



T.C.
KONYA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

β - KAROTEN VE LUTEİN AYRIMI İÇİN
GRAFEN OKSİT VE TÜREVİ HPLC SABİT
FAZLARININ GELİŞTİRİLMESİ

Nadide Songül GÜMÜŞ ŞENTÜRK
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nanoteknoloji ve İleri Malzemeler Anabilim Dalı

Mayıs-2024
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Nadide Songül GÜMÜŞ ŞENTÜRK tarafından hazırlanan “ β - Karoten ve Lutein Ayrımı için Grafen Oksit ve Türevi HPLC Sabit Fazlarının Geliştirilmesi” adlı tez çalışması 30/04/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Konya Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Nanoteknoloji ve İleri Malzemeler Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Prof. Dr. Derya ARSLAN DANACIOĞLU

.....

Danışman

Prof. Dr. Mustafa TOPKAFA

.....

Üye

Doç. Dr. Nihat TELLİ

.....

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Mevlüt UYAN

Enstitü Müdürü

Bu tez çalışması BAP tarafından 221022061 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

İmza

Nadide Songül GÜMÜŞ ŞENTÜRK

Tarih: 06.05.2024

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

β- KAROTEN VE LUTEİN AYRIMI İÇİN GRAFEN OKSİT VE TÜREVİ HPLC SABİT FAZLARININ GELİŞTİRİLMESİ

Nadide Songül GÜMÜŞ ŞENTÜRK

Konya Teknik Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Nanoteknoloji ve İleri Malzemeler Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa TOPKAFA

2024, 68 Sayfa

Jüri
Prof. Dr. Mustafa TOPKAFA
Prof. Dr. Derya ARSLAN DANACIOĞLU
Doç. Dr. Nihat TELLİ

Bu tez çalışmasında; gıda, çevre ve sağlık gibi farklı alanlarda uygulamaları bulunan grafen oksit ve türevlerinin sıvı kromatografisinde sabit faz olarak kullanımı için grafen oksit, Si-GO ve Si-GO-C18 materyallerinin sentezlenmesi, karakterizasyonlarının yapılması, β-karoten ve lutein moleküllerinin ayrımı için metotların geliştirilmesi ve bu metotların validasyonunun yapılması amaçlanmıştır.

H₂SO₄ ve H₃PO₄ ile modifiye edilmiş Hummers metodu kullanılarak sentezlenen grafen oksit (GO), daha önce aminopropil silika üzerine kimyasal olarak bağlanarak Si-GO sabit fazı daha sonra bu sabit üzerine C18 bağlanarak Si-GO-C18 sabit fazı elde edilmiştir. Sentezlenen GO, Si-GO ve Si-GO-C18 materyallerinin karakterizasyonları UV-vis, FTIR, TEM ve SEM analizleri ile yapılmıştır.

Yüksek okside elde edilen GO nano partikülleri FTIR analizine tabi tutularak grafen okside hidrofiliklik veren -OH ve -COOH grupları ile C=C, C=O ve epoksit (C-O-C) pikleri tespit edilmiştir. GO'de bulunan -OH ve -COOH piklerinin bir kısmının azalarak peptit bağının oluştuğu gözlenmiştir. Ayrıca Si-GO-C18 spektrumunda GO üzerine C18 bağlanmasını gösteren -CH titreşimleri tespit edilmiştir. Elde edilen GO ve sabit fazların TEM ve SEM görüntülerinin de FTIR analizini desteklediği görülmüştür.

Elde edilen Si-GO ve Si-GO-C18 sabit fazlarının her ikisi de farklı kolonlara yüksek basınçta doldurulmuştur. Kolonlar sırasıyla metanol, saf su ve asetonitril ile yıkanarak analizlere hazır edilmiştir.

Si-GO kolonu üzerinde β-karoten ve lutein ayrımı için hem izo kritik hem de gradient ayırmalar yapılmış ve istenen ayrımların yapılamadığı görülmüştür. Ayrımları iyileştirmek için kemometrik dizayn yapılmış ve 21 farklı metot oluşturularak ayırma gücü ve tabaka sayıları hesaplanmıştır. Kemometrik tasarımın arzu edilirlilik fonksiyonu (D) kullanılarak optimum metot parametreleri IPA mobil faz bileşimi %25, akış hızı 1,8 mL/dak ve sıcaklık 30°C olduğu belirlenmiştir. Optimum parametreleri belirlenen metodun validasyon çalışmaları için % bağıl standart sapma, % geri kazanım, LOD, LOQ ve R² değerleri

hesaplanmıştır. β -karoten ve lutein için %RSD değerlerinin 3,40 ve 2,76, geri kazanım değerlerinin %90 ve %93, LOD ve LOQ değerlerinin sırasıyla 0,27 ve 0,34 mg/L ile 0,09 ve 0,11 mg/L olduğu bulunmuştur.

Si-GO-C18 kolonu kullanılarak metot tespit etme çalışmalarında hem izo kritik hem de gradient ayırmalar yapılmıştır. İzo kritik çalışmalardan istenen sonuç elde edilememiş ve gradient ayırmalardan Metot 6'nın β -karoten ve lutein ayrımı için uygun olduğu ayırma gücü ve tabaka sayıları hesaplanarak tespit edilmiştir. Metodun β -karoten ve lutein için %RSD değerlerinin 0,86 ve 1,09, geri kazanım değerlerinin %95 ve %80, LOD ve LOQ değerlerinin sırasıyla 0,26 ve 0,27 mg/L ile 0,80 ve 0,82 mg/L olduğu bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: β -karoten, grafen oksit, kemometri, lutein, sıvı kromatografi, silika-grafen oksit, silika-grafen oksit-C18, validasyon.



ABSTRACT

MS THESIS

DEVELOPMENT OF GRAPHENE OXIDE AND DERIVATIVE HPLC STATIONARY PHASES FOR SEPARATION OF β -CAROTENE AND LUTEIN

Nadide Songül GÜMÜŞ ŞENTÜRK
Konya Technical University
Institute of Graduate Studies
Department of Nanotechnology and Advanced Materials

Advisor: Prof. Dr. Mustafa TOPKAFA

2024, 68 Pages

Jury
Prof. Dr. Mustafa TOPKAFA
Prof. Dr. Derya ARSLAN DANACIOĞLU
Assoc. Prof. Dr. Nihat TELLİ

In this thesis study; it was aimed to synthesis and characterization of graphene oxide, Si-GO and Si-GO-C18 materials, to development of methods for the separation of β -carotene and lutein molecules, and validate these methods.

Graphene oxide (GO), synthesized using the Hummers method modified with H_2SO_4 and H_3PO_4 , was first chemically bonded to aminopropyl silica to obtain the Si-GO stationary phase, and then the Si-GO-C18 stationary phase was obtained by bonding C18 to this stationary phase. Characterization of the synthesized GO, Si-GO and Si-GO-C18 materials was carried out by UV-vis, FTIR, TEM and SEM analyses.

Highly oxidized GO nanoparticles were subjected to FTIR analysis and -OH and -COOH groups, which give hydrophilicity to graphene oxide, and C=C, C=O and epoxide (C-O-C) peaks were detected. It was observed that some of the -OH and -COOH peaks in GO decreased and the peptide bond was formed. Additionally, -CH vibrations indicating C18 binding on GO were detected in the Si-GO-C18 spectrum. It was observed that the TEM and SEM images of the obtained GO and stationary phases also supported the FTIR analysis.

Both of the obtained Si-GO and Si-GO-C18 stationary phases were filled into different columns at high pressure. The columns were prepared for analysis by washing with methanol, pure water and acetonitrile, respectively.

Both isocritical and gradient separations were performed on the Si-GO column to separate β -carotene and lutein, and it was observed that the desired separations could not be achieved. A chemometric design was made to improve the separations, and the resolution and teoretical plates were calculated by creating 21 different methods. The optimum method parameters were determined to be IPA mobile phase composition 25%, flow rate 1.8 mL/min and temperature 30°C by using of the desirability function (D) of

the chemometric design. The % relative standard deviation, % recovery, LOD, LOQ and R² values were calculated for validation studies of the method whose optimum parameters were determined. It was found that the %RSD, the recovery, LOD and LOQ values were 3.40 and 2.76, 90% and 93%, 0.27 and 0.34 mg/L, and 0.09 and 0.11 mg/L, respectively.

Both isocritical and gradient separations were performed in method determination studies using the Si-GO-C18 column. The desired result could not be obtained from isocritical studies, and it was determined that Method 6 was suitable for the separation of β -carotene and lutein from gradient separations by calculating the resolution and theoretical plates. It was found that the %RSD, the recovery, LOD and LOQ values were 0.86 ve 1.09, 95% and 80%, 0.26 and 0.27 mg/L, and 0.80 and 0.82 mg/L, respectively.

Keywords: β -carotene, graphene oxide, chemometrics, lutein, liquid chromatography, silica-graphene oxide, silica-graphene oxide-C18, validation.



ÖNSÖZ

Bu çalışma, Konya Teknik Üniversitesi Teknik Bilimler Meslek Yüksek Okulu Kimya Teknolojisi Bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Mustafa TOPKAFA danışmanlığında tamamlanarak, Konya Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü'ne Yüksek Lisans Tezi olarak sunulmuştur.

Çalışma sürecimin her aşamasında verdiği destekle beni cesaretlendiren, bana ışık olan, hiçbir konuda yardımını, değerli zamanını, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, çalışma heyecanına hayranlık duyduğum, saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Mustafa TOPKAFA'ya teşekkür eder ve saygılarımı sunarım.

Bu yolculuğa ilk adımlarımı atmam için beni teşvik eden, eğitim hayatımın her aşamasında varlığını hissettiğim, fikirleriyle bana öncülük eden kıymetli hocam Doç. Dr. Nihat TELLİ'ye teşekkür ederim.

Yüksek lisans sürecimde iş hayatımı kolaylaştıran müdürüm Hacer AYDIN'a teşekkür ederim.

Tüm hayatıma güzellikler katan, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen biricik babam Fevzi GÜMÜŞ ve annem Naile GÜMÜŞ'e, varlıklarıyla bana güç veren ablalarım Nezaket, Nahide ve Gümüş'e, canım abim Seyit Akif AKDENİZ'e, her zaman yanımda olan yeğenlerim Fatma Sümeyye UÇAK, Rumeysa Nur APAN, Feyza Gül APAN, Erva Beyza APAN'a teşekkür ederim.

Bu süreçte sabrını ve desteğini esirgemeyen yol arkadaşım, kıymetli eşim Salih ŞENTÜRK'e teşekkür ederim.

Bu yüksek lisans tezini biricik oğlum, gülen yüzüm Cihangir İlker ŞENTÜRK'e atfediyorum.

Bu tez çalışması Konya Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BAP) tarafından 221022061 nolu proje ile desteklenmiştir.

Nadide Songül GÜMÜŞ ŞENTÜRK

KONYA-2024

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Grafen	1
1.1.1 Grafon	3
1.1.2 Grafan	3
1.1.3 Florografen	4
1.1.4 Grafin ve Grafdin	5
1.1.5 Doplanmış Grafen	6
1.1.6 Grafen oksit	7
1.1.7 İndirgenmiş grafen oksit	8
1.2 Kromatografi	9
1.2.1 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	10
1.2.2 HPLC Yönteminde Ayırma	11
1.3 Beta-karoten	12
1.4 Lutein	14
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	16
2.1 Grafen Oksit ve Türevlerinin Kromatografi Uygulamaları	17
2.2 Beta-Karoten.....	18
2.3 Lutein	25
3. MATERYAL METOT	30
3.1 Kullanılan Kimyasallar	30
3.2 Kullanılan Cihazlar	31
3.3 Grafen oksit eldesi:	31
3.4 Grafen Oksit-Silisyum (Si-GO) Eldesi.....	32
3.5 Si-GO-C18 Eldesi:.....	32
3.6 Karakterizasyon	32
3.6.1 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopik Analizleri	32
3.6.2 Uv-Visible spektrofotometrik analizleri	32
3.6.3 Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) analizleri.....	33
3.6.4 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizleri.....	33
3.7 Kolon Doldurma.....	33
3.8 HPLC Analizleri.....	33
3.8.1 Si-GO kolonunda yapılan çalışmalar	33
3.8.2 Si-GO-C18 kolonunda yapılan çalışmalar	35

3.8.3	Beta-karoten lutein analizi.....	36
4.	ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	37
4.1	Sabit Faz Karakterizasyonu.....	37
4.1.1	Grafen oksit.....	37
4.1.2	Si-GO karakterizasyonu.....	40
4.1.3	Si-GO-C18 karakterizasyonu	41
4.2	HPLC Analizleri.....	43
4.2.1	Si-GO kolonunda yapılan çalışmalar	43
4.2.2	Si-GO-C18 kolonunda yapılan çalışmalar	52
5.	SONUÇLAR VE ÖNERİLER	58
6.	KAYNAKLAR	61



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

μM	: Mikro molar
μmol	: Mikro mol
cm^{-1}	: Dalga sayısı
D	: Arzu edilebilirlik fonksiyonu
k'	: Kapasite faktörü
Kg	: Kilogram
L	: Litre
mg	: Miligram
mm	: Milimetre
N	: Tabaka sayısı
nm	: Nanometre
R^2	: Korelasyon katsayısı
Rs	: Ayırma gücü katsayısı
RT	: Alıkonma zamanı
Sp2	: Karboksil grubu
TF	: Tailing faktörü
β	: Beta
γ	: Gama
λ_{max}	: Maksimum dalga boyu

Kısaltmalar

2D	: İki boyutlu
3D	: Üç boyutlu
ACN	: Asetonitril
BC	: β -Karoten
CAR	: Karotenoid
EDA	: Elektron-verici-alıcı
EDS	: X-ışını spektrometresi
EOF	: Elektroosmotik akış
FTIR	: Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi
G kolonu	: Grafen kaplı kolon
GC	: Gaz kromatografisi
GGPP	: Geranilgeranil pirofosfat
GLV	: Yeşil yapraklı sebze
GNP	: Altın nanopartiküller
GO	: Grafen oksit
GO@SiO2	: Grafen oksit bağlı silika
Gr	: Grafen
HPLC	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
İPA	: İzopropil alkol
LOD	: Tespit limiti
LOQ	: Tayin limiti

MIP	: Makrofaj inflamatuvar protein
NHS	: N-hidroksisuksinimid
NP	: Nanopartikül
OT-CEC	: Açık borulu kılcal elektrokromatografi
OT-CLC	: Açık borulu kılcal sıvı kromatografisi
rGO	: İndirgenmiş grafen oksit
RP-HPLC	: Ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografik
RT	: Alıkonma zamanı
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
TCC	: Toplam karotenoid içeriği
TEM	: Geçirimli elektron mikroskobu
TLC	: İnce tabaka kromatografisi
TMS	: Trimetilsilan
UV-Vis	: Ultra viyole ve görünür bölge
VA	: Vitamin A



1. GİRİŞ

Nanopartiküller (NP); son 20 yıldır boyutları ve fonksiyonel yüzey özellikleri nedeniyle gıda, çevre ve sağlık gibi farklı alanlarda uygulamaları bulunmakta ve önemi gün geçtikçe artmaktadır. Genel olarak NP'ler, nanomalzemelerin en temel unsurlarıdır ve atomik/moleküler yapılar arasında köprü görevi görürler. Bugüne kadar, NP'lerin sentezlenmesi için pek çok yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemler ile sentezlenen metal, metal oksit, tek kristal, yarı iletken, manyetik, çekirdek-kabuk, karbon ve kompozit NP'ler, malzemenin türüne bağlı olarak ilaç dağıtımı, biyosensör, biyo görüntüleme, moleküler etiketleme, gıda teknolojisi, tekstil üretimi, antimikrobiyal kaplama, kuantum bilgisayar, kuantum lazer, enerji ve çevre gibi geniş spektrumlu uygulamalar için kullanılmaktadırlar (Dhand ve ark., 2015). Bu uygulamaların yanı sıra karışımlarda bulunan türlerin ayrılması ve saflaştırılması için kromatografik yöntemlerde sabit faz olarak kullanımı da bulunmaktadır.

Son yıllarda grafen oksit türevleri kullanılarak hazırlanan sabit fazlar, farklı türlerin ayrılmasında ve saflaştırılmasında kullanılmaya başlanmıştır (Liu ve ark., 2017; Li ve ark., 2018). Yapılan araştırmalara göre bu sabit fazların bitkilerde bulunan bazı biyoaktif bileşenlerin yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) sistemlerinde ayrılmasına yönelik çalışmalar oldukça sınırlıdır.

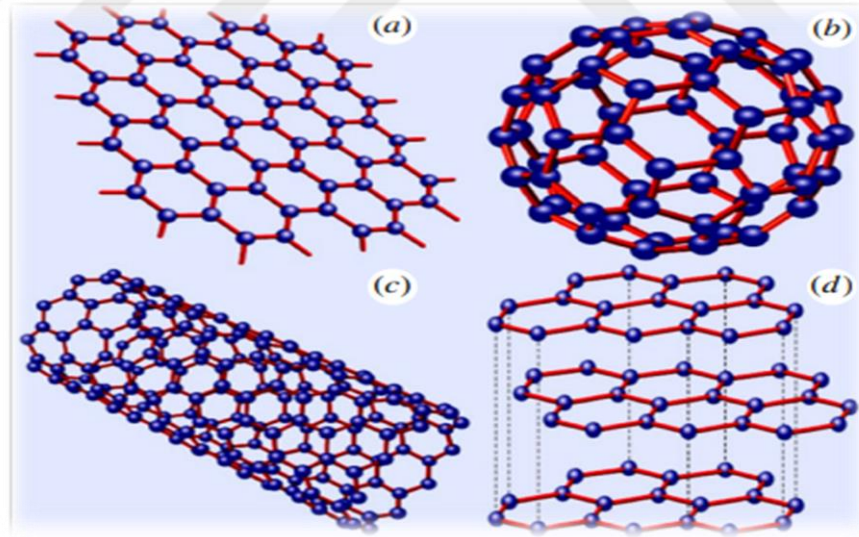
Bu tez çalışmasında; sentezlenen grafen oksit, öncesinde aminopropil silika üzerine kimyasal olarak bağlanarak Si-GO sabit fazı daha sonra bu sabit üzerine C18 bağlanarak Si-GO-C18 sabit fazı elde edilmiştir. Elde edilen Si-Go ve Si-GO-C18 sabit fazları üzerinde farklı fonksiyonel gruplara sahip β -karoten ve luteinin ayrılması için metotlar geliştirilerek bu metotların validasyonları yapılmıştır.

1.1 Grafen

Wallace, 1950'lerde grafen (Gr) kavramını önermiş ve bu tarihten sonra grafenin elektronik yapısı teorik olarak araştırılmaya başlanmıştır (Li ve ark. 2020). Çeşitli nanomalzemeler arasında gelecek vaat eden, iki boyutlu (2D) ve karbon bazlı bir nanomalzeme olan grafen, en ince ve en güçlü malzemedir. 2004 yılında ilk olarak Novoselov ve Geim tarafından yapışkan bir bantla mekanik eksfoliasyon kullanılarak izole edilmiş ve araştırmacılar 2010 yılında Nobel Ödülü'nü kazanmışlardır (Li ve ark., 2022).

Grafen, tek bir atomik tabaka kalınlığına sahip iki boyutlu bir karbon malzemedir (Bai ve ark.,2020). Altıgen yapılarda birbirine bağlanmış sp^2 hibridize karbon atomlarından oluşan, 10 nm'den daha ince iki boyutlu tabakalardan oluşur. Günümüzde grafen, elektronik, havacılık, askeriye, biyotıp ve diğerleri dahil olmak üzere endüstrinin her alanında değerlendirilmektedir. Bu durum fizikokimyasal özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Yüksek mekanik mukavemete sahip olup aynı zamanda elastik, hafif, termal ve elektriksel olarak iletkendir (Dideikin ve Vul', 2019; Korkmaz ve Kariper, 2020).

Birkaç katmanlı grafen, grafitten pul pul döküldüğünden beri malzeme bilimi, fizik, kimya, biyoloji ve diğer alanlarda muazzam bir potansiyel göstermektedir (Geim ve Kim 2008; Geim 2009; Novoselov ve ark., 2008). Grafenin ortaya çıkışı, birçok benzersiz ve büyüleyici özelliğinden dolayı bilim ve teknolojiye heyecan verici yeni alanlar açmıştır (Neto ve ark., 2009; Rao ve ark., 2009). Bu alanlarda; fulleren (2D grafen katmanının 0D molekülüne sarılmasıyla oluşturulur), karbon nanotüp (2D grafen katmanının 1D nanotüplere silindirik olarak yuvarlanmasıyla oluşturulur), grafit (2D grafen katmanları 3D yapıya istiflenir) gibi yeni türlerin keşfine neden olmuştur (Şekil.1.1)



Şekil 1.1. (a) grafen tabakası (2D), (b) fulleren molekülü (0D), (c) karbon nanotüpler (1D) ve (d) grafitin (3D) kimyasal yapıları (Neto ve ark., 2009)

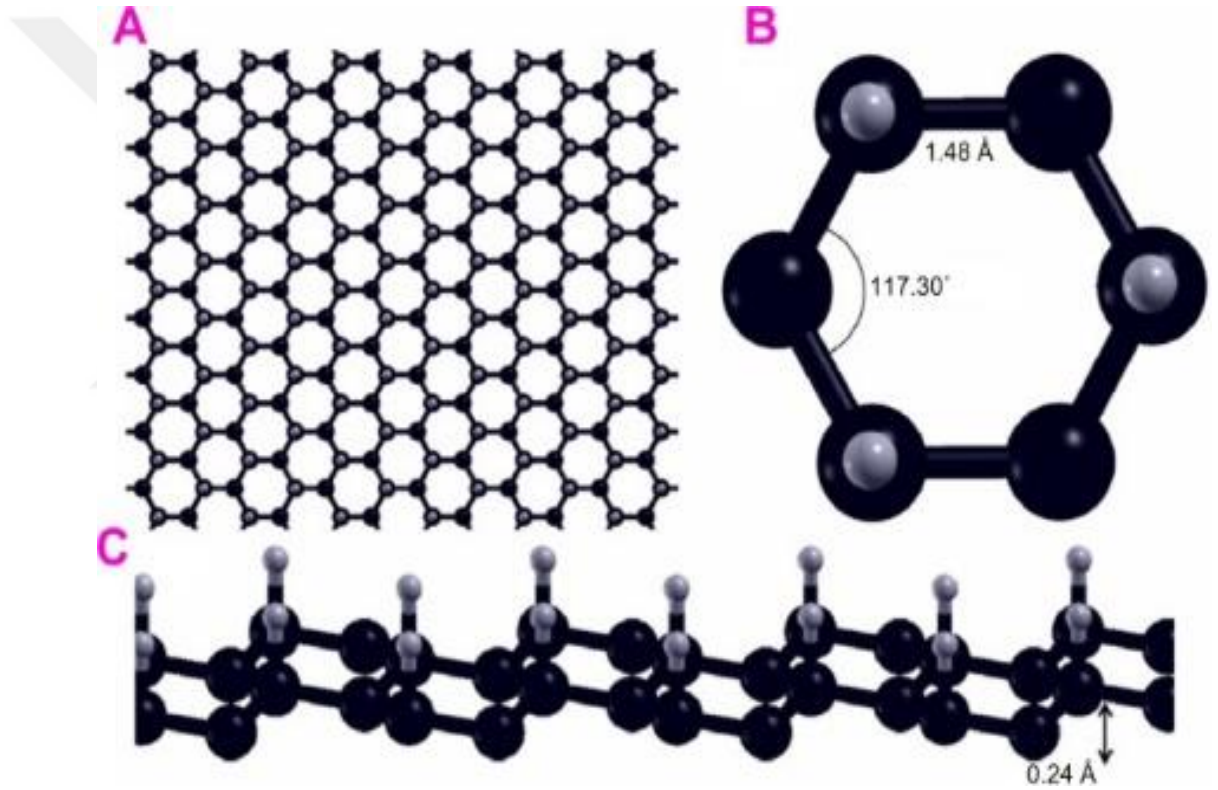
Grafen türevleri (Banerjee, 2018):

1. Grafon
2. Grafan
3. Florografen
4. Grafin ve grafidin

5. Döplanmış grafen
6. Grafen oksit
7. İndirgenmiş grafen oksit

1.1.1 Grafon

2009'da Zhou ve arkadaşları, grafon adını verdikleri yarı hidrojene grafen türevini tahmin etmişlerdir. Grafon, %50 hidrojenasyona ve stokiyometri C_2H 'ye sahip bir grafen levhadır. Ek olarak, hidrojen atomları karbon levhanın sadece bir tarafındadır ve hibritleşmiş sp^2 ve sp^3 karbon atomlarının bir karışımı ile sonuçlanır. Şekil 1.2.'de görülebileceği gibi, grafon zikzak şekline sahiptir (Zhou ve ark., 2009).

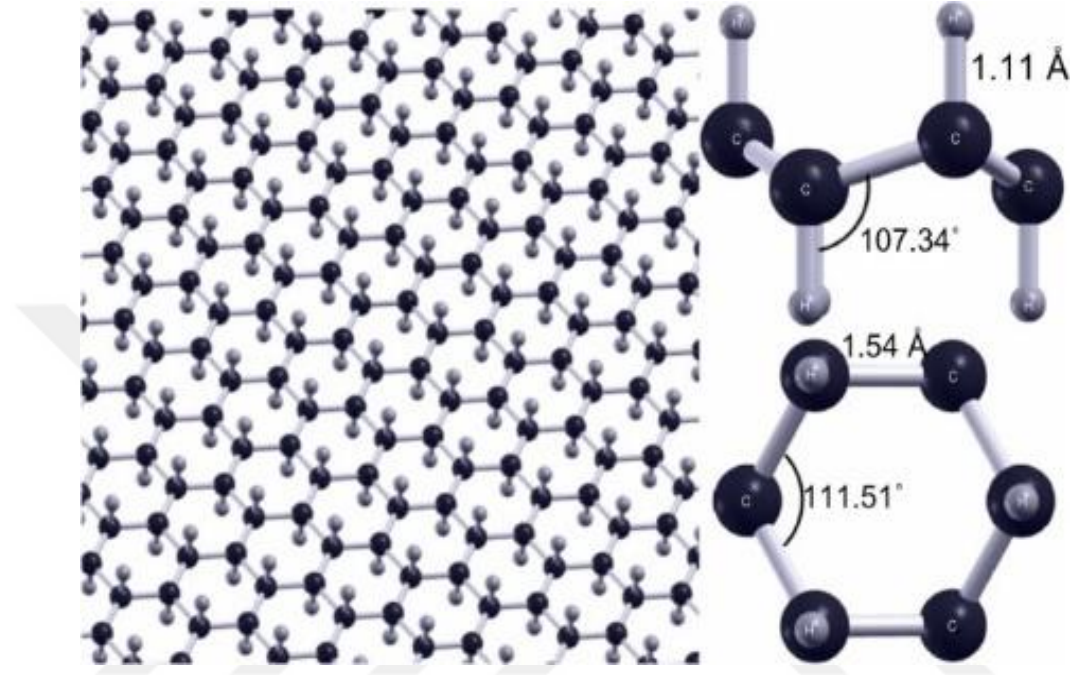


Şekil 1.2. Grafon (A) üstten, (B) hücre ve (C) yandan görünümü (Zhou ve ark, 2009)

1.1.2 Grafan

İlk olarak 2003'te Sluiter ve Kawazoe (Sluiter ve Kawazoe, 2003) tarafından ve ardından 2007'de Sofo ve diğerleri (Sofo ve ark., 2007) tarafından tespit edilen grafan, her bir karbon atomuna bir hidrojen atomu bağlı olarak tamamen hidrojene edilmiş bir grafen tabakasıdır. Grafona benzer şekilde, grafan, iki karbon atomu ve iki hidrojen

atomu içeren hidrojene bir grafen tabakasıdır (Şahin ve ark., 2010). **Şekil 1.3.**'te görülebileceği gibi, en dikkate değer fark, grafonun sp^2 ve sp^3 hibrit bağlarının karışımı veya grafenin sp^2 hibrit yapısının aksine, grafandaki her bir karbonun tek bir hidrojen atomuna bağlı olması ve bunun tam sp^3 hibridizasyonu ile sonuçlanmasıdır (Costamagna ve ark., 2012).

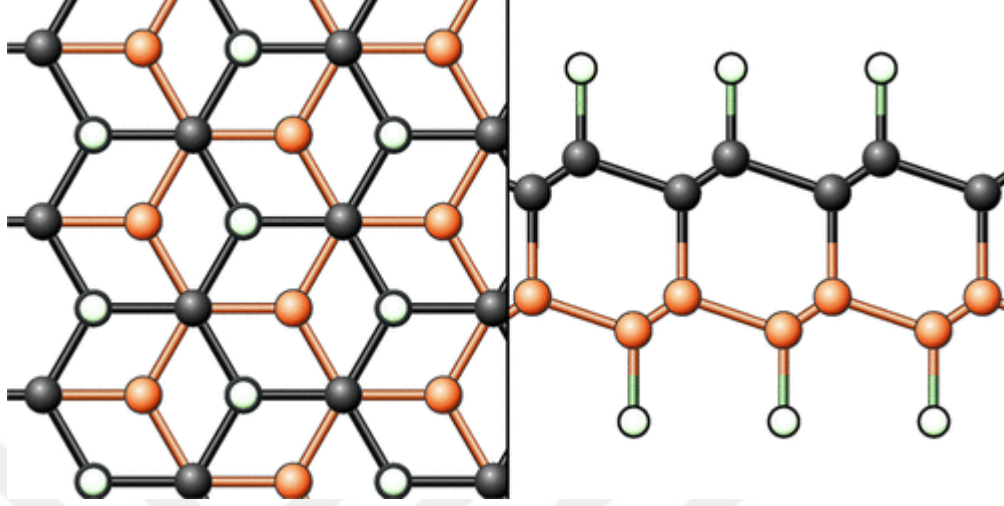


Şekil 1.3. Bir grafan tabakasının geometrisi (Peng ve ark., 2013).

