



Preparative Chromatography: Fundamentals, Applications, and Differences from Analytical Chromatography

Şirin Oba^{1,a,*}

¹Amasya Üniversitesi, Suluova Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Bölümü, 05005, Suluova Amasya, Türkiye

*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><i>Review Article</i></p> <p>Received : 20.07.2025 Accepted : 21.08.2025</p> <p>Keywords: Chromatography Preparative Analytical Isolation Purification</p>	<p>This review aims to identify the most appropriate approaches to method selection and optimization challenges encountered in the isolation and purification of bioactive compounds from food, natural products, and pharmaceutical matrices using various chromatographic techniques (both analytical and preparative). A comparative evaluation is presented of the fundamental principles, application areas, and advantages of analytical and preparative chromatography, including techniques such as thin-layer chromatography, liquid-liquid chromatography, counter-current chromatography (CCC), and high-performance liquid chromatography, in both their analytical and preparative variants. These techniques are examined based on critical parameters including instrumentation components, efficiency, purity levels, scalability, and cost-effectiveness. It is highlighted that preparative techniques offer advantages such as the ability to obtain compounds of high purity, reduced solvent consumption, and ease of scalability, while analytical techniques are primarily preferred for qualitative and quantitative analyses. This review provides a holistic perspective on the interdisciplinary applications and technical distinctions of chromatographic separation technologies. The combined evaluation of analytical and preparative approaches is expected to contribute significantly to method selection and optimization, particularly in food analysis and compound isolation processes.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 13(s2): 3695-3707, 2025

Preparatif Kromatografi: Temel Prensipleri, Uygulamaları ve Analitik Kromatografiden Ayrıntılı Değerlendirilmesi

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p><i>Derleme Makalesi</i></p> <p>Geliş : 20.07.2025 Kabul : 21.08.2025</p> <p>Anahtar Kelimeler: Kromatografi Preparatif Analitik İzolasyon Saflaştırma</p>	<p>Bu derleme çalışmasında, analitik ve preparatif kromatografi teknikleri, temel prensipleri, uygulama alanları, avantajları ve sınırlılıkları bakımından karşılaştırmalı olarak ele alınmıştır. İnce tabaka kromatografisi (İTK), sıvı-sıvı kromatografi, karşı akım kromatografisi ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) gibi yöntemlerin hem analitik hem de preparatif varyantları detaylı biçimde incelenmiştir. Bu yöntemlerin, özellikle gıda, doğal ürün ve farmasötik matrislerdeki biyoaktif bileşiklerin izolasyonu ve saflaştırılmasındaki işlevselliği, literatür örnekleriyle desteklenerek değerlendirilmiştir. Preparatif tekniklerin yüksek saflıkta bileşik elde etme, düşük solvent kullanımı ve kolay ölçeklenebilirlik gibi avantajlar sunduğu; analitik tekniklerin ise kalitatif ve kantitatif analizlerde öncelikli tercih edildiği vurgulanmıştır. Derleme kapsamında, kromatografik ayırma teknolojilerinin disiplinlerarası kullanımı ve teknik farklılıklarına ilişkin bütüncül bir perspektif sunulmaktadır. Analitik ve preparatif yaklaşımların birlikte değerlendirilmesi, özellikle gıda analizleri ve bileşen izolasyon süreçlerinde yöntem seçimi ve optimizasyonu açısından önemli katkılar sağlaması öngörülmektedir.</p>

