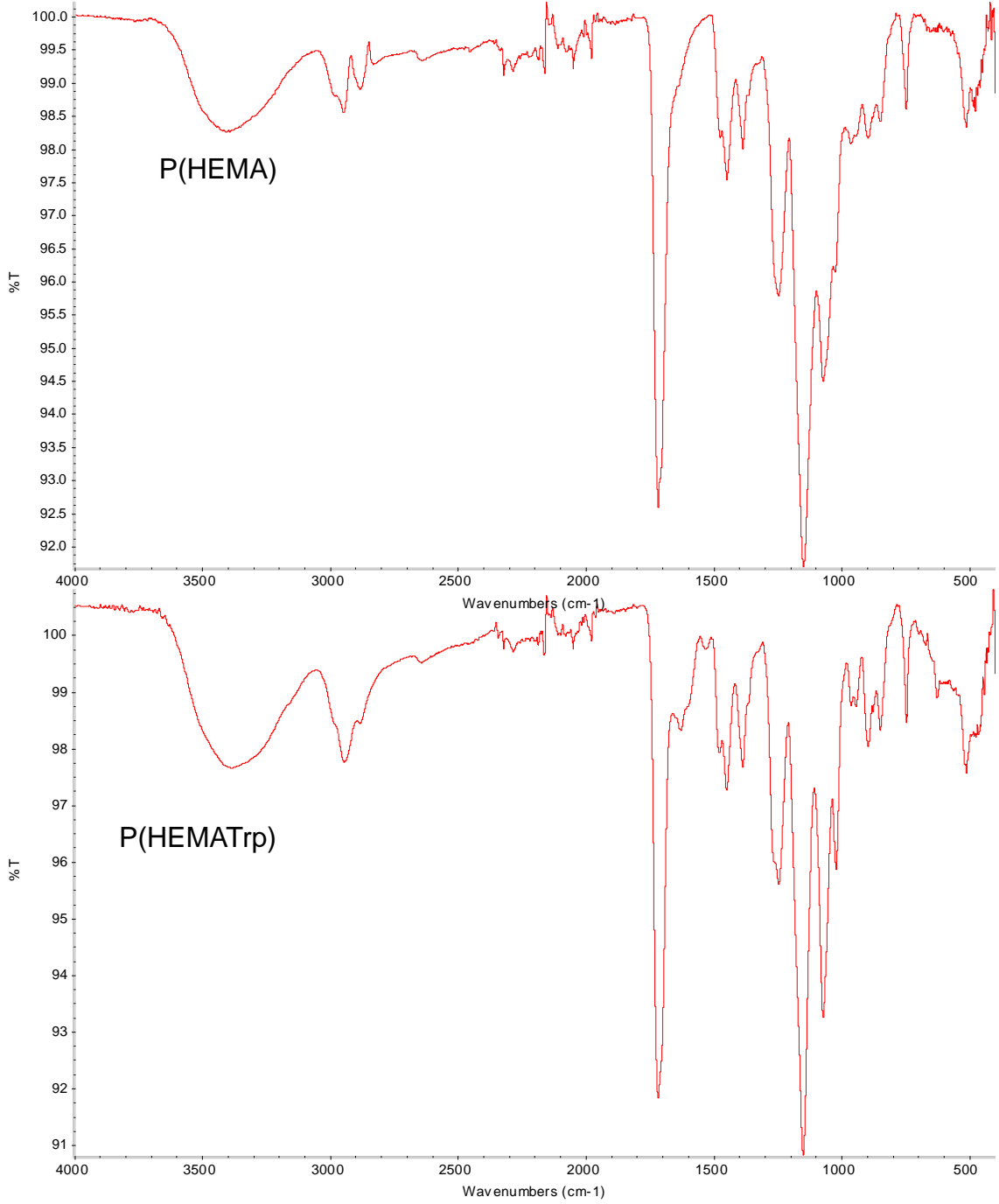
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Kapsaisin saflaştırılmasına yönelik alternatif teknikler oluşturmak için sunulan tez çalışması 4 ana başlık altında toplanmıştır: (i) L-triptofan molekülünün polimerleşebilen türevi olan MATrp monomeri ile afinite etkileşimleri temeline dayalı hidrofobik P(HEMA-MATrp) monolitik HPLC kolonları hazırlanmış ve karakterize edilmiş; (ii) hazırlanan P(HEMA-MATrp) monolitik kolonları ile kapsaisin analiz, tek-boyutlu HPLC sisteminde belirlenmiş; (iii) Soxhlet ekstraksiyon yöntemi ile biber örneklerinden kapsaisin ekstraktı gerçekleştirilmiş ve tek-boyutlu HPLC sistemi ile miktar analizi yapılmıştır; (iv) P(HEMA-MATrp) monolitik kolonun birinci boyut kolonu ve C18 ters faz kolonun ikinci boyut (analitik) kolon olarak kullanıldığı iki-boyutlu HPLC uygulamalarında kapsaisin analizi incelenmiş ve biber örneklerinde (kurutulmuş, taze, kopya ve dolma biber) kapsaisin eş zamanlı olarak tespit edilmiş ve (iv) elde edilen sonuçlar başlıklar halinde tartışılarak açıklanmaya çalışılmıştır.

4.1. P(HEMA) ve P(HEMA-MATrp) Monolitik Kolonların Karakterizasyonu

4.1.1. FTIR-ATR ile Yapı Analizi

P(HEMA-MATrp) monolitik kolonların kimyasal yapı analizi için FTIR spektroskopisi yöntemi uygulanmıştır (Şekil 4.1). Polimerik yapı içerisindeki MATrp monomerinin varlığını göstermek amacıyla P(HEMA) ve P(HEMA-MATrp) monolitik kolonların FTIR spektrumları incelenmiştir. Spektrumlarda sırasıyla 3300 cm^{-1} civarında görülen ortak $-\text{OH}$ gerilme, 2900 cm^{-1} 'de alkan gruplarından kaynaklanan $-\text{CH}$ gerilme ve 2900 cm^{-1} 'de $-\text{CO}$ bükülme bandları, HEMA monomerinden kaynaklanmaktadır. Diğer taraftan 1558 cm^{-1} ve 1618 cm^{-1} civarındaki bandlar MATrp monomerindeki aromatik halkadaki $\text{C}=\text{C}$ gerilme bandlarından kaynaklanmaktadır. Bu sonuçlar polimerik yapıya MATrp monomerinin girdiğini kanıtlamaktadır.

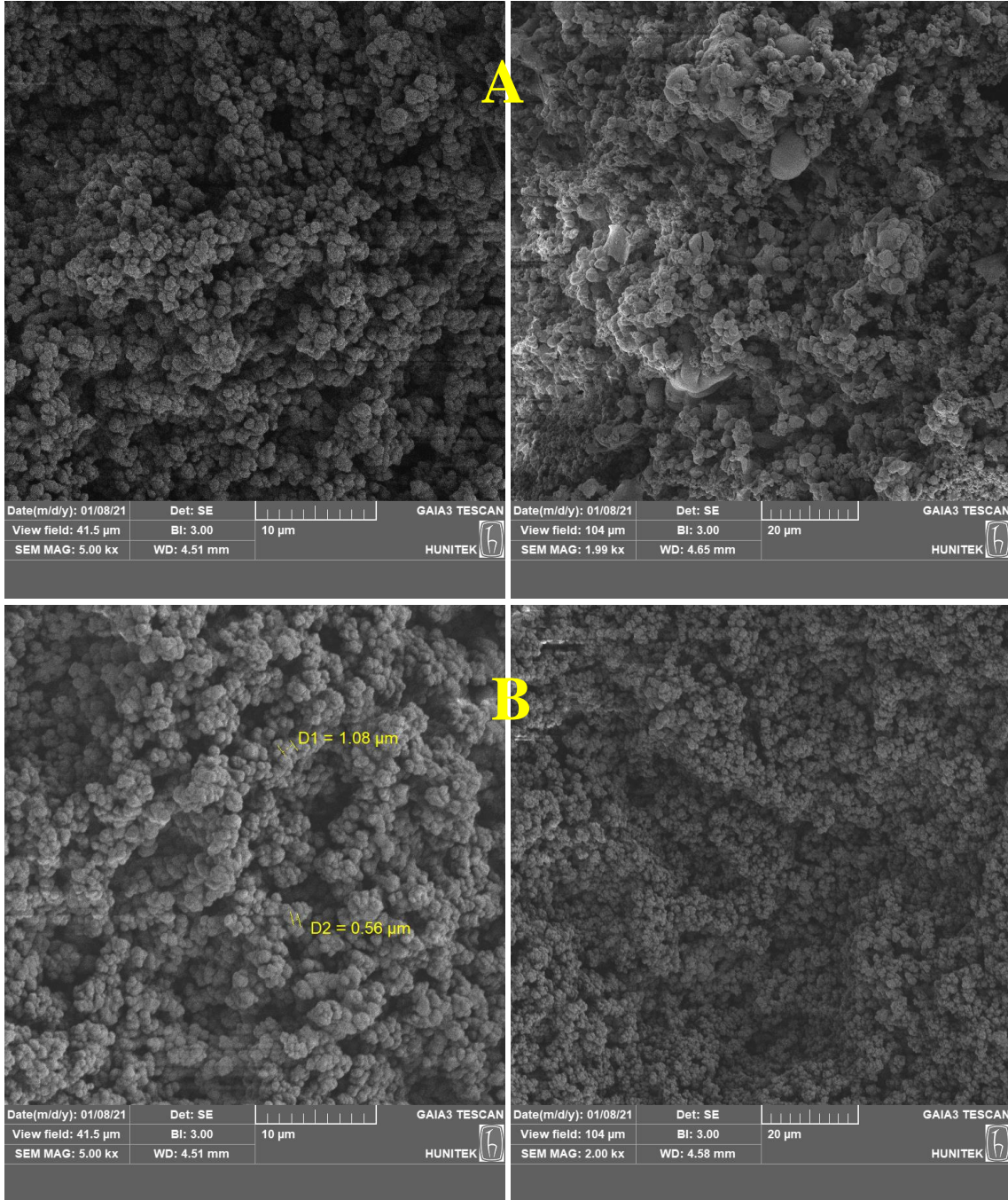


Şekil 4.1. Poli(HEMA) ve Poli(HEMA-MATrp) polimerlerine ait FTIR spektrumları.

4.1.2. Yüzey Morfolojisi

Sentezlenen monolitik kolonların, yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiştir. Monolitik kolonların SEM fotoğrafları Şekil 4.2’de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi monolitik kolonların, oldukça pürüzlü polimerik

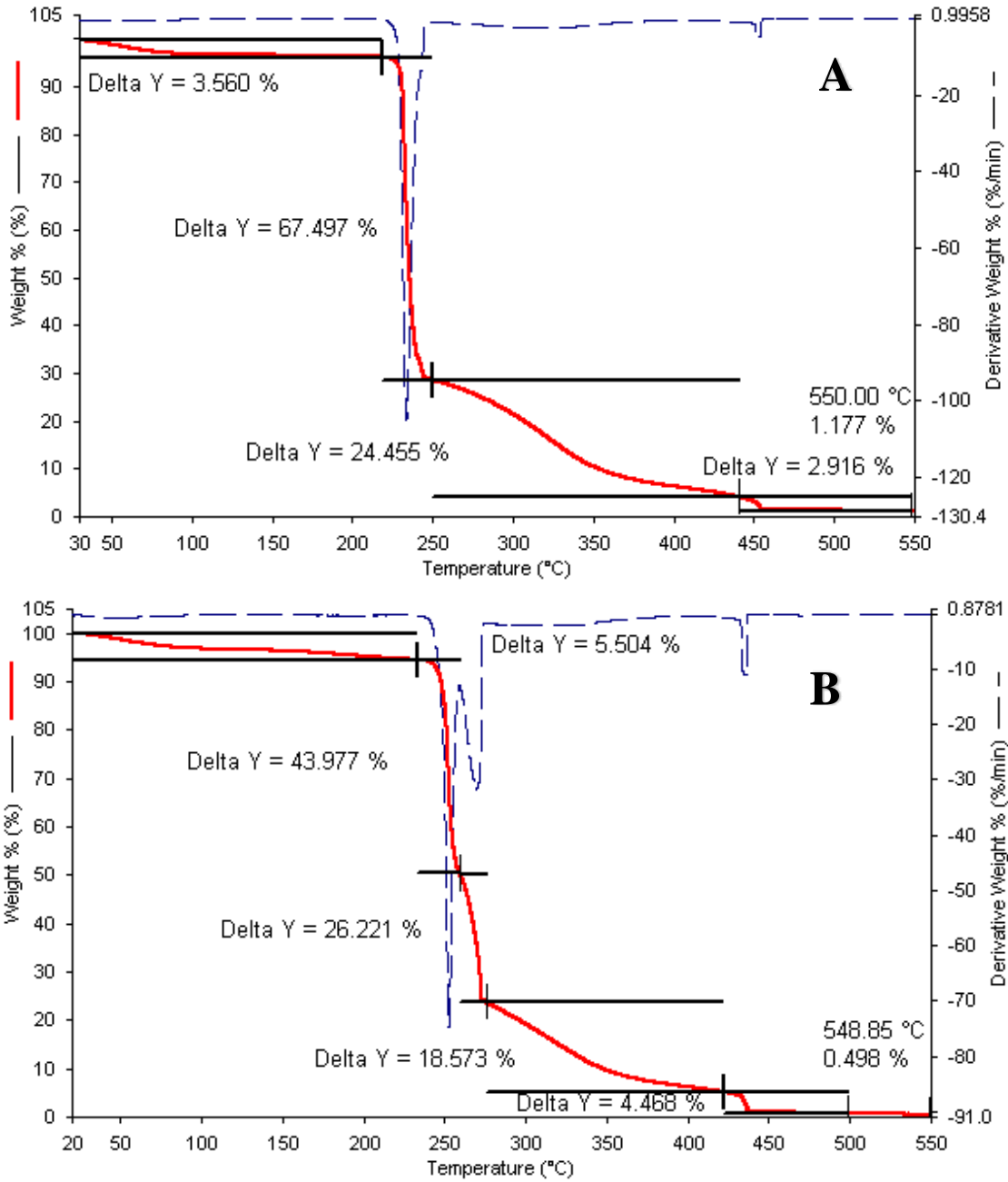
duvarlara sahip olduğu ve gözenek boyutlarının 0,5-1.0 μm arasında değiştiği ve birbiriyle bağlantılı akış kanalları açıkça görölmektedir. Akış kanalları, kapsaisin moleküllerinin kolaylıkla monolitik kolonların yüzeyine ve spesifik boşluklara ulaşmasını ve sonuç olarak hızlı adsorpsiyon kinetiği sağlamaktadır.