1.1.3 Florografen

Son yirmi yılda, florografeni imal etmek için birçok çaba sarf edilmiştir (Cheng ve ark., 2010; Leon ve ark., 2011; Bon ve ark., 2009; Herraiz ve ark., 2018). 2010 yılında Cheng ve ark., grafit ve flor gazının reaksiyona sokulmasıyla grafen florürün sentezini bildirmiştir. CFX'in bant yapısının ve iletkenliğinin florlama veya indirgeme reaksiyonları ile tersine çevrilebileceğini göstermişlerdir (Cheng ve ark., 2010). Ardından 2011 yılında Jeon ve arkadaşları, grafenin ksenon diflorür (XeF_2) ile işlenmesiyle florografen üretmişler ve doğrudan kimyasal florlama yöntemiyle grafen bazlı yarı iletkenler geliştirmenin yolunu açmışlardır (Leon ve ark., 2011). Son zamanlarda, florlu grafenin oda sıcaklığında başarılı termal pul pul dökülmesi, büyük ölçekli florografen üretmenin mümkün olduğunu göstermektedir (Herraiz ve ark., 2018). Bulunuşundan bugüne florografen, mükemmel fiziksel ve kimyasal özellikleri sebebiyle bilim camiasından büyük ilgi görmüştür. Yapılan birçok çalışmada florografenin kimyasal açıdan çok aktif

olduğunu ve farklı deneysel ortamlarda farklı kimyasal reaksiyonlara girdiği görülmüştür. Oldukça reaktif olan florografen görüntüleme, elektronik, algılama ve enerji gibi farklı teknolojilerde uygulama alanları bulmaktadır (Banerjee, 2018).

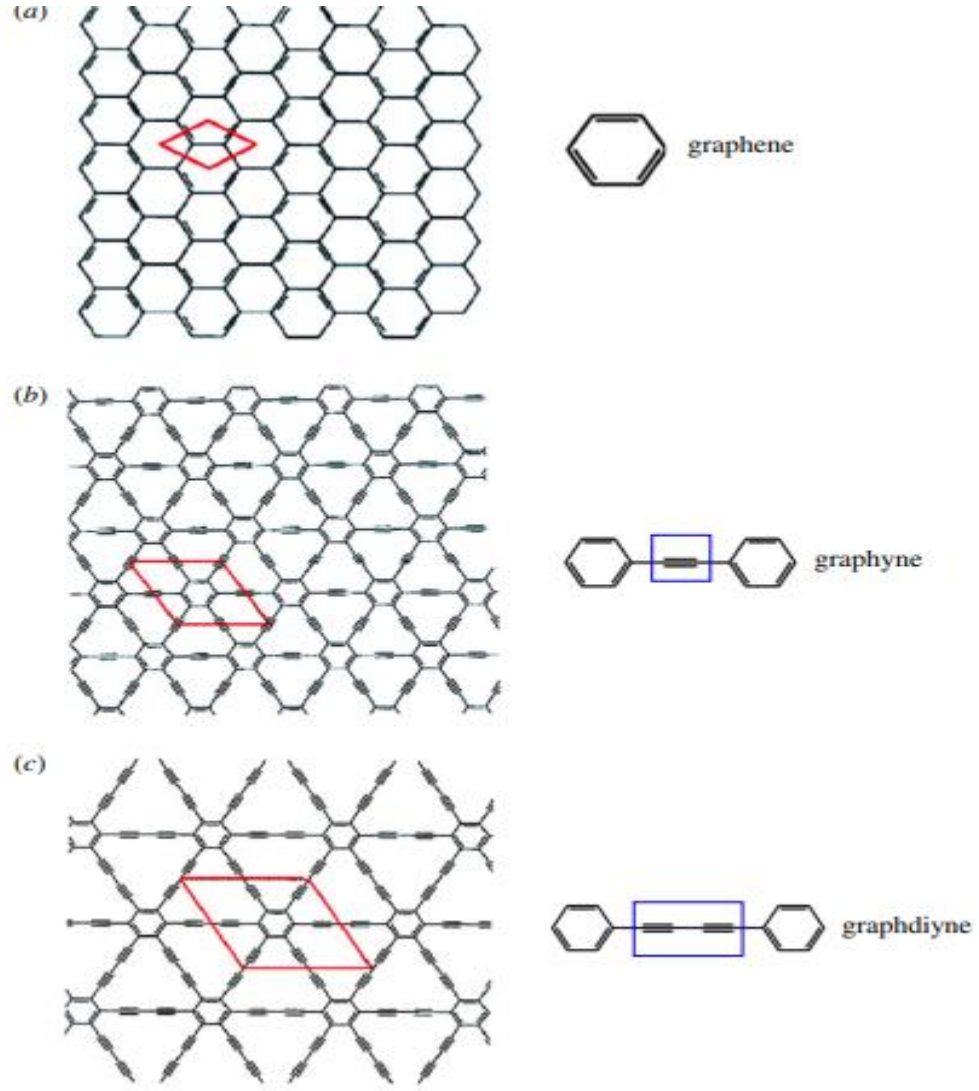


Şekil 1.4. İki tabakalı florografenin üst ve yandan geometrisi (Sivek ve ark., 2012)

1.1.4 Grafin ve Grafidin

Grafin ve grafidin bir karbon allotropudur. Yapısı, sp^2 bağlı karbon atomlarından oluşan düzlemsel bir levhadır (Peng ve ark., 2014). Grafin ve grafidin yapıları birbirine benzerken aralarındaki fark karbon altıgenlerini birbirine bağlayan asetilenik zincir sayısıdır. Grafinde bir grafidine iki asetilenik (di-asetilenik) zincir bulunur (Şekil 1.5.) (Haley ve ark., 1997; Coluci ve ark., 2003; Malko ve ark., 2012).

Grafin, elmas ve grafit gibi diğer karbon bazlı malzemeler de dahil olmak üzere mevcut malzemelerden oldukça farklı olan elektronik yapısı nedeniyle özellikle ilgi çekicidir (Malkove ark., 2012). Grafenin en yaygın biçimi γ -grafindir; γ -grafin birim hücresi, kapalı bir şekilde düzenlenmiş 12 karbon atomundan oluşur (Peng ve ark., 2014).



Şekil 1.5. (a) grafen, (b) grafin, (c) grafdinin şematik yapıları (Peng ve ark., 2014)

1.1.5 Doplanmış Grafen

Grafenin fiziko-kimyasal özelliklerinin kolay manipüle edilmesi sayesinde çeşitli alanlarda özel uygulamalar için kimyasal doplanması daha ilginç bir hale gelmektedir (Rao ve ark., 2014). Ametaller (N, B, S, P, Se, O, Si, I, vs. gibi) ve metaller (Mn, Fe, Co, Ni, Al, Ti, Pd, Ru, Rh, Pt, Au, Ag gibi) çeşitli uygulamalar için süperiletkenlik, ferromanyetizma ve gelişmiş kimyasal/elektrokimyasal aktivite dahil olmak üzere oldukça ilginç özellikler gösteren dopant maddeleri olarak grafene dahil edilmiştir (Giovann ve ark., 2012; Banerjee ver ark., 2018). Bu katkı maddeleri arasında çoğunlukla N ve B kullanılmıştır, çünkü bu elementler yarı iletken cihazlardaki potansiyel uygulamasını genişletmek için doplanmış grafende sırasıyla n- ve p- tipi yarı iletkenlik verirler (Banerjee ver ark., 2018).

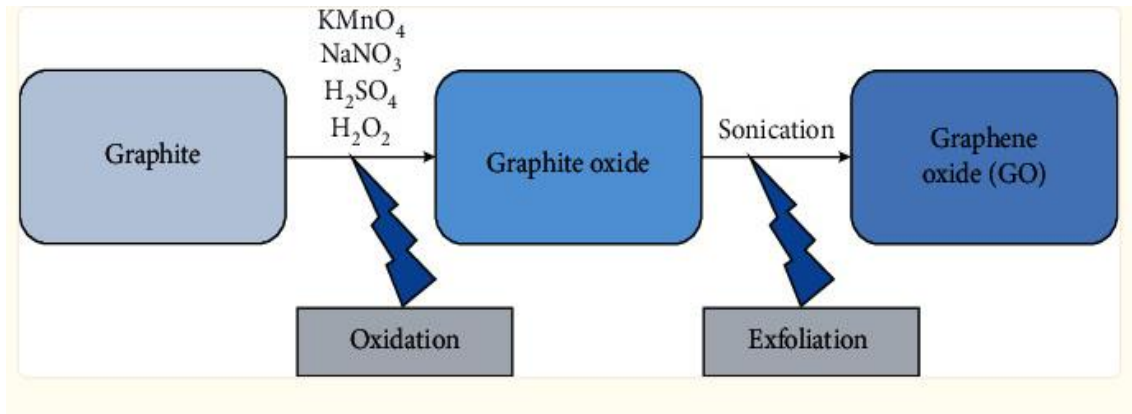
1.1.6 Grafen oksit

GO'nun ilk sentezi genellikle Brodie'ye atfedilir. 1859'da İngiliz araştırmacı Benjamin Brodie, esas olarak potasyum klorat (KClO_3) ve oksitleyici dumanlı nitrik asit kullanarak grafit levhalardan oluşan bir araştırma yapmıştır (Brodie, 1859). Brodie, temel analizle elde edilen ürünün karbon, oksijen ve hidrojenle oluştuğunu belirlemiştir. Malzemesine atıfta bulunmak için "grafik asit" terimini kullanmıştır.

Brodie'nin keşfinden sonra, Alman kimyager Staudenmaier, belirli parametreleri değiştirerek Brodie'nin yöntemini yeniden üretti. Bu yöntem, potasyum kloratın bir sülfürik asit, konsantre nitrik asit ve grafit çözeltisi ile yavaşça karıştırılmasından oluşur. Karışım soğutulmuş bir ortamda bir hafta çalkalanır. Bu modifikasyon, grafit levhaların oksidasyon oranını artırmıştır (Staudenmaier, 1898).

Brodie'nin keşfinden sonraki yıllarda, kimyagerler Hummers ve Offeman grafit oksit sentezlemek amacıyla yeni bir yöntem geliştirerek patlama riskini ve reaksiyon süresini azaltmışlardır. Sülfürik asit, potasyum permanganat ve sodyum nitrat karışımı yaklaşık 2 saat 45°C sıcaklıkta kullanılmıştır (Hummers ve Offeman, 1958). Daha yüksek oksidasyonu artırmak ve magnezyumu nötrlemek için hidrojen peroksit (H_2O_2) ilave edilmiştir (Şekil 1.6.).

Hummers tarafından önerilen sentez yolunu değiştiren veya iyileştiren herhangi bir yöntem, "Değiştirilmiş Hummers" olarak kabul edilir. GO'nun sentez yolu, her araştırmacının ihtiyacına göre değiştirilebilir. Genel olarak, karbon kaynağının boyutu ve şekli GO'yu belirlemektedir (Pendolino ve Armata, 2017).



Şekil 1.6. GO hazırlık şeması (Rhazouani ve ark., 2021)

Grafen oksit (GO), grafitin oksidasyonu ve pul pul dökülmesinden elde edilen, sp^2 hibridize karbonların tek katmanlı tabakalarını, sp^3 hibridize karbonların bölgelerini ve oksijenli grupları içeren iki boyutlu (2D) bir nanomalzemedir (Makharza ve ark., 2013). GO hidrofiliktir ve hidroksil, karboksil, karbonil, epoksit, fenol, lakton ve kinon gibi oksijen içeren fonksiyonel grupları içerirler. İşlevsellikleri nedeniyle su ve polar organik çözücüler içinde dağılılabılır (Hung ve ark., 2014; Siriviriyanun ve ark., 2015; Lee ve ark., 2016).

Karboksilik gruplar GO'nun kenarlarında bulunurken, GO'nun bazal düzleminde epoksit ve hidroksil grupları bulunmaktadır. Ayrıca GO, 2D düzlemsel yapı, geniş yüzey alanı, kolay modifikasyon, kimyasal kararlılık, iyi biyouyumluluk ve yüksek mekanik dayanım gibi mükemmel ve benzersiz özellikler sergiler. Özellikle GO, π - π istifleme, kovalent bağ, hidrofobik etkileşimler, elektrostatik kuvvetler ve hidrojen bağı yoluyla çeşitli küçük moleküller ve makromoleküllerle (örneğin ilaçlar, proteinler, metaller, biyomoleküller ve hücreler) güçlü bir şekilde etkileşime girebilmektedir (Bellier ve ark., 2022).

1.1.7 İndirgenmiş grafen oksit

İndirgenmiş grafen oksit, karbon, oksijen ve hidrojen atomlarından oluşan p-tipi bir yarı iletkenidir (Drewniak ve ark., 2015; Wu ve ark., 2020). GO'nun kimyasal indirgenmesi, indirgenmiş GO'nun (rGO) hazırlanması için en yaygın uygulanan yöntemdir. Susuz hidrazin, hidrazin monohidrat, L-askorbik asit, sodyum borohidrit, hidrokinon, huş ağacı, glikoz, hidroksilamin, pirol, amino asitler, güçlü alkali çözeltiler ve üre gibi çeşitli kimyasal indirgeyicilerin oksijenli fonksiyonel grupların çoğunu uzaklaştırdığı, grafendeki sp^2 karbon bağlarını kısmen eski haline getirdiği bildirilmiştir (He ve Fang, 2016; Singh ve ark., 2016). Kimyasal reaksiyonlar, ilaç salım uygulamaları için önemli olan iletkenliği, hidrofobikliği ve π - π istifleme etkileşimlerini artırmaktadır. Tipik olarak, hidrofobik antikanser ilaçları ve küçük moleküller, GO'ya kıyasla π - π istifleme ve hidrofobik etkileşimler yoluyla rGO yüzeylerine daha verimli bir şekilde yüklenebilir. Ek olarak, rGO nano tabakaları, geniş yüzey alanları, yüksek ışık adsorpsiyon yetenekleri ve mükemmel fototermal etkileri nedeniyle fototerapi için geniş çapta incelenmiştir. Bu istisnai özellikler nedeniyle, rGO, çok amaçlı nano taşıyıcılar için umut verici bir malzeme olarak kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır (Bellier ve ark., 2022).

1.2 Kromatografi

Rus botanikçisi Mikhail Tswett'in 1900 yıllarında bitki pigmentlerinin (klorofil) ayrılması için kullandığı kromatografi; kimya, biyoloji, biyokimya gibi birçok alanda araştırılan moleküllerin tanımlanması ve tayini için etkili bir yöntem olmuştur. 1952 yılında A.J.P. Martin ve R.L.M. Synge, 2002 yılında J. B. Fenn ve K. Tanaka kromatografi yöntemlerini kullanarak Nobel Bilim Ödülü almışlardır. İlk kromatografi cihazı 1965 yılında Yale Üniversitesi'nde Csaba Horvath tarafından geliştirilmiştir.

Yunanca kökenli bir kelime olan kromatografi, “renk yazımı” (“chroma” renk, “graphe” yazı) anlamına gelmektedir (Eser ve Dinçel, 2018). Bir karışımın uygun ve ortak bir çözücü ile içerdiği maddelerin kimyasal ve fiziksel özellikleri doğrultusunda çözünerek ayrılmanın gerçekleştiği ayırma işlemi kromatografi olarak ifade edilmektedir (Di Meo ve ark., 2017).

Bir numune içerisinde bulunan maddelerin ayrılarak miktarlarının tespit edilmesi kromatografinin asıl amacını göstermektedir. Sabit bir faz üzerinden hareketli faz yardımıyla maddeler farklı hızlarda hareket ettirilir. Çözücü hareketli fazdır ve mobil faz olarak da ifade edilebilir. Sabit faz; selüloz kağıdı, içinde katı bir madde bulunduran cam ya da metal gibi farklı materyallerden oluşan kolondur.

Analit bileşenleri mobil faz ile sabit faz arasında etkileşimde bulunarak, belirli bir süre boyunca tutulması, yavaşlatılması ve bunun sonucunda uzun sabit fazdan ayrılması durumuna alıkonma denir. Bu özelliğin bir sonucu olarak her bir maddenin kolondan çıkış zamanı değişmektedir ve alıkonma zamanı (RT) olarak ifade edilir (Eser ve Dinçel, 2018).

Kromatografi tekniği, sabit faza, uygulanan metoda ve hareketli faz tiplerine göre farklı gruplarda sınıflandırılır (Vlčková ve ark., 2018).

Sabit Faza Göre Kromatografiler	Uygulama Metoda Göre Kromatografiler	Hareketli Faza Göre Kromatografiler
Adsorpsiyon kromatografisi	Kolon kromatografisi • Gaz kromatografisi (GC) • Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)	Sıvı kromatografisi
İyon değiştirme kromatografisi	Düzlemsel kromatografi	Gaz kromatografisi

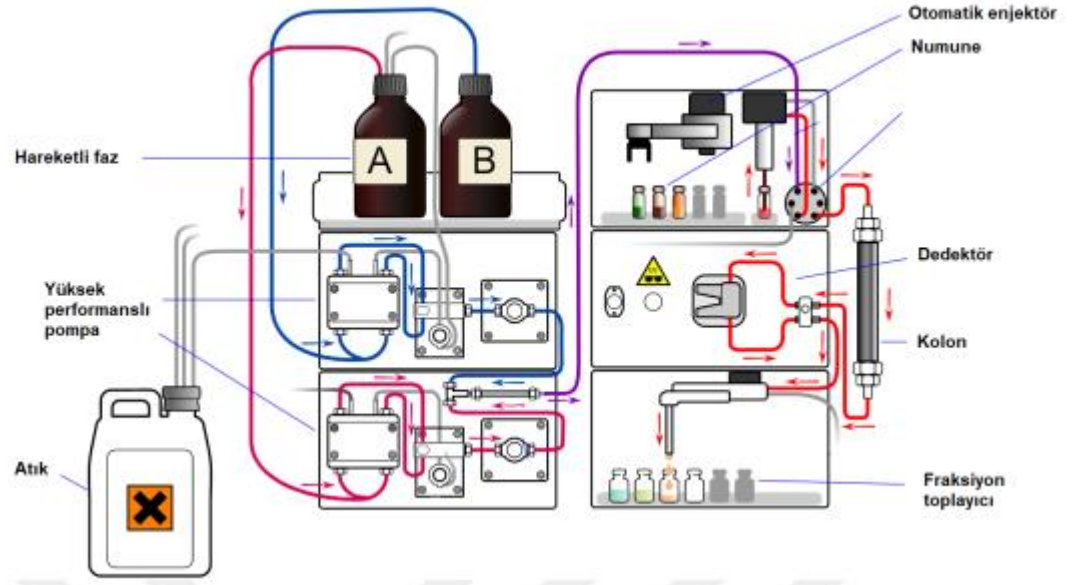
Dağılma kromatografisi	• Kağıt kromatografisi	Süper kritik akışkan kromatografisi
Boyut eleme (Moleküler eleme) kromatografisi	• İnce tabaka kromatografisi (TLC)	

1.2.1 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi, bir karışım içindeki türlerin nitel ve nicel tayini, maddelerin saflaştırılması ve ayrılmasında kullanılan bir yöntemdir. Bu teknikte sıvı hareketli faz, analitleri yüksek basınçta kolondan geçirdiğinden dolayı "yüksek basınçlı sıvı kromatografisi" adını almaktadır. HPLC yöntemi 1960'larda Horvath ve Josef Huber önderliğinde gelişmiş ve aynı yılların sonlarında cihaz ticari olarak piyasada yer almıştır (Serin, 2019).

HPLC yöntemi diğer kromatografi yöntemlerine kıyasla birçok avantaja sahiptir. En önemli avantajı, büyük molekül ağırlığına ve polarite aralığına sahip farklı maddeler ile çalışma imkânı sunmasıdır. Yöntemin etkin bir şekilde kullanılmasının diğer nedenleri arasında; sıcaklık karışımında duyarlı ve dayanıklı olmayan uçucu maddelerin de analizinde kolaylık sunmasıdır. Kantitatif analizlerde yüksek doğruluk, kesinlik ve duyarlılık gibi özelliklerinin yer alması, yöntemin tercih edilmesindeki bir diğer nedendir. Analizlerin hızlı ve kolay bir şekilde yapılabilmesi, elde edilen sonuçların tekrarlanabilir olması, yüksek ayırma gibi özelliklerinin bulunması avantajları arasında yer almaktadır. Gıda, adli kimya, kozmetik, ilaç, çevre kozmetik gibi farklı alanlardaki kullanım kolaylığı nedeniyle HPLC sistemi en çok tercih edilen tekniklerden biri olmuştur (Aktaş ve Yavaş, 2019).

Bir HPLC sistemi, enjeksiyon bloğu, pompa, kolon ve dedektörden oluşmaktadır (**Şekil 1.7.**) (Çebi, 2018).

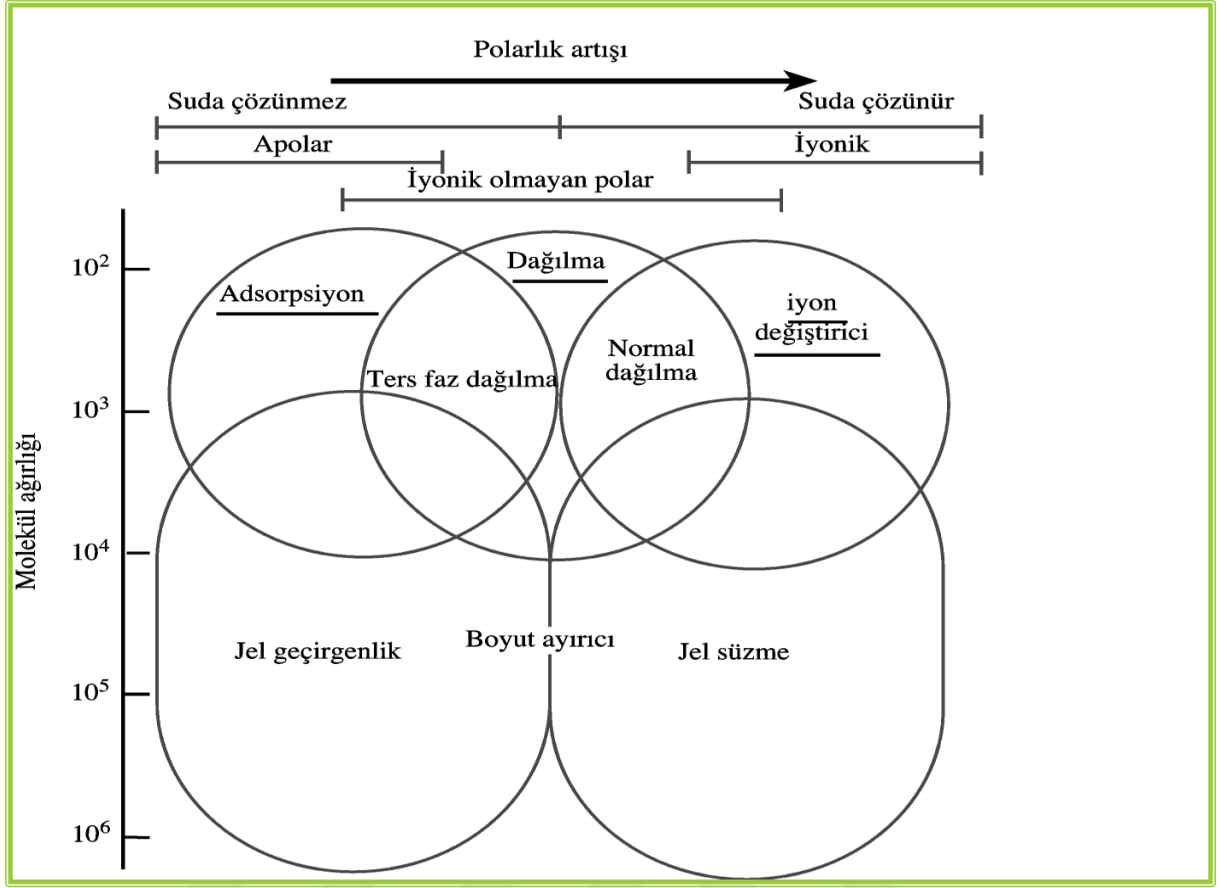


Şekil 1.7.: HPLC analiz yönteminin şematik gösterimi (Serin, 2019)

1.2.2 HPLC Yönteminde Ayırma

HPLC yönteminde sabit faz ile etkileşim şekline, hareketli ve mobil fazın polaritelerine göre ayırma ve saflaştırma işlemleri 4 ayrı şekilde gerçekleştirilmektedir:

- Boyut eleme (jel–geçirgenlik ve jel–süzme),
- Dağılma (normal–faz ve ters–faz dağılma),
- Adsorpsiyon ve
- İyon değiştirme kromatografisi (Şekil 1.8.) (Serin, 2019).



Şekil 1.8. Sıvı kromatografi yöntemi ve uygulamalarına ait şema (Serin, 2018)

Mol kütlesi 10000'den küçük iyonik analitler için iyon değiştirme kromatografi yöntemleri kullanılırken, daha büyük türlerin analizlerinde boyut ayırma kromatografisi kullanılır. Adsorpsiyon kromatografi yöntemi, apolar türlerin, alifatik hidrokarbonlar ve kimyasal izomerlerin ayrılması gibi analizlerde kullanılmaktadır. Sıvı kromatografi yönteminden en fazla tercih edileni dağılma yöntemidir. Bu yöntem düşük molekül ağırlığa sahip olup iyonik olmayan polar türlerin ve homolog serilerin analizlerinde çok fazla kullanılmaktadır. Dağılma kromatografi yöntemi, normal faz ve ters faz kromatografi tekniği olarak iki ayrı şekilde, sabit fazın ve hareketli fazın polarlıkları dikkate alınarak kullanılmaktadır (Serin, 2018).

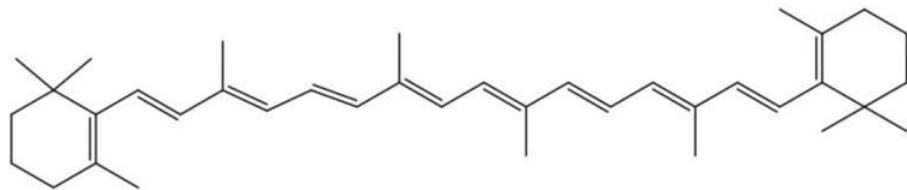
1.3 Beta-karoten

Bugüne kadar, doğal kaynaklardan 1204 adet karotenoid (CAR) tanımlanmış olup bunlar esas olarak 40 karbon zincirlerinden (C40: 1121) oluşmaktadır. Bunu C50 (37), C30 (33) ve C45 (13) takip eder (Yabuzaki, 2017). Basit hidrokarbon CAR'lar, karotenler (örneğin, likopen ve α - ve β -karoten) olarak bilinir ve karotenlerin oksijenli türevleri, ksantofiller olarak adlandırılmaktadır (Saini ve ark., 2022). Ksantofillerde, hidroksil (ör.

β -kriptoksantin, lutein ve zeaksantin), karbonil (ör. kapsantin, astaksantin ve kantaksantin), epoksit (ör. violaksantin, neoksantin ve fukoksantin) veya diğer birçok fonksiyonel grup, CAR'ların çeşitliliğine katkıda bulunmaktadır (Saini ve Keum, 2018, Meléndez-Martínez, 2019). Karotenlerin basit hidrokarbon yapısı onları apolar yapar, oysa ksantofiller polar moleküllerdir. Karotenoidlerin (CAR) ilk kromatografik ayrımı 1906'da gerçekleştirilmiştir. β -karoten ve likopenin yapıları 1930'da aydınlatılmıştır (Saini ve ark., 2022).

Karotenoidler, bitkilere ve gıdalara sarıdan kırmızıya değişen farklı renkler veren geniş bir doğal pigment grubudur (Namitha ve Negi 2010). β -karoten gıdalarda en bol bulunan karotenoiddir. Havuç, balkabağı ve tatlı patatesten fazla miktarda bulunur. Gıdalardaki konsantrasyonu değişkendir ve farklı faktörlerden etkilenmektedir. Bunlar arasında türler, olgunlaşma derecesi, çevresel ve büyüme koşulları, güneşlenme sıklığı, depolama ve gıdanın tabii tutulduğu işleme türü bulunmaktadır (Paiva ve Russell, 1999). Ek olarak, β -karotenin, doğadaki bitki yapılarıyla karşılaştırıldığında yağlarda dağıldığında biyoyararlılığının daha fazla olduğu gösterilmiştir (Kiokias ve Gordon, 2004).

β -karoten, A vitamininin öncüsü olarak görev yapar (Meléndez-Martínez, (2019). β -karoten molekülünün her iki ucunun da halkalar halinde çevrildiği bir ($C_{40}H_{56}$) karoten türüdür. En belirgin yapısal özelliği, merkezin uzun bir çift bağ ve tek bağ sistemi olmasıdır. Molekül, ikisi halka (Rodriguez-Amaya, 2016) üzerinde bulunan 11 konjuge çift bağa sahiptir. Beta-karotenin kimyasal yapısı **Şekil 1.9.**'da gösterilmiştir. Simetri merkezli eşlenik çift bağların yapısı, beta-karoteni oldukça hidrofobik yapmaktadır (Rocha ve ark., 2018). Bu konjuge çift bağ sistemi, karotenoidlere renk veren ve onların özel özelliklerini ve fonksiyonlarını veren ışığı emen kromoforu oluşturmaktadır (Paiva ve Russell, 1999; Rodriguez-Amaya, 2016).



Şekil 1.9. Beta-karotenin kimyasal yapısı (Chen ve ark., 2021)

Besin açısından en aktif bileşik olan beta-karoten, gıda endüstrisi için özellikle caziptir. Ayrıca beta-karotenin birçok özelliği ve fonksiyonunun insan sağlığına faydalı

olduğu onaylanmıştır. O atomu içermeyen bir karoten olan β -karoten, esas olarak bitkilerde bulunan, yağda çözünen ve turuncu-kırmızı renkli doğal bir pigmenttir (Chen ve ark., 2021).

İnsanlar β -karoten'i yalnızca sarı, kırmızı, turuncu sebzelerin ve meyvelerin yanı sıra koyu yeşil yapraklı sebzelerden veya bunları yiyen hayvanların etinden elde eder (Moran ve ark., 2018). β -karoten, birçok sebzenin kök, meyve ve yaprak dokularında bulunan yüksek konsantrasyonla insan beslenmesinde en bol bulunan karotenoiddir. Kök mahsul taze havuçta (*Daucus carrota L.*), 3.2 ile 6.1 mg/100 g arasında değişen düzeylerle en yüksek β -karoten konsantrasyonuna sahiptir. Bununla birlikte, turpgillerden yapraklı sebzeler, havuca eşit veya daha yüksek konsantrasyonlara sahip olabilir. Örneğin taze lahana ve karalahana 3,8-10,0 mg/100 g arasında değişmektedir (Kopsell ve Kopsell, 2010).