^a sirin_oba@hotmail.com <https://orcid.org/0000-0002-4620-7483>



This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 International License

Giriş

Kromatografi, tıp, gıda, mikrobiyoloji ve kimya gibi çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılan analitik bir yöntemdir (Soares Maciel ve ark., 2018). Kromatografi; kompleks karışımdaki bileşenleri tespit ederek tanımlama, izolasyonunu sağlama ve yabancı maddelerden ayrılması istenen hedef bileşiğin seperasyonunu sağlayan nispeten basit ve sıklıkla kullanılan bir ayırma tekniğidir (Coşkun, 2016; Dar ve ark., 2019). Uluslararası Saf ve Uygulamalı Kimya Birliği, kromatografiyi şu şekilde tanımlamaktadır: "Kromatografi, ayrılacak bileşenlerin iki faz arasında dağıtıldığı, bunlardan birinin sabit (sabit faz), diğersinin ise belirli bir yönde hareket eden (hareketli faz) faz olduğu fiziksel bir ayırma yöntemidir" (Ettre, 1993). Ayrımı istenen karışım hareketli faz yardımıyla sabit faz boyunca taşınır ve karışımı oluşturan bileşikler sabit faz tarafından farklı ölçüde tutulması ile her bir bileşik farklı zamanlarda ve farklı oranlarda sistemi terk eder. Böylece bileşikleri birbirinden ayırmak, tanımlamak ve ayrı ayrı elde etmek olasıdır (Jandera, 2011). Sabit ve hareketli fazlar arasında bileşenlerin farklı afinite ve etkileşimleri esas alınarak çeşitli kromatografik yöntemler geliştirilmiştir. Günümüzde kullanılan başlıca kromatografi türleri arasında kolon kromatografisi, ince tabaka kromatografisi (İTK), kağıt kromatografisi, gaz kromatografisi, iyon değişim kromatografisi, jel geçirgenlik kromatografisi, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve afinite kromatografisi yer almaktadır (Morley ve Minceva, 2021; Ubale ve ark., 2024). Bu teknikler, başta karbonhidratlar (Harvey, 2012), yağ asitleri (Fuchs ve ark., 2011), aminoasit ve protein türevleri (Carta ve Jungbauer, 2020), vitaminler (Jenkinson ve ark., 2018), toksik gazlar (Asghar ve ark., 2017) ile doping kontrolü gerektiren farmasötik ajanlar (Deventer ve ark., 2014) gibi çok çeşitli organik ve anorganik maddelerin analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Kromatografinin geniş uygulama alanı, gıda analizlerinde bileşen izolasyonu açısından değerlendirildiğinde, gıdaların yapısal çeşitliliği dikkat çeker. Gıda matrisleri; nispeten daha basit yapıya sahip örnekler (örneğin bitkisel yağlar) ile oldukça karmaşık bileşenler içeren örnekler (örneğin Maillard reaksiyonu ürünleri) arasında geniş bir yelpazede yer almaktadır (de Araujo Gomes ve ark., 2023). Doğal ürünlerin (bal şekerleri ve süt lipitleri...), teknolojik olarak oluşturulan ürünlerin (örneğin kavrulmuş ürünler ve peynir peptitleri), istenmeyen dönüşüm ürünlerinin (örneğin oksidasyon, izomerizasyon ve hidroliz) veya ksenobiyotik ürünlerinde (örneğin renklendiriciler, mineral yağ, plastik türevleri ve baskı mürekkepleri) kromatografi tabanlı uygulamalar kullanılarak araştırmaları yapılabilmektedir (Herrero ve ark., 2009; Marrubin ve ark., 2018; Cortés-Herrera ve ark., 2018). Bu bağlamda, kromatografi temelli bir gıda uygulamasının nihai kapsamı, temel olarak üç ana grupta sınıflandırılabilir: (I) hedefsiz analizler, (II) hedefli analizler ve (III) numuneye özgü parmak izi oluşturulması olarak sınıflandırılabilir. Hedefsiz analizler, gıda matrisindeki tüm bileşenlerin genel bir profilini elde etmeye odaklanır ve bileşenlerinin taranması genellikle tam tarama modunda, kütle spektrometrisi (MS) kullanılarak gerçekleştirilmektedir (Milman, 2015). Kromatografi açısından, yüksek çözünürlüklü bir