şekil 4.2. Monolitik kolonların SEM fotoğrafları; (A) P(HEMA), (B) P(HEMATrp).

4.1.3. Termogravimetrik Analiz (TGA) Sonuçları

P(HEMA) ve p(HEMA-MATrp) modifiye monolit örneklerinin ısıl dayanımları ve bozulma davranışlarına monomer etkisini incelemek amacıyla termogravimetrik ölçümler yapılmıştır ve Şekil 4.3’de ilgili verilerin türev grafikleri gösterilmiştir. P(HEMA)’nın termogramları ve türevleri incelendiğinde bozunmanın iki basamaklı bir bozunma kinetiği gerçekleştiği ve 450°C’de tamamen bozunduğu gözlenmektedir. İlk bozunma ana zincire bağlı olan HEMA grubunun polar birimlerinin kaybindan kaynaklanırken, ikinci bozunma ana zincir yapısından kaynaklanmaktadır. P(HEMA-MATrp)’nin termogramları incelendiğinde ise 110°C’nin altında p(HEMA-MATrp)’nin yüzeyinde adsorplanan suyun ve 110-220°C aralığında tabakalar arası bağlı suyun uzaklaşmasından (dehidratasyon) kaynaklanan kütle kaybı gözlenmiştir. P(HEMA) ile karşılaştırıldığında 220-250°C aralığında yüzeyin hidrofobitesinden dolayı daha az kütle kaybı gerçekleşmiştir (%43,97), diğer taraftan bu değer P(HEMA) için %67,50’dir. Bununla birlikte her iki polimerin 250-450°C aralığındaki bozunmaları incelendiğinde 450°C’de p(HEMA-MATrp) örneği için %4,68 ve p(HEMA) örneği için %2,92 artık kalmıştır. P(HEMA-MATrp) örneği, P(HEMA) ile kıyaslandığında yapısının daha karmaşık yapıda olmasından dolayı bozunma sıcaklıklarının daha yüksek değerlerde olduğu görülmektedir.

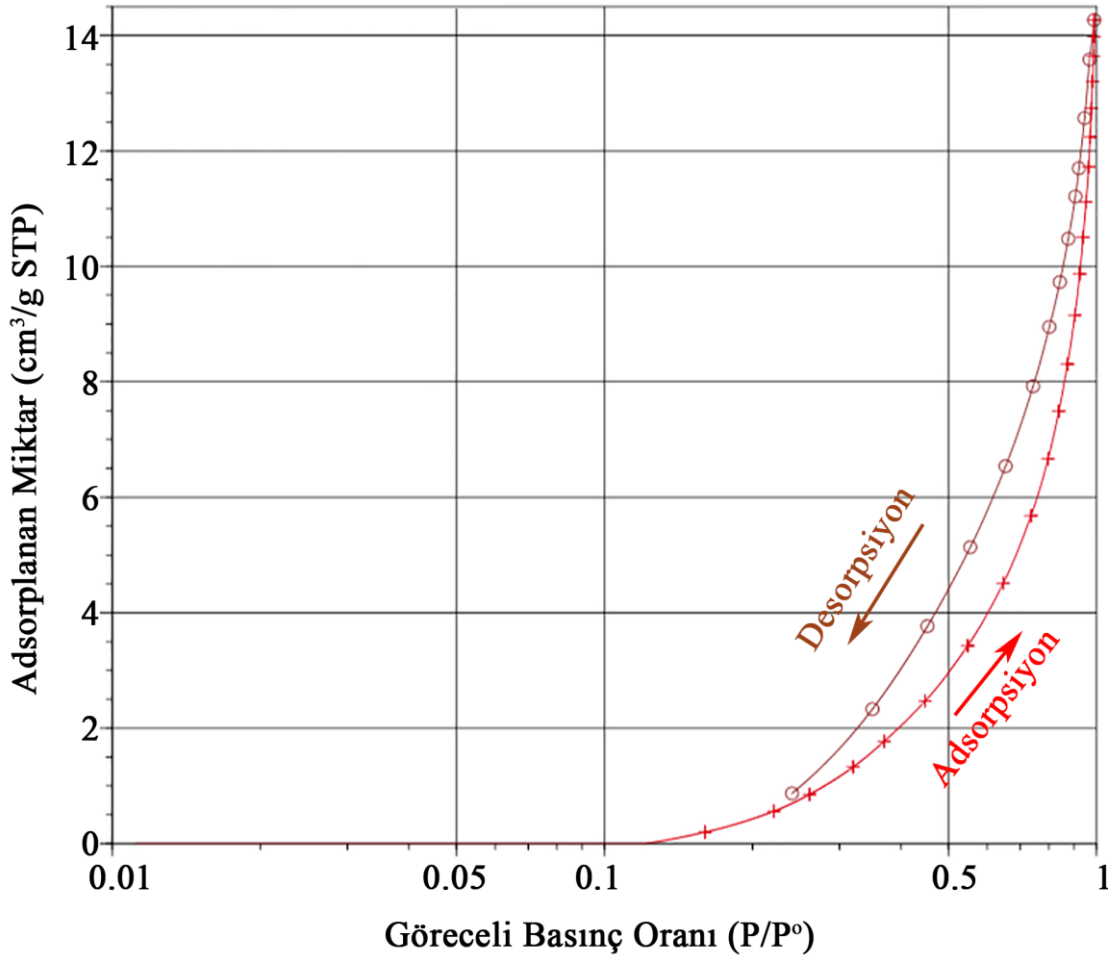


Şekil 4.3. P(HEMA) ve p(HEMA-MATrp) termogramları.

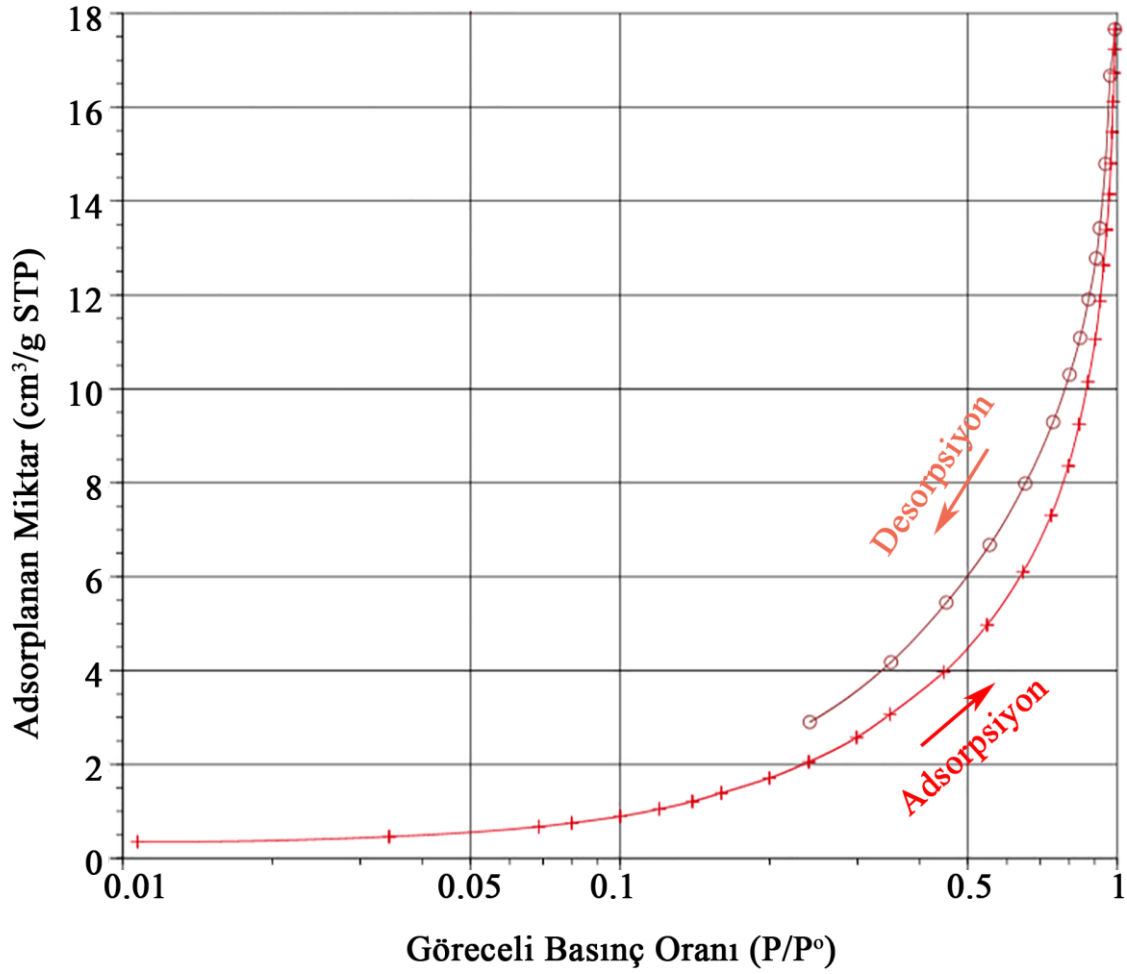
4.1.4. Yüzey Alanı Ölçümü (BET) Analizi

Sentezlenen monolitik HPLC kolonların spesifik yüzey alanı ölçümleri, BET yüzey alanı ölçümleri ve azot gazı adsorpsiyon-desorpsiyon verilerine göre hesaplanmıştır. P(HEMA) monolitik kolonuna ait grafik Şekil 4.4'de ve p(HEMA-MATrp) monolitik kolonuna ait grafik ise Şekil 4.5'de verilmiştir. Şekillerden de görüldüğü gibi p(HEMA) monolitik kolonun azot adsorpsiyonu 0.1 P/P⁰ değerine kadar düşük düzeyde seyredirken

en yüksek değer 1.0 P/P₀ değerinde 14.27 cm³/g STP olarak belirlenmiştir. P(HEMA-MATrp) monolitik kolonu için ise azot adsorpsiyonu 0.1 P/P₀ değerinde 1.0514.27 cm³/g STP iken en yüksek değer 1.0 P/P₀ değerinde 17.66 cm³/g STP olarak belirlenmiştir. lim sonucu elde edilen verilere göre tek nokta yüzey alanı (m²/g), Brunauer-Emmett-Teller (BET) yüzey alanı (m²/g), Barrett-Joyner-Halenda (BJH) kümülatif adsorpsiyon yüzey alanı (m²/g), BJH kümülatif adsorpsiyon gözenek hacmi (mm³/g) ve BJH adsorpsiyon gözenek apı (Å) değerleri izelge 4.1’de özetlenmiştir.



şekil 4.4. P(HEMA) monolitik kolonuna ait BET yüzey alanı ölçümü azot gazı adsorpsiyon-desorpsiyon grafiği.



Şekil 4.5. P(HEMA-MATrp) monolitik kolonuna ait BET yüzey alanı ölçümü azot gazı adsorpsiyon-desorpsiyon grafiği.

P(HEMA-MATrp) monolitik kolonun tek nokta yüzey alanı değeri ($7,852 \text{ m}^2/\text{g}$), P(HEMA) kolonun değerine ($3,923 \text{ m}^2/\text{g}$) göre yaklaşık iki katı kadar olduğu görülmüştür (Çizelge 4.1). BET izotermine göre ise bu değerler sırasıyla $11,434 \text{ m}^2/\text{g}$ ve $7,577 \text{ m}^2/\text{g}$ olarak belirlenmiş ve aradaki oran yaklaşık 1,5 kat olarak hesaplanmıştır. Ölçümlerde BJH izotermine göre hesaplanan gözenek hacmi ve gözenek çapı değerleri, p(HEMA-MATrp) için sırasıyla $26,547 \text{ mm}^3/\text{g}$ ve $80,377 \text{ Å}$ iken p(HEMA) için aynı sırayla $21,741 \text{ mm}^3/\text{g}$ ve $77,833 \text{ Å}$ olarak hesaplanmıştır. Artan spesifik yüzey alanı, ana polimerik yapıya eklenen ikinci monomer (MATrp)'in polimerizasyon kinetiği üzerindeki etkisi, polarite farkı ve polimer zincir boyunun/molekül kütlelerinin azalmasına bağlıdır. Artan spesifik yüzey alanına ek olarak gözenek hacmi ve çapındaki artışlar da elde edilen monolitik kolonun akış özelliklerinin daha iyi olduğunu, düşük geri basınç ve yüksek

adsorpsiyon kinetiğine işaret etmektedir. Deneysel çalışmalar sırasında p(HEMA-MATrp) kolonlarda basınç düşmesi (veya geri basınç artışı) gözlenmemesi de bu durumla ilişkilidir.