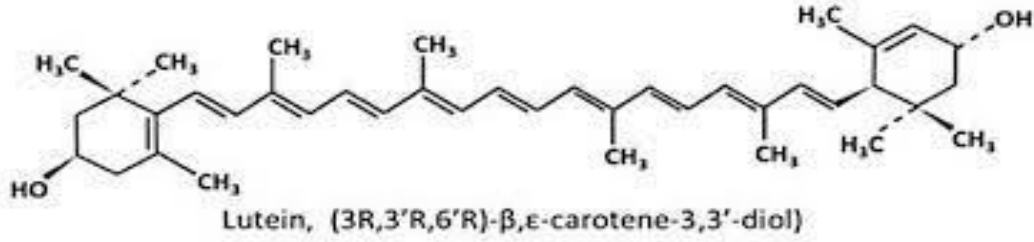
β -karoten'in A vitaminine dönüşümü ilk kez 1930'da A vitamini eksikliği olan hayvanların β -karoten ile beslendiklerinde sağlığına kavuştuğunu gözlemledikten sonra Moore tarafından öne sürülmüştür (Moore, 1930). 1965'te iki araştırma grubu, β -karotenin sıçan bağırsağı homojenatlarının varlığında inkübe edildiğinde bölündüğünü ve bu bölünmenin merkezi 15-15' çift bağda meydana geldiğini ve iki A vitamini aldehit (retinal) molekülü verdiğini göstermiştir. Enzimin bir oksijenaz gibi davrandığı öne sürülmüş ve buna β -karoten 15-15' dioksijenaz (daha sonra β -karoten oksijenaz 1, BCO1 olarak adlandırılmıştır) adı verilmiştir, çünkü bir dioksijenaz reaksiyon mekanizması içeriyor gibi görünmektedir (Olson ve Hayaishi, 1965; Fidge ve ark., 1969).

1.4 Lutein

Karotenoidler, yapraklarda, meyvelerde ve çiçeklerde yer alan sarı, turuncu veya kırmızı renkleri veren, doğada en bol bulunan pigment grupları ve yağda çözünen antioksidanlardır (Fraser ve Bramley, 2004). Karotenoidler kimyasal yapılarına göre iki sınıfa ayrılır: karotenler ve ksantofiller. Karotenler β -karoten ve likopen gibi hidrokarbonlarken ksantofiller lutein ve onun stereoizomeri zeaksantin gibi moleküllerinde oksijen atomları içeren polar bileşiklerdir (Arteni ve ark., 2015).

Luteinin biyokimyası ve metabolizması son zamanlarda ayrıntılı olarak gözden geçirilmiştir (Arunkumar ve ark., 2020). Karotenoidler, kafa kafaya bir şekilde birleşen iki 20 karbonlu öncü, geranilgeranil pirofosfat (GGPP) tarafından oluşturulan 40 karbonlu bir iskelete sahiptir. Uzun karbon iskeleti, *cis* veya *trans* konfigürasyon gibi

yapısal çeşitliliklere izin veren lineer ve siklik alternatifleri olan konjuge çift bağlar taşımaktadır. Saf hidrokarbonlardan oluşan karotenoidler, karoten adı verilen alt grupta sınıflandırılırken, polien zincirlerinde en az bir O atomu olanlar ksantofil olarak gruplandırılmaktadır. Lutein, her iki taraftaki terminal iyonon halkalarına bağlı iki hidroksil grubu ile ikinci alt gruba aittir (Şekil 1.10.).



Şekil 1.10. Lutein kimyasal yapısı (Nian ve Lo, 2019).

Karotenoidler çoğunlukla bitkilerde ve mikroorganizmalarda sentezlenirken insanda sentezlenmez. Bu nedenle, lutein diyetten alınmalıdır (Perry ve ark., 2009). Bugüne kadar doğada keşfedilen ve karakterize edilen yaklaşık 850 tip karotenoid olmasına rağmen bunların çok azı insan dokularında mevcuttur (Maoka, 2020). Bunların arasında bulunan lutein insan retinasında bulunan tek karotenoiddir (Bone ve ark., 1985).

Memeliler karotenoidleri sentezleyemezler ve bu nedenle gıda ile alınması gerekmektedir (Eroglu ve Harrison, 2013). Yutulduktan sonra, lutein ince bağırsağın mukozası tarafından emilir ve şilomikronlara bağlanır; daha sonra lenf içine salgılanır ve karaciğere ulaşır (Parker, 1996). Hepatositlerde lutein, periferik dokulara (Clevence ve Bieri, 1993, Ribaya-Mercado ve ark., 1995) özellikle en yüksek konsantrasyonların gösterildiği retinaya (Bernstein ve ark., 2016) dağılan lipoproteinlere dahil edilmektedir. Lutein yağda çözünür (Castenmiller ve ark., 1999) bu nedenle lipidlerin diyet içeriği, misellere dahil edilmesi yoluyla lutein emilimine aracılık etmektedir (Unlu ve ark., 2005) ve birkaç diyet faktörü rekabet edebilmektedir. Lif açısından zengin bir diyetin karotenoid serum düzeylerini düşürdüğü (Rock ve Swendseid, 1992, Buscemi ve ark., 2018) ve aynı zamanda lutein emilimini etkilediği bildirilmiştir (Kostic ve ark., 1992). Demir ve çinko içeriği ile protein eksikliği lutein emilimini etkileyebilir (Williams ve ark., 1998). Tersine mono- ve di-gliseritlerin mevcudiyetinin, önemli ölçüde artan lutein plazma seviyeleri tarafından öne sürüldüğü gibi, lutein emilimini pozitif olarak düzenlemesi muhtemeldir (Chiu ve ark., 2015).

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Grafen oksit (GO) ağırlıklı olarak doğal grafitin kimyasal oksidasyonu yoluyla sentezlenmektedir (Wazir ve Kundi, 2016; Novoselov ve ark., 2004). 1859'da Brodie ilk olarak dumanlı nitrik asit içindeki grafit bulamacına potasyum klorat ekleyerek grafit oksidi sentezlemiştir (Brodie, 1859). Yaklaşık 40 yıl sonra Staudenmaier, dumanlı HNO_3 'ün yaklaşık üçte ikisini konsantre H_2SO_4 ile değiştirerek ve kloratı gruplar halinde besleyerek bu yöntemi geliştirmiştir (Staudenmaier, 1898). Bu çalışmalara dayanarak, Hummers ve Offeman 1958'de, genellikle Hummers yöntemi olarak adlandırılan alternatif bir oksidasyon yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemde, konsantre H_2SO_4 içinde çözülmüş NaNO_3 ve KMnO_4 , grafiti birkaç saat içinde grafit okside oksitlemek için kullanılmıştır. Uygulama kolaylığı ve kısa süresi sayesinde, Hummers'ın yöntemi GO'yu sağlamak için geniş çapta benimsenmiş olsa da zehirli gaz üretimi (NO_2 , N_2O_4), artık nitrat ve düşük verim vb. dahil olmak üzere çeşitli problemler teşkil etmektedir. Bu sorunları çözmek için çeşitli modifikasyonlar yapılmıştır. Hummers yöntemi son 20 yılda uygulanmıştır ve ana stratejiler şu şekilde özetlenebilir: ilk olarak NaNO_3 'ün Hummers yönteminden geliştirilmiş bir çalışmayla doğrudan uzaklaştırılması; ikinci olarak KMnO_4 oksidasyonundan önce bir ön oksidasyon adımının eklenmesi (NaNO_3 yokluğunda); NaNO_3 yerine KMnO_4 miktarının artırılması, dördüncüsü KMnO_4 'ün K_2FeO_4 ile değiştirilmesi, NaNO_3 'ün uzaklaştırılması (Yu ve ark. 2016). Örneğin Kovtyukhova ve arkadaşları; grafit için Hummers prosedürü uygulanmadan önce $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ve P_2O_5 ile önceden oksitlenmiştir. Bu çalışma yüksek düzeyde oksitlenmiş GO ile sonuçlanmış, ancak çözelti aktarımı ve malzeme kurutmayı içeren tüm süreç oldukça zaman alıcı olmuştur. (Kovtyukhova, 1999). Marcano ve arkadaşları NaNO_3 yerine hem KMnO_4 hem de konsantre H_2SO_4 ($1/9 \text{ H}_3\text{PO}_4$ içeren) miktarını artırarak, geliştirilmiş Hummers yönteminin daha yüksek verim sağladığını ve sıcaklığın kolayca kontrol edilebildiğini keşfetmişlerdir. (Marcano ve ark., 2010). Son zamanlarda Gao ve arkadaşları KMnO_4 yerine K_2FeO_4 bazlı bir oksidasyon yaklaşımı bildirmişler ve oda sıcaklığında tek katmanlı GO elde etmişlerdir (Yu ve ark. 2016; Peng ve ark., 2015).

Grafen oksit (GO), özellikle son yirmi yılda elektronik cihazlarda, süper kapasitörlerde, tuz giderme membranlarında, kompozit malzemelerde, elektrokatalizörlerde, katalizörlerde, gaz sensörlerinde ve geniş bir tıbbi tedavi yelpazesinde sayısız uygulamaları olan kullanışlı bir malzemedir (Otsuka ve ark., 2024).

2.1 Grafen Oksit ve Türevlerinin Kromatografi Uygulamaları

Qu ve ark. (2012); yaptıkları çalışmada, grafen oksit (GO) nano tabakaları, birleştirme maddesi olarak 3-aminopropildietoksümetil silan kullanılarak kılcal duvar üzerine immobilize etmiştir. Grafen kaplı kolon (G kolonu), GO ile değiştirmiş sütunun hidrazin indirgenmesiyle üretmiştir. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri, kılcal damar duvarına aşıl原因an GO'nun görünür kanıtını sağlamaktadır. Enerji dağıtıcı X-ışını spektrometresi (EDS), GO'nun kılcal duvar üzerinde yüksek kapsama alanını göstermektedir. G@kolonu, 3–9 pH aralığında anottan katoda pH'a bağlı bir elektroosmotik akış (EOF) sergilerken, grafen oksit kaplı kolon (GO@kolon) sabit bir EOF göstermektedir. Hem GO@kolonu hem de G@kolonu, açık borulu kılcal elektrokromatografi (OT-CEC) için değerlendirilmiştir. GO@kolonu ayrıca açık borulu kılcal sıvı kromatografisi (OT-CLC) için de değerlendirilmiştir. Test edilen nötr analitlerin GO@ kolonunda iyi bir şekilde ayrılması, tipik bir ters faz davranışı temelinde elde edilmiştir. Aksine, G@kolonu, grafen ve poliaromatik hidrokarbonlar arasındaki güçlü π – π istiflenmesi ve hidrofobik etkileşimler nedeniyle zayıf ayırma performansı göstermiştir. GO'nun yüksek kapsamı, GO@kolonu OT-CLC ayrımı için umut verici hale getiren kolon fazı oranını iyileştirmiştir. Tavuk yumurtası beyazındaki ovalbüminin üç glikoizofomu da dahil olmak üzere bilinen başlıca proteinlerden beşi, fosfat tamponu (5 mM, pH 7.0) ve 20 kV uygulanan voltaj ile GO@ kolonu üzerinde tek bir çalışmada tanımlanmıştır. Çalışmalardan çalışmalara, günden güne ve kolondan kolona tekrarlanabilirlikler, sırasıyla OT-CEC'deki EOF'nin göreceli standart sapmalarının (RSD'ler) ve OT CLC'deki naftalinin alıkonma süresinin hesaplanmasıyla değerlendirilmiştir. Bu RSD değerlerinin %3'ün altında olduğu görülmüştür (Qu ve ark., 2012).

Liang ve ark. (2014); yaptıkları çalışmada, grafen oksit (GO)/silikayı, GO'nun silika parçacıkları üzerine birleştirilmesiyle üretmiş ve ardından yüksek performanslı sıvı kromatografisi için yeni bir sabit faz hazırlamak üzere GO/silikayı değiştirmek için altın nanopartikülleri (GNP'ler) kullanmıştır. GO/silika fazı ve GNP/silika fazı ile karşılaştırdığında, hidrofiliklik, büyük π -elektron sistemleri, hidrofobiklik ve koordinasyon fonksiyonlarının yanı sıra bu yeni sabit fazın, 2D GO'nun sıfır boyutlu GNP/silika'larla kombinasyonu nedeniyle özel ayırma performansı sergilediği de bulunmuştur. Bu sebeple nanokompozitin çeşitli pratik uygulamalarda kullanımının gelecekte daha detaylı incelenmesi gerektiği ifade edilmiştir (Liang ve ark., 2014).

Zhang ve ark. (2013); yaptıkları çalışmada, HPLC için grafen oksit (GO) bağlı sabit fazı, GO tabakalarının kovalent birleştirme yoluyla aminosilika mikroküreler üzerine kaplanmasıyla üretmiştir. Grafen (G) işlevselleştirilmiş HPLC sabit fazı daha sonra, HPLC için sabit faz bileşeni olarak grafenin kullanılmasının ilk örneği olan GO bağlı silika (GO@SiO₂) kompozitinin hidrazinin indirgenmesi yoluyla hazırlamışlardır. Test edilen nötr ve polar bileşiklerin hem GO@SiO₂ hem de grafen bağlı silika (G@SiO₂) kolonları üzerinde etkili şekilde ayrılması, optimum deney koşulları altında elde edilmiştir. Ticari C18 kolonu ile karşılaştırıldığında GO ve grafen bağlı kolonların farklı kromatografik performansları, benzersiz tutma mekanizmalarına atfedilmiştir. GO ve grafenin poliaromatik iskelesi, π - π istifleme özelliği ve hidrofobik etki sağlamaktadır ve nitroaromatik bileşiklerin ayrılması için π - π elektron-verici-alıcı (EDA) etkileşimi ve hidroksil ve amino bileşikler için hidrojen bağlanması gibi diğer tutma mekanizmaları sağlaması da dikkate alınabilir. Deneysel sonuçlar, karışık modlu tutma mekanizmasının, C18 kolonuyla karşılaştırıldığında benzersiz bir özellik olan benzer hidrofobikliğe sahip analitlerin ayrılmasını kolaylaştırabildiğini göstermektedir. Ek olarak, G@SiO₂, GO@SiO₂'nin aksine aromatik analitlere daha yüksek afinite göstermektedir ve tutma mekanizması, tipik ters faz davranışıyla tutarlı değildir. Aromatik bileşiklerin G@SiO₂ kolonunda ayrılması öncelikle π - π istifleme etkileşimine ve daha sonra hidrofobikliğe dayanırken, iki etkileşim GO@SiO₂ kolonunda eşit paylara sahiptir (Zhang ve ark., 2013).

2.2 Beta-Karoten

Corone ve ark. (2019); yaptıkları çalışmada β -karotenin insan sağlığındaki rolüne odaklanmış ve bu bileşik ve türevlerinin adiposit biyolojisini düzenlediği mekanizmaları vurgulamışlardır. Ayrıca karotenoid birikiminin fizyolojik önemi tartışılmış, karotenoid parçalayan enzimlerin anlamı ve teknik zorluklar ve araştırmacıların bu biyoaktif moleküllerle çalışırken dikkate almaları gereken hususlar vurgulanmıştır. Son yıllarda yüksek kalorili, düşük besin değeri olan gıdalara erişim arttıkça, obezite sıklıkla gözlemlenen bir sağlık sorunu haline geldiği ifade etmiştir. Meyve ve sebzelerde bulunan karotenoidler gibi bazı biyoaktif bileşenlerin obezitenin önlenmesine ve tedavisine katkıda bulunabileceği gösterilmektedir. Bu karotenoidlerin bazıları, memelilerde pleiotropik etkileri olan hormon benzeri bir vitamin olan A vitamini üretiminden sorumludur. Bu etkiler arasında A vitamini, yağ dokusu gelişiminin güçlü bir düzenleyicisidir ve bu nedenle obezite için önemlidir. Ayrıca karotenoid birikiminin

fizyolojik önemi tartışılmaktadır. Karotenoid parçalayan enzimlerin anlamı ve teknik zorluklar ve araştırmacıların bu biyoaktif moleküllerle çalışırken dikkate almaları gereken hususlardır. Karotenoidlerin modern beslenme ve sağlıkta sahip oldukları geniş işlev yelpazesi sayesinde, tıp ve farmasötik alanlara uygulanabilirliklerini değerlendirmek için obezite gibi metabolik hastalıklara ilişkin faydalarını anlamak gerekmektedir. Hücre kültürü ve hayvan modellerinde geliştirilen mekanik çalışmalar, A vitamini ve retinoik asidin ana öncüsü olan β -karotenin, adipositlerde ve diğer dokularda yağ asidi oksidasyonunu teşvik ederek obeziteyi azalttığını göstermektedir. Gözlemsel ve girişimsel çalışmalar bu bulguları desteklemekte ve provitamin A karotenoidleri açısından zengin meyve ve sebze tüketiminin obezite gelişimini önlediğine dair bir açıklama sağlamaktadır. Buradan hareketle, provitamin A karotenoidleri yönünden zengin gıdaların tüketimini teşvik eden politika ve stratejilerin uygulanmasının, obezite ve ateroskleroz ve diyabet gibi diğer metabolik hastalıkların gelişiminin önlenmesine katkıda bulunabileceği ön görülmektedir. Ek olarak, sağlık durumunun yeni belirteçleri olarak retinoik asit ve β -karoten miktarının klinik uygulamaya dahil edilmesi de önerilmektedir. Bu yaklaşım iki bileşiğin düşük seviyelerinin metabolik hastalıkların gelişimi ile sıkı bir şekilde bağlantılı olduğu fikrini destekleyen klinik ve preklinik modellerden elde edilen son verilere dayanmaktadır (Corone ve ark., 2019).

Hira ve ark. (2019); ekzojen antioksidanların, özellikle β -karoten (1.02 ve 2.05 mg/kg)'nin etkinliğini değerlendirmeyi amaçladıkları çalışmada, farelerde intraserebroventriküler enjekte edilen streptozotosin kaynaklı hafıza bozukluğunu incelemişlerdir. Nörodejenerasyon için streptozotosin (3 mg/kg, icv) iki ayrı dozda (tedavinin 1. ve 3. gününde) uygulanmıştır. Protokolde elli Albino fare (erkek) seçilmiştir ve seçilen antioksidanların bilişsel geliştirme etkisini araştırmak için beş gruba ayrılmıştır (Grup I - kontrol, Grup II - hastalık, Grup III - standart, Grup IV - V - β -karoten ile tedavi edilmiştir). Bilişsel performans, yükseltilmiş artı labirent, pasif kaçınma ve açık alan paradigmalarının ardından gözlemlenmiştir. Beyin homojenatlarında asetilkolin esterase, β -amiloid proteini ve glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalaz gibi oksidatif stresin biyokimyasal belirteçleri analiz edilmiştir. Asetilkolinesteraza (AChE) karşı *in silico* aktivite, β -karotenin moleküler modellemesi ile belirlenmiştir. 2.05 mg/kg dozundaki β -karotenin, asetilkolinesteraz aktivitesinin inhibisyonu da dahil olmak üzere streptozotosin kaynaklı davranışsal ve biyokimyasal bozuklukların zararlı etkilerini azalttığı bulunmuştur. *In silico* çalışmalar, β -karotenin asetilkolinesteraz enzimi ile

bağlanma kapasitesini doğrulamıştır. B-karoten uygulaması, anti-oksidatif etkileri, asetilkolinesterazın inhibisyonu ve amiloid β -protein fragmanlarının indirgenmesi yoluyla streptozotosin kaynaklı bilişsel eksikliği zayıflatmıştır. Bu sonuçlar, β -karotenin Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde faydalı olabileceğini düşündürmektedir (Hira ve ark., 2019).

El-Baz ve ark. (2023); yaptıkları çalışmada β -karotenin güçlü antioksidan özellikleri sayesinde, farelerde siklofosamid (CP) kaynaklı akut akciğer hasarına (ALI) karşı güçlü bir koruyucu etki göstereceğini varsaymaktadır. Farelerde CP kaynaklı ALI'ye karşı β -karoten takviyesinin etkisinin altında yatan mekanizmaları incelemişlerdir. β -karoteni *Scenedesmus obliquus* mikroalg n-heksan özünden izole edilmiştir ve HPLC ve ¹H-NMR analizi ile tanımlanmıştır. Deneylerde, 40 fare rastgele beş gruba ayrılmış ve grup 1 (Kontrol): Farelere salin verilmiştir. Grup 2 (β -karoten kontrolü): Farelere CP enjeksiyonu yapılmadan art arda 10 gün boyunca günde bir kez β -karoten (40 mg/kg; oral) uygulanmıştır. Grup 3 (CP): Farelere 200 (mg/kg) CP'lik bir ip enjeksiyonu verilmiştir. Grup 4 ve 5 (CP + β -karoten): Farelere CP enjeksiyonunu takiben on gün boyunca günde bir kez β -karoten (20 ve 40 mg/kg; oral) uygulanmıştır. Deney sonunda hayvanlardan laboratuvar analizi için akciğer örnekleri toplanmıştır. β -karoten uygulaması oral olarak CP'nin neden olduğu ALI'yi ve enflamasyonu azaltmıştır. β -karoten ıslak-kuru ağırlık oranlarını (W/D), aşağı regüle edilmiş IL-17, NF- κ B ve IKBKB'yi önemli ölçüde azaltmış, TNF- α , COX-2 ve PKC içeriğini azaltmış, ve akciğer dokularında SIRT1 ve PPAR γ içeriğini artırmıştır. β -karoten, CP'nin neden olduğu histopatolojik değişiklikleri iyileştirmiştir ve CP'ye kıyasla inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve amfizem puanlama sayısını azaltmıştır. Sonuç olarak, doğal β -karotenin, farklı inflamatuvarla ilişkili komplikasyonlar için umut verici bir anti-inflamatuvar aracı olduğu sonucuna varılmıştır. β -karotenin, farklı immün ve inflamatuvarla ilişkili komplikasyonlar için potansiyel bir anti-inflamatuvar ajan olduğu ileri sürülmüştür (El-Baz ve ark., 2023).

Dai ve Row (2019); yaptıkları çalışmada, β -karotenin ultrasonik yardımcı katı faz ekstraksiyonunu bildirmektedir. β -karoten, birçok alanda kullanılan ve büyük ilgi gören güçlü antioksidan aktiviteye sahip bir karotenoiddir. Bununla birlikte, bilimsel literatürde, β -karoten çıkarmak için manyetik kitosan biyopolimerlerinin uygun ve çevre dostu kullanımına dair birkaç örnek vardır. Havuç numunelerindeki β -karoten, HPLC tespiti öncesinde sentezlenmiş manyetik kitosan β -siklodekstrin biyopolimerleri kullanılarak

ekstre edilmiştir. Optimum koşullar altında havucun β -karoten içeriği $41.06 \pm 0.02 \mu\text{g/g}$ olarak bulunmuştur. Manyetik kitosan siklodekstrin biyopolimerlerini kullanan bu yeni geliştirilen yöntem, işlemin kolay ve hızlı olması ve manyetik biyopolimerlerin basit bir işlem kullanılarak uzaklaştırılabilmesi nedeniyle sebzelerden karotenoidlerin ultrasonik yardımlı katı faz ekstraksiyonu için umut verici bir yöntem olduğu bildirilmiştir (Dai ve Row, 2019).

Rodríguez-Rodríguez ve ark. (2020); yaptıkları çalışmada, insan dışkıdaki ana diyet karotenoidlerinin tanımlanması ve miktarının belirlenmesini amaçlamışlardır. Karotenoidler, yaygın olarak kabul edilen sağlık yararları olan biyoaktif bileşiklerdir. İnsan dışkıdaki miktarının belirlenmesi, biyoyararlanımlarını değerlendirmek için yararlı, invazif olmayan bir yaklaşım olabilmektedir. Dışkı ve diyet alımı, 101 sağlıklı yetişkinden (45-65 yaş) elde edilmiştir. Karotenoid konsantrasyonları, dışkıda HPLC ile ve diyet alımında 3 günlük gıda kayıtları ile belirlenmiştir. Dışkıda ölçülen karotenoidler ($\mu\text{g/g}$ kuru ağırlık, medyan): β -karoten (39,5), likopen (20), lutein (17,5), fitoen (11,4), zeaksantin (6,3), β -kriptoksantin (4,5), fitofluen (2,9) olmuştur. α -karoten (5,3) ve violaxanthin dışkı örneklerinin sırasıyla; %75.5'inde ve %7.1'inde bulunmuştur. En yüksek konsantrasyonlarda bulunan karotenoidler, en fazla tüketilenlere karşılık gelmektedir ($\mu\text{g/gün}$): likopen (13.146), fitoen (2697), β -karoten (1812), lutein+zeaksantin (1148). Dışkıdaki ve diyet alımındaki karotenoid konsantrasyonu, toplam provitamin A olmayan karotenoidler için korelasyon göstermektedir ($r = 0.302$; $p = 0,003$), fitoen ($r = 0,339$; $p = 0,001$), fitofluen ($r = 0,279$; $p = 0,005$), likopen ($r = 0,223$; $p = 0,027$), lutein+zeaksantin ($r = 0,291$; $p = 0,04$) ve β -kriptoksantin ($r = 0.323$; $p = 0.001$). Diyet karotenoidlerinin yüksek bir oranı, özellikle provitamin A aktivitesine sahip olanlar ve izomerlerinin bir kısmı, kalın bağırsağa ulaşır ve bozulmamış formlarının düşük bir biyoyararlanımı olduğunu düşündürmektedir (Rodríguez-Rodríguez ve ark., 2020).

Gea-Botella ve ark. (2021); yaptıkları çalışmada, meyve suyu üretim sürecinde oluşan iki hurma yan ürünü A ve B'nin kullanılması ve yeniden değerlendirilmesini amaçlamışlardır. Meyve suyu ekstraksiyonunu optimize etmek için kabukların ve posanın pektinaz enzimatik işleminden elde edilen yan ürün B, özellikle değerli biyoaktif karotenoidlerin geri kazanılması için uygundur. Kullanılan ekstraksiyon çözücüler ve çözücü kombinasyonları şunlardır: etanol, aseton, etanol/aseton (50:50 v/v) ve etanol/aseton/heksan (25:25:50 v/v/v). HPLC-DAD analizi, violaxanthin, neoxanthin,

antheraxanthin, lutein, zeaxanthin, β -cryptoxanthin 5,6-epoxide, β -cryptoxanthin, α -karoten ve β -karoten olmak üzere toplam dokuz ayrı karotenoid saptanmıştır ve tanımlanmıştır. β -kriptoksantin ve β -karoten, yan ürün B'den elde edilen aseton ekstraktındaki toplam karotenoid içeriğinin (TCC) %49.2'sini ve %13.2'sini temsil etmektedir. TCC, bu yan üründen elde edilen aseton ekstraktının antioksidan aktivitesine büyük ölçüde katkıda bulunmuştur. Trabzon hurması kabuklarının ve posasının pektinaz enzimatik işlemi ve ardından karotenoidlerin mutlak aseton ekstraksiyonu, nutrasötik bileşen olarak kullanılabilecek bu bileşikler açısından zengin bir ekstrakt elde etmek için etkili bir yöntem olabileceği öne sürülmüştür (Gea-Botella ve ark., 2021).

Xu ve ark. (2023); yaptıkları çalışmada, hem acı biberlerde hem de ürünlerinde karotenoid belirleme yönteminin daha iyi standardizasyonu ve yaygın uygulaması için, ilk kez kapsantin, zeaksantin, lutein, β -kriptoksantin ve β -karoten dahil olmak üzere beş ana karotenoidin eş zamanlı tayinini rapor etmektedir. Optimize edilmiş ekstraksiyon ve HPLC yöntemi ile acı biber ve ürünlerinde metodolojik değerlendirmedeki tüm parametrelerin referans değerlerle iyi bir stabilite, geri kazanım ve doğruluk uyumu içinde olduğu bulunmuştur; R_kalibrasyon eğrileri için katsayılar 0,998'den fazladır ve LOD'lar ve LOQ'lar sırasıyla 0,020 ila 0,063 ve 0,067 ila 0,209 mg/L arasında değişmiştir. Acı biber ve ürünlerindeki beş karotenoidin karakterizasyonu, gerekli tüm doğrulama kriterlerini geçmiştir. Yöntem dokuz acı biber ve yedi acı biber ürününde karotenoid tayininde uygulanmıştır. Sonuçlar, geniş bir tespit aralığı ve düşük tespit limiti ile doğru, kararlı, tekrarlanabilir ve hassas olan HPLC-PDA yönteminin uygulanmasının kolay olduğunu göstermiştir. Daha az adım ve doğrudan deneysel çözücülerle, hem acı biber hem de ürünlerinde yaygın olarak kullanılan karotenoidlerin niteliksel ve niceliksel analizi için etkili ve güvenilir bir yöntem sağlamıştır (Xu ve ark., 2023).

Zhuang ve ark. (2022); yaptıkları çalışmada, HPLC analizi kullanılarak gastrointestinal sindirim ve emilim sırasında β -karoten (BC)'nin biyoyararlanımını değerlendirmek için yapay olarak simüle edilmiş gastrointestinal sindirim ve Caco-2 hücre emilim modellerini kullanmışlardır. A vitamininin (VA) öncüsü olan BC, antioksidan aktiviteye sahiptir ancak yağda çözünür ve düşük biyoyararlanıma sahiptir. Önceki in vitro antioksidan ve 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorür (AAPH) serbest radikal temizlemeyi değerlendiren tahliller, hem BC hem de VA, radikalleri temizleme ve hücreleri oksidatif strese koruma konusunda güçlü bir yetenek göstermiştir. BC'nin yüksek emilim ve transfer hızları gözlemlenmiş ve retinol

metabolitleri (A Vitamini) tespit edilmiştir. Bu nedenle BC, HPLC kullanılarak asidik gastrointestinal ortamda tespit edilebilir. Optimize edilmiş yöntem, kolonda BC ve VA'nın daha iyi ayrılmasını sağlayarak test sonuçlarının doğruluğunu arttırmıştır (Zhuang ve ark., 2022).