yöntemin kullanılabilirliği kesinlikle tavsiye edilir, çünkü birçok gıda örneği yüksek karmaşıklığa sahiptir (Gavage, Delahaut ve Gillard, 2021). Hedefli analizlerde ise belirli bileşiklerin veya kontaminantların hassas ve seçici olarak tespit edilmesini amaçlar; bu kapsamda, ksenobiyotikler, dönüşüm ürünleri ve doğal olarak oluşan çözünen maddeler (örneğin, belirli enantiyomerler) gibi farklı kökenlere sahip hedef bileşenlerin araştırılması söz konusu olabilir. Hedef bileşenin varlığı öncelikle doğrulanmalı, ardından tercihen kütle spektrometrisi (MS) ile miktarlandırılması sağlanmalıdır. Kromatografi ile kütle spektrometrisinin birlikte kullanılması, gıda matrislerinde çok düşük konsantrasyonlardaki hedef bileşenlerin yüksek duyarlılıkla ve seçicilikle tespit edilmesine olanak tanır (Ştefanac ve ark., 2021). Bu sebeple, tandem MS (MS/MS), yüksek çözünürlüklü MS ve seçim izleme yaygın olarak kullanılmaktadır (Neagu ve ark., 2022). Numuneye özgü parmak izi oluşturulmasında ise, özellikle gıda otantisitesi ve kalite kontrolünde, ürünün kimyasal profilinin karakteristik bir izini çıkarmak için kullanılır ve bu yöntem, farklı gıda türlerinin veya coğrafi kökenlerin ayırt edilmesinde oldukça etkilidir (Liu ve ark., 2022). Örneğin, kavrulmuş bir kahve aroma profilinin parmak izi, coğrafi kökeni veya düşük maliyetli bir malzemenin (örneğin, Arabica kahvesindeki Robusta) varlığını ayırt etmek için yararlıdır (Strocchi ve ark., 2022). Bu tür çalışmalarda, çok sayıda örneği analiz etmek ve kemometrik yöntemler (yani, temel bileşen analizi) kullanmak gerekir. Dahası, bilgi açısından zayıf dedektörler kullanılabilir (örneğin, alev iyonizasyon dedektörü (FID)), çünkü analit tepkisinin yoğunluğu en değerli bilgidir. Bu nedenle, MS kullanımı arzu edilir olsa da zorunlu değildir (Tranchida ve ark., 2013). Gıda analizlerinde kromatografik yöntemlerle örneklerin taranması, bileşenlerin listelenmesi ve hedef bileşenlerin kantitatif analizleri yaygın olarak uygulanırken, karışımlardan tek bileşenli fraksiyonların preparatif ölçeklerde fraksiyonlanması ve saflaştırılması için geliştirilen prosedürler hâlen sınırlıdır (Tenório ve ak., 2022). Bu noktada, preparatif (hazırlayıcı) kromatografi, özellikle karmaşık gıda matrislerinden biyolojik olarak aktif bileşenlerin, doğal pigmentlerin, vitaminlerin ve lipidlerin yüksek saflıkta ve verimli şekilde izole edilmesi açısından kritik bir rol oynamaktadır (Ashaolu ve ark., 2025). Preparatif kromatografi, hem laboratuvar hem de endüstriyel ölçekte, hedef bileşenlerin yapısal bütünlüğünü koruyarak yüksek verimle saflaştırılmasını sağlar ve geleneksel yöntemlere kıyasla daha az solvent kullanımı, daha kısa işlem süresi ve daha yüksek ölçeklenebilirlik gibi avantajlar sunar (Luo ve ark., 2016). Preparatif kromatografinin gelişen uygulamaları, gıda bileşenlerinin izolasyonunda saflık, verim ve maliyet açısından optimum dengeyi sağlamada önemli bir potansiyel sunmaktadır.

Bu derleme kapsamında preparatif ve analitik İTK ve HPLC kromatografik ayırma yöntemlerini disiplinler arası bir bakış açısıyla ele alarak, bu tekniklerin temel esaslarını ve analiz süreçlerini ortaya koymak ve analitik kromatografiden farklılaştıkları yönlerle ilişkin bilgiler sunmak amaçlanmaktadır. Preparatif İTK ve HPLC kromatografi yöntemlerine yer verilmesinin temel gerekçesi, bu tekniklerin geniş uygulama alanlarına sahip

olması ve analitik kromatografiden farklı olarak hedef bileşiklerin yüksek saflıkta elde edilmesine olanak tanınmasıdır.