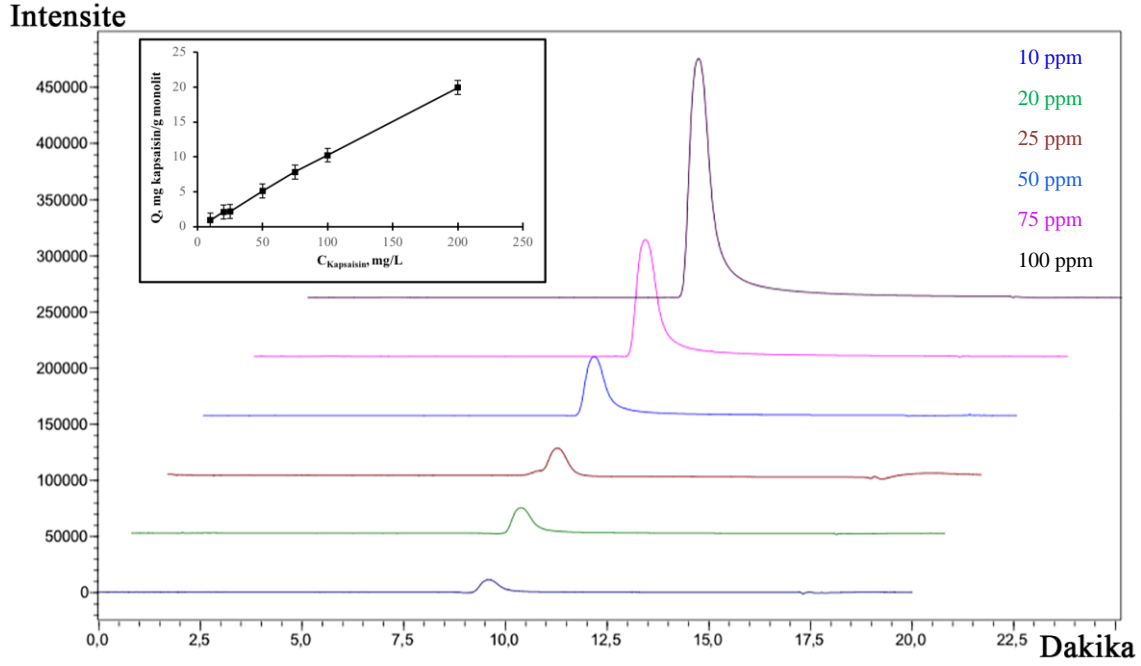
Çizelge 4.1. Monolitik kolonlara ait yüzey alanı ölçüm sonuçları.

	P(HEMA)	P(HEMA-MATrp)
Yüzey Alanı*, m ² /g	3,923	7,852
BET Yüzey Alanı, m ² /g	7,577	11,434
BJH Kümülatif Adsorpsiyon Yüzey Alanı, m ² /g	11,173	13,211
BJH Kümülatif Adsorpsiyon Gözenek Hacmi, mm ³ /g	21,741	26,547
BJH Adsorpsiyon Gözenek Çapı, Å	77,833	80,377

* P/P^o'daki tek nokta yüzey alanı

4.2. Poli(HEMA-MATrp) Monolitik Kolonları ile Kapsaisin Adsorpsiyonu

P(HEMA-MATrp) monolitik kolonda kapsaisin adsorpsiyonuna kapsaisin derişiminin etkisi incelenmiş ve Şekil 4.6'de ilgili kromatogram verilmektedir. Şekilden de görüldüğü gibi p(HEMA-MATrp) monolitik kolon için kapsaisin derişimi arttıkça birim monolit kütlesi başına adsorplanan kapsaisin miktarı artmaktadır (Şekil 4.6, iç şekil). Bu adsorpsiyon davranışında beklenen bir durumdur. Derişimin artması ile adsorpsiyon için sürücü kuvvet olan derişim farkı artmakta ve adsorpsiyon kapasitesinde de artış ile sonuçlanmaktadır. Adsorpsiyon miktarı p(HEMA-MATrp) monolitik kolon için 100 ppm derişimde kapsaisin kapasitesi 10.24 µg/g olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.6. P(HEMA-MATrp) monolitik kolonda kapsaisin adsorpsiyonuna kapsaisinin başlangıç derişiminin etkisi.

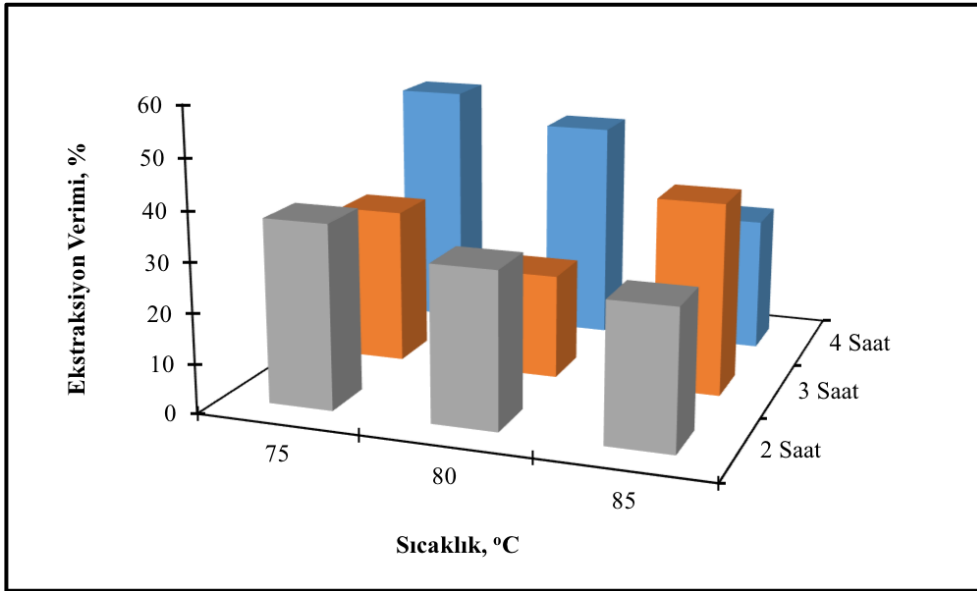
4.3. Soxhlet Ekstraksiyonu Koşullarının Optimizasyonu

Biber örneklerindeki en yüksek kapsaisin içeriğini elde etmek için ekstraksiyon işleminde etkili olan süre ve çözücü türü parametrelerinin optimum değerleri belirlenmiştir. İşlemden Hatay Samandağ ilçesinde toplanan kırmızı biberler kurutulup toz halinde getirildikten sonra Soxhlet düzeneğinde ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuştur. Ekstraksiyon verimi aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır:

$$\text{Ekstraksiyon verimi (\%)} = \left[\frac{\text{Kapsaisin miktarı (g)}}{\text{Kullanılan Biber miktarı (g)}} \right] \times 100$$

Ekstraksiyon sonucunda elde edilen ekstraktlardaki kapsaisin içeriği HPLC sistemi ile analiz edilmiştir. Bu aşamada; üç farklı çözücü ile üç farklı sıcaklık değeri (metanol için 75°C, 80°C ve 85°C; etanol için 88°C, 90°C ve 100°C; ve asetonitril için 90°C, 95°C ve 100°C)'nde Soxhlet ekstraksiyonu çalışmaları ve verimleri HPLC ölçümlerine göre hesaplanmıştır. Ekstraksiyon verimlerinde en yüksek verim, çözücü olarak metanolün kullanıldığı 4 saat'lik işlemde %50.8 değeri hesaplanmıştır. Ancak, HPLC kromatogramları incelendiğinde ise uzun süreli ekstraksiyonun üründe kirlilik ve

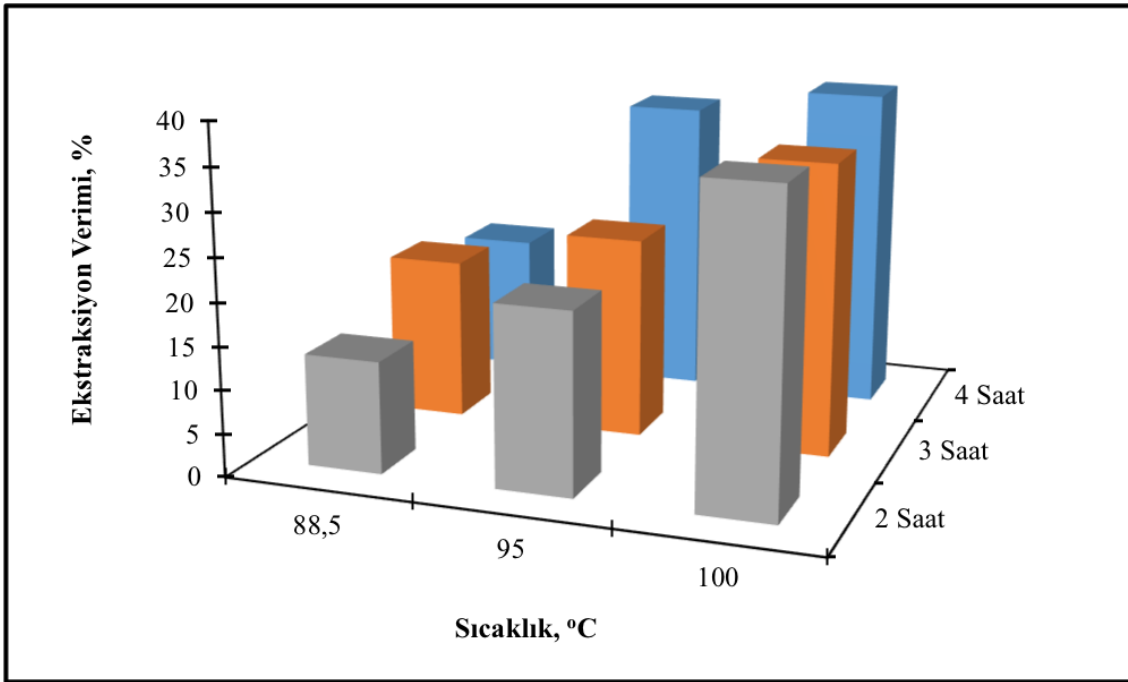
bozunmalara işaret etmektedir. İşlemden malzemenin süreye bağlı olarak ısıya maruz kalma süresi artmasına, bu da kapsaisin bileşenlerinin bazılarının degradasyonuna neden olabileceği düşüncesiyle süre 3 saat olarak belirlenmiştir. İşlem ekonomik açıdan incelendiğinde uzun ekstraksiyon süresinin zaman kaybına neden olmasıyla birlikte tüketilen enerji miktarıyla da maliyetin artmasına yol açacağı açıktır. Bütün bu bulgular doğrultusunda ekstraksiyon süresi için 2 saatin yeterli olduğu sonucuna varılmıştır. Sonuç olarak; en optimum ekstraksiyonu koşullarının metanolün çözücü olarak kullanıldığı ve 2 saat işlem süresi sonunda %31,3 verim olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.7. Metanol ile ekstrakte edilen kapsaisin miktarı süre-zaman ilişkisi.

Çizelge 4.2. Metanol çözeltisi ile ekstraksiyon verimi.