Enggi ve ark. (2022); yaptıkları çalışmada, çözünürlüğü artırmak ve sürekli salım davranışı elde etmek için β -karotenin yerinde katı dispersiyon ve yüzen jelin bir kombinasyon yaklaşımını içeren bir kuru toz takviyesi geliştirilmiştir β -karotenin sağlık yararlarına rağmen, zayıf sulu çözünürlüğü ve düşük oral biyoyararlanımı nedeniyle aktivitesi engellenmiştir. Bu nedenle, bu sorunların üstesinden gelmek için yeni bir yaklaşım geliştirmek çok önemlidir. Burada, Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu (ICH) yönergelerine göre β -karoteni ölçmek için bir HPLC yöntemi doğrulanmıştır. Analitik yöntem, geri kazanımda ve in vitro β -karoten belirlemek için metanol ve Aç Kalmış Durum Simüle Mide Sıvısı (FaSSGF) içinde doğrulanmıştır. 3,5 μ m partikül boyutuna sahip Xselect CSH™ C18 kolonu (Waters, 3,0 x 150 mm) kullanan basit bir HPLC yöntemi, mobil faz olarak %100 asetonitril ile doğrulanmıştır. Kalibrasyon eğrilerinin LLOQ değerleri < 3 ng/mL ile doğrusal olduğu bulunmuştur. Daha da önemlisi, yöntem, taşıma etkisi olmadan doğru ve kesindi veriler sunmuştur. Bileşiğin içerik analizinde β -karoten konsantrasyonunu belirlemek için başarıyla uygulanmış ve katı dispersiyon formülasyonları ile yerinde yüklü yüzen jelden in vitro ilaç salınımını belirlemek için başarıyla uygulanmıştır. Burada elde edilen yöntemin duyarlılığı, ilaç dağıtım sistemlerinde çeşitli uygulamalarda geniş bir potansiyel kullanım alanı sunmaktadır (Enggi ve ark., 2022).

Jang ve ark. (2023); çeşitli işlenmiş gıdalarda β -karoten ve β -apo-8'-karoten analizleri için sağlam ve hızlı bir HPLC yöntemi geliştirilmişlerdir. Analiz yöntemi, az yağlı, orta yağlı ve yüksek yağlı gıda matrisleri için doğrulanmıştır. İki karotenoid, LC–MS/MS ile tanımlanmıştır. Üç gıda matrisinde β -karoten ve β -apo-8'-karoten için tespit limitleri sırasıyla 0,08–0,27 μ g/g ve 0,09–0,18 μ g/g'dır. Günler arası ve gün içi doğruluk ve kesinlik, Kodeks yönergelerine uygundur. Doğrulanmış yöntem, Kore'de elde edilen, muhtemelen β -karoten ve β -apo-8'-karotenal içeren 57 işlenmiş gıda örneğine uygulanmıştır. Numunelerde tespit edilen β -karoten ve β -apo-8'-karoten seviyeleri, sırasıyla tespit edilmeyen (ND) ile 6,92 μ g/g ve ND ile 1,63 μ g/g aralığındadır. Çikolata ve peynir örnekleri sırasıyla en yüksek β -karoten ve β -apo-8'-karoten seviyelerine sahiptir. Özellikle, etiketli karotenoid katkı maddesi içermeyen birkaç numune β -karoten

içermektedir. Ayrıca geliştirilen analitik yöntemin, çeşitli işlenmiş gıda matrisleriyle uyumlu olduğu bulunmuştur (Jang ve ark., 2023).

Natesan ve ark. (2020); yaptıkları çalışmada, gene özgü işaretleyici (crtRB1 3'TE) ve HPLC kullanarak Kuzey-Doğu Himalaya bölgesi (NEHR) mısır yerel çeşitlerinde crtRB1 gen polimorfizmini ve β -karoten içeriğini karakterize etmeyi amaçlamıştır. Mikrobesein yetersiz beslenmesi veya gizli açlık, gelişmekte olan ve gelişmiş ülkelerde büyük bir nüfusu etkilemektedir. Başlıca mikrobesein eksikliklerinden biri, büyüme geriliği, körlük ve bulaşıcı hastalıklara karşı artan duyarlılık gibi birçok önemli rahatsızlığa neden olan A vitamini eksikliğidir. Mısır, provitamin A karotenoidleri için büyük bir doğal varyasyona sahip olduğu gösterilmiştir ve provitamin A biyolojik zenginleştirilmesi için umut verici bir mahsuldür. crtRB1 (β -karoten hidroksilaz 1) geni, mısırdaki β -karoten içeriğini artırmaktan sorumludur. crtRB1'e bağlı DNA işaretçisinin daha önce tanımlanmış olan β -karoten içeriğini artırmada önemli bir etkisi olmuştur. Hindistan'da, NEHR mısır çeşitliliğinin merkezidir. Bu bölgeden gelen yerel mısır çeşitleri iyi agronomik karakterlere sahiptir ve stresli ortamlara iyi adapte olmuştur. Bununla birlikte, NEHR mısır yerel çeşitlerinde crtRB1 geninin ve β -karoten içeriğinin varlığı hakkında önceden bilgi mevcut değildir. crtRB13'TE işaretleyici kullanarak 26 yerel mısır çeşidini taranmış işaretçisi ve tüm mısır yerel çeşitlerinin ya olumsuz alele homozigot ya da heterozigot (hem olumlu hem de olumsuz aleller) olduğunu, ancak hiçbir yerel türün olumlu alel için homozigot olmadığı bulunmuştur. Öte yandan, HPLC analizi, heterozigot alel tipi yerel çeşitlerdeki β -karoten içeriğinin 1,36 ila 4,40 $\mu\text{g/g}$ arasında değiştiğini, elverişsiz homozigot alel tipi yerel türlerde ise 0,33 ila 0,94 $\mu\text{g/g}$ arasında değiştiğini göstermiştir. CAU-M66 ve CAU-M16 yerel çeşitlerinin, incelenen 26 yerel mısır çeşidi arasında en yüksek miktarda β -karoten içeriğine (4.40 ve 4.26 $\mu\text{g/g}$) sahip olduğu ve heterozigot durumda crtRB1 uygun aleline sahip olduğu bulunmuştur. Bu, NEHR mısır yerel çeşitlerinde crtRB1 gen polimorfizmini ve β -karoten içeriğini açıklayan ilk çalışmadır. Yeni tanımlanan β -karoten bakımından zengin yerel mısır türleri, mısırdaki β -karoten içeriğini artırmak için ıslah programlarında etkili bir şekilde kullanılabilir (Natesan ve ark., 2020).

Gebregziabher ve ark. (2021); yaptıkları çalışmada lutein, zeaksantin, α -karoten, β –karoten , β 'nın eş zamanlı tayini için basit, hızlı ve seçici bir ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografik (RP-HPLC) yöntemi geliştirmek ve doğrulamak amaçlanmıştır. Soya fasulyesi, insan sağlığı yararları ile ilişkili karotenoidler dahil

olmak üzere besleyici biyoaktif bileşikler içermektedir. Karotenoidler farmasötikler/besin ilaçları, kozmetik ve başlıca gıda endüstrilerinde uygulanabilir. Bununla birlikte, soya fasulyesi tohumları için karotenoid ve klorofil tespiti ve ölçümü için etkili ve doğru bir yöntem henüz geliştirilmemiş ve doğrulanmamıştır. Hızlı ve güvenilir bir analiz yöntemine duyulan ihtiyaç giderek daha önemli hale gelmiştir. 1,50 mL hacimde etanol-aseton (1:1) çözücüler kullanılarak ekstrakte edilen soya fasulyesi unu örneğinde (100,00 mg) kriptoksantin ve klorofil -a ve -b. İlginç bir şekilde, etkili ayırma tekniği, metil tert-butil eter, 10 mM amonyum asetat içeren metanol ve bir C₃₀ YMC Karotenoid (250 × 4,6 mm ID, S-5 µm) kolonu aracılığıyla 0,90 mL⁻¹ dk akış hızında verilen suyun mobil fazları kullanılarak elde edilmiştir. 450 nm'de ayarlanmış bir UV-VIS detektörü ile birleştirilmiştir. Dedektör yanıtı, 0.9993-0.9999'luk bir belirleme katsayısı (R₂) ile 0.05–30.00 µg mL⁻¹ arasında doğrusaldır. Doğrulanmış yöntem, saptama limiti (LOD) 0,0051–0,0300 µg mL⁻¹ ve nicelme limiti (LOQ) için 0,0155–0,0909 µg mL⁻¹ ile duyarlıdır. Yöntem ve sistem için geri kazanım değerleri %83,12–106,58 arasındaydı ve tekrarlanabilirlik kesinliği sırasıyla %1,25–4,20 ve %0,15–0,81 arasında değişmektedir. Yöntem, %3,00'den küçük bir göreceli standart sapma ile yeterli kesinlik göstermiştir. Bu yöntemin, diğer baklagillerdeki karotenoidlerin ve klorofillerin profilinin çıkarılması için de geçerli olduğu bulunmuştur. Özetle, bu yöntem, küresel olarak insan beslenme taleplerini karşılamak amacıyla gıda endüstrisi ve kaliteli ıslah programları için faydalı olan soya fasulyesi ve diğer baklagil tohumlarındaki ana karotenoidlerin ve klorofillerin kalitatif ve kantitatif tayini için başarıyla uygulanmıştır (Gebregziabher ve ark., 2021).

2.3 Lutein

Kavalappa ve ark. (2021); lutein açısından zengin gıda takviyelerinin alınması üzerine meme kanseri riskinin azalması, luteinin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde büyümeyi inhibe etme potansiyelinin altında yatan moleküler mekanizmayı araştırmışlardır. *Spinacia oleracea*'dan saflaştırılmış lutein HPLC ve sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi ile tanımlanmaktadır. Hücre canlılığı, suda çözünür tetrazolyum-1 deneyi ile ölçülmüştür. Hücre içi reaktif oksijen türleri seviyesi, 2',7'-dikloroflorescein tahlili ile incelenmiştir. Antioksidan savunma, hücre canlılığı ve apoptoz belirteçlerinin protein ekspresyonu, western blot analizi ile analiz edilmiştir. Apoptozun lutein tarafından uyarılması, 4',6-diamidino-2-fenilindol boyama ve kaspaz-3 aktivite tahlili ile ölçülmüştür. Saflaştırılmış lutein, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin

yaşayabilirliğini inhibe etmiştir. Luteinin büyümeyi inhibe edici etkisi, süperoksit dismutaz-2 ve heme oksijenaz-1'in baskılanmış protein ekspresyonu ve bunun transkripsiyon faktörü nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör-2 ile ilişkilendirilmiştir. Lutein tedavisi daha sonra hücre içi hücre hayatta kalma proteinlerinin, fosforile protein kinaz B'nin, fosforile hücre dışı düzenlenmiş kinaz 1/2'nin ve nükleer faktör-kB'nin ekspresyonunu bloke etmiştir. Antioksidan savunmanın ve hücre canlılığı belirteçlerinin lutein tarafından baskılanması, ayrıca yüksek kaspaz-3 aktivitesi ve Bcl-2 ve poli-ADP riboz polimerazın aşağı regüle edilmiş ekspresyonu ile apoptoz indüksiyonu ile bağlantılıdır. Sonuçlar, luteinin, kısmen antioksidan savunma tepkisine bağlı hücre hayatta kalma sinyal belirteçlerinin modülasyonu yoluyla hücre ölümünü aktive eden insan meme kanseri hücre büyümesinin etkili bir inhibitörü olarak önemli bir rolünü vurgulamaktadır. Antioksidan savunmanın ve hücre hayatta kalma belirteçlerinin lutein tarafından baskılanması, ayrıca yüksek kaspaz-3 aktivitesi ve Bcl-2 ve poli-ADP riboz polimerazın aşağı regüle edilmiş ekspresyonu ile apoptoz indüksiyonu ile bağlantılıdır. Sonuçlar, luteinin, kısmen antioksidan savunma tepkisine bağlı hücre hayatta kalma sinyal belirteçlerinin modülasyonu yoluyla hücre ölümünü aktive eden insan meme kanseri hücre büyümesinin etkili bir inhibitörü olarak önemli bir rolünü vurgulamaktadır. (Kavalappa ve ark., 2021).

Lutein, yeşil mikroalglerde sentezlenen doğal olarak güçlü bir antioksidan karotenoiddir ve farklı insan kronik durumlarını önleme konusunda güçlü bir yeteneğe sahiptir. Bugüne kadar, *Scenedesmus obliquus*'dan izole edilen saf luteinin bağışıklığı uyarıcı etkisine dair bir rapor bulunmamaktadır. El-Baz ve ark. (2022); bu nedenle, doğal luteini *S. obliquus*'tan izole ederek siklofosfamid kaynaklı beyin hasarına karşı bir immüno-uyarıcı olarak etkinliğini değerlendirmişlerdir. Tüm -E-(3R, 3'R, 6'R)-Luteini *S. obliquus*'tan prep-HPLC kullanılarak saflaştırılmıştır ve ¹H- ve ¹³C-NMR spektroskopisi ile karakterize edilmiştir. Sıçanları rastgele dört deney grubuna sınıflandırılmıştır: Kontrol grubuna art arda on gün boyunca lutein dimetil sülfoksit verilmiştir. Siklofosfamid grubuna tek bir intraperitoneal enjeksiyonu Siklofosfamid (200 mg/kg) verilmiştir. Lutein grupları, siklofosfamid dozundan sonraki on gün boyunca günde bir kez 50 ve 100 (mg/kg) lutein uygulanmıştır. Lutein uygulaması, beyinde makrofaj inflamatuvar protein2 (MIP2), sitokin kaynaklı nötrofil kemoatraktan (CINC) ve matrix metaloproteinaz 1 (MMP1) içeriğini azaltmıştır. Ayrıca, siklofosfamid grubuna kıyasla düşük NLR pirin alan protein 3 (NLRP3) ve dolayısıyla kaspaz-1 içeriği ile ilişkili

interlökin 1 beta (IL-1 β) ve interlökin 18 (IL-18) içeriğini düşürmüştür. Histomorfometrik analizde, lutein grupları (50 ve 100 mg/Kg), siklofosfamid grubuna kıyasla nükleer piknoz sayılarını sırasıyla %65 ve %69 oranında önemli ölçüde azalttıkları için hafif histopatolojik değişiklikler göstermiştir. Bu, immün belirteçlerin modülasyonu ile azalan nöroinflamasyon, kemokin alımı ve nöron dejenerasyonu yoluyla siklofosfamid kaynaklı beyin hasarına karşı luteinin immünomodülatör rollerini gösteren ilk çalışmadır. Bu nedenle luteinin, enflamasyonla ilişkili bağışıklık bozukluklarına karşı etkili bir immünomodülatör olabileceği ileri sürülmüştür (El-Baz ve ark., 2022).

Yeşil yapraklı sebzeler (GLV'ler), sağlıklı beslenme modellerinin temel bir unsurudur ve önemli bir lutein kaynağıdır. Li ve ark. (2021); GLV'ler ile lutein alımı ve çoklu sağlık sonuçları arasındaki ilişkilere dair kanıtları açıklığa kavuşturmak için bir inceleme yapmışlardır. 29 sağlık çıktısı ile toplam 24 meta-analiz, uygunluk kriterlerine göre belirlenmiştir. Doz-yanıt analizleri, 100 g/gün başına GLV alımının, tüm nedenlere bağlı ölüm, koroner kalp hastalığı ve inme riskinde azalma (yaklaşık %25) ile ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır. GLV alımının yararlı etkileri, kardiyovasküler hastalık ve mesane ve ağız kanseri için bulunmuştur. Diyetle lutein alımı yaşa bağlı makula dejenerasyonu, yaşa bağlı katarakt, koroner kalp hastalığı, inme, özofagus kanseri, Hodgkin olmayan lenfoma, metabolik sendrom ve amiyotrofik lateral skleroz ile ters ilişkilidir (Li ve ark., 2021).

Lutein, daha çekici biyoaktivitesi antioksidan kapasitesi olan ksantofil ailesine ait bir karotenoid bileşiktir. Spinola ve Díaz-Santos (2020); bu karotenoid esas olarak sebze ve meyvelerde bulunur ve sarı renk tonundan sorumlu bir pigment olarak makula luteada bulunur. Lutein, hayvan dokularının pigmentasyonunda yaygın olarak bulunmasının yanı sıra önemli bir nutrasötik olarak kabul edilmekte ve gıdaların, ilaçların ve kozmetiklerin renklendirilmesinde kullanılmaktadır. Son zamanlarda luteinin yaşa bağlı makula dejenerasyonu, katarakt, kalp-damar hastalıkları ve bazı kanser türlerinin önlenmesinde etkili olduğu bulunmuş ve bu nedenle insan sağlığı açısından büyük ilgi görmüştür. Şu anda, endüstriyel ölçekte bir lutein üretimi için ana kaynak, kadife çiçeği oleoresindir. Lutein üreten mikroalglerle ilgili sürekli raporlar, bu organizmaların uygun bir alternatif haline gelip gelmeyeceği sorusunu gündeme getirmektedir. Aslında, birkaç mikroalg türü, örneğin *Scenedesmus almeriensis*, *Chlorella zofingiensis* veya *Muriellopsis sp.*, kadife çiçeği çeşitlerinin çoğundan daha yüksek lutein

içeriğine sahiptir ve m² bazında kadife çiçeği mahsullerinden çok daha fazla verim verdiği gösterilmiştir, bu da teknolojinin mevcut durumunda , mikroalgler kadife çiçeği veya diğer lutein üreticileriyle rekabet edebilmektedir. Luteinin nutrasötik olma potansiyeli ve mikroalglerden üretiminin yanı sıra insan sağlığı ile ilgili metabolik fonksiyonlardaki rolü bu bölümde gözden geçirilmektedir (Spinola ve Díaz-Santos, 2020).

Chen ve ark. (2019); hayvansal kaynaklı gıdalarda (domuz kası ve karaciğeri, balık, tavuk ve ördek kası ve yemleri (domuz, tavuk ve ördek) karaciğeri ve derisi dahil) tartrazin, lutein, kapsantin, kantaksantin ve β -karoten dahil pigmentlerin eş zamanlı tayini için HPLC yöntemi geliştirmiştir. Pigmentler gıda ve yem endüstrisinde halen yaygın olarak kullanılmaktadır ve gıdalarda bulunmaları yan etkileri nedeniyle insan sağlığına zararlı olabilmektedir. Lutein, capsanthin, canthaxanthin ve β -karoten, ultrasonikasyonla asetonitril-etil asetat ile ekstrakte edilmiştir ve tartrazin, suyla ekstrakte edilmiştir. Ardından n-heksan ile yağdan arındırma ve zayıf anyon değiştirme kartuşlarında katı faz ekstraksiyonu ile temizleme yapılmıştır. Beş pigmentin miktar tayini, ultraviyole ve görünür spektrofotometre tespiti ile HPLC metoduyla gerçekleştirilmiştir. Gradyan elüsyonlu bir C8 kolonu üzerinde kromatografik ayırmalar yapılmıştır. Analitlerin ortalama geri kazanımları %80.4 ile %92.5 arasında değişmektedir. Gün içi ve günler arası değişkenlik %15,0'in altındadır. HPLC yönteminin, hayvansal kaynaklı gıda ve yemlerdeki pigment kalıntılarının rutin olarak belirlenmesi için uygun olduğu ifade edilmiştir (Chen ve ark., 2019).

Wu ve ark. (2022); buğdaydaki karotenoidin ana bileşeni olan luteinin HPLC ile belirlenmesi için bir yöntem oluşturmuşlardır. Numuneler, aseton ve metanol (aseton : metanol 7 : 3, v/v, %0.1 BHT w/v) ile çözömlenmiştir ve metanol / asetonitril / n-heksan (7 : 2 : 1, v / v / v) karışık çözelti içinde tamamen çözölmüştür. Ayırma kolonu olarak Poroshell 120 EC-C18 kolonu (4,6 mm× 150 mm, 4 μ m), mobil faz olarak asetonitril, metanol ve n-heksan solösyonu gradyanlı elösyon ile kullanılmış, akış hızı 1,0 mL·dk⁻¹, kolon sıcaklık 25 °C, enjeksiyon hacmi 50 uL ve algılama dalga uzunluğu 450 nm'dir. Luteinin kütle konsantrasyonu, 0.5-5.0 μ g·mL⁻¹ aralığında kromatografik tepe alanı ile iyi bir doğrusal ilişkiye sahiptir. Korelasyon katsayılarının tümü 0,9998'den az değildir ve tespit limitleri 12 ng·mL⁻¹ dir. Örneklemede standart eklemenin geri kazanım oranı %95,50-%97,33 ve belirleme sonuçlarının bağıl standart sapmaları %1,20-%1,66 (n=5)'dir. Yöntem hassas, kesin, hızlı, doğru ve etkilidir. Bu çalışmanın avantajları aşğıdaki maddelerde özetlenebilir:

Buğdayda lutein tayini için kullanılabilir.

Algılama süresi kısadır.

Lutein için tespit limiti (LOD) ve ölçüm limiti (LOQ) $12 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ve $42 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 'dir (Wu ve ark., 2022).

Rahman ve Aeri (2022); üç farklı *Lactobacillus* türü (*L. rhamnosus*, *L. casei* spp. *casei* ve *L. plantarum*) kullanılarak incelenen katı hal fermantasyonu ile *C. officinalis* çiçeklerindeki lutein içeriğinin artırılmasını kontrol etmişlerdir. *Calendula officinalis* Linn, *Calendula* çiçeklerinin turuncu çeşidinde en yüksek miktarda lutein içermektedir. Gözü, göz retinasında UV ışınları ile ilişkili serbest radikallerden korumaktadır. İlgili mikroorganizmalar izole edilmiş ve *C. officinalis*'in taze ve kurutulmuş yaprakları üzerinde kuluçka makinesinde 10 gün mayalanmaya bırakılmıştır. Fermente edilmiş ve fermente edilmemiş taç yapraklar, heksan ekstraksiyon yöntemiyle ekstrakte edilmiş ve luteinin varlığı, ters fazlı bir C18 kolonu ve asetonyitril ve metanolden (40:60) 1.0 ml/dk akış hızı ve 446 nm'de UV tespiti ile oluşan bir mobil faz ile gradyan elüsyonu kullanılarak HPLC tekniği ile doğrulanmıştır. En yüksek lutein miktarı (9.92 mg/g), *Lactobacillus rhamnosus* ile fermente edilmiş kurutulmuş portakal çeşidi *Calendula* petallerinde bulunmuştur. Bununla birlikte, taze yapraklarının turuncu çeşidi, *Lactobacillus plantarum*'da en yüksek konsantrasyonu (40.66 mg/g) göstermiştir. Deney sonuçları, 1 kg taze yaprağının *Lactobacillus plantarum* tarafından fermente edilmiş %4.0 lutein içerdiği sonucuna ulaşılmış ve 1 kg kurutulmuş yaprağı, fermente edilmemiş ve ticari lutein ile karşılaştırıldığında *Lactobacillus rhamnosus* tarafından fermente edilmiş %0,99 oranında lutein içerdiği tespit edilmiştir. Fermente olmayan taze ve kurutulmuş portakal çiçekleri %1.1 ve %0.4 lutein içerir ve ticari lutein %0.2 içermektedir. Yukarıda belirtilen işlem, özütleme için çözücü olarak etanol kullanılarak da gerçekleştirilmiştir ve bu tatmin edici bir verim göstermiştir. 1 kg taze *Calendula* çiçeği, *Lactobacillus plantarum* tarafından fermente edilmiş %0.43 lutein içerir ve 1 kg kurutulmuş, *Lactobacillus rhamnosus* tarafından fermente edilmiş %0.52 lutein içermektedir (Rahman ve Aeri, 2022).

3. MATERYAL METOT

3.1 Kullanılan Kimyasallar

Analizlerde kullanılan kimyasal malzemeler ve çözücüler, Merck, Fluka, Sigma-Aldrich, Supelco ve Labsan firmalarından; kromatografik çalışmalarda kullanılan standartlar Sigma-Aldrich firmasından tedarik edilmiştir. Kullanım özelliklerine göre kromatografik veya analitik saflıktadır (**Çizelge 3.1.**). Kromatografik yöntemde kullanılan kolonların özellikleri **Çizelge 3. 2.**'de yer almaktadır.

Çizelge 3.1. Kullanılan Kimyasallar

Grafen Oksit Sentezi	Grafen Oksit -Silisyum (Si-GO) Eldesi
Grafit tozu	GO
H ₂ SO ₄	Saf Su
H ₃ PO ₄	Metanol
H ₂ O ₂	EDC (1-etil-3-(3-dimetil aminopropil) karbodiimid hidroklorid)
KMnO ₄	NHS (N-hidroksisüksinimid)
HCl	Aminopropil Silika (~9nm)
Metanol	
Si-GO-C18 eldesi	β- karoten/ Lutein Analizi
Si-GO	Metanol
Toluen	Asetonitril (ACN)
İmidazol	İzopropil Alkol (İPA)
Metanol (Met)	Beta-karoten
Diklorometan	Lutein
Aseton	Etanol
Klorodimetiloktadesilsilan	
Trimetilsilan(TMS)	

Çizelge 3.2. Kullanılan Kolonlar

HPLC
Si-GO Kolonu (250x4.6mm)
Si-GO-C18 Kolonu (250x4.6mm)

3.2 Kullanılan Cihazlar

β - karoten ve lutein ayrımı HPLC cihazında gerçekleştirilmeye çalışılmıştır. GO, Si-GO ve Si-GO-C18 eldesi ve fiziksel ve kimyasal karakterizasyon analizleri için kullanılan cihazların marka ve modelleri **Çizelge 3.3.**'de yer almaktadır.

Çizelge 3. 3 Kullanılan Cihazlar

Cihaz	Marka
HPLC (High Performance Liquid Chromatography)	Agilent 1220 Infinity II
UV-Vis Spektrofotometre	Shimadzu UV-1280
FTIR	Bruker Vertex 70
TEM	Jeol Jem 2100
SEM	ZEISS EVO LS10
Etüv	Nüve FN 4000
Ultrasonik Banyo	Bandelin Sonorex
pH metre	Hanna HI 2211
Dijital Manyetik karıştırıcı	Isotex
Analitik terazi	Radwag
Santrifüj Cihazı	Elektro-mag M815 M

3.3 Grafen oksit eldesi:

Grafen oksit, doğal grafitten modifiye edilmiş Hummers metodu kullanılarak hazırlanmıştır (Hummers Jr ve Offeman, 1958). 360:40ml H₂SO₄:o-H₃PO₄ karışımı bir behere alınarak üzerine saflaştırılmış 3g grafit tozu ilave edilmiş ve 1 saat boyunca karıştırılmıştır. Karışım üzerine soğuk buz altında 20 g KMnO₄ patlamayı engellemek için yavaş yavaş eklenmiştir (sıcaklık 27°C'nin üzerine çıkmamıştır). Elde edilen karışım 50°C'de 1 gün karıştırılmıştır. 5 ml %30'luk H₂O₂ 500 ml saf suda çözülerek buzdolabının buzluk kısmında 1 gün boyunca bekletilmiştir. Grafit tozu, H₂SO₄, H₃PO₄ ve KMnO₄ karışımı donmuş halde olan H₂O₂-Saf su karışımının üzerine damla damla ilave edilmiştir. Grafit tozlu karışımın tamamı peroksitli karışımın üzerine ilave eklendikten sonra 2 ml % 30'luk H₂O₂ daha eklenerek karışım 4000 devirde 20 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonunda elde edilen grafen oksit katısı önce 500 ml saf su daha sonra da 300 ml 1:10 oranında seyreltilmiş, HCl ile yıkanmıştır. Son olarak karışım pH'ı saf su ile aynı pH'ya gelene kadar suyla birkaç kez daha yıkanmıştır. Yıkama sonunda katı karışım 300 ml metanol de yıkanarak süzölmüş ve 110°C'de etüvde kurutulmuştur. Kurutma sonunda katı grafen oksit amberli bir şişeye alınarak saklanmıştır (Marcano ve ark., 2010; Kang ve Shin, 2012; Yu ve ark., 2013).

3.4 Grafen Oksit-Silisyum (Si-GO) Eldesi

400 mg GO uygun bir behere alınarak 100 ml saf suda dağıtılmış ve ultrasonik banyoda 3 saat boyunca sonike edilmiştir. Elde edilen karışıma 0,1M EDC ve 0,1M NHC ihtiva eden çözeltiden 15 ml ilave edilmiş ve 1 saat oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Elde edilen bu karışıma 10 g aminopropil silika ilave edilmiş ve 24 saat boyunca karıştırılmıştır. 24 saat sonunda karışım 15 dk 4000 devirde santrifüjlenerek 3 kez saf su ve 3 kez metanol ile yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen katı kısım 105°C’ de etüvde kurutmaya tabi tutulmuştur. (Mejía-Carmona ve Lanças, 2020).

3.5 Si-GO-C18 Eldesi:

1 g Si-GO üzerine 250 mL toluen ilave edilerek bir kaç dakika karıştırılmıştır. Karıştırma sonunda karışıma 400 µL toluende çözülmüş 5 mg imidazol ve 600 µL toluende çözülmüş 40 mg ODS ilave edilmiştir. Bu karışım, oda sıcaklığında 5 saat karıştırılmıştır. Karıştırma sonunda, katı madde (Si-GO-C18) 15 dk 4000 devirde santrifüjlenmiştir. Elde edilen katı sırasıyla toluen, metanol, metanol-su (1:1, v/v) ve metanol ile yıkanmıştır. Katı son olarak diklorometan ve aseton ile yıkandıktan sonra 40°C’ ta kurutulmuştur. Uçları tamamen kapatılmamış olan Si-GO fazının uçları 50 µL TMS ile tamamen kapatılmıştır (end-capping) (Mejía-Carmona ve Lanças, 2020).

3.6 Karakterizasyon

3.6.1 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopik Analizleri

FTIR taramaları, Bruker Vertex 70 FT-IR-ATR cihazı ile sentez ürünlerinin fonksiyonel gruplarını tayinini tespit etmek için yapılmıştır. ATR-FT-IR cihazında numune yada çözücü olmadan cihazın background ayarı yapılarak cihaz analize hazır hale getirilmiştir. Analizi gerçekleştirilecek numuneler ATR prop üzerine uygun miktarda eklenmiş ve 400-4000 cm⁻¹ aralığında FTIR taramaları yapılmıştır.