Analitik ve Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi: Prensipler ve Uygulamalar

Analitik İnce Tabaka Kromatografisi

Maddelerin kolay, hızlı, kesin taranması ve ucuz olması sebebiyle geleneksel ince tabaka kromatografisi (İTK), karmaşık numunelerin paralel analizi için iyi kurulmuş ideal bir ayırma tekniğidir. Son yıllarda, İTK ve görüntü analizinin birleşimi gıda ve diğer ilgili doğal ürünlerin bileşenlerinin tanımlanmasını kolaylaştırmıştır (Sereshti ve ark., 2018) ve İTK'nin yüzey destekli Raman spektroskopisi (Li ve ark., 2021), kütle spektrometrisi (Morlock ve Klingelhofer, 2014) ve nükleer manyetik rezonans (Azadnya ve ark., 2020) gibi tespit yöntemleriyle birleştirilmesi, gıda analizi için metodolojinin kullanılabilirliğini daha da artırmıştır. Bu etkili tespit yöntemleri sayesinde, gıda analizi ve kalite kontrolü için yaygın olarak kullanılmaktadır. Gıda bileşimi, katkı maddeleri (Schwanck ve ark., 2018; Vega, 2000), sahtecilik maddeleri (Villani ve ark., 2015), kirleticiler ve ayırma (Sun ve ark., 2017) alanlarında yapılan çok çeşitli İTK uygulamaları bildirilmiştir. Bu uygulamalar amino asitler, biyojenik aminler, lipitler, şekerler ve organik asitler gibi bileşik sınıflarının belirlenmesini de içermektedir (Sherma, 2019).

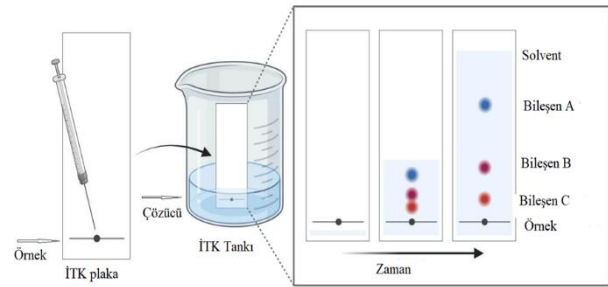
Bu geniş uygulama yelpazesi, İTK'nin temel çalışma prensipleriyle yakından ilişkilidir ve İTK sabit faz ile mobil fazdan oluşan bir sistemdir ve Şekil 1'de gösterilmiştir.

İTK'da sabit faz, genellikle cam, plastik veya alüminyum gibi inert bir plaka yüzeyi üzerine kaplanmış, silika jel veya alüminyum oksitten oluşan ince bir adsorban malzeme tabakasından oluşmaktadır.

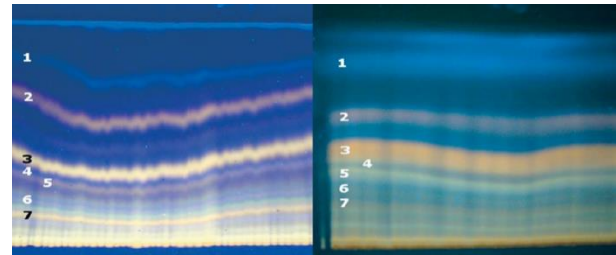
İTK'nin bileşenleri ayırma prensibi adsorbsiyondur. Ayrılacak materyalin polarite durumuna göre solvent seçimi yapılmaktadır (Colegate ve Molyneux, 2007; Hameed ve ark., 2023). Solventlerin gücü dielektrik sabitesine göre değişmektedir. Numune İTK plakasının bir ucuna damlatılır ve organik bir çözücü (hareketli faz) içeren kapalı bir bölme dikey olarak yerleştirilir. Hareketli faz kılcal kuvvetler vasıtasıyla plaka üzerinde yukarıya doğru hareket eder ve numune bileşenleri, sabit ve hareketli fazlar için farklı afinitelerine bağlı olarak değişen mesafelere geç eder. Çözücü plakanın tepesine ulaştığında plaka geliştirme odasından çıkarılır ve kurutulur. Ayrılan bileşenler plaka üzerinde noktalar halinde görünür ve her bileşeni alıkonma faktörü (*Retardation factor, R_f*) değerlendirilir. Geleneksel analitik İTK uygulaması seperasyon işlemi sırasında bileşiklerin hareketine göre tespit ve izlemesi yapılabilmektedir. İTK'da ayrılan maddelerin görünür hale getirilmesi işlemi fiziksel yöntem (UV ışınları (254-365 nm)) ve birçok farklı kimyasal (pH, ninhidrin, iyot çözeltisi vb.) yöntem kullanılabilmektedir (Nyireddy, 2004; Sarker ve ark., 2006; Colegate ve Molyneux, 2007; Yetim ve Çam, 2012).