Çözücü türü	Sıcaklık (°C)	Süre(s)	Ekstraksiyon verimi (%)
Metanol (%100, v/v)	75	2	37,1
		3	31,5
		4	50,8
	80	2	31,3
		3	21,1
		4	45,0
	85	2	27,9
		3	38,9
		4	27,4

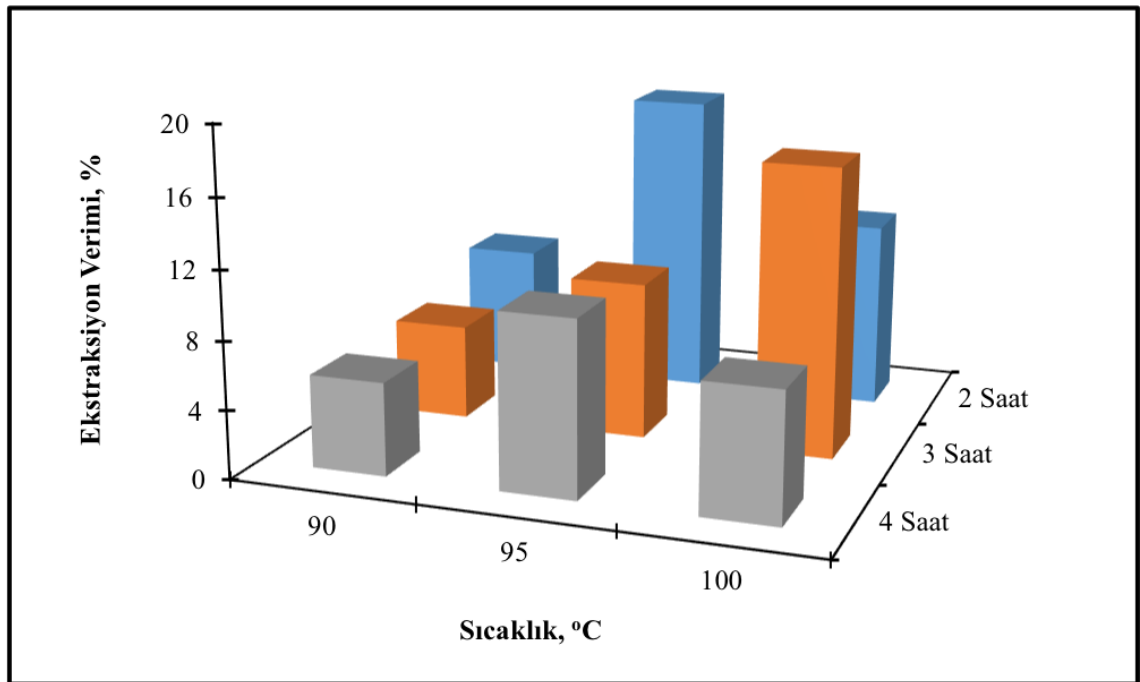


Şekil 4.8. Etanol ile ekstrakte edilen kapsaisin miktarı süre-zaman ilişkisi.

Çizelge 4.3. Etanol çözeltisi ile ekstraksiyon verimi.

Çözücü türü	Sıcaklık (°C)	Süre (s)	Ekstraksiyon verimi (%)
Etanol (%100, v/v)	88*	2	13,0
		3	18,9
		4	16,3
	90	2	21,0
		3	23,4
		4	34,9
	100	2	36,3
		3	34,0
		4	37,9

* 85°C'de Soxhlet sisteminde sifon oluşmadığı için 88°C'de ekstraksiyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.9. Asetonitril ile ekstrakte edilen kapsaisin miktarı süre-zaman ilişkisi.

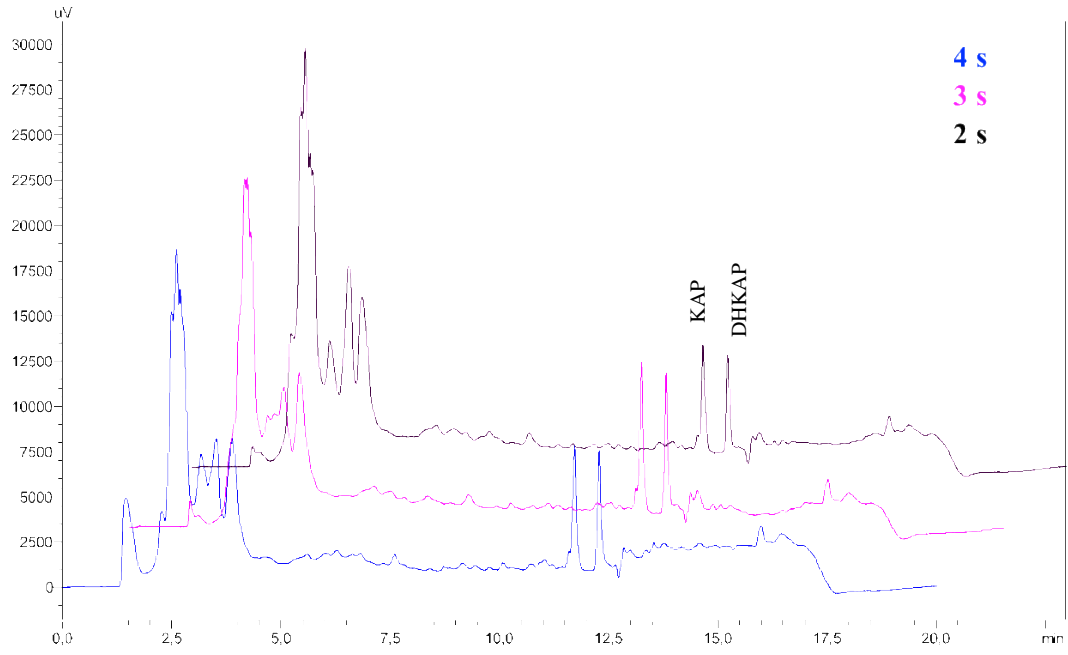
Çizelge 4.4. Asetonitril çözeltisi ile ekstraksiyon verimi.

Çözücü türü	Sıcaklık (°C)	Süre (s)	Ekstraksiyon verimi (%)
Asetonitril (%100, v/v)	90	2	7,6
		3	5,6
		4	5,4
	95	2	18,0
		3	9,3
		4	10,2
	100	2	11,1
		3	16,9
		4	7,5

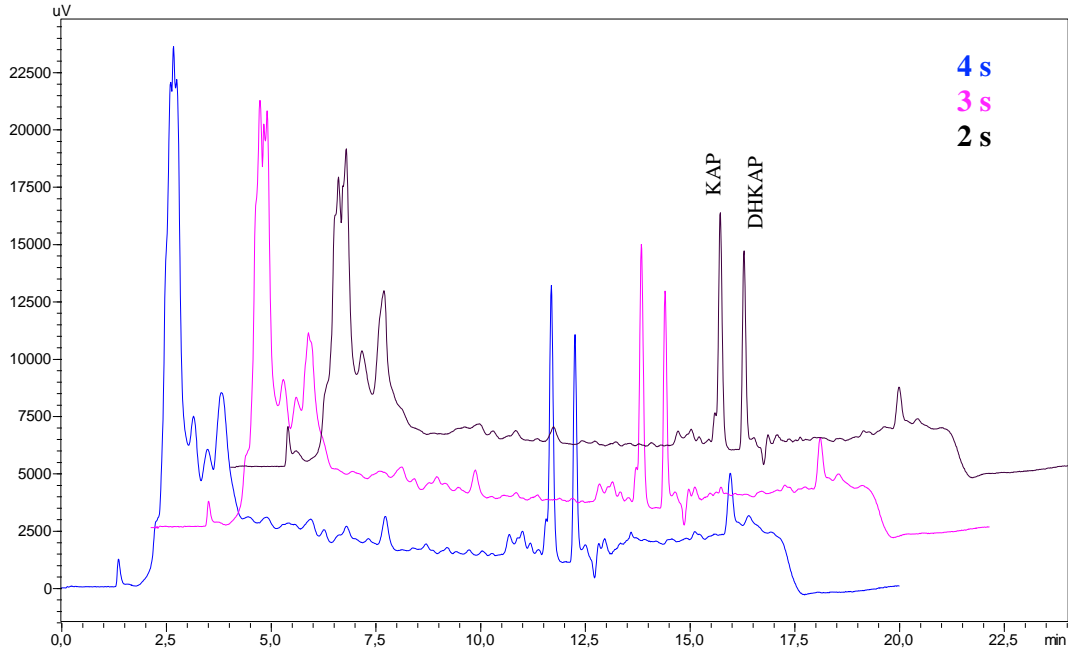
4.4. Tek Boyutlu HPLC Analizleri

4.4.1. Kurutulmuş Biber Örneklerinin HPLC Analizi

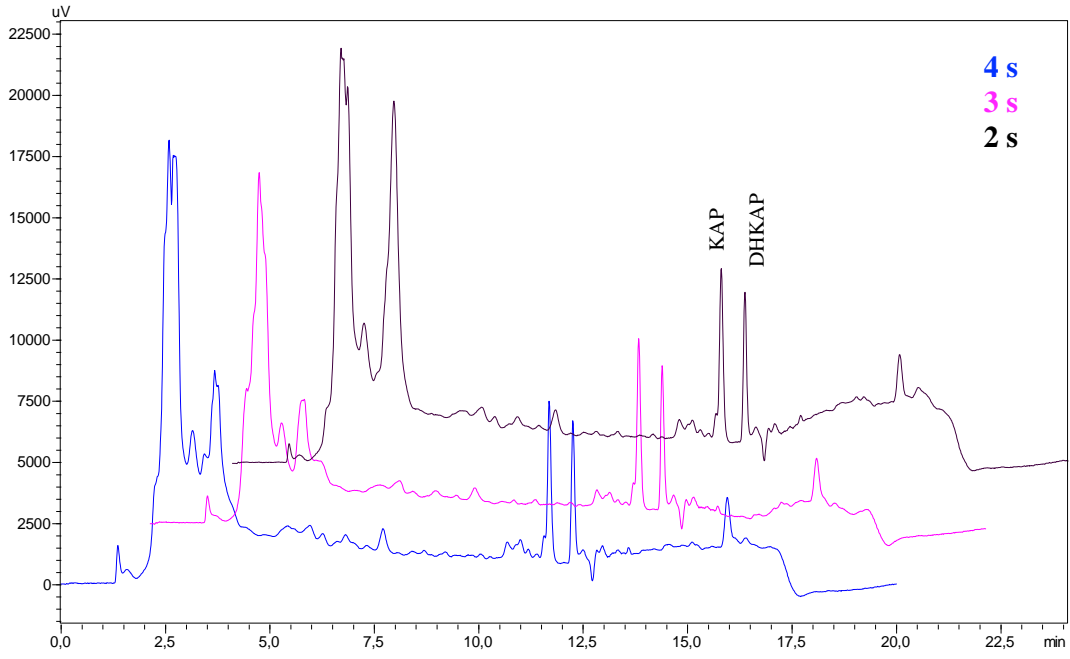
Soxhlet ekstraksiyon sistemindeki ekstraktların içerdiği kapsaisinoid bileşenlerinin konsantrasyonları HPLC standart kromatogramıyla karşılaştırılarak $\mu\text{g/g}$ seviyesinde hesaplanmış ve sonuçlar her bir çözücü için Çizelge 4.5-4.7’de özetlenerek sunulmuştur. Ekstraktların içeriği incelendiğinde, en yüksek miktarda kapsaisinoid metanol çözücüsünden elde edildiği belirlenmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.10. Kurutulmuş biber numunesindeki kapsaisinodilerin HPLC kromatogramları (Metanol: 85°C).



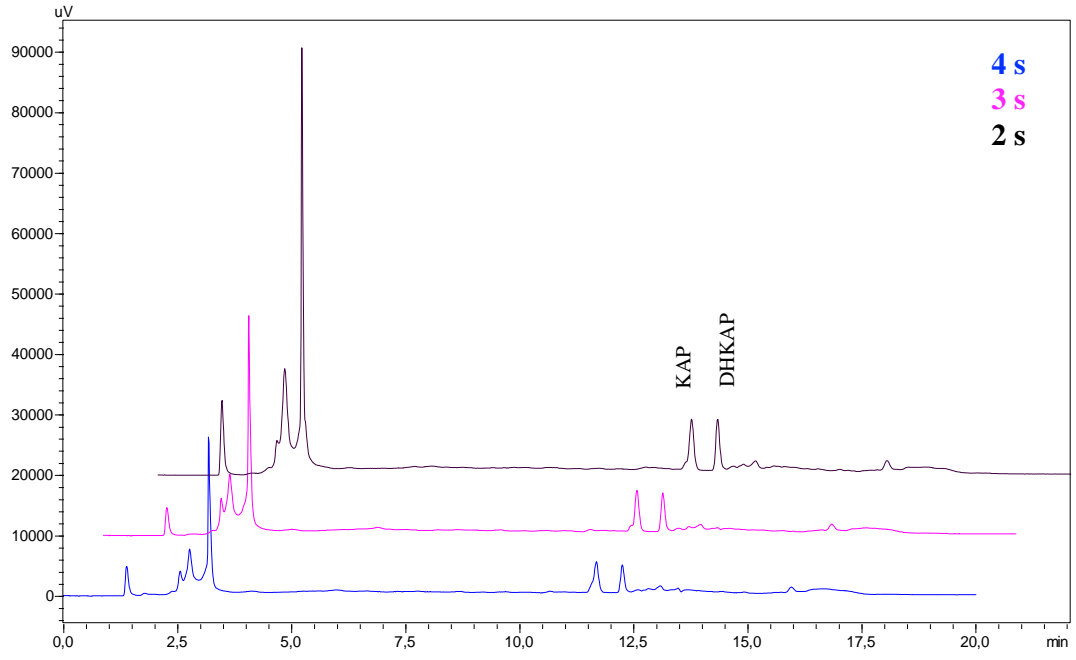
Şekil 4.11. Kurutulmuş biber numunesindeki kapsaisinodilerin HPLC kromatogramları (Metanol: 80°C)



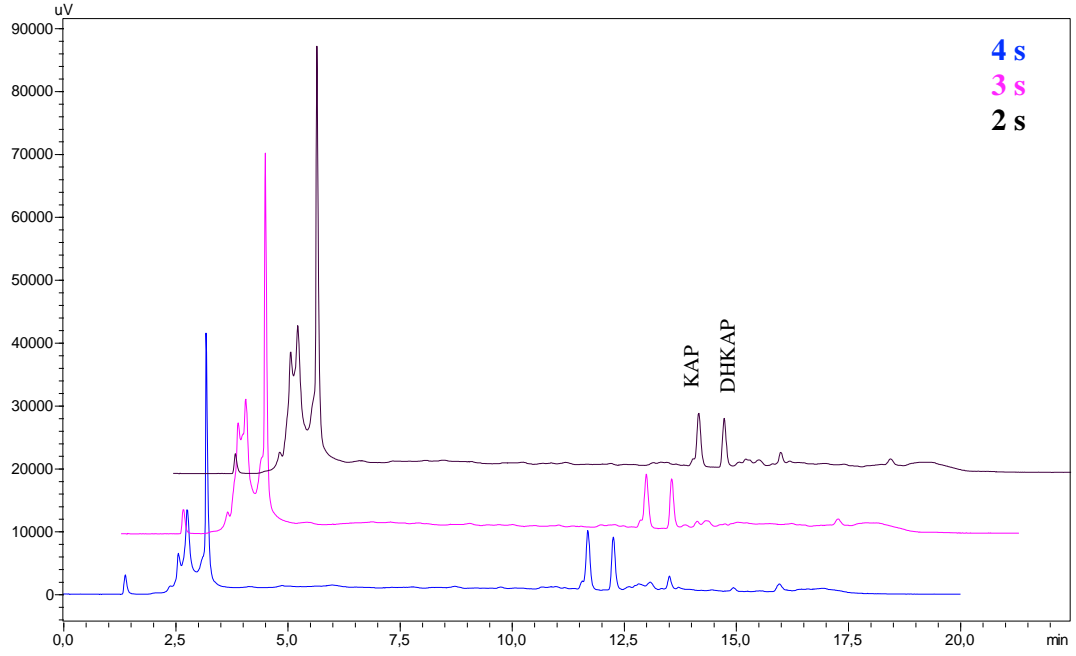
Şekil 4.12. Kurutulmuş biber numunesindeki kapsaisinodilerin HPLC kromatogramları (Metanol: 75°C).