3.6.2 Uv-Visible spektrofotometrik analizleri

Shimadzu UV-1280 cihazında GO sentez maddesinin fonksiyonel gruplarını tespit etmek amacıyla spektrum taraması yapılmıştır. Tarama 200-800 nm aralığında %0.1’lik GO sulu karışımı ile gerçekleştirilmiştir.

3.6.3 Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) analizleri

Katı numunelerin Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) analizleri Jeol Jem 2100 cihazı kullanılarak yapılmış ve görüntüleri değerlendirilmiştir.

3.6.4 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizleri

Katı numunelerin taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri ZEISS marka (EVO LS 10 model) cihazı kullanılarak yapılmış ve GO, Si-GO ve Si-GO-C18'nin partikül boyutları ve görüntüleri değerlendirilmiştir.

3.7 Kolon Doldurma

Si-GO ve Si-GO-C18 sabit fazları LabAlliance- Model CP cihazı kullanılarak 250x4,6 mm ebatlardaki paslanmaz çelik boş HPLC kolonlarına sıvı doldurma tekniği ile yüksek basınç altında (5000 psi) doldurulmuştur. 2 g sabit faz 100 mL metanol ile bulamaç haline getirilerek doldurulmuştur. Doldurulan kolonlar metanol, su ve asetonyitril çözücülerini uzun süre yıkanmıştır. Çalışmaların yapılacağı süreye kadar doldurulan kolonlar metanolde saklanmıştır.

3.8 HPLC Analizleri

3.8.1 Si-GO kolonunda yapılan çalışmalar

Si-GO kolonu ile β -karoten ve lutein ayrımı için yapılan HPLC ön deneme çalışmalarında hareketli faz bileşimi ve akış hızı farklı 6 metot kullanılmıştır. Ön denemelerden elde edilen sonuçlar kullanılarak β -karoten ve lutein ayrımı için kemometrik dizayn yapılmıştır. Yapılan ön denemelere ait metotların parametreleri **Çizelge 3.4.** verilmiştir.

Çizelge 3.4. Si-GO kolonu ön deneme parametreleri

<i>İzokritik Ayırma</i>					
	Met- ACN (1:1) (%)	IPA (%)	Akış hızı (mL/min)	Dalga boyu (nm)	
Metot1	50	50	2	455	
Metot 2	60	40	1.5	455	
<i>Gradient Ayırma</i>					
Metot 3	Time (dk)	Met (%)	IPA (%)	Akış hızı (mL/min)	Dalga boyu (nm)
	0	100	0	1.5	455
	25	25	75	1.5	455
Metot 4	Time (dk)	Met-ACN (50:50) (%)	IPA (%)	Akış hızı (mL/min)	Dalga boyu (nm)
	0	100	0	1.5	455
	25	25	75	1.5	455
Metot 5	Time (dk)	ACN (%)	IPA (%)	Akış hızı (mL/min)	Dalga boyu (nm)
	0	100	0	1.5	455
	25	25	75	1.5	455
Metot 6	Time (dk)	Met- ACN (75:25) (%)	IPA (%)	Akış hızı (mL/min)	Dalga boyu (nm)
	0	100	0	1.5	455
	25	25	75	1.5	455

Kemometrik tasarımda hareketli faz olarak iki faz kullanılmıştır. Birinci hareketli faz (mobil faz A) metanol ve asetonitril (1:1) karışımıyken ikinci hareketli faz (mobil faz B) izopropil alkoldür. Mobil faz A ve mobil faz B karışım oranları kemometrik tasarımda değiştirilmiştir. Çizelge 3.5’de mobil faz B (IPA) yüzdesi verilmiştir. Metanol ve asetonitril karışımının oranı sabit olup 1:1’dir.

Çizelge 3.5. Si-GO kolonu design expert tasarımı

Run	IPA(%)	Akış Hızı (mL/min)	Sıcaklık (°C)
1	40	2,07272	28
2	55	1,4	28
3	55	1,8	33
4	40	1,4	28
5	40	1,4	28
6	55	1	23
7	40	1,4	28
8	40	1,4	19,591
9	40	1,4	28
10	25	1	23
11	14,7731	1,4	28
12	55	1	33
13	40	1,4	28
14	25	1,8	33
15	40	1,4	28
16	65,2269	1,4	28
17	55	1,8	23
18	40	0,727283	28
19	25	1	33
20	40	1,4	36,409
21	40	1,4	28

3.8.2 Si-GO-C18 kolonunda yapılan çalışmalar

Si-GO-C18 kolonu ile β -karoten ve lutein ayrımı için yapılan HPLC çalışmalarında hareketli faz bileşimi ve akış hızı farklı hem izokritik hem de gradient metotlar geliştirilerek denemeler yapılmıştır. Gerçekleştirilen izokritik ve gradient kromatografik metotlara ait parametreler Çizelge 3.6 verilmiştir.

Çizelge 3.6 İzokritik ve gradient metot parametreleri

İzokritik Ayırma					
	Met (%)	ACN (%)		Akış hızı (mL/min)	Dalga boyu (nm)
Metot 1	100	0		1,25	455
Metot 2	50	50		1.25	455
Metot 3	60	40		1.25	455
Metot 4	40	60		1,25	455
Metot 5	25	75		1,25	455
Gradient Ayırma					
Metot 6	Time (dk)	Met (%)	ACN (%)	Akış hızı (mL/min)	Dalga boyu (nm)
	0	100	0	1,25	455
	15	0	100	1.25	455
	25	0	100	1.25	455
Metot 7	Time (dk)	Met (%)	ACN (%)	Akış hızı (mL/min)	Dalga boyu (nm)
	0	100	0	1,25	455
	5	100	0	1.25	455
	15	0	100	1.25	455
	25	0	100	1.25	455

3.8.3 Beta-karoten lutein analizi

Gerçek numune analizleri için 50 gr domates ve havuç kabukları soyulup rendelenerek hazırlanmıştır. Üzerine 50 mL hexan, 25 mL aseton, 25 mL etenol eklenip karıştırılmıştır. Posalarından ayrılan çözelti, süzme işlemi yapılarak ayırma hunisine eklenmiş ve üzerine 15 mL etanol ilave edilmiştir. Ayırma hunisinde oluşan faz farkı sayesinde alt faz ve üst faz ayrılıp tüplere konularak folyo ile sarılmıştır. Elde edilen bu numuneler kullanılarak domates ve havuçta bulunan β -karoten ve lutein hem Si-GO hem de Si-GO-C18 kolonlarında ayrılarak miktarları tayin edilmiştir (Barba ve ark., 2006).



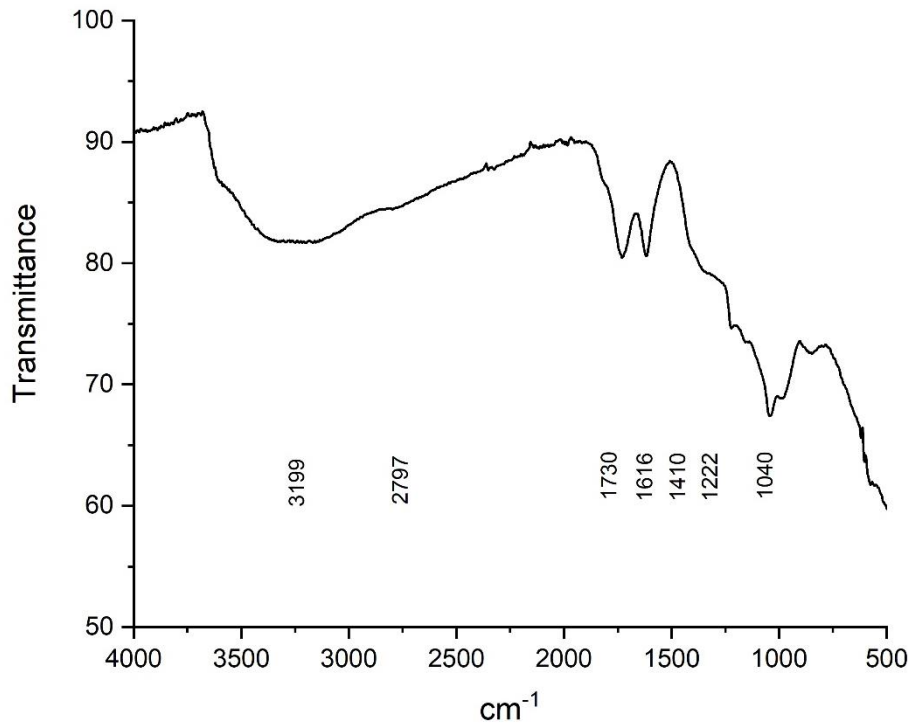
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1 Sabit Faz Karakterizasyonu

4.1.1 Grafen oksit

4.1.1.1 FTIR analizleri

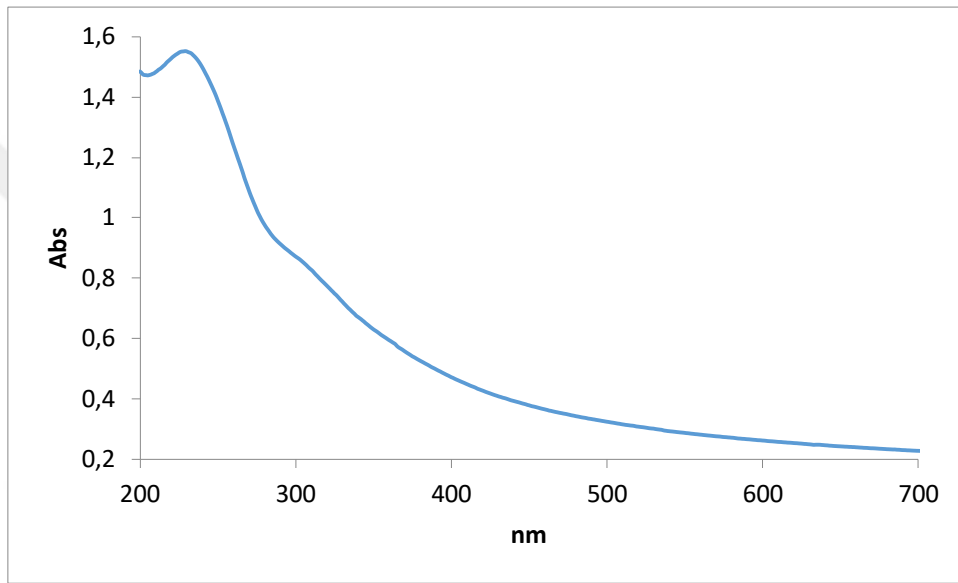
Modifiye Hummers metodu kullanılarak elde edilen GO için elde edilen FTIR spektrumu **Şekil 4.1.**'de yer almaktadır. Spektrum incelendiğinde molekülde bulunan farklı fonksiyonel gruplara ait titreşim frekans pikleri görülmektedir. GO molekülünde bulunan ve hidrofiliklik veren -OH gruplarına ait geniş pik 3000-3500 cm^{-1} arasında gözlemlenmiştir. 1616 cm^{-1} görülen pik düzlem içi sp^2 hibriti C=C grubuna aitken COOH ve C=O gruplarının gerilme titreşimleri 1730 cm^{-1} 'de pik vermiştir. Ayrıca epoksit (C-O-C) pikleri 1222 ve 1320 cm^{-1} 'de görülmüştür. CH_2 'nin 2797 cm^{-1} 'deki absorpsiyon piki CH_2 'nin gerilme titreşimi olarak değerlendirilmiştir. Yapıdaki çeşitli oksijen konfigürasyonları arasında epoksit (C-O-C), karboksil (COOH), karbonil türler (C=O) ve hidroksil (OH) fonksiyonel gruplarının oksitlendiğini açık bir şekilde göstermektedir (Guo ve ark, 2009; ; Shahriary ve Athawale, 2014; Ramezanzadeh ve ark., 2016 Çınar, 2023).



Şekil 4.1. GO FTIR analizi

4.1.1.2 Uv-Visible spektrofotometrik analizler

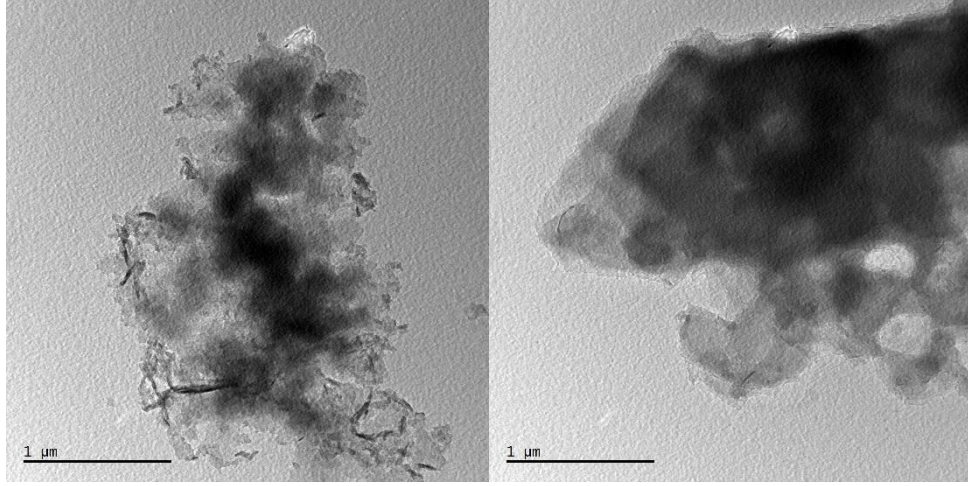
GO`in suda dağıtılarak elde edilen karışıma ait Uv-Visible spektrum **Şekil 4.2`de** verilmiştir. Spektrum incelendiğinde 230 nm`de görülen pik  $\pi$ - $\pi^*$  geçişine aittir. Bu aromatik C=C bağlarına atfedilmektedir. Ayrıca 300 nm`deki küçük omuz da n- π^* geçişini göstermektedir ve C=O bağlarına atfedilmektedir. Hem 230 nm`deki hem de 300 nm`deki pikler yapının fazlaca oksidasyona uğratıldığı ve iki boyutlu düzlemde aromatik halkaların konjugasyonlu bir GO molekülü elde edildiğini göstermektedir (Marcano ve ark., 2010; Shahriary ve Athawale, 2014; Çınar, 2023).



Şekil 4.2. GO Uv-Visible analizi (Çınar, 2023)

4.1.1.3 TEM analizleri

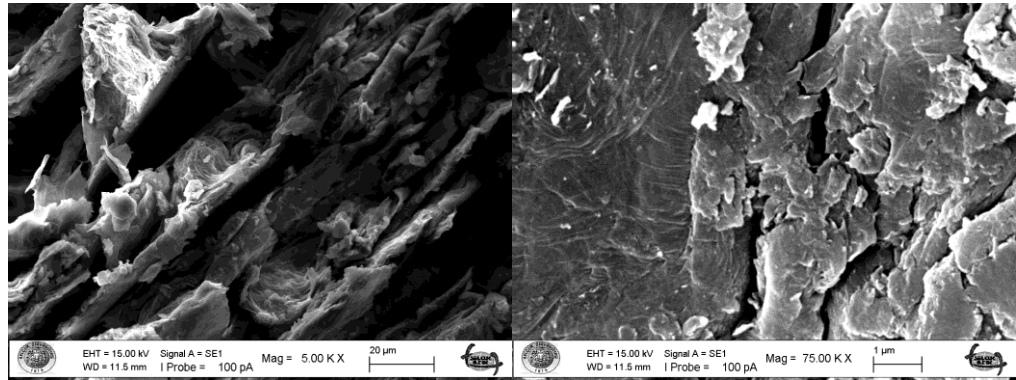
Sentezlenen grafen oksitin morfolojik özelliklerine ilişkin yüzey çalışmaları **Şekil 4.3.`de** gösterildiği gibi TEM mikrografı ile incelenmiştir. Malzemenin toz halinde üretilmesi nedeniyle numunelerin birden fazla katmana sahip olduğu görüntülerde net bir şekilde görülmektedir. TEM görüntüsü, malzemenin yüksek enerji ışını altında stabil olmadığını gösteren yarı şeffaf bir şekilde ortaya çıkmıştır. Grafen oksitin morfolojisi; kalın düz pul tabakaları, pürüzlü yüzey, buruşmamış ve düzensiz parçacık boyutuna sahip bir şekildedir. Düzensiz ve kırışksız yapı, oksijen atomlarından ve oksidasyon işlemi sırasında yüksek derecede pul pul dökülmesinden kaynaklanmaktadır (Aziz ve ark., 2014; Çınar 2023).



Şekil 4.3. GO TEM analizi

4.1.1.4 SEM analizleri

Sentezlenen GO'ye ait SEM görüntüsü Şekil 4.4.'de verilmiştir. SEM görüntüleri GO'nun belirgin bir şekilde agreste olduğu, ince ve oldukça üst üste binen tabakalardan oluşan düzensiz bir katı olduğunu ortaya çıkarmıştır. GO'nun buruşuk ve katmanlı yapıları, oksijen içeren fonksiyonel gruplar arasındaki etkileşimlerden dolayı ortaya çıkmaktadır. Filmler zaman zaman katlanmış veya sürekli ve bükülmüş ve kırılmış alanları, bireysel tabakaların kenarları ayırt edilmektedir (Shahriary ve Athawale, 2014). Ayrıca GO ait SEM ve TEM görüntüleri birbirini desteklemektedir.

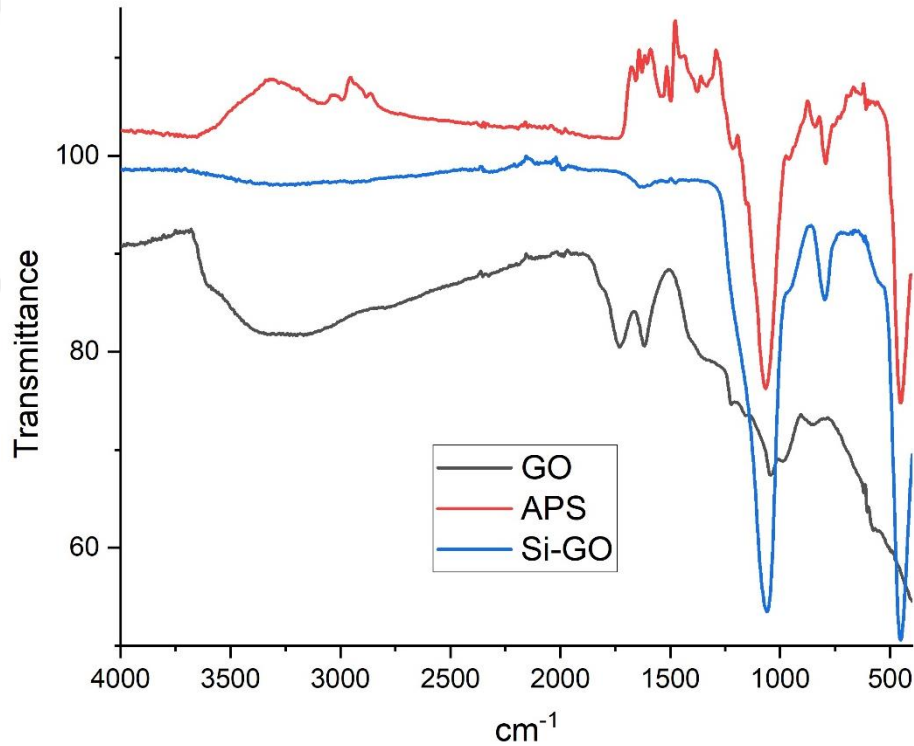


Şekil 4.4. GO SEM analizi

4.1.2 Si-GO karakterizasyonu

4.1.2.1 FTIR analizleri

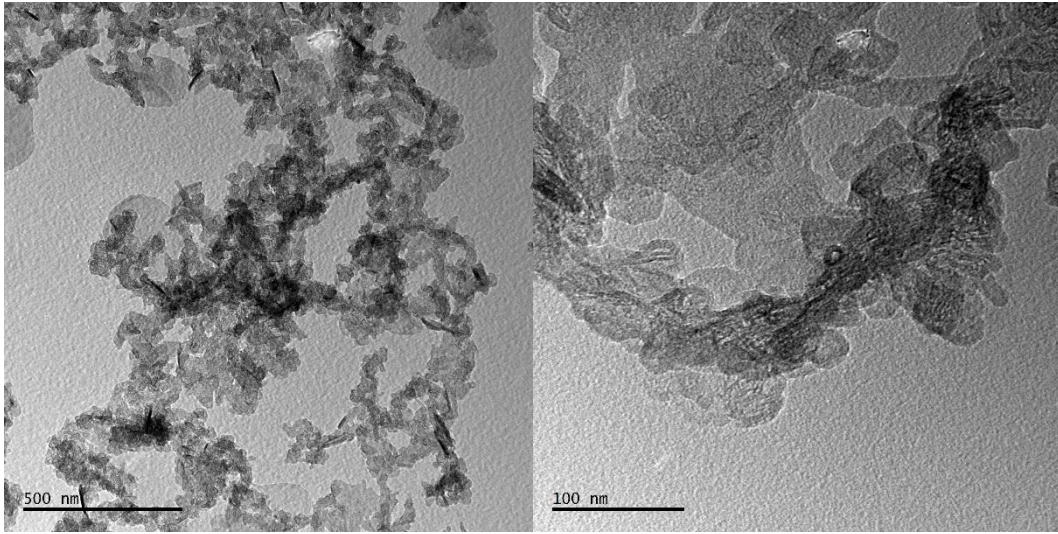
FTIR analizinden elde edilen spektrum **Şekil 4.5.**'de verilmiştir. Spektrumlar incelendiğinde Si-GO ait gerilme titreşimleri 1050 cm^{-1} civarında büyük bir pik vermiştir. GO spektrumunda bulunan 1730 cm^{-1} 'deki -COOH ve C=O gruplarının gerilme titreşimleri ile 1222 ve 1320 cm^{-1} 'deki epoksit (C-O-C) piklerinin bir kısmı Si-GO spektrumunda görülmemektedir. Bunun yanı sıra APS spektrumunda bulunan 3652 cm^{-1} 'deki NH_2 piki de Si-GO spektrumunda bulunmamaktadır. Hem GO hem de APS'de bulunan bu piklerin kaybolup Si-GO spektrumunda bulunan 1124 cm^{-1} 'te pikin Si-O-C oluşumu ve 1540 ile 1624 cm^{-1} piklerinin -COOH ve -NH_2 gruplarının reaksiyonu sonucu oluşan peptit bağına ait olduğu düşünülmektedir (Ramezanzadeh ve ark, 2016).



Şekil 4.5. Si-GO FTIR analizi

4.1.2.2 TEM analizleri

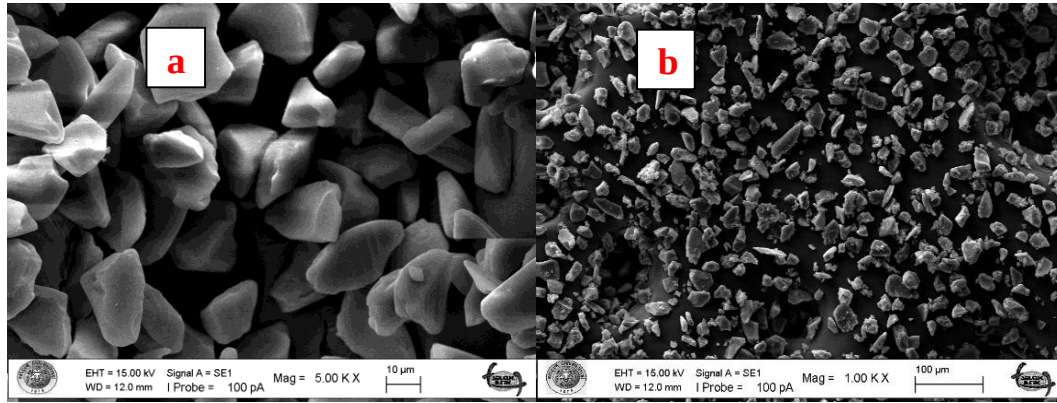
Yapılan TEM analizine ait görüntüler **Şekil 4.6.** 'de yer almaktadır. TEM görüntüleri incelendiğinde saf APS'deki silika yüzeyi üzerine immobilize edilen GO'nin iki boyutlu levhalarının heterojen bir şekilde pürüzlü ve buruşuk bir biçimde kaplandığı anlaşılmaktadır.



Şekil 4.6. Si-GO TEM analizi

4.1.2.3 SEM analizleri

APS ve Si-GO ait yapılan SEM analizinin görüntüleri Şekil 4.7.'de yer almaktadır. Saf APS partikülleri ile GO ile kaplanmış partiküllerin görüntüleri incelendiğinde, GO moleküllerinin tüm APS partikülleri üzerine kimyasal bağ ile immobilize edildiği net bir şekilde görülmektedir. Hem TEM hem de SEM görüntüleri immobilizasyonun gerçekleştiğini doğrulamaktadırlar.



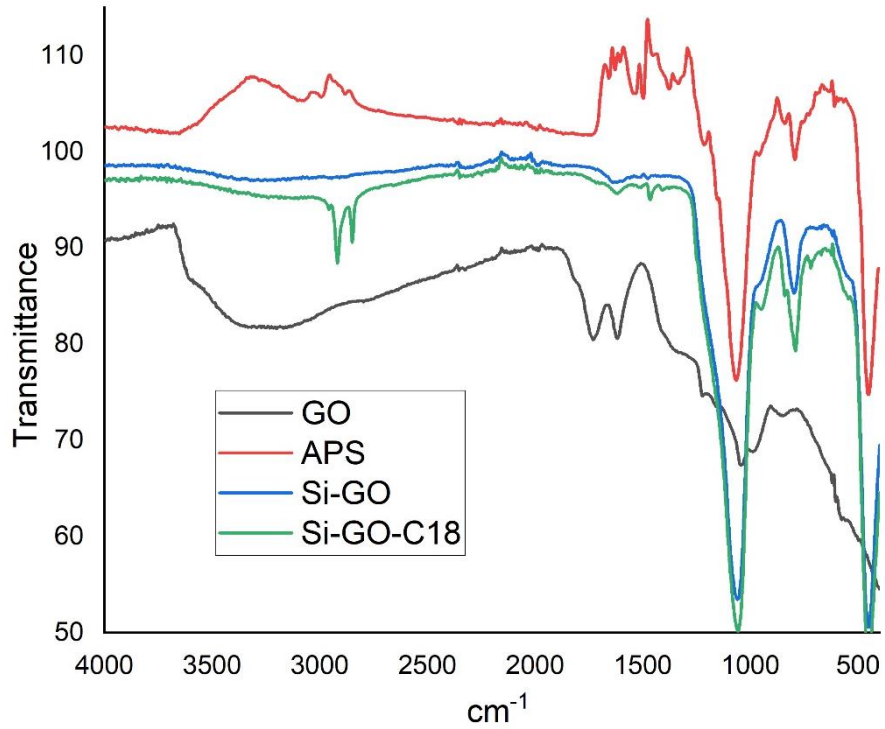
Şekil 4.7. a) APS b) Si-GO SEM görüntüleri

4.1.3 Si-GO-C18 karakterizasyonu

4.1.3.1 FTIR analizleri

FTIR analizinden elde edilen spektrum Şekil 4.8.'da verilmiştir. FTIR spektrumları incelendiğinde 799 cm^{-1} 'de Si-H bükülmesine, 1050 cm^{-1} 'de Si-O

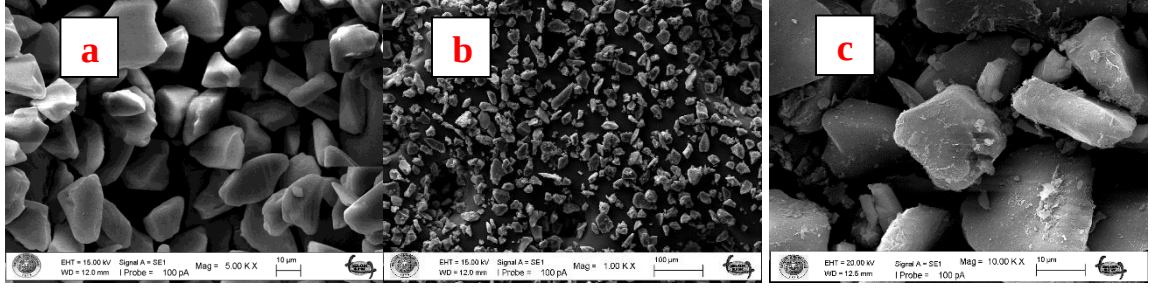
gerilmesine ve 3260 cm^{-1} 'de O-H gerilmesine karşılık gelen karakteristik bantlar gözlenmiştir. Amit gruplarının karbonil gerilme karakteristiğine karşılık gelen 1630 cm^{-1} 'de doğrulayıcı bir bant ile bu Si'den gelen amin grubu ile GO tabakalarının karboksil grubu arasında bir peptit bağının oluştuğunu göstermektedir. Si-GO-C18 spektrumunda 2917 cm^{-1} ve 2849 cm^{-1} 'deki iki dar bandın görünümü, metilen ($-\text{CH}_2-$) gruplarının asimetrik CH uzantılarına atfedilir. Bu, C18'in Si-GO parçacıklarına bağlanmasının meydana geldiğini gösterir (Mejía-Carmona ve Lanças, 2020).



Şekil 4.8. Si-GO-C18 FTIR analizi

4.1.3.2 SEM analizleri

APS, Si-GO ve Si-GO-C18'e ait yapılan SEM görüntüleri Şekil 4.9.'de yer almaktadır. Saf APS, GO ile kaplanmış Si-GO ve Si-GO-C18 partiküllerin görüntüleri incelendiğinde, C18 moleküllerinin Si-GO partikülleri üzerine bağlandığı net bir şekilde görülmektedir.