İTK hızlı, basit ve nispeten düşük maliyetle yüksek hassasiyet sağlayabilmektedir. Reaksiyonun ilerleyişini izlenebilir ve bir karışımdaki bileşikler tanımlanabilir, saflığı belirlemek için tercih edilebilmektedir (Tiwari ve Talreja, 2022). İTK'nin gıda analizlerindeki yaygın

kullanımı, yöntemin pratikliği ve çok yönlülüğünden kaynaklıdır, bazı önemli sınırlamaları ve dezavantajları bulunmaktadır. Öncelikle, analitik İTK'nin çözünürlük kapasitesi sınırlı olduğundan, karmaşık gıda matrislerinde benzer özellikteki bileşenlerin tam olarak ayrılması her zaman mümkün olmayabilir. Ayrıca, düşük duyarlılık ve kantitatif analizdeki hassasiyet eksikliği, özellikle iz miktardaki bileşiklerin tespitinde sorun yaratabilir. Otomasyonun sınırlı olması ve sonuçların operatöre bağlı olarak değişkenlik göstermesi de yöntemin diğer dezavantajları arasındadır. Bu nedenlerle, yüksek saflıkta ve miktarda bileşik izolasyonu gerektiğinde analitik İTK yetersiz kalabilmektedir (Hussain ve ark., 2019; Akash ve Rehman, 2025). İşte bu noktada, daha kalın adsorban tabakası ve daha büyük numune kapasitesiyle çalışan preparatif İTK önerilmektedir. Preparatif İTK, özellikle doğal ürünlerin, biyolojik örneklerin veya gıda bileşenlerinin saflaştırılması ve izole edilmesinde, analitik yöntemin ötesinde avantajlar sunar; hedef bileşiklerin daha yüksek miktarda ve saflıkta elde edilmesini sağlayabilmektedir. Böylece, analitik İTK'nin sınırlamalarını aşmak ve daha ileri analizler için saf bileşikler elde etmek amacıyla preparatif İTK tercih edilmektedir ve analitik İTK ve PİTK kromatogram arasındaki farkın anlaşılması için örnek bir kromatogram görüntüsü Şekil 2.'de gösterilmiştir.



Şekil 1. İnce Tabaka Kromatografisinin (İTK) Bileşenleri
Figure 1. Components of Thin Layer Chromatography (TLC)



Şekil 2. Epicoccum nigrum i9b izolatından etanol:asetonitril (v/v) karışımı ile elde edilen ekstraktın bileşenlerinin analitik ince tabaka kromatografisi (İTK, sol) ve preparatif ince tabaka kromatografisi (PİTK, sağ) ile ayırma ait kromatogram görüntüleri (Kaliňák ve ark., 2013).