Çizelge 4.5. Metanol çözeltisi ile ekstraksiyon verimi.

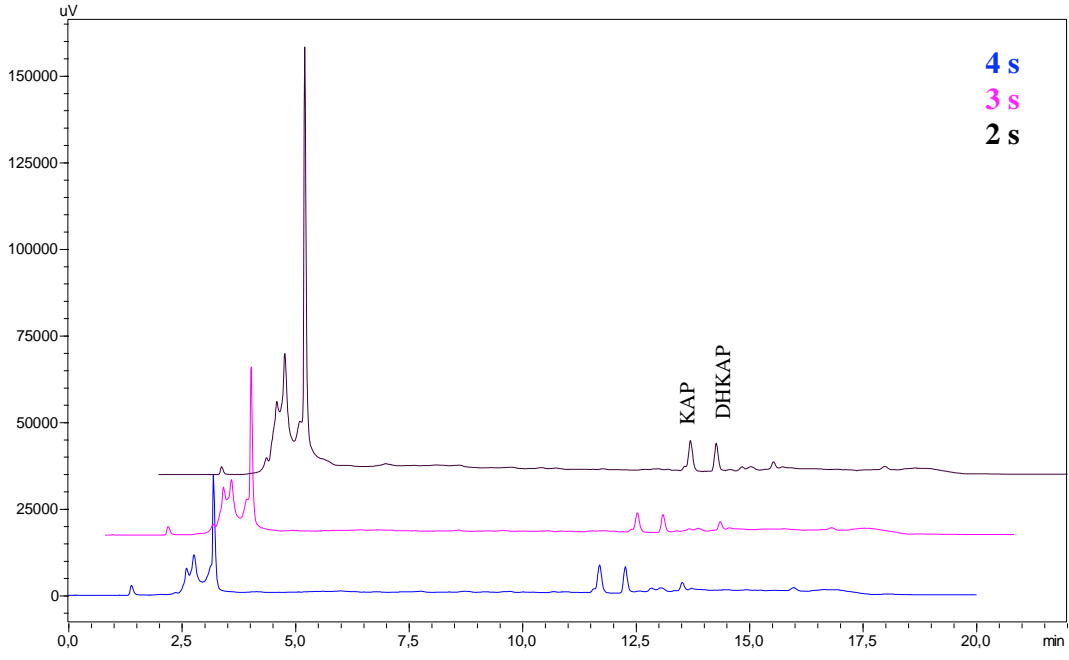
Çözücü türü	Sıcaklık (°C)	Süre (s)	Kapsaisin		Dihidrocapsaisin	
			(µg/g)	%	(µg/g)	%
Metanol (%100, v/v)	75	2	1585,6	74,2	550,8	25,8
		3	1565,4	78,4	431,8	21,6
		4	1563,1	76,3	486,0	23,7
	80	2	1699,6	70,4	714,7	29,6
		3	1780,9	66,5	897,8	33,5
		4	1613,6	65,7	843,8	34,3
	85	2	1571,4	66,4	794,4	33,6
		3	1528,1	72,9	566,6	27,1
		4	1525,4	74,9	510,7	25,1



Şekil 4.13. Kurutulmuş biber numunesindeki kapsaisinodilerin HPLC kromatogramları (Etanol: 95°C).



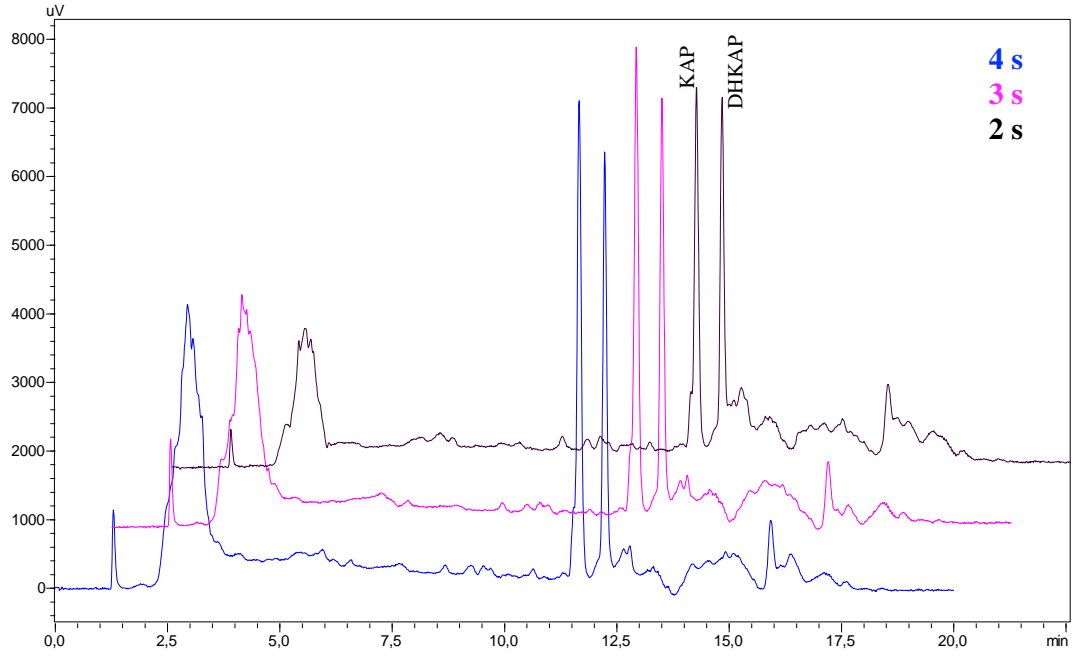
Şekil 4.14. Kurutulmuş biber numunesindeki kapsaisinodilerin HPLC kromatogramları (Etanol: 88°C).



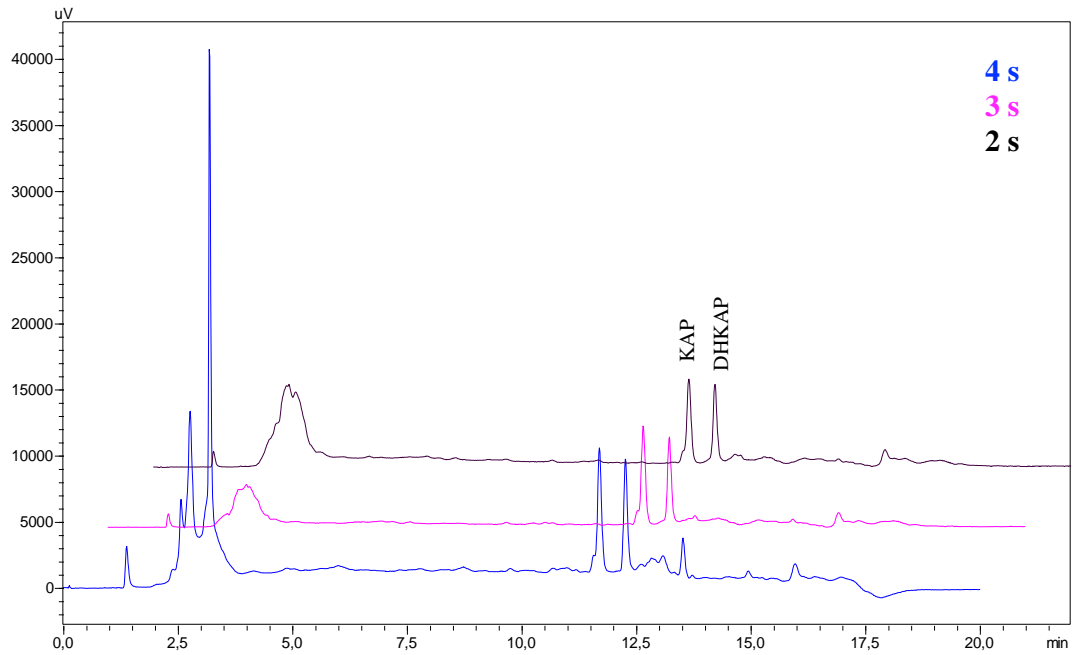
Şekil 4.15. Kurutulmuş biber numunesindeki kapsaisinodilerin HPLC kromatogramları (Etanol: 100°C).

Çizelge 4.6. Etanol çözücüsü ile ekstraksiyon verimi.

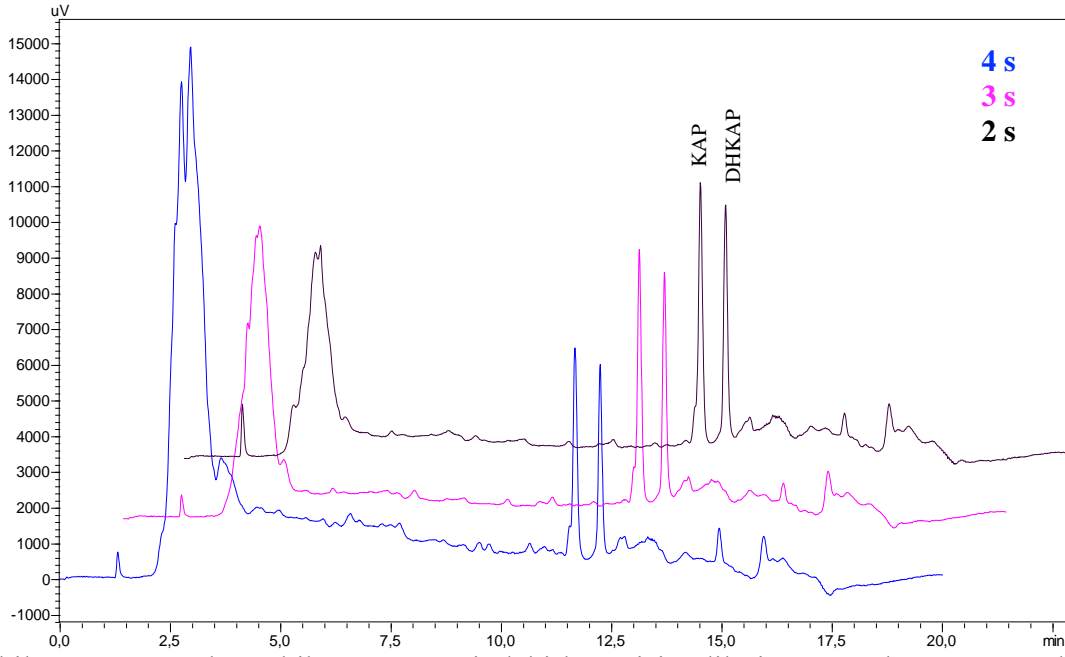
Çözücü türü	Sıcaklık (°C)	Süre(s)	Kapsaisin		Dihidrocapsaisin	
			(µg/g)	%	(µg/g)	%
Etanol (%100, v/v)	88	2	1340,4	87,8	185,9	12,2
		3	1477,5	76,8	445,5	23,2
		4	1595,6	69,5	701,4	30,5
	95	2	1509,9	70,1	645,5	29,9
		3	1574,2	71,1	640,0	28,9
		4	1604,1	70,0	688,7	30,0
	100	2	1402,8	70,4	591,1	29,6
		3	1513,0	78,6	412,3	21,4
		4	1512,6	75,8	483,5	24,2



Şekil 4.16. Kurutulmuş biber numunesindeki kapsaisinodilerin HPLC kromatogramları (Asetonitril: 90°C).



Şekil 4.17. Kurutulmuş biber numunesindeki kapsaisinodilerin HPLC kromatogramları (Asetonitril: 95°C).