Şekil 4.9. a) APS b) Si-GO c) Si-GO-C18 SEM görüntüleri

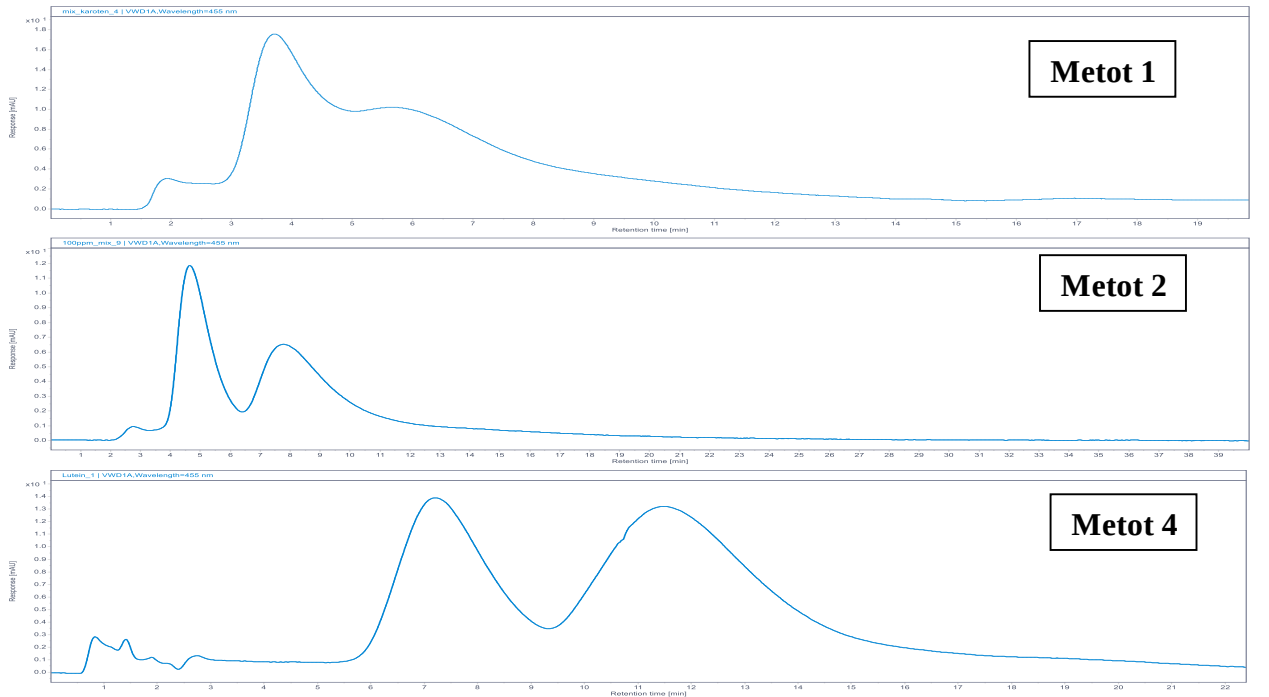
4.2 HPLC Analizleri

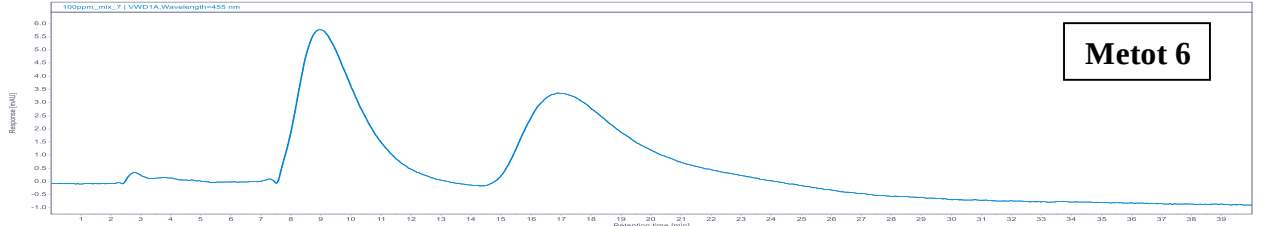
4.2.1 Si-GO kolonunda yapılan çalışmalar

Si-GO kolonu ile yapılan ön çalışmalarda 6 ayrı metot kullanılmış ve bu metotların kromatografik verim hesaplamalarına ait sonuçlar Çizelge 4.1.'de, bu metotlara ait bazı kromatogramlar Şekil 4.10.'de yer almaktadır.

Çizelge 4.1. Si-GO kolonu analiz metotları kromatografik verim sonuçları

	k'	Rs	N-A	N-B	N-ORT	TF-A	TF-B
Metot1	0,86	0,61	34,20	34,29	34,245	1,42	3,84
Metot2	0,69	1,12	93,06	74,51	83,785	1,74	1,61
Metot3	3,33	1,25	72,45	112,70	92,575	1,36	1,57
Metot4	1,62	1,14	92,72	102,33	97,525	1,41	1,27
Metot5	3,26	0,42	396,11	135,843	265,9765	0,63	3,13
Metot6	2,27	1,61	101,25	115,43	108,34	1,73	2,21



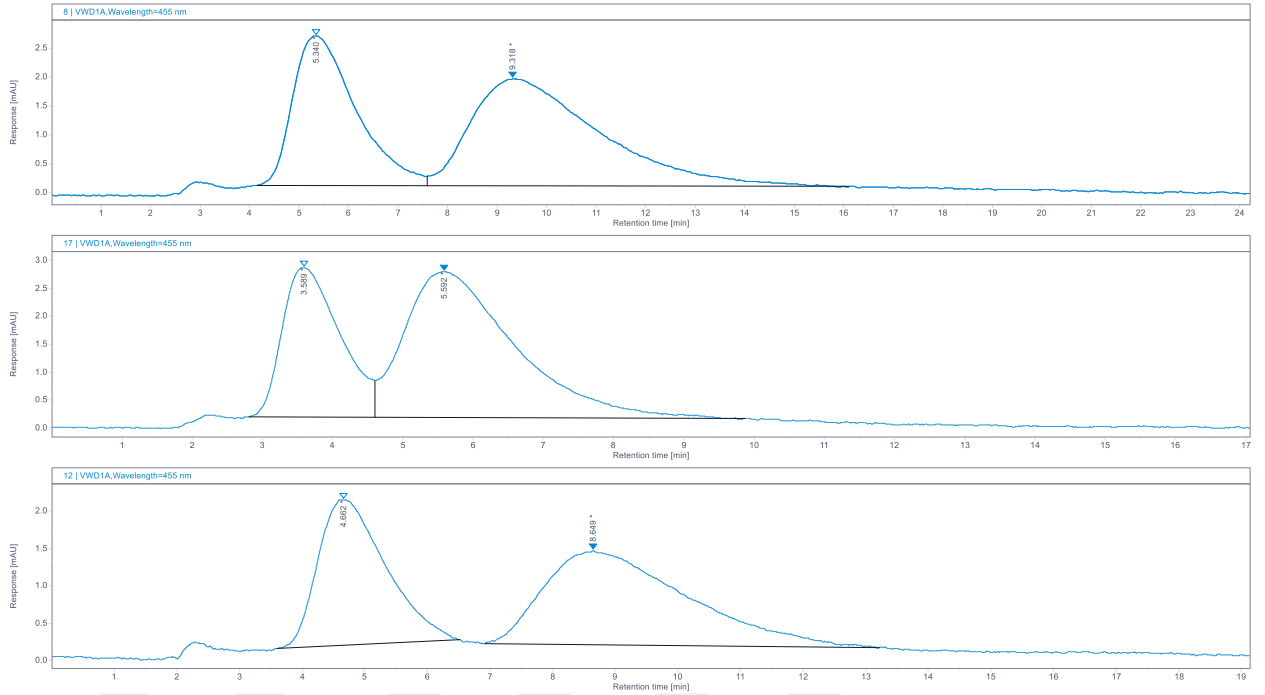


Şekil 4.10. Si-GO kolonu ön çalışma metotlarına ait bazı kromatogramlar

Ön deneme için geliştirilen metotların kromatografik verim hesap sonuçları ve kromatogramlardan da görüleceği üzere metotların β -karoten ve lutein ayrımı için yetersiz olduğu sonucuna varılmıştır. Bu nedenle daha iyi ayrım için kemometrik dizayn yapılmış ve 21 farklı metot parametresi belirlenmiştir. Bu parametrelerde ayrımlar gerçekleştirilmiştir. Kromatografik parametreler ve ayrımlar sonucunda elde edilen veriler vasıtasıyla hesap edilen N ve Rs gibi kromatografik verimlere ait sonuçlar **Çizelge 4.2.** ve bazı metotlara ait kromatogramlar **Şekil 4.11.**'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Si-GO kolonu kemometrik dizayn kromatografik verim sonuçları

Run	IPA(%)	Akış Hızı (mL/min)	Sıcaklık (°C)	Rs	N
1	40	2,07272	28	1,03	80,935
2	55	1,4	28	0,79	102,545
3	55	1,8	33	0,74	82,96
4	40	1,4	28	1,07	90,112
5	40	1,4	28	1,07	88,731
6	55	1	23	0,97	82,88
7	40	1,4	28	1,08	90,59
8	40	1,4	19,591	1,16	76,625
9	40	1,4	28	1,09	88,795
10	25	1	23	1,42	88,93
11	14,7731	1,4	28	1,41	77,15
12	55	1	33	1,31	78,64
13	40	1,4	28	1,10	87,58
14	25	1,8	33	1,08	80,755
15	40	1,4	28	1,08	89,85
16	65,2269	1,4	28	0,79	81,915
17	55	1,8	23	0,93	74,9
18	40	0,727283	28	1,13	100,605
19	25	1	33	1,21	97,575
20	40	1,4	36,409	0,90	96,025
21	40	1,4	28	1,08	88,375



Şekil 4.11. Kemometrik dizayn ile yapılan bazı metotlara ait kromatogramlar

Geleneksel 'adım adım' veya 'bir seferde tek değişken' yaklaşımları yüksek analiz maliyetine sahiptir ve çok sayıda deney ve zaman gerektirirken, kemometrik yaklaşım deneysel koşullara bağlı olarak analiz maliyetini, zamanı ve deney sayısını azaltır. Çünkü kemometri en kısa sürede en az sayıda çalışma ile en doğru sonucu bulmak için kullanılmaktadır. Bu yöntemle su, ilaç ve gıda gibi farklı kimyasal türler için uygun yöntem geliştirilmesi ve optimizasyonu için sıklıkla kullanılmaktadır. Kromatografik sistemler için faktöriyel, merkezi kompozit, Box-Behnken, Doehlert ve karışık gibi farklı kemometrik teknikler mevcuttur. Kemometrik tekniklerde en sık kullanılan araçlardan biri olan merkezi kompozit tasarım (CCD), geleneksel yaklaşımlara göre daha az sayıda deneyle ölçülen yanıtlar vasıtasıyla her bir değişken arasındaki ilişkiler hakkında bilgi verir (Sivakumar ve ark, 2007; Topkafa ve ark, 2016). Yapılan kemometrik tasarımda hareketli faz, akış hızı ve sıcaklık parametreleri faktör olarak seçilmiştir. Tasarımda kullanılan hareketli faz olarak iki faz kullanılmıştır ve birinci hareketli faz (mobil faz A) metanol ve asetonitril (1:1) karışımıyken ikinci hareketli faz (mobil faz B) izopropil alkoldür. Hareketli faz bileşimi olarak mobil faz B karışım oranı kemometrik tasarımda verilmiştir. Tasarımda hareketli faz için %İPA 14,77-65,23 arasında, akış hızı 0,73-2,07 mL/dk ve sıcaklık 19,59-36,41°C aralığındadır. Bu değişkenlerin yanında yapılan ayırmalar sonunda elde edilen veriler vasıtasıyla kromatografik verim parametreleri olan ayırma gücü (R_s) ve ortalama tabaka sayısı (N) değerleri hesap edilmiş ve cevap değeri olarak kullanılmıştır. Yapılan ayırma işlemleri sonunda elde edilen veriler Design Expert

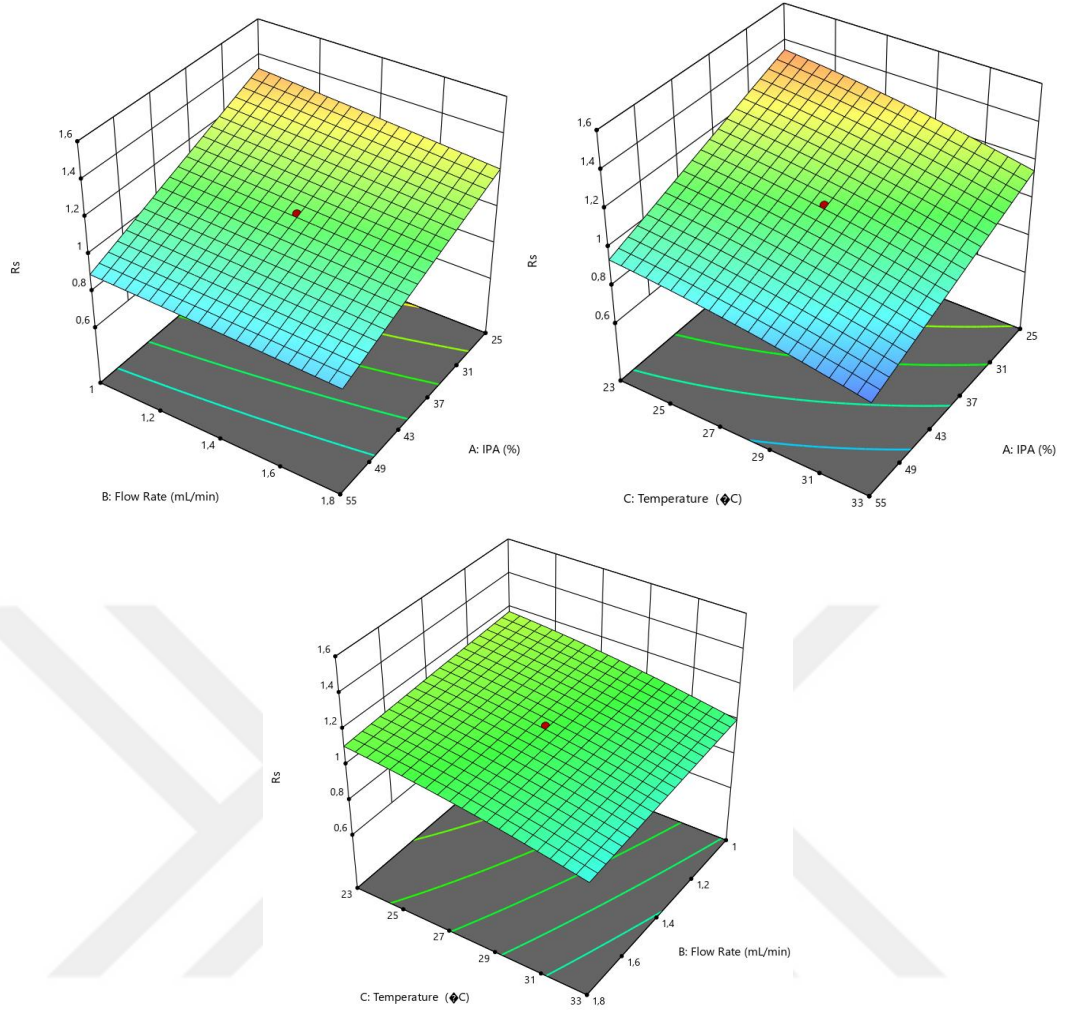
yazılım programında işlenerek en uygun modelin tespiti için kullanılmıştır. Regresyon modeline ait sabitler aşağıda verilmiştir.

Çizelge 4.3. Regresyon model sabitleri

	Sabit	A	B	C	AB	AC	BC	A ²	B ²	C ²
Rs	1,081	-0,196	-0,037	-0,090	0,018	0,009	-0,003	-0,001	-0,002	-0,020
p-değerleri		< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0,0172	0,2030	0,6169	0,8981	0,7043	0,0014
N	89,22	-0,989	-6,426	5,202	-0,056	2,121	-2,267	-4,849	1,112	-0,451
p- değerleri		0,1143	< 0.0001	< 0.0001	0,9425	0,0169	0,0119	< 0.0001	0,0683	0,4299

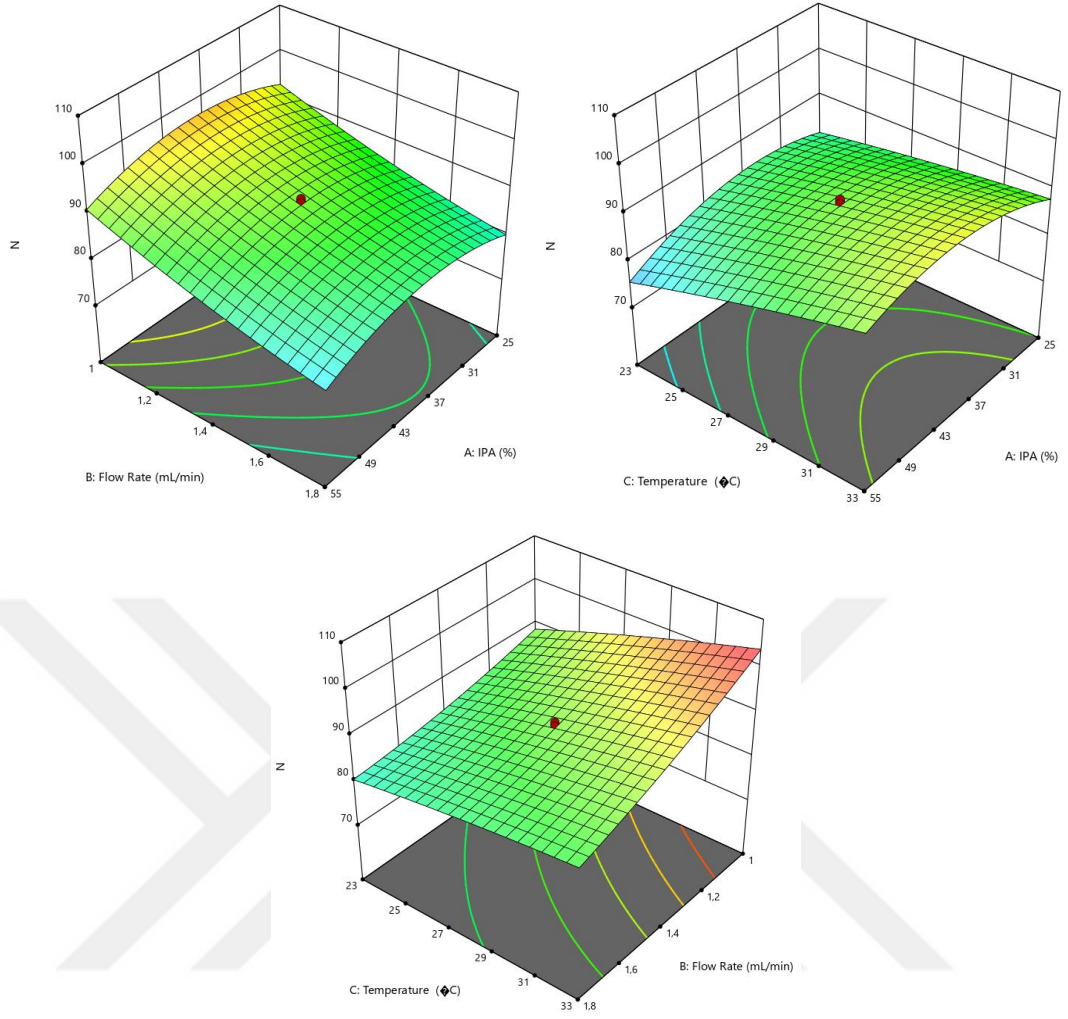
Design Expert yazılımı aynı zamanda bir istatistik programı olduğundan modele ait ANOVA sonuçları da hesap edilmiştir. Buna göre Rs ve N için kabul edilebilir R² değerleri 0,9943 ve 0,9657, düzeltilmiş R² değerleri 0,9651 ve 0,9376 olarak hesaplanmıştır. Kabul edilebilir ve düzeltilmiş R² sonuçları modelin kuadratik modele uygun olduğunu göstermiştir. Modelin P değerleri 0.0001'den küçük olduğundan hem faktörlerin hem de değişkenlerin yanıtlara (Rs ve N) etkisinin önemli olduğu görülmüştür (Li ve ark., 2011; Topkafa ve ark., 2016). Kromatografik parametrelerin β -karoten ve lutein ayırımına etkileri istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur.

Merkezi kompozit tasarım kullanılarak yapılan dizayn sonucunda kuadratik modelin uygun olduğu görülmüştür. Kuadratik modele göre Rs ve N için üç boyutlu (3D) cevap yüzey modellemesi (RSM) grafikleri çizilmiştir. Rs cevap değeri kullanılarak çizilen üç boyutlu grafikler **Şekil 4.12.**'de verilmiştir. Ayırma gücüne; IPA %'si, akış hızı ve sıcaklığın çok fazla etki ettiği grafikler incelendiğinde görülmektedir.



Şekil 4.12. Rs için yüzeyi grafikleri

N cevap değeri kullanılarak çizilen üç boyutlu grafikler Şekil 4.13.'de verilmiştir. Tabaka sayısına; IPA %'si, akış hızı ve sıcaklığın çok fazla etki ettiği grafikler incelendiğinde görülmektedir.



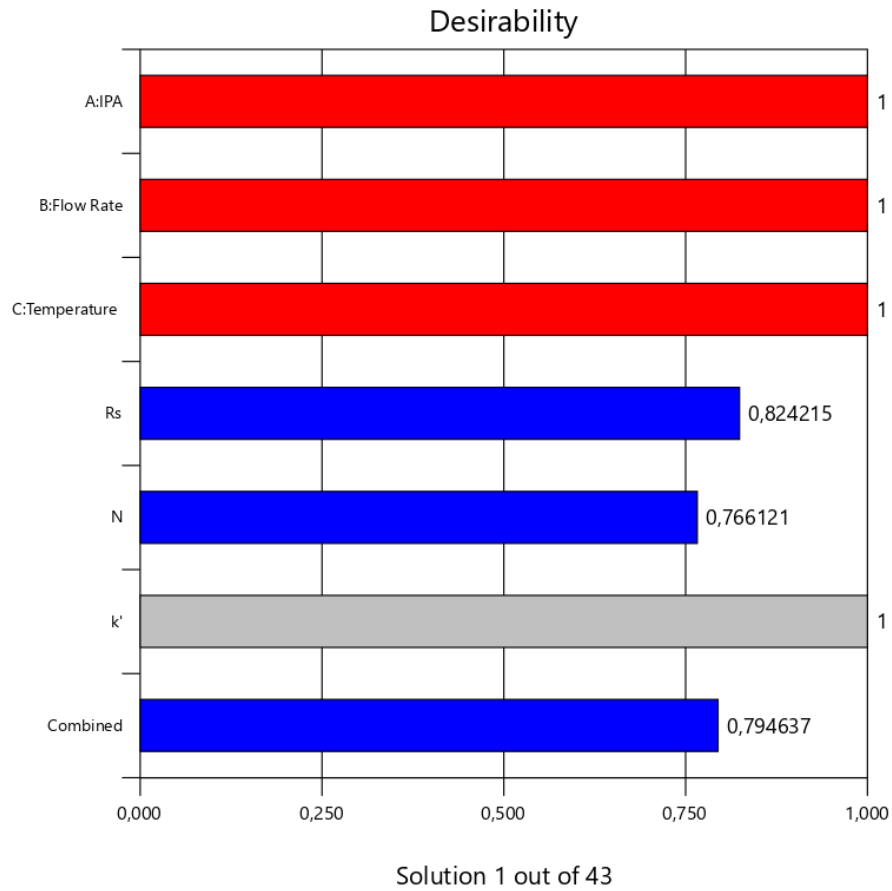
Şekil 4.13. Üç boyutlu yanıt yüzeyi grafikleri

Kromatografik yöntemlerin temel amacı en kısa sürede en iyi ayırmayı yapmaktır. Bu amaç doğrultusunda geliştirilecek HPLC yöntemlerinin optimizasyonunda belirlenecek parametreler genel olarak mobil faz bileşimi, akış hızı ve sıcaklıktır. Kromatografik yöntemlerin kemometrik dizayn kullanılarak yapılan optimizasyonunda da bu parametreler değişkenler olarak belirlenir ve bu parametreleri dikkate alarak deneyler gerçekleştirilir. Elde edilen veriler yardımıyla en uygun yöntemin tespiti gerçekleştirilir. Tespit sırasında dizayn programının arzu edilebilirlik fonksiyonu (D) kullanılmaktadır. Arzu edilebilirlik fonksiyonu en uygun kromatografik metodu için araştırmacıya mobil faz bileşimi, akış hızı ve sıcaklık değerlerini tahmin eder. Arzu edilebilirlik fonksiyonu her bir parametre için 0-1 arasında bir değerdir. Kromatografik yöntemin belirlenmesinde mobil faz bileşimi, akış hızı ve sıcaklık değerleri için hedef değer 1 olarak seçilmiştir. Optimizasyon için belirlenen alt-üst değerler **Çizelge 4.4.**'de

verilmiştir. β -karoten ve lutein için ayırma gücü ve tabaka sayısı değerlerinin maksimum olduğu değerler hedef değer olarak belirlenmiştir. Bu kapsamda en iyi ayırma için Rs 1,42 terik tabaka sayısı 102,55 olarak tespit edilmiştir. Kemometrik dizay sonunda program tarafından tespit edilen arzu edilebilirlik grafiği **Şekil 4.14.**'de gösterilmiştir. Arzu edilebilirlik fonksiyonuna göre, optimum parametreler; IPA mobil faz bileşimi %25, akış hızı 1,8 mL/dak ve sıcaklık 30°C olarak belirlenmiştir. Sonraki çalışmalarda bu parametreler kullanılmıştır.

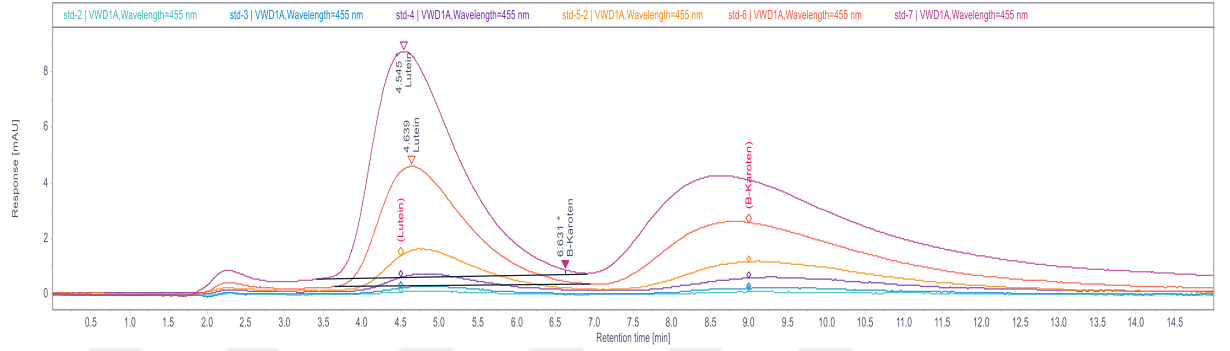
Çizelge 4.4. Optimum deneysel koşullar için optimizasyon kriterleri

	Hedef	Alt Limit	Üst Limit
A:IPA %		25	55
B:Akış hızı		1	1,8
C:Sıcaklık		23	33
Rs	Maksimum	0,74	1,42
N	Maksimum	70,67	102,55



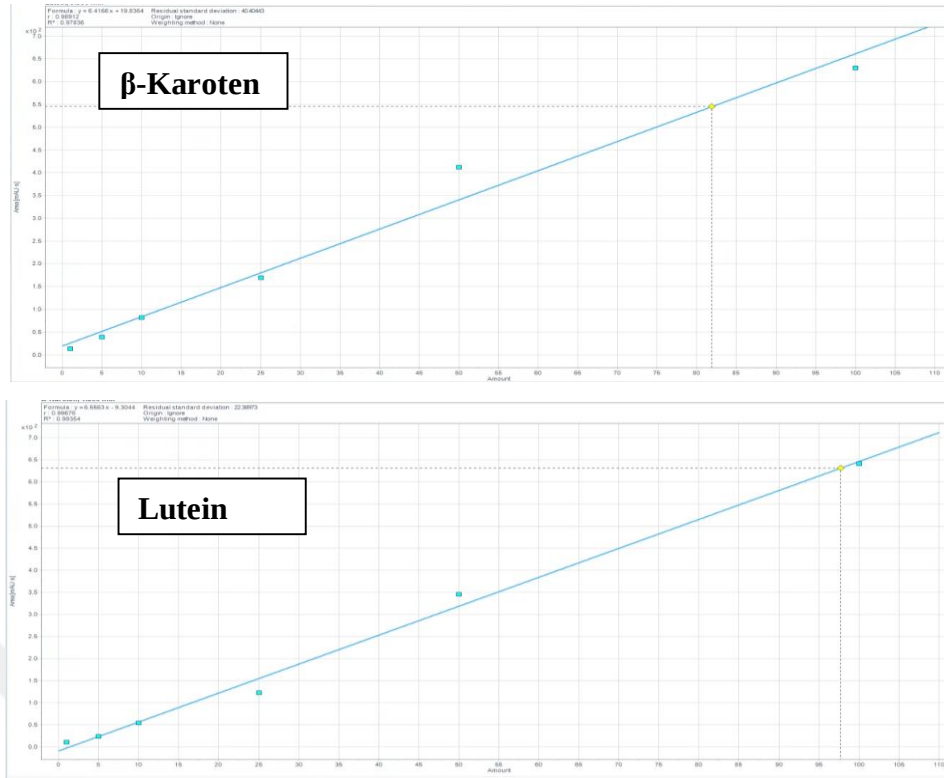
Şekil 4.14. Arzu edilebilirlik grafiği

β -karoten ve lutein ayrımı için belirlenen kromatografik deney koşullarında hem standartlar hem de gerçek numuneler üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Standartlar kullanılarak yapılan çalışmalarda iki türün tam olarak ayrıldığı gözlenmiş ve farklı derişimlerdeki (1-100 mg/L) standartlar HPLC sistemine enjekte edilerek **Şekil 4.15.**'da görülen standartlara ait kromatogramlar elde edilmiştir.