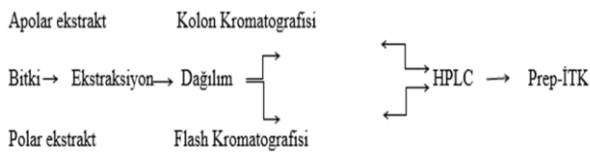
Figure 2. Chromatogram images of the separation of the components of the extract obtained with the ethanol:acetonitrile (v/v) mixture from the Epicoccum nigrum i9b isolate by analytical thin layer chromatography (TLC, left) and preparative thin layer chromatography (PTLC, right) (Kaliňák et al., 2013)

Preparatif ince tabaka kromatografisi

Preparatif ince tabaka kromatografisi (PİTK), analitik İTK'dan farklı olarak, daha büyük miktarlarda saf bileşik elde edilmesi gereken durumlarda öne çıkan etkili bir ayırma ve saflaştırma yöntemidir. Özellikle gaz kromatografisi, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography; HPLC), analitik İTK, görünür spektrometri, floresans spektrometri ve kızılötesi (infrared spectrometer; IR) spektrometrisi gibi ileri analizlerde kullanılacak saf bileşiklerin eldesinde PİTK sıklıkla tercih edilmektedir (Rabel ve Sherma, 2017). Bu teknik, özellikle bitkisel kaynaklı materyaller, gıdalar ve diğer doğal ürünlerden işaretleyici bileşiklerin veya biyoaktif maddelerin izolasyonu için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra PİTK'nin diğer kullanılma sebebi ise bileşenlerin fiziksel, kimyasal, farmakolojik veya biyolojik özelliklerinin araştırılması, analitik standartlarının elde edilmesi, ürünleri bir kimyasal reaksiyonda karakterize etmek ve bunları sentetik bir dizide ek reaksiyonlar için izole etmek gibi çeşitli analizlerde kullanmaktır (Rabel ve Sherma, 2017). PİTK çeşitli alanlarda sıklıkla kullanılmasının sebepleri arasında, karmaşık ve pahalı ekipman gerektirmemesi, laboratuvar ortamında kolayca uygulanabilmesi ve çoklu örneklerin aynı anda işlenebilmesi yer almaktadır.

PİTK'nin bu geniş kullanım alanları, uygulama prosedürlerinin de çeşitlenmesine yol açmakta; elde edilmek istenen saf bileşiğin türüne ve karışımın yapısına göre ayırma stratejileri ve işlem basamakları farklılık göstermektedir. Kullanım alanlarının çeşitliliği, PİTK prosedürünü doğrudan etkiler; bu nedenle, karışımların ayırılması için çeşitli basamaklar uygulanır. Bileşenlerin kimyasal yapısına bağlı olarak seçilen sabit faz, çözücü sistemi ve işlem adımları değişiklik gösterebilir (Kim ve ark., 2025). Özellikle üç veya daha fazla bileşenden oluşan karışımların ayrılmasında, Şekil 3'de gösterildiği gibi, birden fazla uygulama adımının dikkatlice planlanması gerekmektedir (Colegate ve Molyneux, 2007).

PİTK, farklı sabit fazlar ve çözücü sistemleri kullanılarak, karışık örneklerdeki bileşenlerin etkin şekilde ayrılmasını sağlar ve bu süreçte her bir bileşenin fizikokimyasal özellikleri göz önünde bulundurulur. Ayrıca, çok bileşenli karışımların ayrılmasında iki boyutlu veya çok boyutlu İTK gibi gelişmiş teknikler de kullanılabilir ve bu yöntemler, özellikle benzer özellikteki bileşenlerin ayrımında avantaj sağlar. Sonuç olarak, PİTK prosedürünün başarısı, karışımdaki bileşenlerin özelliklerine uygun sabit faz, çözücü ve işlem adımlarının seçilmesine bağlıdır (Sherma & Fried, 2003). Bu çerçevede, PİTK'nin temel prensipleri ve uygulama adımları aşağıda ayrıntılı olarak ele alınmıştır.