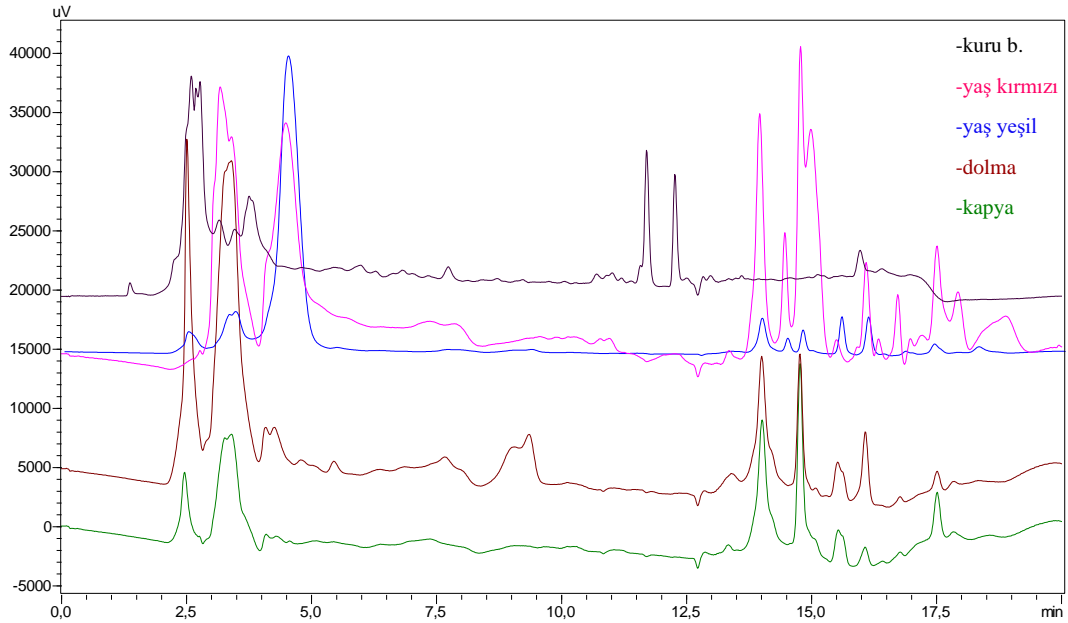
Şekil 4.18. Kurutulmuş biber numunesindeki kapsaisinodilerin HPLC kromatogramları (Asetonitril: 100°C).

Çizelge 4.7. Asetonitril çözücüsünde ekstraksiyon verimi.

Çözücü türü	Sıcaklık (°C)	Süre (s)	Kapsaisin		Dihidrocapsaisin	
			(µg/g)	%	(µg/g)	%
Asetonitril (%100, v/v)	90	2	1480,0	75,7	473,8	24,3
		3	1475,4	75,8	470,2	24,2
		4	1414,4	82,0	310,8	18,0
	95	2	1426,0	75,4	465,6	24,6
		3	1489,1	77,5	433,1	22,5
		4	1431,8	74,9	479,0	25,1
	100	2	1424,0	82,3	306,2	17,7
		3	1491,1	77,1	442,5	22,9
		4	1496,6	70,5	627,5	29,5

4.4.2. Farklı Biber Örneklerinin HPLC Analizi

Farklı biber örneklerden kapsaisinodlerin belirlenmesi beş farklı numune (kurutulmuş biber, yaş kırmızı biber, yaş yeşil biber, dolma ve kapy) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Soxhlet ekstraksiyon sisteminden ekstrakte edilen tüm biber örneklerinde C18 kolonları kullanılarak tayini gerçekleştirilmiştir. Kromatogramlardan da görüldüğü gibi biber örnekleri C18 kolonuna aktarıldığında kapsaisin ve dihidroksikapsaisin görülmektedir. Kromatogram incelendiğinde kurutulmuş biber örneğinde 11,6. dakikada gözlenen pik kapsaisine ait iken 12,4. dakikada gözlenen pik dihidroksikapsaisine aittir. Kurutulmuş biber örneğindeki kapsaisin ve dihidroksikapsaisin miktarı sırasıyla 1780,9 µg/g ve 897,8 µg/g olarak belirlenmiştir. Toplam kapsaisinodi miktarı 2678,7 µg/g olarak hesaplanmış ve Acılık (SÜ, Scoville Ünitesi) miktarı 40180.5 SÜ olarak tespit edilmiştir. Buna en yakın değer yaş kırmızı biberde 105,4 ve 66,5 µg/g olarak tespit edilmiştir. Diğer taraftan dolma ve kapy biberleri için kapsaisin ve dihidroksikapsaisin tespit edilememiştir.



Şekil 4.19. Kurutulmuş biber, yaş kırmızı biber, yaş yeşil biber dolma ve kapy biber HPLC kromatogramları.

Çizelge 4.8. Farklı biber türlerindeki kapsaisinoid miktarları ve Acılık değerleri.

Biber Çeşitleri	KAP		DHKAP		Toplam Kapsaisinoid (µg/g)	Acılık (S.Ü.- Scoville Ünitesi) (SÜ)
	(µg/g)	%	(µg/g)	%		
Kuru	1780,9	66,5	897,8	33,5	2678,7	40180,5
Yaş Kırmızı	105,4	61,3	66,5	38,7	171,9	2578,2
Yaş Yeşil	-		-		9,7	145,5
Dolma	-		-		-	-
Kapya	-		-		-	-

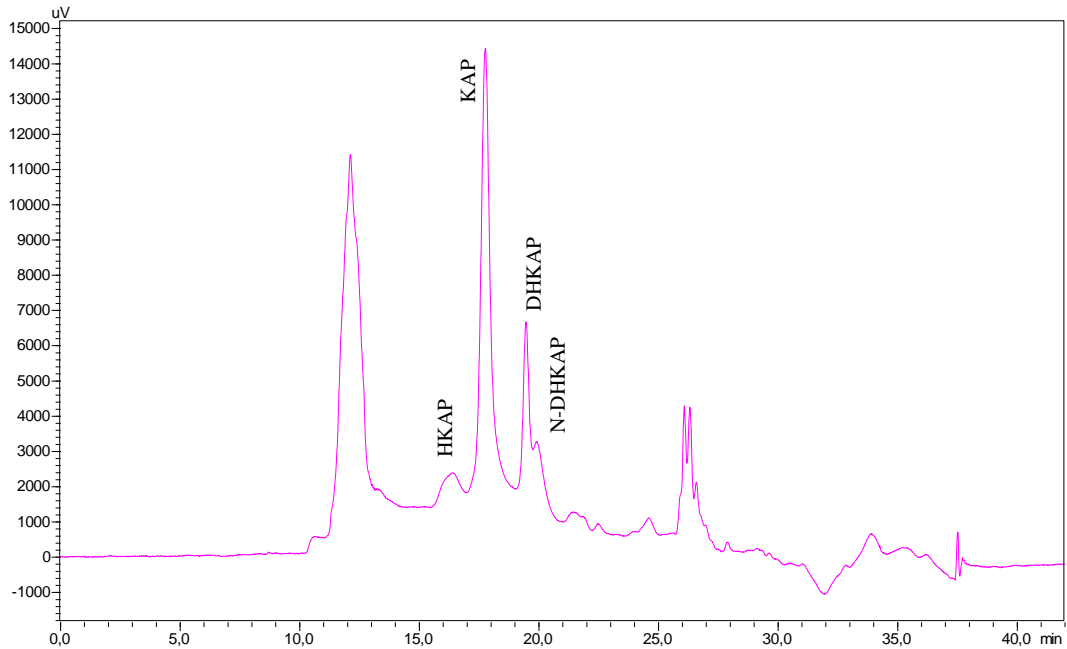
4.5. İki Boyutlu HPLC Sistemi

4.5.1. Kapsaisinin Saflaştırılması

Sunulan tezde, sentezlenen afinite monolitik kolonları iki boyutlu HPLC sisteme entegre edilerek yüksek performanslı sıvı afinite kolonları (HPLAC) sentezlenmiştir. HPLC ve monolitik kolonların kombinasyonu ile oluşturulan HPLAC istenilen maddenin ön-deriştirilmesini sağlayarak; kompleks biber ekstraktından kapsaisinin ön-deriştirilmesi ve yüksek saflıkta eldesi için alternatif bir yöntem sunmuştur. HPLC sisteminde kullanılan C18 kolonları serbest halde bulunan kapsaisinin analizinde tayin amaçlı kullanılmaktadır. Fakat biber matrisinde kompleks halinde bulunan kapsaisinin ekstraksiyonunda yetersiz kalmaktadır. Bundan dolayı özütleme, ön-deriştirme ve son tayin aşamalarının tüm otomasyonunun gerçekleşeceği online 2D-HPLC sistemleri bu sisteme entegre edilerek kapsaisinin ön-deriştirilmesi ve saflaştırılması hedeflenmiştir.

P(HEMA-MATrp) monolitik kolonun etkinliği göstermek için, kurutulmuş biber örneklerinden alınan ekstrakt iki boyutlu HPLC sistemde incelenmiştir. Biber ekstraktından elde edilen kromatogramlar Şekil 4.19'da verilmiştir. Ortaya çıkan sonuçlar göstermiştir ki tek boyutlu HPLC sisteminde (Şekil 4.20) kapsaisinoid türlerinden sadece kapsaisin ve dihidrokapsaisin görülmüştür. İki boyutlu HPLC sisteminde ise karşılaşılan önemli bulgu kapsaisin ve dihidrokapsaisin ile birlikte nor-dihidrokapsaisin ve homokapsaisin türlerinin de gözlenmesidir. Önemle vurgulanması gereken diğer önemli bir husus ise tek boyutlu sistemde total kapsaisinoid miktarı 2678,7

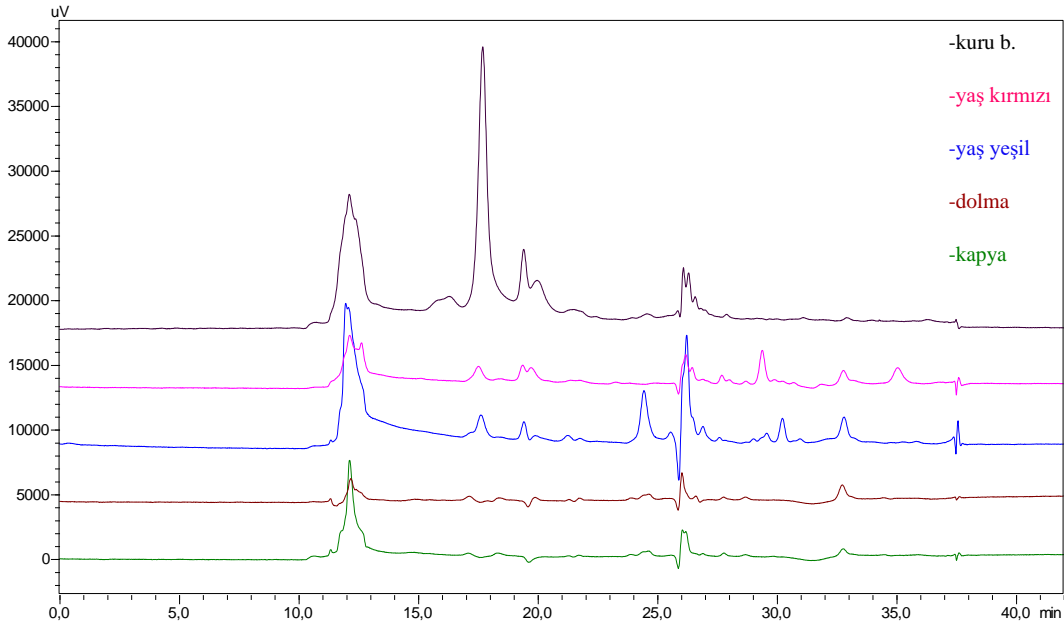
$\mu\text{g/g}$ olarak tespit edilmesine rağmen 2-boyutlu sistemde total kapsaisinoid miktarı $3853,7 \mu\text{g/g}$ olarak belirlenmiştir. 2-Boyutlu sistemde gözlenen bu yüksek kapsaisinoid miktarının nedeni; ilk kolon olarak kullanılan p(HEMA-MATrp) kolon önderiştirme kolonu olarak kullanılmıştır. Böylece ilk kolonda düşük akış hızında tutunma sağlanmış ve ikinci kolon olan analitik kolonda yüksek akış hızı oluşturularak ilk kolonda daha fazla kapsaisinoidin tutunması sağlanmıştır. Tek-boyutlu HPLC sistemi incelendiğinde, bitki ekstraktından gelen tüm bileşenler HPLC kromatogramında gözlenmektedir, bu da düşük derişimdeki kapsaisinoidlerin belirlenmesini zorlaştırmaktadır. Oysaki 2-boyutlu HPLC sisteminde sadece ilgilenilen kısım yani kapsaisinoidlerin alıkonulduğu zaman aralıkları kromatogramda görülmektedir. Bunun dışında kalan diğer bitki ekstraktında yer alan türler saf dışı kalmaktadır. 2-Boyutlu HPLC’de kesikli sistem olarak adlandırılan bu yöntemde ilk kolonda sadece ilgilenilen türler belli zaman aralıklarında tutulur ve ikinci kolona aktarılır böylece kompleks matristen gelen diğer tüm bileşenler elimine edilerek sadece hedef bileşenler analitik kolonda belirlenir. Şekil 4.21’den da görüldüğü gibi kromatogramda 15. dakika ile 20. dakika aralığındaki kromatogramlar sadece kapsaisinoidlere ait olan kromatogramlardır.