Şekil 4.15. Geliştirilen metot için mix standartlara ait kromatogram

β -karoten ve lutein ayrımı için geliştirilen HPLC metodunun validasyonu uygunluk, doğrusallık, doğruluk ve hassasiyet kriterleri dikkate alınarak yapılmıştır. Bu kapsamda Si-GO kolonunda yapılan analizler 20 dakikada gerçekleştirilmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki β -karoten ve lutein standartlarından elde edilen kalibrasyon grafikleri **Şekil 4.16**'de verilmiştir. Elde edilen grafiklerin R^2 'leri 0,9935 ve 0,9784 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.16. β-karoten ve lutein için kalibrasyon grafikleri

Geliştirilen metodun hassasiyeti için 25 mg/L konsantrasyona β-karoten ve lutein standartlarının 6 kez enjeksiyonu yapılarak her bir standart için pik alanları vasıtasıyla bağıl standart sapmaları (% RSD) hesaplanmıştır. β-karoten ve lutein için bağıl standart sapma değerleri 3,40 ve 2,76 olarak bulunmuştur. Metodun geri kazanım testleri yapılarak β-karoten ve lutein için geri kazanım değerleri %90-%93 olarak bulunmuştur. β-karoten ve lutein için tayin sınır (LOD) ve tayin limiti (LOQ) sırasıyla 0,27-0,34 mg/L ve 0,09-0,11 mg/L olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.5. Validasyon değerleri

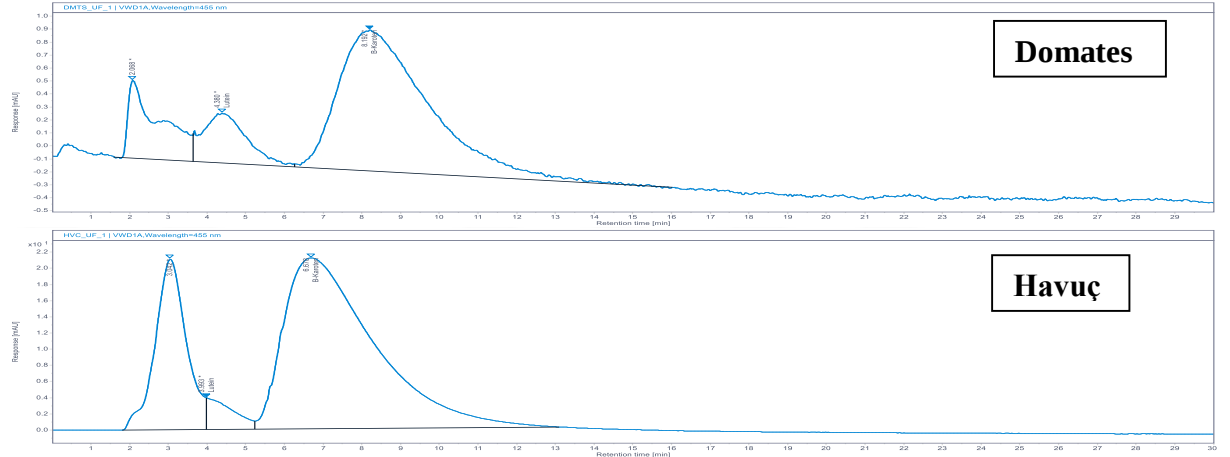
	β-Karoten	Lutein
%RSD	3,40	2,76
% Geri Kazanım	90	93
LOD (mg/L)	0,11	0,09
LOQ (mg/L)	0,34	0,27
R ²	0,9784	0,9935
Lineer aralık (mg/L)	1-100	1-100

Geliştirilen metodun optimizasyonu ve validasyonu sonunda gerçek numunede kullanımını kontrol etmek için domates ve havuç numunelerindeki β-karoten ve lutein analizi gerçekleştirilmiştir. Domates ve havuç ekstraksiyonu sonunda yapılan β-karoten

ve lutein analizlerine ait kromatogramlar **Şekil 4.17.**'de ve miktarları **Çizelge 4.6**'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Domates ve havuçta bulunan β -karoten ve lutein miktarları

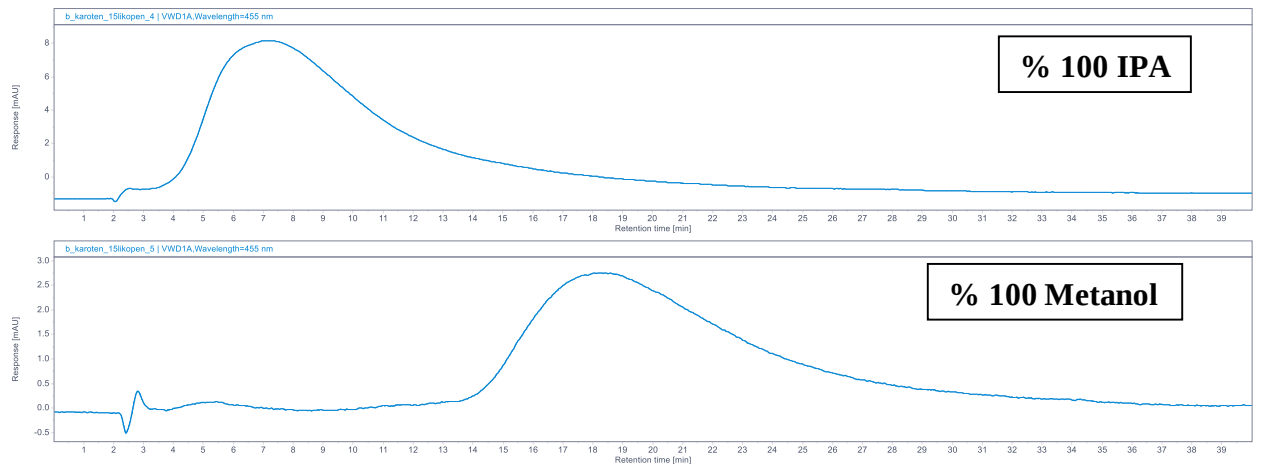
mg/100g	β -Karoten	Lutein
Havuç	34,58	1,91
Domates	1,75	0,72

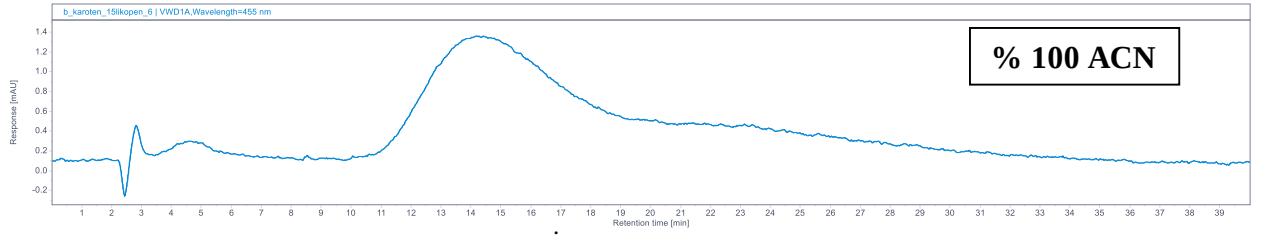


Şekil 4.17. Domates ve havuca ait kromatogramlar

4.2.2 Si-GO-C18 kolonunda yapılan çalışmalar

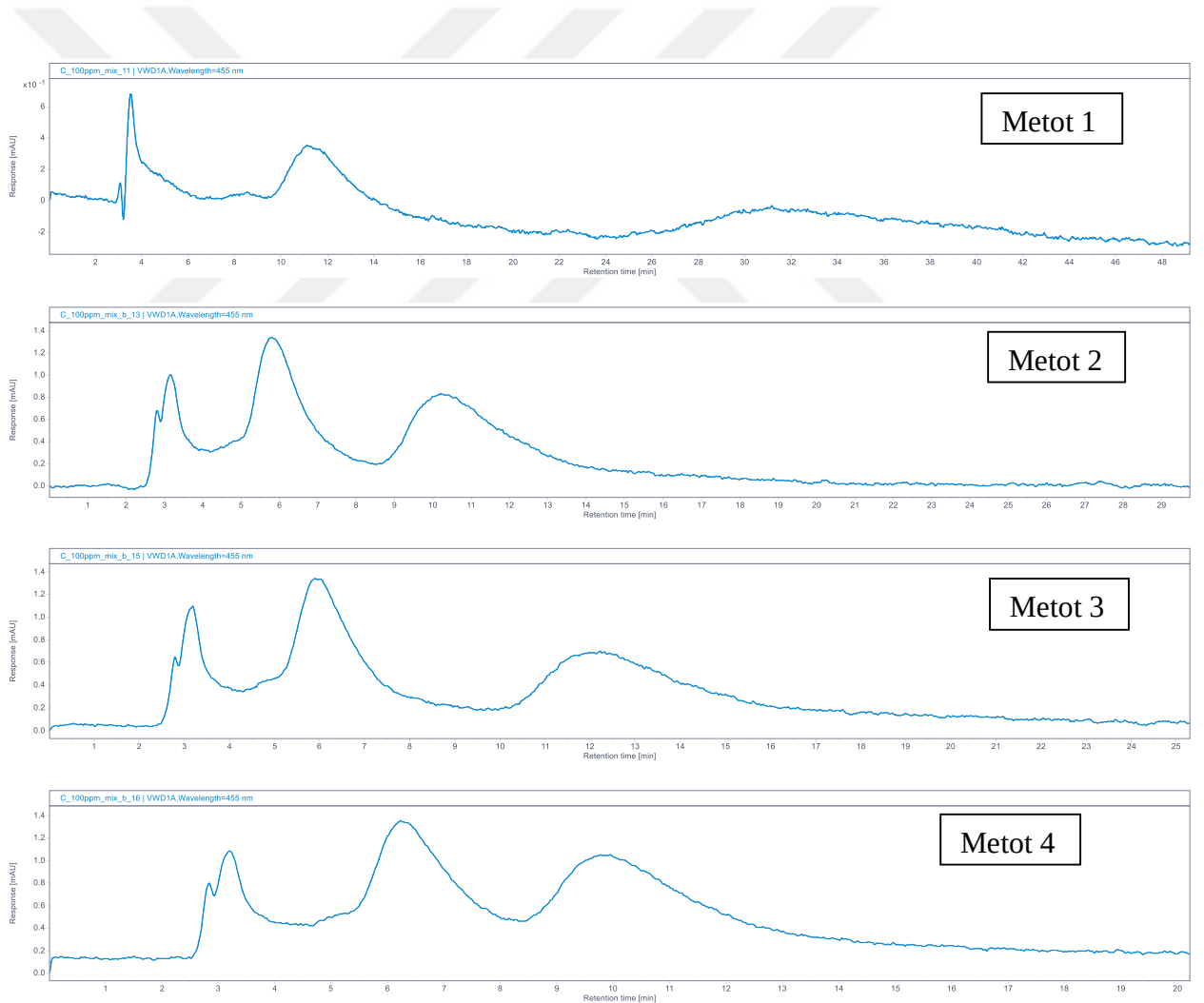
Si-GO-C18 kolonu kullanılarak metot tespit etme çalışmaları için 25mg/L β -karoten ve lutein standartları kullanılmıştır. Çalışmalarda öncelikle saf metanol, asetonitril (ACN), izopropil alkol (İPA) ile başlanmış ve bu çözücülerden elde edilen kromatogramlar **Şekil 4.18**'de verilmiştir.

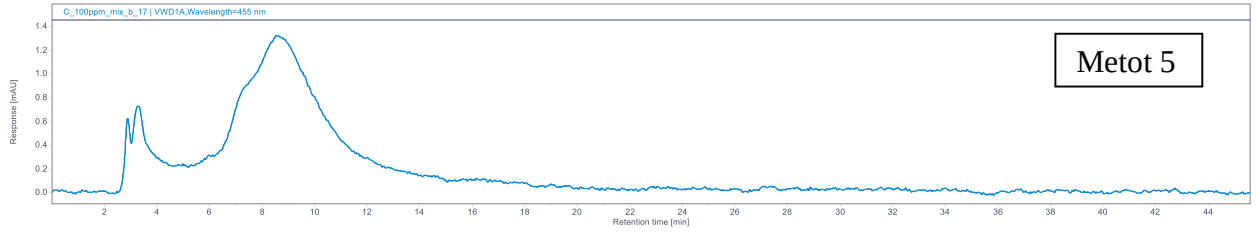




Şekil 4.18. Saf metanol, ACN ve İPA mobil fazlara ait kromatogramlar

Ön deneme çalışmalarında saf çözücülerin β -karoten ve lutein moleküllerini tam olarak ayıramadığı görülmüştür. Bu nedenle bu çözücülerin farklı oranlardaki karışımları kullanılarak izokritik şartlarda çalışmaları yapılmış ve Çizelge 3.6.'da verilen metot parametreleri denenmiştir. Bu çalışmalarla ilgili kromatogramlar Şekil 4.19'da verilmiştir.



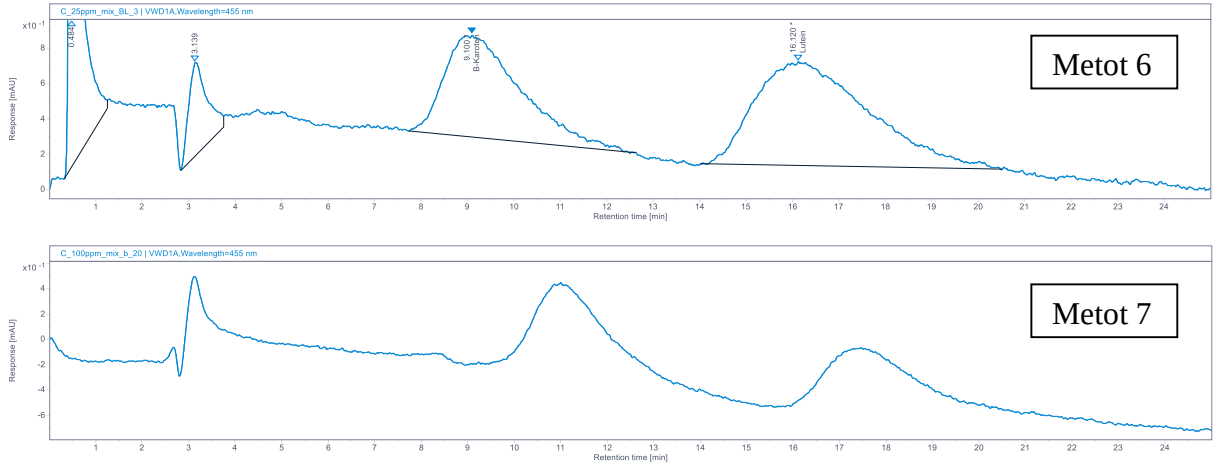


Şekil 4.19. Si-GO-C18 kolonu izokritik çalışma metotlarına ait kromatogramlar

Yapılan izokritik denemelerde β -karoten ve lutein ayrımının tam olarak yapılamadığı görülmüş ve sonraki çalışmalarda gradient ayırmalar denenmiştir. Bu kapsamda toplam 2 farklı metot daha belirlenerek ayırmalar yapılmıştır. Analiz sonuçlarından elde edilen veriler kullanılarak kromatografik verimde kullanılan N ve Rs değerleri hesaplanarak yapılan tüm kromatografik analizler değerlendirilmiştir. Hesaplamalara ait sonuçlar **Çizelge 4.7.**'de ve yapılan gradient ayırmalara ait bazı kromatogramlar **Şekil 4.20.**'de görülmektedir.

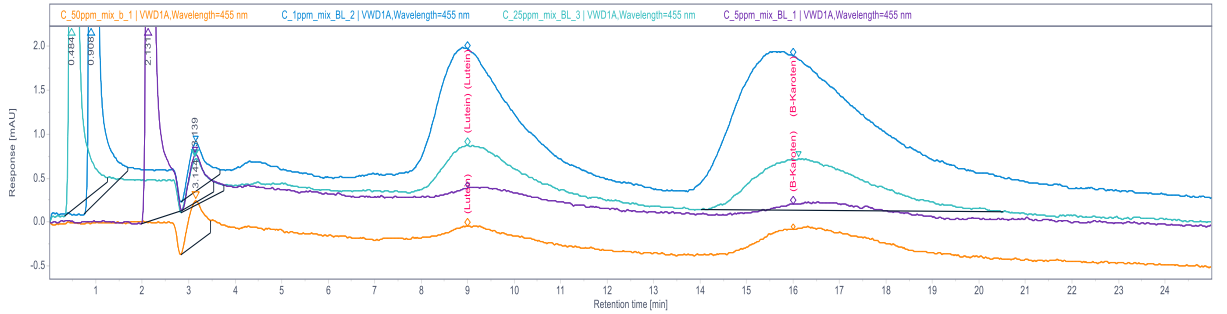
Çizelge 4.7. GO-Si kolonu analiz metotları kromatografik verim sonuçları

Kromatografik Verim						
		k'	Rs	N _{ort}	TF-Lutein	TF- β-Karoten
İzokritik	Metot1	2,17	3,46	195,535	1,34	1,42
	Metot 2	0,83	1,55	136,9	1,33	1,59
	Metot 3	0,86	1,89	129,84	1,34	1,48
	Metot 4	0,97	1,33	132,25	1,25	1,28
	Metot 5	1,33	0,32	305,03	0,5	2,26
Gradient	Metot 6	1,46	2,09	243,78	1,29	1,36
	Metot 7	2,51	2,24	383,22	1,20	1,29



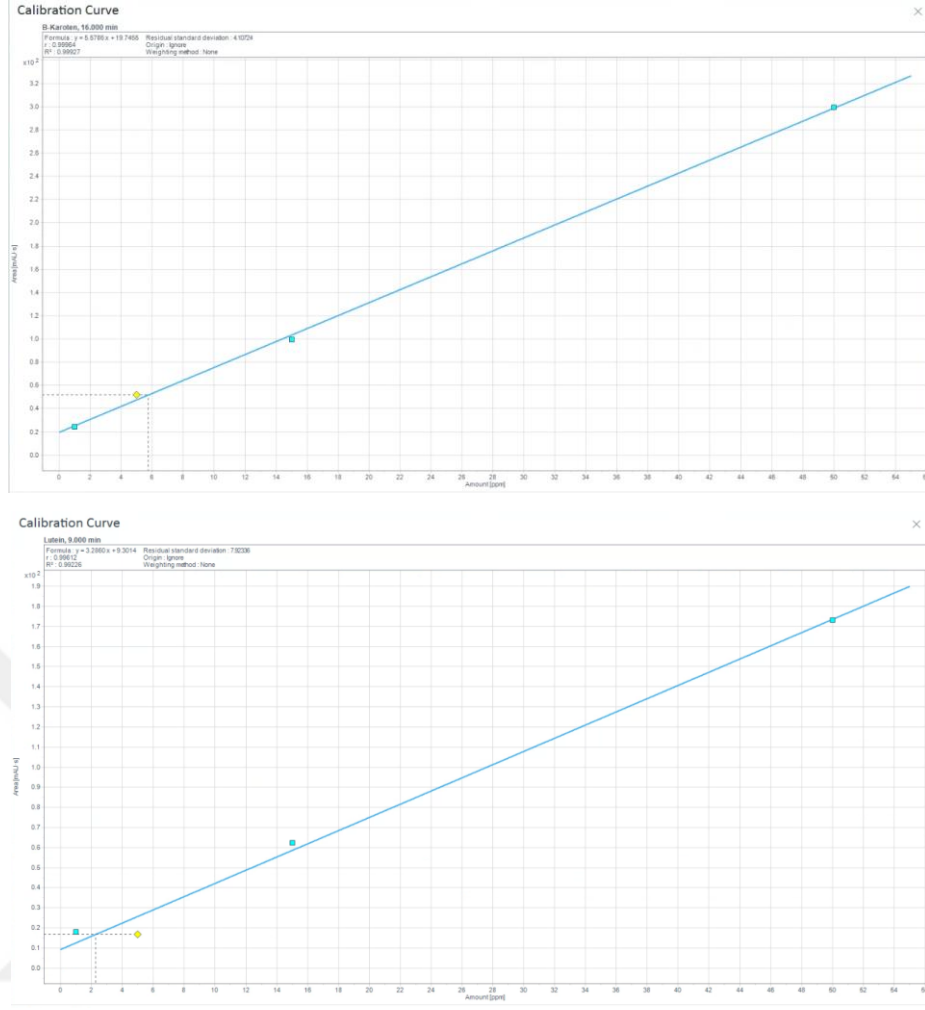
Şekil 4.20. Si-GO-C18 kolonu ile yapılan bazı gradient ayırmalara ait kromatogramlar

β -karoten ve lutein moleküllerinin analizi için 7 farklı metot geliştirilmiş ve yapılan çalışmalar sonunda en iyi ayrımın Metot 6 ve Metot 7 ile gerçekleştiği görülmüştür. Metot 6 kullanılarak gerçekleştirilen farklı konsantrasyonlara (1-100 mg/L) sahip β -karoten ve lutein analizi için elde edilen kromatogram **Şekil 4.21.**'de verilmiştir.



Şekil 4.21. Metot 6 için β -karoten ve lutein standartlarına ait kromatogram

β -karoten ve lutein ayrımı için geliştirilen HPLC metodunun validasyonu uygunluk, doğrusalılık, doğruluk ve hassasiyet kriterleri dikkate alınarak yapılmıştır. Bu kapsamda Si-GO-C18 kolonunda yapılan analizler 25 dakikada gerçekleştirilmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki β -karoten ve lutein standartlarından elde edilen kalibrasyon grafikleri **Şekil 4.22**'de verilmiştir. Elde edilen grafiklerin R^2 'leri 0,9993 ve 0,9923 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.22. β -karoten ve lutein için kalibrasyon grafikleri

Geliştirilen metodun hassasiyeti için 10 mg/L konsantrasyona β -karoten ve lutein standartlarının 5 kez enjeksiyonu yapılarak her bir standart için pik alanları vasıtasıyla bağıl standart sapmaları (% RSD) hesaplanmıştır. β -karoten ve lutein için bağıl standart sapma değerleri 0,86 ve 1,09 olarak bulunmuştur. Metodun geri kazanım testleri yapılarak β -karoten ve lutein için geri kazanım değerleri %95-%80 olarak bulunmuştur. β -karoten ve lutein için tayin sınır (LOD) ve tayin limiti (LOQ) sırasıyla 0,26-0,27 mg/L ve 0,80-0,82 mg/L olarak bulunmuştur.

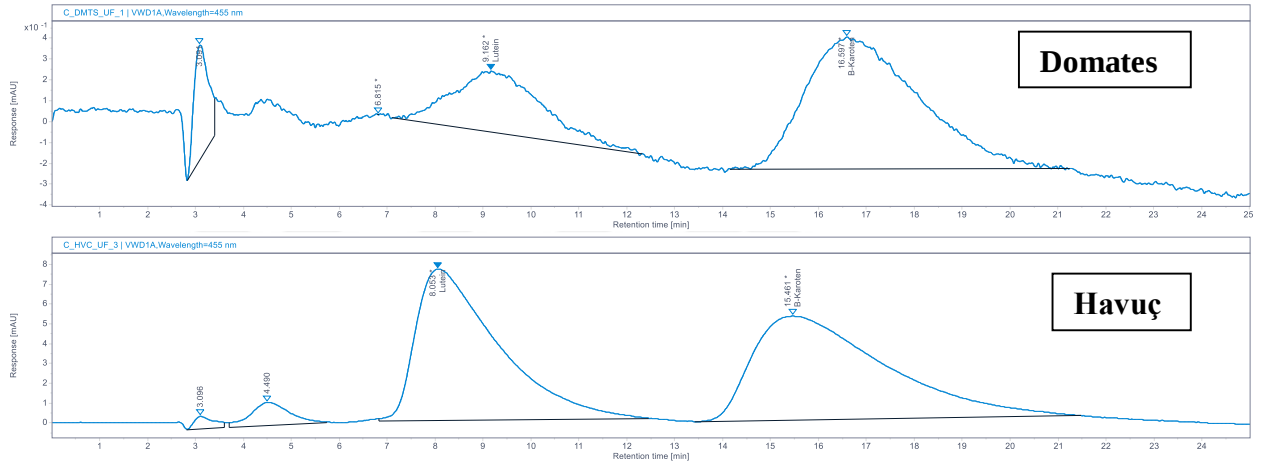
Çizelge 4.8. Validasyon değerleri

	β -Karatene	Lutein
%RSD	0,86	1,09
% Geri Kazanım	95	80
LOD (mg/L)	0,26	0,80
LOQ (mg/L)	0,27	0,82
R^2	0,9993	0,9923
Lineer aralık (mg/L)	1-100	1-100

Geliştirilen metodun optimizasyonu ve validasyonu sonunda gerçek numunede kullanımını kontrol etmek için domates ve havuç numunelerindeki β -karoten ve lutein analizi gerçekleştirilmiştir. Domates ve havuç ekstraksiyonu sonunda yapılan β -karoten ve lutein analizlerine ait kromatogramlar Şekil 4.23.'de ve miktarları Çizelge 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Domates ve havuçta bulunan β -karoten ve lutein miktarları

mg/100g	β -Karoten	Lutein
Havuç	11,58	17,83
Domates	1,09	0,64



Şekil 4.23. Domates ve havuca ait kromatogramlar

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Kimyasal metotlar ile sentezlenen ve özellikle son yıllarda nanopartikül olarak pek çok çalışmada kullanılan grafen oksit ve türevleri; kimyasal türlerin ayrılması, saflaştırılması ve analizinde sıklıkla kullanılmaktadırlar. Özellikle birçok türün ayrılması ve saflaştırılması için katı faz ekstraksiyon sistemlerinde katı faz olarak ve monolitik, elektrokromatografi, kapiler kromatografi, gaz kromatografisi, sıvı kromatografi ve hidrofilik etkileşim kromatografisi gibi kromatografik yöntemlerde de sabit faz olarak grafen oksit ve türevi NP'lerin kullanımı mevcuttur. Günümüzde, biyolojik olarak önemli bileşiklerin analizi için, kullanımı daha kolay, ucuz, seçici ve daha hassas sıvı kromatografisi kolonlarının geliştirilmesine yönelik çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır. Gıdalarda bulunan ve insan sağlığına faydaları gün geçtikçe ortaya konulan β -karoten ve lutein ayrılması ve miktarının tespit edilmesi amacıyla; H_2SO_4 ve H_3PO_4 ile modifiye edilmiş Hummers metodu kullanılarak GO sentezlenmiş, elde edilen GO; EDC ve NHS katalizörlüğünde aminopropilsilika üzerine kimyasal bağ ile bağlanmış, Si-GO partikülleri üzerine C18 kimyasal bağ ile bağlanmış, elde edilen Si-GO ve Si-GO-C18 sabit fazları boş kolonlara doldurulmuştur. β -karoten ve lutein ayrımı ve miktar tespiti için yeni kromatografik metotlar geliştirilerek metotların validasyonları yapılmıştır. Yapılan tez çalışmasında gerçekleştirilen çalışmalar ile ilgili detaylar ve sonuçları aşağıda özetlenmiştir.

H_2SO_4 ve H_3PO_4 ile modifiye edilmiş Hummers metodu kullanılarak elde edilen nano GO partikülleri yeteri kadar oksitlenerek istenen miktarda elde edilmiştir. Yüksek okside elde edilen GO nano partikülleri FTIR analizine tabi tutularak grafen okside hidrofiliklik veren -OH ve -COOH grupları ile sp^2 hibrit C=C ve C=O grupları ve epoksit (C-O-C) pikleri tespit edilmiştir. Ayrıca nanopartikülün kristal yapısı ile ilgili bilgi veren UV-Vis, TEM, SEM analizleri de gerçekleştirilmiştir.

EDC ve NHS katalizörlüğünde GO partikülleri aminopropilsilika üzerine kimyasal amid bağı ile bağlanarak elde edilen Si-GO sabit fazının FTIR spektrumu ile TEM ve SEM görüntüleri alınmıştır. Elde edilen sabit fazın FTIR spektrumu incelendiğinde GO'de bulunan -OH ve -COOH piklerinin bir kısmının azalarak peptit bağının olduğu gözlenmiştir. Ayrıca GO moleküllerinin amino propil silika üzerine bağlanmalarını görsel olarak da tespit etmek için Si-GO sabit fazının TEM ve SEM

görüntüleri de alınmıştır. Görüntüler bağlanmanın tam olarak gerçekleştiğini göstermiştir.

Si-GO sabit fazı üzerine C18 kimyasal bağ ile bağlanmış ve FTIR spektrumu ile TEM ve SEM görüntüleri alınmıştır. Elde edilen sabit fazın FTIR spektrumu incelendiğinde GO üzerine C18 bağlanmasını gösteren -CH titreşimleri tespit edilmiştir. Ayrıca C18 moleküllerinin GO üzerine bağlanmalarını görsel olarak da tespit etmek için Si-GO-C18 sabit fazının SEM görüntüleri de alınmıştır. Elde edilen Si-GO ve Si-GO-C18 sabit fazlarının her ikisi de farklı kolonlara yüksek basınçta doldurulmuştur. Kolonlar sırasıyla metanol, saf su ve asetonitril ile yıkanarak analizlere hazır edilmiştir.

İlk olarak Si-GO kolonu üzerinde β -karoten ve lutein ayrımı için farklı çözücüler ile ön denemeler yapılmıştır. Ön denemelerde hem izo kritik hem de gradient ayırmalar yapılmak istense de istenen ayrımların yapılamadığı görülmüştür. Bu nedenle ayrımları iyileştirmek için kemometrik dizayn yapılmış ve 21 farklı metot oluşturulmuştur. Bu metotlar yardımıyla ayırma gücü ve tabaka sayıları hesaplanmış ve arzu edilebilirlik fonksiyonu (D) kullanılarak en ideal metot tespit edilmiştir. Arzu edilebilirlik fonksiyonu yardımıyla optimum parametrelerin İPA mobil faz bileşimi %25, akış hızı 1,8 mL/dak ve sıcaklık 30°C olduğu belirlenmiştir. Optimum parametreleri belirlenen metodun validasyon çalışmaları için %RSD, % geri kazanım, LOD, LOQ ve R^2 değerleri hesaplanmıştır. Metodun β -karoten ve lutein için bağıl standart sapma değerlerinin 3,40 ve 2,76, geri kazanım değerlerinin %90 ve %93, LOD ve LOQ değerlerinin sırasıyla 0,27 ve 0,34 mg/L ile 0,09 ve 0,11 mg/L olduğu bulunmuştur.