Şekil 3. Preparatif ince tabaka kromatografi prosedürü (Colegate ve Molyneux, 2007)

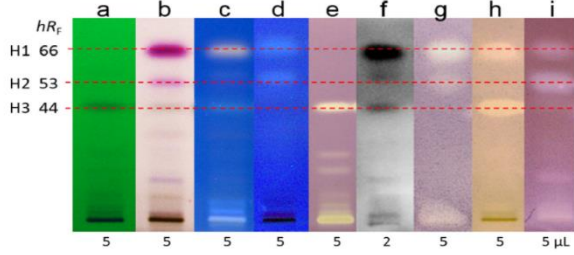
Figure 3. Preparative thin layer chromatography procedure (Colegate and Molyneux, 2007)

PİTK temel prensibi, karışım halindeki bileşenlerin kalın bir adsorban tabakası üzerinde uygun bir mobil faz yardımıyla ayrılması ve hedef bileşiğin izole edilmesidir. PİTK'de kullanılan kromatografi plakalarının boyutları genellikle 20x20 cm veya 20x40 cm arasında değişmekte olup, bu plakalar 0.5 ila 10 mm kalınlığında adsorban tabakasıyla kaplanmaktadır; en yaygın tercih edilen kalınlık ise 1.0 ila 2.0 mm'dir. Bu yapı sayesinde, PİTK mikrogramdan grama kadar değişen miktarlarda bileşiğin etkin şekilde ayrılmasını ve izole edilmesini mümkün kılar. Ölçek büyüme, katmanın kalınlığının artırılması ve numune uygulaması için kullanılan plaka uzunluğunun artırılmasıyla elde edilir (Józwiak ve ark., 2016). Kama biçimli, gradyan kalınlıkta katmanlar kullanılarak çözünürlük önemli ölçüde artırılabilir. Bu katmanlar, altta 0.3 mm'den üstte 1.7 mm'ye kadar eşit bir kalınlığa sahiptir (Sherma ve Fried, 2003). Tabaka kalınlığındaki artış, ayırma kapasitesini artırırken, ayırma kalitesinde bir miktar azalmaya yol açabilir. PİTK plakalarının yükleme kapasitesi, tabaka kalınlığının kareköküyle orantılı olarak artar ve bu nedenle yüksek miktarda örnek işlenmesi gereken uygulamalarda avantaj sağlamaktadır (Bobbitt ve Kirchner, 2013). Günümüzde, 0.5–2 mm kalınlığında, tekrarlanabilirliği yüksek ve ticari olarak temin edilebilen hazır PİTK plakaları, manuel üretim plakalara kıyasla daha tutarlı sonuçlar sunmakta ve tercih edilmektedir.

Plaka ve adsorban özelliklerinin yanı sıra, PİTK uygulamasında başarılı bir ayırma ve izolasyon için mobil faz seçimi ve numune uygulama adımları da büyük önem taşımaktadır. Adsorbanların partikül boyutları, geleneksel İTK plakalarına benzer olduğundan, analitik İTK'da kullanılan çözücüler doğrudan PİTK uygulamalarına aktarılabilir. Elüent seçimi ise genellikle analitik İTK'da yapılan ön araştırmalar sonucunda belirlenir ve Stahl'ın (1967) İTK üzerine yaptığı standart referans çalışması, birçok farklı bileşik sınıfı için geniş bir çözücü sistemi seçeneği sunar.

Mobil faz optimizasyonunda, Snyder (1967)'in çözücü seçicilik üçgenine dayanan "PRISMA" modeli gibi sistematik yöntemler kullanılabilir ve bu model, farklı bileşiklerin ayrımında uygun çözücü kombinasyonlarının belirlenmesine yardımcı olur. Adsorban ve elüent seçimi tamamlandıktan sonra, numune uygulaması PİTK için kritik bir adımdır; yanlış uygulama, ayırmanın etkinliğini olumsuz etkileyebilir. Plakaların önceden yıkanması, bileşiklerin sorbennten çıkarılması sırasında geri kazanılabilecek safsızlıkları en aza indirir. Numune genellikle uçucu bir çözücü (örneğin heksan, diklorometan veya etil asetat) içinde %5 ila %10'luk bir çözelti olarak hazırlanır ve her bir milimetre tabaka kalınlığı için yaklaşık 5 mg/cm olacak şekilde, tabakanın bir kenarı boyunca bant şeklinde uygulanır (Sarker ve ark., 2006). Numune uygulaması elle (şırınga veya pipet) ya da otomatik aplikatörlerle gerçekleştirilebilir. Plaka uygulama sonrası kurutulur ve seçilen çözücü ile ayrıştırılır. PİTK, özellikle tarama analizleri için uygun bir yöntem olup, örnek bir PİTK kromatogramı Şekil 4.'de gösterilmiştir.