Şekil 4.20. İki boyutlu HPLC sisteminde p(HEMA-MATrp) monolitik kolonlara adsorbe edilen kapsaisin ve diğer kapsaisinoidlerin saflaştırılması.

4.5.2. Farklı Biber Türlerinden Kapsaisin ÖN-Derİştirilmesi ve Saflaştırılması

Farklı biber örneklerden kapsaisinoidlerin ön-deriştirme çalışmaları beş farklı numune (kurutulmuş biber, yaş kırmızı biber, yaş yeşil biber, dolma ve kapy) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Soxhlet ekstraksiyon sisteminden ekstrakte edilen tüm biber örneklerinde p(HEMA-MATrp) kolonları kullanılarak kapsaisinoidlerin ön-deriştirilmesi ve tayini gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.22'deki kromatogramlardan da görüldüğü gibi biber örnekleri p(HEMA-MATrp) birinci kolonundan geçirilip ticari C18 kolonuna aktarıldığında kapsaisinoid türleri birbirinden ayrılmakta ve açık bir şekilde ortaya çıkmaktadır. Tüm biber türleri kendi içerisinde incelendiğinde en yüksek kapsaisin ve kapsaisinoid türleri kurutulmuş biber örneklerinde 3853,7 µg/g olarak belirlenmiştir. Buna en yakın değer yaş kırmızı biberde 804,2 µg/g olarak tespit edilmiştir. Yaş yeşil biber örnekleri için tek boyutlu HPLC sisteminde belirlenemeyen kapsaisinoid türleri 2-boyutlu HPLC sisteminde 695,4 µg/g olarak tespit edilmiştir. Diğer taraftan tek boyutlu sistemde olduğu gibi 2-boyutlu sistemde de dolma ve kapy biber için kapsaisin ve türleri tespit edilememiştir.



Şekil 4.21. İki boyutlu HPLC sisteminde absorbe edilen kapsaisinoidler.

Çizelge 4.9. İki boyutlu HPLC analizi sonucunda kapsaisinoid türlerinin verimi.

Biber Çeşitleri	KAP		DHKAP		N-DHKAP		HKAP		Toplam Kapsaisinoid	Acılık (S.Ü.-Scoville Ünitesi)
	(µg/g)	%	(µg/g)	%	(µg/g)	%	(µg/g)	%	(µg/g)	
Kuru	2911,1	75,5	701,7	18,2	188,8	4,9	52,1	1,4	3853,7	57805,5
Yaş Kırmızı	697,7	86,8	106,5	13,2	-	-	-		804,2	
Yaş Yeşil	453,7	65,2	241,7	34,8	-		-		695,4	
Dolma	-		-		-		-		-	
Kapya	-		-		-		-		-	

5. YORUM

- Tez çalışmasının ana hedefi önemli bir ticari değere sahip kapsaisinin yüksek saflıkta elde edilebilmesi için yeni bir yöntem ortaya koymaktır.
- Bu hedefe yönelik olarak acılığı ile dünyaca ünlü ve yerel endemik bir ürün olan Samandağ (Hatay) biberi seçilmiş, bu biberdeki kapsaisin miktarı belirlenmiş ve farklı biber türleri ile karşılaştırılmıştır.
- Kapsaisinin saflaştırılması sırasında başlangıç olarak Soxhlet ekstraksiyonu kullanılmış ekstraksiyon veriminin en üst düzeye çıkartılması için en uygun çözücü, sıcaklık ve zaman parametreleri ortaya konmuştur.
- Ekstraktlardaki kapsaisinoid türlerinin diğer bileşenlerden ayrılması ve yüksek saflıkta elde edilebilmesi amacıyla tek boyutlu ve iki boyutlu HPLC sistemleri kullanılmıştır.
- Çalışmanın birinci özgün değeri ekstraksiyondaki parametrelerin optimize edilmiş olmasıdır.
- İkinci özgün değer ise iki boyutlu HPLC analizi için L-triptofan molekülünün polimerleşebilen türevi olan MATrp monomeri ile afinite etkileşimleri temeline dayalı hidrofobik p(HEMA-MATrp) monolitik HPLC kolonları hazırlanmış ve karakterize edilmiş, bu kolonun kapsaisinoid bileşenlerini birbirinden ayırmada ve yüksek tutuculuk sağlamada oldukça etkili olduğunun ortaya konmuştur.
- İki boyutlu HPLC sisteminin kapsaisin, dihidrokapsaisin, nordihidrokapsaisin ve homokapsaisin bileşenlerini kırmızı biber ekstraktından kısa sürede ve tekrarlanabilir şekilde tespit edebildiği ve saf olarak elde edilmelerini sağladığı kanıtlanmıştır.
- Tez çalışmasının en önemli özgün değeri ise yerel bir üründen yola çıkarak kapsaisinin saf olarak elde edilmesi için yeni bir yöntem ortaya koyabilme hedefinin gerçekleştirilmiş olmasıdır.

6. KAYNAKLAR

1. Azmir, J., et al., *Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review*. Journal of food engineering, 2013. **117**(4): p. 426-436.
2. Vinatoru, M., *An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs*. Ultrasonics sonochemistry, 2001. **8**(3): p. 303-313.
3. Paulsen, B.S., *Highlights through the history of plant medicine*. Bioactive compounds in plants-benefits and risks for man and animals, 2010. **50**.
4. Bernhoft, A., *A brief review on bioactive compounds in plants*. Bioactive compounds in plants-benefits and risks for man and animals, 2010. **50**: p. 11-17.
5. Martin, J. and A. Demain, *Fungal development and metabolite formation*. Filamentous fungi, 1978.
6. Dudareva, N. and E. Pichersky, *Biochemical and molecular genetic aspects of floral scents*. Plant physiology, 2000. **122**(3): p. 627-634.
7. Croteau, R., T.M. Kutchan, and N.G. Lewis, *Natural products (secondary metabolites)*. Biochemistry and molecular biology of plants, 2000. **24**: p. 1250-1319.
8. Taiz, L. and E. Zeiger, *Secondary metabolites and plant defense*. Plant physiology, 2006. **4**: p. 315-344.
9. Wink, M., *Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective*. Phytochemistry, 2003. **64**(1): p. 3-19.
10. Kobata, K., et al., *Potent production of capsaicinoids and capsinoids by Capsicum peppers*. Journal of agricultural and food chemistry, 2013. **61**(46): p. 11127-11132.
11. Davis, C.B., et al., *Determination of capsaicinoids in habanero peppers by chemometric analysis of UV spectral data*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**(15): p. 5925-5933.
12. Mueller-Seitz, E., C. Hiepler, and M. Petz, *Chili pepper fruits: content and pattern of capsaicinoids in single fruits of different ages*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. **56**(24): p. 12114-12121.
13. Thiele, R., E. Mueller-Seitz, and M. Petz, *Chili pepper fruits: presumed precursors of fatty acids characteristic for capsaicinoids*. Journal of agricultural and food chemistry, 2008. **56**(11): p. 4219-4224.

14. Tanaka, Y., et al., *Assessment of capsiconinoid composition, nonpungent capsaicinoid analogues, in capsicum cultivars*. Journal of agricultural and food chemistry, 2009. **57**(12): p. 5407-5412.
15. Kobata, K., et al., *Novel capsaicinoid-like substances, capsiate and dihydrocapsiate, from the fruits of a nonpungent cultivar, CH-19 Sweet, of pepper (Capsicum annuum L.)*. Journal of agricultural and food chemistry, 1998. **46**(5): p. 1695-1697.
16. Kobata, K., et al., *Nordihydrocapsiate, a new capsinoid from the fruits of a nonpungent pepper, Capsicum annuum*. Journal of natural products, 1999. **62**(2): p. 335-336.
17. Yazawa, S., et al., *Novel capsaicinoid like substances in the fruits of new non-pungent cultivar 'CH-19 Sweet' of pepper (Capsicum annuum)*. 2004.
18. Han, K., et al., *Biosynthesis of capsinoid is controlled by the Pun1 locus in pepper*. Molecular breeding, 2013. **31**(3): p. 537-548.
19. Macho, A., et al., *Non-pungent capsaicinoids from sweet pepper*. European Journal of Nutrition, 2003. **42**(1): p. 2-9.
20. Ludy, M.-J., G.E. Moore, and R.D. Mattes, *The effects of capsaicin and capsiate on energy balance: critical review and meta-analyses of studies in humans*. Chemical senses, 2012. **37**(2): p. 103-121.
21. Dong, M.W., *Modern HPLC for practicing scientists*. 2006: John Wiley & Sons.
22. Collins, M.D., L.M. Wasmund, and P.W. Bosland, *Improved method for quantifying capsaicinoids in Capsicum using high-performance liquid chromatography*. HortScience, 1995. **30**(1): p. 137-139.
23. Dong, M.W., *Instruments & Applications How Hot Is That Pepper? Quantifying capsaicinoids with chromatography*. Today's Chemist at Work, 2000. **9**(5): p. 17-22.
24. Fraenkel, L., et al., *Treatment options in knee osteoarthritis: the patient's perspective*. Archives of internal medicine, 2004. **164**(12): p. 1299-1304.
25. Remadevi, R. and A. Szallasi, *Adlea (ALGRX-4975), an injectable capsaicin (TRPV1 receptor agonist) formulation for longlasting pain relief*. IDrugs: the investigational drugs journal, 2008. **11**(2): p. 120-132.
26. Knotkova, H., M. Pappagallo, and A. Szallasi, *Capsaicin (TRPV1 Agonist) therapy for pain relief: farewell or revival?* The Clinical journal of pain, 2008. **24**(2): p. 142-154.

27. Caterina, M.J., et al., *A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat*. Nature, 1999. **398**(6726): p. 436-441.
28. Cortright, D.N. and A. Szallasi, *TRP channels and pain*. Current pharmaceutical design, 2009. **15**(15): p. 1736-1749.
29. Caterina, M.J., et al., *Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor*. science, 2000. **288**(5464): p. 306-313.
30. Wong, G.Y. and N.R. Gavva, *Therapeutic potential of vanilloid receptor TRPV1 agonists and antagonists as analgesics: Recent advances and setbacks*. Brain research reviews, 2009. **60**(1): p. 267-277.
31. Gerner, P., et al., *Capsaicin combined with local anesthetics preferentially prolongs sensory/nociceptive block in rat sciatic nerve*. Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists, 2008. **109**(5): p. 872-878.
32. Kissin, I., *Vanilloid-induced conduction analgesia: selective, dose-dependent, long-lasting, with a low level of potential neurotoxicity*. Anesthesia and analgesia, 2008. **107**(1): p. 271.
33. Iida, T., et al., *TRPV1 activation and induction of nociceptive response by a non-pungent capsaicin-like compound, capsiate*. Neuropharmacology, 2003. **44**(7): p. 958-967.
34. Luo, X.-J., J. Peng, and Y.-J. Li, *Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids*. European journal of pharmacology, 2011. **650**(1): p. 1-7.
35. Surh, Y.-J., *More than spice: capsaicin in hot chili peppers makes tumor cells commit suicide*. 2002, Oxford University Press.
36. Thoennissen, N., et al., *Capsaicin causes cell-cycle arrest and apoptosis in ER-positive and-negative breast cancer cells by modulating the EGFR/HER-2 pathway*. Oncogene, 2010. **29**(2): p. 285-296.
37. Ito, K., et al., *Induction of apoptosis in leukemic cells by homovanillic acid derivative, capsaicin, through oxidative stress: implication of phosphorylation of p53 at Ser-15 residue by reactive oxygen species*. Cancer research, 2004. **64**(3): p. 1071-1078.
38. Singh, S., et al., *Oxidative DNA damage by capsaicin and dihydrocapsaicin in the presence of Cu (II)*. Cancer letters, 2001. **169**(2): p. 139-146.
39. Ziglioli, F., et al., *Vanilloid-mediated apoptosis in prostate cancer cells through a TRPV-1 dependent and a TRPV-1-independent mechanism*. Acta Bio-Medica: Atenei Parmensis, 2009. **80**(1): p. 13-20.