Si-GO-C18 kolonu kullanılarak metot tespit etme çalışmalarında öncelikle saf metanol, asetonitril (ACN), izopropil alkol (İPA) ile ön denemeler yapılmıştır. Ön denemelerden yararlanarak hem izo kritik hem de gradient ayırmalar yapılmıştır. İzo kritik çalışmalardan istenen sonuç elde edilememiş ve gradient ayırmalardan Metot 6'nın β -karoten ve lutein ayrımı için uygun olduğu R_s ve N hesaplanarak tespit edilmiştir. Optimum parametreleri belirlenen metodun validasyon çalışmaları için %RSD, % geri kazanım, LOD, LOQ ve R^2 değerleri hesaplanmıştır. Metodun β -karoten ve lutein için bağıl standart sapma değerlerinin 0,86 ve 1,09, geri kazanım değerlerinin %95 ve %80, LOD ve LOQ değerlerinin sırasıyla 0,26 ve 0,27 mg/L ile 0,80 ve 0,82 mg/L olduğu bulunmuştur.

Yapılan gerçek numune analizlerinde hem domateste hem de havuçta bulunan β -karoten ve lutein miktarları farklı numuneler kullanıldığından sonuçların da farklı olduğu gözlenmiştir.

Si-GO ve Si-GO-C18 kolonları birbiri içinde kıyaslandığında her iki kolonunda β -karoten ve lutein türlerini ayırmada avantaj ve dezavantajlarının olduğu görölmüştür.

Sonuç olarak; bu tez çalışması ile şimdiye kadar β -karoten ve lutein moleküllerinin kromatografik olarak ayrımı için HPLC sabit fazı olarak kullanılmamış olan Si-GO ve Si-GO-C18'in sentezlenmesi ve karakterizasyonları yapılarak β -karoten ve luteinin ayırımında kullanılmak üzere yeni metotlar geliştirilmiş ve gerçek numuneler üzerinde denemeleri yapılmıştır. Yapılan çalışmalardan elde edilen veriler, sentezlenen sabit fazların β -karoten ve luteinin ayırımında kullanılabileceğini göstermiştir. Ancak ayrımların daha iyi yapılabilmesi için sabit fazların farklı yöntemler kullanılarak geliştirilebileceği ve farklı aktif uçlar kullanılarak yeni kolon materyallerinin elde edilebileceği tavsiye edilmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Aktaş, A. H., & Yavaş, U. (2019). Yüksek Tansiyon Tedavisinde Kullanılan Bazı İlaç Etken Maddelerinin UV/VIS Spektrofotometrik ve Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografik (HPLC) Yöntemlerle İncelenmesi ve Elde Edilen Verilerin Kemometrik Yöntemlerle Değerlendirilmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 23(1), 175-184.
- Arteni, A. A., Fradot, M., Galzerano, D., Mendes-Pinto, M. M., Sahel, J. A., Picaud, S., ... & Pascal, A. A. (2015). Structure and conformation of the carotenoids in human retinal macular pigment. *PLoS one*, 10(8), e0135779.
- Arunkumar R., Gorusupudi A., Bernstein P.S. The macular carotenoids: A biochemical overview. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids*. 2020:158617. doi: 10.1016/j.bbalip.2020.158617.
- Aziz, M., Halim, F. A. ve Jaafar, J., 2014, Preparation and characterization of graphene membrane electrode assembly, *Jurnal teknologi* 69 9: 11-14.
- Bai, Y., Xu, T., & Zhang, X. (2020). Graphene-based biosensors for detection of biomarkers. *Micromachines*, 11(1), 60.
- Banerjee, A. N. (2018). Graphene and its derivatives as biomedical materials: Future prospects and challenges. *Interface focus*, 8(3), 20170056.
- Barba, A. O., Hurtado, M. C., Mata, M. S., Ruiz, V. F. ve De Tejada, M. L. S., 2006, Application of a UV–vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and β -carotene in vegetables, *Food chemistry* 95 2: 328-336.
- Bellier, N., Baipaywad, P., Ryu, N., Lee, J. Y., & Park, H. (2022). Recent biomedical advancements in graphene oxide-and reduced graphene oxide-based nanocomposite nanocarriers. *Biomaterials research*, 26(1), 65.
- Bernstein, P. S., Li, B., Vachali, P. P., Gorusupudi, A., Shyam, R., Henriksen, B. S., & Nolan, J. M. (2016). Lutein, zeaxanthin, and meso-zeaxanthin: The basic and clinical science underlying carotenoid-based nutritional interventions against ocular disease. *Progress in retinal and eye research*, 50, 34-66.
- Bon, S. B., Valentini, L., Verdejo, R., Garcia Fierro, J. L., Peponi, L., Lopez-Manchado, M. A., & Kenny, J. M. (2009). Plasma fluorination of chemically derived graphene sheets and subsequent modification with butylamine. *Chemistry of Materials*, 21(14), 3433-3438.
- Bone, R. A., Landrum, J. T., & Tarsis, S. L. (1985). Preliminary identification of the human macular pigment. *Vision research*, 25(11), 1531-1535.
- Brodie, B. C. (1859). XIII. On the atomic weight of graphite. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*, (149), 249-259.
- Buscemi, S., Corleo, D., Di Pace, F., Petroni, M. L., Satriano, A., & Marchesini, G. (2018). The effect of lutein on eye and extra-eye health. *Nutrients*, 10(9), 1321.
- Castenmiller, J. J., West, C. E., Linssen, J. P., van het Hof, K. H., & Voragen, A. G. (1999). The food matrix of spinach is a limiting factor in determining the bioavailability of β -carotene and to a lesser extent of lutein in humans. *The Journal of nutrition*, 129(2), 349-355.
- Chen, D., Wu, M., Xie, S., Li, X., Tao, Y., Wang, X., ... & Yuan, Z. (2019). Determination of tartrazine, lutein, capsanthin, canthaxanthin and β -carotene in animal-derived

- foods and feeds by HPLC method. *Journal of chromatographic science*, 57(5), 462-468.
- Chen, Q. H., Wu, B. K., Pan, D., Sang, L. X., & Chang, B. (2021). Beta-carotene and its protective effect on gastric cancer. *World Journal of Clinical Cases*, 9(23), 6591.
- Cheng, S. H., Zou, K., Okino, F., Gutierrez, H. R., Gupta, A., Shen, N., ... & Zhu, J. (2010). Reversible fluorination of graphene: Evidence of a two-dimensional wide bandgap semiconductor. *Physical Review B*, 81(20), 205435.
- Chiu, Y. F., Hsu, C. C., Chiu, T. H., Lee, C. Y., Liu, T. T., Tsao, C. K., ... & Hsiung, C. A. (2015). Cross-sectional and longitudinal comparisons of metabolic profiles between vegetarian and non-vegetarian subjects: a matched cohort study. *British Journal of Nutrition*, 114(8), 1313-1320.
- Clevidence, B. A., & Bieri, J. G. (1993). [4] Association of carotenoids with human plasma lipoproteins. In *Methods in enzymology* (Vol. 214, pp. 33-46). Academic Press.
- Coluci, V. R., Braga, S. F., Legoas, S. B., Galvao, D. S., & Baughman, R. H. (2003). Families of carbon nanotubes: Graphyne-based nanotubes. *Physical Review B*, 68(3), 035430.
- Coronel, J., Pinos, I., & Amengual, J. (2019). β -carotene in obesity research: technical considerations and current status of the field. *Nutrients*, 11(4), 842.
- Costamagna, S., Neek-Amal, M., Los, J. H., & Peeters, F. M. (2012). Thermal rippling behavior of graphane. *Physical Review B*, 86(4), 041408.
- Çebi, N. (2018). Helal gıda kapsamında yumuşak şekerlemelerde jelatin kökeninin tespitinde spektroskopik ve kromatografik yöntemlerin geliştirilmesi ve metod validasyonu (Doctoral dissertation).
- Çınar, N. (2023). Grafen oksit temelli sıvı kromatografisi (HPLC) sabit fazlarının geliştirilmesi ve ilaç moleküllerinin analizlerinde kullanımı (Master's thesis, Konya Teknik Üniversitesi).
- Dai, Y., & Row, K. H. (2019). Isolation and determination of beta-carotene in carrots by magnetic chitosan beta-cyclodextrin extraction and high-performance liquid chromatography (HPLC). *Analytical Letters*, 52(11), 1828-1843.
- Di Meo, A., Bartlett, J., Cheng, Y., Pasic, M. D., & Yousef, G. M. (2017). Liquid biopsy: a step forward towards precision medicine in urologic malignancies. *Molecular cancer*, 16, 1-14.
- Dideikin, A. T., & Vul', A. Y. (2019). Graphene oxide and derivatives: the place in graphene family. *Frontiers in Physics*, 6, 149.
- Drewniak, S., Pustelny, T., Muzyka, R., Stolarczyk, A., & Konieczny, G. (2015). Investigations of selected physical properties of graphite oxide and thermally exfoliated/reduced graphene oxide in the aspect of their applications in photonic gas sensors. *Photonics Letters of Poland*, 7(2), 47-49.
- El-Baz, F. K., Ali, S. I., Elgohary, R., & Salama, A. (2023). Natural β -carotene prevents acute lung injury induced by cyclophosphamide in mice. *Plos one*, 18(4), e0283779.
- El-Baz, F. K., Salama, A., Ali, S. I., & Elgohary, R. (2022). Lutein isolated from *Scenedesmus obliquus* microalga boosts immunity against cyclophosphamide-induced brain injury in rats. *Scientific Reports*, 12(1), 22601.
- Enggi, C. K., Mahardika, F., Devara, D. M., Saputra, M. D., Wafiah, N., Raihan, M., & Permana, A. D. (2022). HPLC-UV method validation for quantification of β -carotene in the development of sustained release supplement formulation containing solid dispersion-floating gel in situ. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 221, 115041.

- Eroglu, A., & Harrison, E. H. (2013). Carotenoid metabolism in mammals, including man: formation, occurrence, and function of apocarotenoids: Thematic Review Series: Fat-Soluble Vitamins: Vitamin A. *Journal of lipid research*, 54(7), 1719-1730.
- Eser, B., & Dinçel, A. S. (2018). Kromatografiye giriş, yüksek performanslı sıvı kromatografi kullanımında basit ipuçları. *Sağlık Hizmetleri ve Eğitimi Dergisi*, 2(2), 51-57.
- Fidge, N. H., Smith, F. R., & Goodman, D. S. (1969). Vitamin A and carotenoids. The enzymic conversion of β -carotene into retinal in hog intestinal mucosa. *Biochemical Journal*, 114(4), 689-694.
- Fraser, P. D., & Bramley, P. M. (2004). The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in lipid research*, 43(3), 228-265.
- Gea-Botella, S., Agulló, L., Martí, N., Martínez-Madrid, M. C., Lizama, V., Martín-Bermudo, F., ... & Valero, M. (2021). Carotenoids from persimmon juice processing. *Food Research International*, 141, 109882.
- Gebregziabher, B. S., Zhang, S., Qi, J., Azam, M., Ghosh, S., Feng, Y., ... & Sun, J. (2021). Simultaneous determination of carotenoids and chlorophylls by the HPLC-UV-VIS method in soybean seeds. *Agronomy*, 11(4), 758.
- Geim, A. K. (2009). Graphene: status and prospects. *science*, 324(5934), 1530-1534.
- Geim, A. K., & Kim, P. (2008). Carbon wonderland. *Scientific American*, 298(4), 90-97.
- Giovanni, M., Poh, H. L., Ambrosi, A., Zhao, G., Sofer, Z., Šaněk, F., ... & Pumera, M. (2012). Noble metal (Pd, Ru, Rh, Pt, Au, Ag) doped graphene hybrids for electrocatalysis. *Nanoscale*, 4(16), 5002-5008.
- Haley, M. M., Brand, S. C., & Pak, J. J. (1997). Carbon networks based on dehydrobenzoannulenes: synthesis of graphdiyne substructures. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 36(8), 836-838.
- He, J., & Fang, L. (2016). Controllable synthesis of reduced graphene oxide. *Current Applied Physics*, 16(9), 1152-1158.
- Herraiz, M., Dubois, M., Batisse, N., Hajjar-Garreau, S., & Simon, L. (2018). Large-scale synthesis of fluorinated graphene by rapid thermal exfoliation of highly fluorinated graphite. *Dalton Transactions*, 47(13), 4596-4606.
- Hira, S., Saleem, U., Anwar, F., Sohail, M. F., Raza, Z., & Ahmad, B. (2019). β -Carotene: a natural compound improves cognitive impairment and oxidative stress in a mouse model of streptozotocin-induced Alzheimer's disease. *Biomolecules*, 9(9), 441.
- Hummers Jr, W. S. ve Offeman, R. E., 1958, Preparation of graphitic oxide, *Journal Of The American Chemical Society* 80 6: 1339-1339.
- Hung, A. H., Holbrook, R. J., Rotz, M. W., Glasscock, C. J., Mansukhani, N. D., MacRenaris, K. W., ... & Meade, T. J. (2014). Graphene oxide enhances cellular delivery of hydrophilic small molecules by co-incubation. *ACS nano*, 8(10), 10168-10177.
- Jang, W., Lee, C., Suh, HJ ve Lee, J. (2023). Kore'de işlenmiş gıdalarda β -Karoten ve β -apo-8'-karoten içerikleri. *Gıda Bilimi ve Biyoteknoloji* , 1-13.
- Jeon, K. J., Lee, Z., Pollak, E., Moreschini, L., Bostwick, A., Park, C. M., ... & Rotenberg, E. (2011). Fluorographene: a wide bandgap semiconductor with ultraviolet luminescence. *Acs Nano*, 5(2), 1042-1046.
- Kang, D. W., & Shin, H. S. (2012). Control of size and physical properties of graphene oxide by changing the oxidation temperature.
- Kang, D.-W. ve Shin, H.-S., 2012, Control of size and physical properties of graphene oxide by changing the oxidation temperature, *Carbon letters* 13 1: 39-43.

- Kavalappa, Y. P., Gopal, S. S., & Ponesakki, G. (2021). Lutein inhibits breast cancer cell growth by suppressing antioxidant and cell survival signals and induces apoptosis. *Journal of Cellular Physiology*, 236(3), 1798-1809.
- Kim, E. K., Kim, H., Kwon, O., & Chang, N. (2018). Associations between fruits, vegetables, vitamin A, β -carotene and flavonol dietary intake, and age-related macular degeneration in elderly women in Korea: the Fifth Korea National Health and Nutrition Examination Survey. *European journal of clinical nutrition*, 72(1), 161-167.
- Kiokias, S., & Gordon, M. H. (2004). Antioxidant properties of carotenoids in vitro and in vivo. *Food Reviews International*, 20(2), 99-121.
- Kopsell, D. A., & Kopsell, D. E. (2010). Carotenoids in vegetables: Biosynthesis, occurrence, impacts on human health, and potential for manipulation. In *Bioactive Foods in Promoting Health* (pp. 645-662). Academic Press.
- Korkmaz, S., & Kariper, İ. A. (2020). Graphene and graphene oxide based aerogels: Synthesis, characteristics and supercapacitor applications. *Journal of Energy Storage*, 27, 101038.
- Kostic, D., White, W. S., & Olson, J. A. (1995). Intestinal absorption, serum clearance, and interactions between lutein and beta-carotene when administered to human adults in separate or combined oral doses. *The American journal of clinical nutrition*, 62(3), 604-610.
- Kovtyukhova, N. I., Ollivier, P. J., Martin, B. R., Mallouk, T. E., Chizhik, S. A., Buzaneva, E. V., & Gorchinskiy, A. D. (1999). Layer-by-layer assembly of ultrathin composite films from micron-sized graphite oxide sheets and polycations. *Chemistry of materials*, 11(3), 771-778.
- Lee, J., Yim, Y., Kim, S., Choi, M. H., Choi, B. S., Lee, Y., & Min, D. H. (2016). In-depth investigation of the interaction between DNA and nano-sized graphene oxide. *Carbon*, 97, 92-98.
- Li, F., Long, L., & Weng, Y. (2020). A review on the contemporary development of composite materials comprising graphene/graphene derivatives. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2020, 1-16.
- Li, N., Wu, X., Zhuang, W., Xia, L., Chen, Y., Wang, Y., ... & Zhou, Y. (2021). Green leafy vegetable and lutein intake and multiple health outcomes. *Food chemistry*, 360, 130145.
- Li, X., Liang, X., Wang, Y., Wang, D., Teng, M., Xu, H., ... & Han, L. (2022). Graphene-based nanomaterials for dental applications: Principles, current advances, and future outlook. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10.
- Li, X., Xu, X., Albano, D. R., & You, T. (2011). Optimization using central composite design for antihistamines separation by nonaqueous capillary electrophoresis with electrochemical and electrochemiluminescence detections. *Analyst*, 136(24), 5294-5301.
- Li, Y., Li, Q., Zhu, N., Gao, Z. ve Ma, Y., 2018, Cellulose type chiral stationary phase based on reduced graphene oxide@ silica gel for the enantiomer separation of chiral compounds, *Chirality* 30 8: 996-1004.
- Liang, X., Wang, X., Ren, H., Jiang, S., Wang, L., & Liu, S. (2014). Gold nanoparticle decorated graphene oxide/silica composite stationary phase for high-performance liquid chromatography. *Journal of separation science*, 37(12), 1371-1379.
- Liu, Z., Du, Y. ve Feng, Z., 2017, Enantioseparation of drugs by capillary electrochromatography using a stationary phase covalently modified with graphene oxide, *Microchimica Acta* 184 2: 583-593.

- Makharza, S., Cirillo, G., Bachmatiuk, A., Ibrahim, I., Ioannides, N., Trzebicka, B., ... & Rummeli, M. H. (2013). Graphene oxide-based drug delivery vehicles: functionalization, characterization, and cytotoxicity evaluation. *Journal of nanoparticle research*, 15, 1-26.
- Malko, D., Neiss, C., Vines, F., & Görling, A. (2012). Competition for graphene: graphynes with direction-dependent dirac cones. *Physical review letters*, 108(8), 086804.
- Maoka, T. (2020). Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of natural medicines*, 74(1), 1-16
- Marcano, D. C., Kosynkin, D. V., Berlin, J. M., Sinitskii, A., Sun, Z., Slesarev, A., ... & Tour, J. M. (2010). Improved synthesis of graphene oxide. *ACS nano*, 4(8), 4806-4814.
- Mejía-Carmona, K., & Lanças, F. M. (2020). Modified graphene-silica as a sorbent for in-tube solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Determination of xanthines in coffee beverages. *Journal of Chromatography A*, 1621, 461089.
- Meléndez-Martínez, A. J. (2019). An overview of carotenoids, apocarotenoids, and vitamin A in agro-food, nutrition, health, and disease. *Molecular nutrition & food research*, 63(15), 1801045.
- Meléndez-Martínez, A. J., Stinco, C. M., & Mapelli-Brahm, P. (2019). Skin carotenoids in public health and nutricosmetics: The emerging roles and applications of the UV radiation-absorbing colourless carotenoids phytoene and phytofluene. *Nutrients*, 11(5), 1093.
- Moore, T. (1930). Vitamin A and carotene: The absence of the liver oil vitamin A from carotene. VI. The conversion of carotene to vitamin A in vivo. *Biochemical Journal*, 24(3), 692.
- Moran, N. E., Mohn, E. S., Hason, N., Erdman Jr, J. W., & Johnson, E. J. (2018). Intrinsic and extrinsic factors impacting absorption, metabolism, and health effects of dietary carotenoids. *Advances in Nutrition*, 9(4), 465-492
- Namitha, K. K., & Negi, P. S. (2010). Chemistry and biotechnology of carotenoids. *Critical reviews in food science and nutrition*, 50(8), 728-760.
- Natesan, S., Singh, T. S., Duraisamy, T., Chandrasekharan, N., Chandran, S., Adhimoolam, K., ... & Meitei, L. J. (2020). Characterization of crtRB1 gene polymorphism and β -carotene content in maize landraces originated from north eastern himalayan region (NEHR) of India. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4, 78.
- Neto, A. C., Guinea, F., Peres, N. M., Novoselov, K. S., & Geim, A. K. (2009). The electronic properties of graphene. *Reviews of modern physics*, 81(1), 109.
- Nian, S., & Lo, A. C. (2019). Protecting the Aging Retina. In *Neuroprotection*. IntechOpen.
- Novoselov, K. S., Geim, A. K., Morozov, S. V., Jiang, D. E., Zhang, Y., Dubonos, S. V., ... & Firsov, A. A. (2004). Electric field effect in atomically thin carbon films. *science*, 306(5696), 666-669.
- Olson, J. A., & Hayaishi, O. (1965). The enzymatic cleavage of beta-carotene into vitamin A by soluble enzymes of rat liver and intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 54(5), 1364-1370.
- Otsuka, H., Urita, K., Honma, N., Kimuro, T., Amako, Y., Kukobat, R., ... & Kaneko, K. (2024). Transient chemical and structural changes in graphene oxide during ripening. *Nature Communications*, 15(1), 1708.

- Paiva, S. A., & Russell, R. M. (1999). β -carotene and other carotenoids as antioxidants. *Journal of the American college of nutrition*, 18(5), 426-433.
- Parker, R. S. (1996). Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. *The FASEB Journal*, 10(5), 542-551.
- Pendolino, F., & Armata, N. (2017). Graphene oxide in environmental remediation process.
- Peng, L., Xu, Z., Liu, Z., Wei, Y., Sun, H., Li, Z., ... & Gao, C. (2015). An iron-based green approach to 1-h production of single-layer graphene oxide. *Nature communications*, 6(1), 5716.
- Peng, Q., Dearden, A. K., Crean, J., Han, L., Liu, S., Wen, X., & De, S. (2014). New materials graphyne, graphdiyne, graphone, and graphane: review of properties, synthesis, and application in nanotechnology. *Nanotechnology, science and applications*, 1-29.
- Peng, Q., Liang, C., Ji, W., & De, S. (2013). A theoretical analysis of the effect of the hydrogenation of graphene to graphane on its mechanical properties. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 15(6), 2003-2011.
- Perry, A., Rasmussen, H., & Johnson, E. J. (2009). Xanthophyll (lutein, zeaxanthin) content in fruits, vegetables and corn and egg products. *Journal of food Composition and Analysis*, 22(1), 9-15.
- Qu, Q., Gu, C., & Hu, X. (2012). Capillary coated with graphene and graphene oxide sheets as stationary phase for capillary electrochromatography and capillary liquid chromatography. *Analytical chemistry*, 84(20), 8880-8890.
- Rahman, Z., & Aeri, V. (2022). Enhancement of lutein content in *Calendula officinalis* Linn. By solid-state fermentation with *Lactobacillus* species. *Journal of Food Science and Technology*, 59(12), 4794-4800.
- Ramezanzadeh, B., Haeri, Z., & Ramezanzadeh, M. (2016). A facile route of making silica nanoparticles-covered graphene oxide nanohybrids (SiO₂-GO); fabrication of SiO₂-GO/epoxy composite coating with superior barrier and corrosion protection performance. *Chemical Engineering Journal*, 303, 511-528.
- Rao, C. N. R., Biswas, K., Subrahmanyam, K. S., & Govindaraj, A. (2009). Graphene, the new nanocarbon. *Journal of Materials Chemistry*, 19(17), 2457-2469.
- Rao, C. N. R., Gopalakrishnan, K., & Govindaraj, A. (2014). Synthesis, properties and applications of graphene doped with boron, nitrogen and other elements. *Nano today*, 9(3), 324-343.
- Ribaya-Mercado, J. D., Ordovas, J. M., & Russell, R. M. (1995). Effect of beta-carotene supplementation on the concentrations and distribution of carotenoids, vitamin E, vitamin A, and cholesterol in plasma lipoprotein and non-lipoprotein fractions in healthy older women. *Journal of the American College of Nutrition*, 14(6), 614-620.
- Rocha, F., Sugahara, L. Y., Leimann, F. V., de Oliveira, S. M., da Silva Brum, E., Calhella, R. C., ... & Gonçalves, O. H. (2018). Nanodispersions of beta-carotene: effects on antioxidant enzymes and cytotoxic properties. *Food & function*, 9(7), 3698-3706.
- Rock, C. L., & Swendseid, M. E. (1992). Plasma β -carotene response in humans after meals supplemented with dietary pectin. *The American journal of clinical nutrition*, 55(1), 96-99.
- Rodríguez-Rodríguez, E., Beltrán-de-Miguel, B., Samaniego-Aguilar, K. X., Sánchez-Prieto, M., Estévez-Santiago, R., & Olmedilla-Alonso, B. (2020). Extraction and analysis by HPLC-DAD of carotenoids in human faeces from Spanish adults. *Antioxidants*, 9(6), 484.

- Saini, R. K., & Keum, Y. S. (2018). Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food chemistry*, 240, 90-103.
- Saini, R. K., Prasad, P., Lokesh, V., Shang, X., Shin, J., Keum, Y. S., & Lee, J. H. (2022). Carotenoids: Dietary sources, extraction, encapsulation, bioavailability, and health benefits—A review of recent advancements. *Antioxidants*, 11(4), 795.
- Serin, A. (2019). Tokokromanol ve sterol biyoaktif bileşenlerinin eş zamanlı tayinine yönelik kromatografik yöntemlerin geliştirilmesi ve tepki yüzey metodolojisi ile optimizasyonu (Master's thesis, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi).
- Shahriary, L., & Athawale, A. A. (2014). Graphene oxide synthesized by using modified hummers approach. *Int. J. Renew. Energy Environ. Eng*, 2(01), 58-63.
- Singh, R. K., Kumar, R., & Singh, D. P. (2016). Graphene oxide: strategies for synthesis, reduction and frontier applications. *Rsc Advances*, 6(69), 64993-65011.
- Siriviriyannun, A., Popova, M., Imae, T., Kiew, L. V., Looi, C. Y., Wong, W. F., ... & Chung, L. Y. (2015). Preparation of graphene oxide/dendrimer hybrid carriers for delivery of doxorubicin. *Chemical Engineering Journal*, 281, 771-781.
- Sivek, J., Leenaerts, O., Partoens, B., & Peeters, F. M. (2012). First-principles investigation of bilayer fluorographene. *The Journal of Physical Chemistry C*, 116(36), 19240-19245.
- Sluiter, M. H., & Kawazoe, Y. (2003). Cluster expansion method for adsorption: Application to hydrogen chemisorption on graphene. *Physical Review B*, 68(8), 085410.
- Sofo, J. O., Chaudhari, A. S., & Barber, G. D. (2007). Graphane: A two-dimensional hydrocarbon. *Physical Review B*, 75(15), 153401.
- Spinola, M. V., & Díaz-Santos, E. (2020). Microalgae nutraceuticals: the role of lutein in human health. *Microalgae biotechnology for food, health and high value products*, 243-263.
- Staudenmaier, L. (1898). Verfahren zur darstellung der graphitsäure. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 31(2), 1481-1487.
- Şahin, H., Ataca, C., & Ciraci, S. (2010). Electronic and magnetic properties of graphane nanoribbons. *Physical Review B*, 81(20), 205417.
- Unlu, N. Z., Bohn, T., Clinton, S. K., & Schwartz, S. J. (2005). Carotenoid absorption from salad and salsa by humans is enhanced by the addition of avocado or avocado oil. *The Journal of nutrition*, 135(3), 431-436.
- Vlčková, H. K., Pilařová, V., Svobodová, P., Plíšek, J., Švec, F., & Nováková, L. (2018). Current state of bioanalytical chromatography in clinical analysis. *Analyst*, 143(6), 1305-1325.
- Wazir, A. H., & Kundi, I. W. (2016). Synthesis of Graphene Nano Sheets by the Rapid Reduction of Electrochemically Exfoliated Graphene Oxide Induced by Microwaves. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, 38(1).
- Williams, A. W., Boileau, T. W., & Erdman Jr, J. W. (1998). Factors influencing the uptake and absorption of carotenoids. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 218(2), 106-108.
- Wu, B., Li, X., Zheng, X., Zhao, J., Qiao, L., & Zheng, J. (2022). A simple and robust HPLC method to analyze lutein in wheat. *MethodsX*, 9, 101926.
- Wu, T. C., Dai, J., Hu, G., Yu, W. B., Ogbeide, O., De Luca, A., ... & Hasan, T. (2020). Machine-intelligent inkjet-printed α -Fe₂O₃/rGO towards NO₂ quantification in ambient humidity. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 321, 128446.
- Xu, J., Lin, J., Peng, S., Zhao, H., Wang, Y., Rao, L., ... & Zhao, L. (2023). Development of an HPLC-PDA Method for the Determination of Capsanthin, Zeaxanthin, Lutein,

- β -Cryptoxanthin and β -Carotene Simultaneously in Chili Peppers and Products. *Molecules*, 28(5), 2362.
- Yabuzaki, J. (2017). Carotenoids Database: Structures, chemical fingerprints and distribution among organisms. Database, 2017.
- Yang, L., Hu, J., Wu, W., Tang, J., Ding, K., & Li, J. (2016). In situ NH₂-functionalized graphene oxide/SiO₂ composites to improve Cu (II) removal from ammoniacal solutions. *Chemical Engineering Journal*, 306, 77-85.
- Yu, H., Zhang, B., Bulin, C., Li, R., & Xing, R. (2016). High-efficient synthesis of graphene oxide based on improved hummers method. *Scientific reports*, 6(1), 36143.
- Yu, L., Li, P., Zhang, Q., Zhang, W., Ding, X., & Wang, X. (2013). Graphene oxide: an adsorbent for the extraction and quantification of aflatoxins in peanuts by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1318, 27-34.
- Zhang, X., Chen, S., Han, Q., & Ding, M. (2013). Preparation and retention mechanism study of graphene and graphene oxide bonded silica microspheres as stationary phases for high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1307, 135-143.
- Zhou, J., Wang, Q., Sun, Q., Chen, X. S., Kawazoe, Y., & Jena, P. (2009). Ferromagnetism in semihydrogenated graphene sheet. *Nano letters*, 9(11), 3867-3870.
- Zhuang, S., Zheng, W., Na, Y., Chen, N., Gong, F., Huang, B., ... & Liu, H. (2022). Changes in the content and antioxidative activity of β -carotene and its metabolite vitamin A during gastrointestinal digestion and absorption and optimisation of HPLC-based detection. *International Journal of Food Science & Technology*, 57(2), 1093-1103.