40. Kim, S. and A. Moon, *Capsaicin-Induced apoptosis of h-ras-transformed human breast epithelial cells is rac-dependent via ros generation*. Archives of pharmacological research, 2004. **27**(8): p. 845-849.
41. Oh, S.-H. and S.-C. Lim, *Endoplasmic reticulum stress-mediated autophagy/apoptosis induced by capsaicin (8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide) and dihydrocapsaicin is regulated by the extent of c-Jun NH2-terminal kinase/extracellular signal-regulated kinase activation in WI38 lung epithelial fibroblast cells*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2009. **329**(1): p. 112-122.
42. Macho, A., et al., *Involvement of reactive oxygen species in capsaicinoid-induced apoptosis in transformed cells*. Free radical research, 2003. **37**(6): p. 611-619.
43. Pyun, B.-J., et al., *Capsiate, a nonpungent capsaicin-like compound, inhibits angiogenesis and vascular permeability via a direct inhibition of Src kinase activity*. Cancer Research, 2008. **68**(1): p. 227-235.
44. Surh, Y.-J. and S. Lee, *Capsaicin in hot chili pepper: carcinogen, co-carcinogen or anticarcinogen?* Food and Chemical Toxicology, 1996. **34**(3): p. 313-316.
45. Báez, S., et al., *Genetic variants involved in gallstone formation and capsaicin metabolism, and the risk of gallbladder cancer in Chilean women*. World journal of gastroenterology: WJG, 2010. **16**(3): p. 372.
46. Reinbach, H.C., et al., *Effects of capsaicin, green tea and CH-19 sweet pepper on appetite and energy intake in humans in negative and positive energy balance*. Clinical nutrition, 2009. **28**(3): p. 260-265.
47. Shin, K.O. and T. Moritani, *Alterations of autonomic nervous activity and energy metabolism by capsaicin ingestion during aerobic exercise in healthy men*. Journal of nutritional science and vitaminology, 2007. **53**(2): p. 124-132.
48. Joo, J.I., et al., *Proteomic analysis for antiobesity potential of capsaicin on white adipose tissue in rats fed with a high fat diet*. Journal of proteome research, 2010. **9**(6): p. 2977-2987.
49. Faraut, B., et al., *Capsiate administration results in an uncoupling protein-3 downregulation, an enhanced muscle oxidative capacity and a decreased abdominal fat content in vivo*. International journal of obesity, 2009. **33**(12): p. 1348-1355.

50. Kawabata, F., et al., *Non-pungent capsaicin analogs (capsinoids) increase metabolic rate and enhance thermogenesis via gastrointestinal TRPV1 in mice.* *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 2009. **73**(12): p. 2690-2697.
51. Harada, N. and K. Okajima, *Effects of capsaicin and isoflavone on blood pressure and serum levels of insulin-like growth factor-I in normotensive and hypertensive volunteers with alopecia.* *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 2009. **73**(6): p. 1456-1459.
52. Peng, J. and Y.-J. Li, *The vanilloid receptor TRPV1: role in cardiovascular and gastrointestinal protection.* *European journal of pharmacology*, 2010. **627**(1-3): p. 1-7.
53. Zvara, Á., et al., *Capsaicin-sensitive sensory neurons regulate myocardial function and gene expression pattern of rat hearts: a DNA microarray study.* *The FASEB journal*, 2006. **20**(1): p. 160-162.
54. Peng, J., et al., *Involvement of α -calcitonin gene-related peptide in monophosphoryl lipid A-induced delayed preconditioning in rat hearts.* *European journal of pharmacology*, 2002. **436**(1-2): p. 89-96.
55. Peng, J., et al., *Involvement Of α -Calcitonin Gene-Related Peptide In Heat Stress-Induced Delayed Preconditioning In Rat Hearts.* *Clinical and experimental pharmacology and physiology*, 2002. **29**(7): p. 569-574.
56. Adams, M.J., K.D. Ahuja, and D.P. Geraghty, *Effect of capsaicin and dihydrocapsaicin on in vitro blood coagulation and platelet aggregation.* *Thrombosis research*, 2009. **124**(6): p. 721-723.
57. Hogaboam, C.M. and J.L. Wallace, *Inhibition of platelet aggregation by capsaicin. An effect unrelated to actions on sensory afferent neurons.* *European journal of pharmacology*, 1991. **202**(1): p. 129-131.
58. Harper, A., S. Brownlow, and S. Sage, *A role for TRPV1 in agonist-evoked activation of human platelets.* *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2009. **7**(2): p. 330-338.
59. Ahuja, K.D., et al., *Effects of capsaicin, dihydrocapsaicin, and curcumin on copper-induced oxidation of human serum lipids.* *Journal of agricultural and food chemistry*, 2006. **54**(17): p. 6436-6439.
60. Manjunatha, H. and K. Srinivasan, *Protective effect of dietary curcumin and capsaicin on induced oxidation of low-density lipoprotein, iron-induced*

- hepatotoxicity and carrageenan-induced inflammation in experimental rats*. The FEBS journal, 2006. **273**(19): p. 4528-4537.
61. Ahuja, K.D. and M.J. Ball, *Effects of daily ingestion of chilli on serum lipoprotein oxidation in adult men and women*. British journal of nutrition, 2006. **96**(2): p. 239-242.
 62. Satyanarayana, M., *Capsaicin and gastric ulcers*. Critical reviews in food science and nutrition, 2006. **46**(4): p. 275-328.
 63. Mózsik, G., J. Szolcsányi, and A. Dömötör, *Capsaicin research as a new tool to approach of the human gastrointestinal physiology, pathology and pharmacology*. Inflammopharmacology, 2007. **15**(6): p. 232-245.
 64. Szolcsanyi, J. and L. Bartho, *Capsaicin-sensitive afferents and their role in gastroprotection: an update*. Journal of Physiology-Paris, 2001. **95**(1-6): p. 181-188.
 65. Wang, L., et al., *The protective effects of rutaecarpine on gastric mucosa injury in rats*. Planta medica, 2005. **71**(05): p. 416-419.
 66. Nishihara, K., et al., *Sensitizing effects of lafutidine on CGRP-containing afferent nerves in the rat stomach*. British journal of pharmacology, 2002. **135**(6): p. 1487-1494.
 67. Watanabe, E., et al., *Studies of the toxicological potential of capsinoids: VIII. A 13-week toxicity study of commercial-grade dihydrocapsiate in rats*. International journal of toxicology, 2008. **27**(3_suppl): p. 101-118.
 68. Vriens, J., G. Appendino, and B. Nilius, *Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels*. Molecular pharmacology, 2009. **75**(6): p. 1262-1279.
 69. Montell, C., *The TRP superfamily of cation channels*. Science Signaling, 2005. **2005**(272): p. re3-re3.
 70. Liedtke, W. and C. Kim, *Functionality of the TRPV subfamily of TRP ion channels: add mechano-TRP and osmo-TRP to the lexicon!* Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 2005. **62**(24): p. 2985-3001.
 71. Altier, C. and G.W. Zamponi, *Targeting Ca²⁺ channels to treat pain: T-type versus N-type*. Trends in pharmacological sciences, 2004. **25**(9): p. 465-470.
 72. Castillo, E., et al., *Enzymatic synthesis of capsaicin analogs and their effect on the T-type Ca²⁺ channels*. Biochemical and biophysical research communications, 2007. **356**(2): p. 424-430.

73. Tominaga, M., *Molecular mechanisms of trigeminal nociception and sensation of pungency*. *Chemical senses*, 2005. **30**(suppl_1): p. i191-i192.
74. Dean, J.R., *Extraction techniques in analytical sciences*. Vol. 34. 2010: John Wiley & Sons.
75. Smith, R.M., *Before the injection—modern methods of sample preparation for separation techniques*. *Journal of chromatography A*, 2003. **1000**(1-2): p. 3-27.
76. Wang, L. and C.L. Weller, *Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants*. *Trends in Food Science & Technology*, 2006. **17**(6): p. 300-312.
77. De Castro, M.L. and L. Garcia-Ayuso, *Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future*. *Analytica chimica acta*, 1998. **369**(1-2): p. 1-10.
78. Mamidipally, P.K. and S.X. Liu, *First approach on rice bran oil extraction using limonene*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2004. **106**(2): p. 122-125.
79. de Castro, M.D.L., M. Valcárcel, and M.T. Tena, *Analytical supercritical fluid extraction*. 2012: Springer Science & Business Media.
80. Ettre, L.S., *Chromatography: the separation technique of the twentieth century*. 2002: Marcel Dekker, Inc.
81. Meyer, V.R., *Practical high-performance liquid chromatography*. 2013: John Wiley & Sons.
82. Melander, W. and C. Horvath, *High Performance Liquid Chromatography: Advances and Perspectives*. Academic Press, New York, 1980. **2**.
83. Carr, P., D. Martire, and L. Snyder, *THE RETENTION PROCESS IN REVERSED-PHASE LIQUID-CHROMATOGRAPHY-PREFACE*. 1993, ELSEVIER SCIENCE BV PO BOX 211, 1000 AE AMSTERDAM, NETHERLANDS.
84. Snyder, L.R., J.J. Kirkland, and J.L. Glajch, *Practical HPLC method development*. 2012: John Wiley & Sons.
85. Weiss, J., *Handbook of Ion Chromatography, 3 Volume Set*. Vol. 1. 2016: John Wiley & Sons.
86. Mori, S. and H.G. Barth, *Size exclusion chromatography*. 2013: Springer Science & Business Media.
87. Neue, U.D. and M.Z. El Fallah, *HPLC columns: theory, technology, and practice*. Vol. 415. 1997: Wiley-VcH New York.

88. Beesley, T.E. and R.P. Scott, *Chiral chromatography*. 1999: John Wiley & Sons.
89. Weinberger, R., *Practical capillary electrophoresis*. 2000: Elsevier.
90. Anton, K. and C. Berger, *Supercritical Fluid Chromatography with Packed Columns: Techniques and Applications*. Vol. 75. 1997: CRC Press.
91. Walters, R.R., *Affinity chromatography*. Analytical chemistry, 1985. **57**(11): p. 1099A-1114A.
92. Hage, D.S., *High-performance affinity chromatography: a powerful tool for studying serum protein binding*. Journal of Chromatography B, 2002. **768**(1): p. 3-30.
93. Mallik, R., T. Jiang, and D.S. Hage, *High-performance affinity monolith chromatography: development and evaluation of human serum albumin columns*. Analytical chemistry, 2004. **76**(23): p. 7013-7022.
94. Chen, J. and D.S. Hage, *Quantitative analysis of allosteric drug-protein binding by biointeraction chromatography*. Nature biotechnology, 2004. **22**(11): p. 1445-1448.
95. Mallik, R. and D.S. Hage, *Affinity monolith chromatography*. Journal of separation science, 2006. **29**(12): p. 1686-1704.
96. Peters, E.C., F. Svec, and J. Fréchet, *Rigid macroporous polymer monoliths*. Advanced Materials, 1999. **11**(14): p. 1169-1181.
97. Svec, F., T.B. Tennikova, and Z. Deyl, *Monolithic materials: preparation, properties and applications*. 2003: Elsevier.
98. Hileman, F.D., et al., *In situ preparation and evaluation of open pore polyurethane chromatographic columns*. Analytical Chemistry, 1973. **45**(7): p. 1126-1130.
99. Josić, D., et al., *High-performance membrane chromatography of serum and plasma membrane proteins*. Journal of Chromatography A, 1992. **590**(1): p. 59-76.
100. Svec, F. and J.M. Fréchet, *Continuous rods of macroporous polymer as high-performance liquid chromatography separation media*. Analytical Chemistry, 1992. **64**(7): p. 820-822.
101. Fields, S.M., *Silica xerogel as a continuous column support for high-performance liquid chromatography*. Analytical chemistry, 1996. **68**(15): p. 2709-2712.

102. Unger, K., „*Packings and Stationary Phases in Chromatography Techniques* “*Marcel Dekker*. New York, 1990.
103. Jiang, T., R. Mallik, and D.S. Hage, *Affinity monoliths for ultrafast immunoextraction*. *Analytical chemistry*, 2005. **77**(8): p. 2362-2372.
104. Josic, D., A. Buchacher, and A. Jungbauer, *Monoliths as stationary phases for separation of proteins and polynucleotides and enzymatic conversion*. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 2001. **752**(2): p. 191-205.
105. Schuster, M., et al., *High speed immuno-affinity chromatography on supports with gigapores and porous glass*. *Bioseparation*, 2000. **9**(5): p. 259-268.
106. Köhne, A.P. and T. Welsch, *Coupling of a microbore column with a column packed with non-porous particles for fast comprehensive two-dimensional high-performance liquid chromatography*. *Journal of Chromatography A*, 1999. **845**(1-2): p. 463-469.
107. Ikegami, T., et al., *Two-dimensional reversed-phase liquid chromatography using two monolithic silica C18 columns and different mobile phase modifiers in the two dimensions*. *Journal of Chromatography A*, 2006. **1106**(1-2): p. 112-117.
108. Garcia-Falcón, M., B. Cancho-Grande, and J. Simal-Gándara, *Stirring bar sorptive extraction in the determination of PAHs in drinking waters*. *Water research*, 2004. **38**(7): p. 1679-1684.
109. Wagner, K., et al., *An automated on-line multidimensional HPLC system for protein and peptide mapping with integrated sample preparation*. *Analytical chemistry*, 2002. **74**(4): p. 809-820.
110. Urban, J. and P. Jandera, *Polymethacrylate monolithic columns for capillary liquid chromatography*. *Journal of separation science*, 2008. **31**(14): p. 2521-2540.
111. Svec, F., *Porous polymer monoliths: amazingly wide variety of techniques enabling their preparation*. *Journal of Chromatography A*, 2010. **1217**(6): p. 902-924.
112. Vlakh, E. and T. Tennikova, *Applications of polymethacrylate-based monoliths in high-performance liquid chromatography*. *Journal of Chromatography A*, 2009. **1216**(13): p. 2637-2650.

113. Miyazaki, S., et al., *Titania-coated monolithic silica as separation medium for high performance liquid chromatography of phosphorus-containing compounds*. Journal of separation science, 2005. **28**(1): p. 39-44.
114. Uygun, D.A., et al., *Poly (hydroxyethyl methacrylate-co-methacryloylamidotryptophane) nanospheres and their utilization as affinity adsorbents for porcine pancreas lipase adsorption*. Materials Science and Engineering: C, 2010. **30**(8): p. 1285-1290.