Tüm bu teknik detayların yanında, PİTK'nin pratik avantajları ve bazı sınırlamaları da yöntemin tercih edilmesinde belirleyici olmaktadır. PİTK, temel ve ekonomik bir ayırma tekniği olarak öne çıkmaktadır. Ekipman gereksiniminin minimal olması ve operasyonel becerilerin kolayca öğrenilip uygulanabilmesi, yöntemin pratikliğini artırmaktadır (Kim ve ark., 2025).



Şekil 4. Ayçiçeği yaprağı özünden elde edilen biyoaktif bileşiklerin (a-i) UV 254 nm’de PİTK kromatogram görüntüsü (Móriczve ark., 2018)

Figure 4. UV 254 nm PTK chromatogram image of bioactive compounds obtained from sunflower leaf extract (a-i) (Móricz et al., 2018).

Az miktarda çözücü kullanımı, analitik İTK ile parametrelerin önceden tahmin edilebilmesi, çoklu geliştirme imkânı sayesinde daha keskin ayrımlar elde edilebilmesi, katman üzerinde doğrudan algılama yapılabilmesi, ayrılmış bölgelerin plakadan kolayca çıkarılabilmesi ve referans bileşiklerinin eş zamanlı olarak aynı koşullarda çalıştırılabilmesi PİTK’nin başlıca avantajları arasında yer almaktadır (Kim ve ark., 2025). Bununla birlikte, katman yüzeyindeki bileşiklerin hava ve ışıkla temas ettiğinde kararsız bileşiklere dönüşebilmesi ve geri kazanılan bileşiklerde ekstrakte edilen katmandan kaynaklanan yabancı maddeler veya ince emici parçacıkların bulunabilmesi PİTK’nin olası dezavantajlarıdır. PİTK izolasyon yöntemi, özellikle doğal ürünler üzerinde çalışan araştırmacılar tarafından yaygın olarak tercih edilmektedir; bu tercih, yöntemin doğal bileşiklerin çözünürlüğünü artırması, yüksek tekrarlanabilirlik ve verimlilik sunması gibi avantajlara dayanmaktadır (Kim ve ark.,2025). Bu bilgiler ışığında, literatürde PİTK ile çeşitli doğal ürünlerden izole edilen bileşiklere ait çalışma koşulları Çizelge 1’de özetlenmiştir.

Analitik ve Preparatif Sıvı- Sıvı Kromatografisi: Prensipler ve Uygulamalar

Analitik Sıvı sıvı Kromatografisi

Sıvı-sıvı kromatografisi bütün sıvı kromatografi teknikleri arasında en yaygın olarak kullanılan dağılıma kromatografisidir (Colegate ve Molyneux, 2007). Sıvı-sıvı kromatografisi, karşı akım kromatografisi veya santrifüjlü bölme kromatografisi olarak da bilinir ve kanıtlanmış yüksek yüklem kapasitesine sahip, çok sayıda çözücü sistemiyle çalışan ve dolayısıyla geniş bir polarite ve seçicilik aralığına sahip bir tekniktir. Sabit fazın sıvı yapısı, numune denatürasyonunu ve geri dönüşümsüz adsorpsiyonu önleyerek yüksek numune geri kazanımı sağlar (Marlot ve Faure, 2017).

Bu teknikte birbirine karışmayan sıvı fazlar arasında durgun sıvı ile çözücü arasındaki dağılım oranına göre seperasyon sağlanır (Snyder ve ark., 2011). Sıvı –sıvı kromatografisi’deki kolon, sarmal bir tüp yapısına (hidrodinamik karşı akım kromatografisi, (hydrodynamic countercurrent chromatography, CCC)) sahip olabilir veya kanallarla seri olarak bağlanmış çok sayıda küçük bölmeden (hidrostatik santrifüjlü bölme kromatografisi, (hydrostatic centrifugal partition chromatography, CPC)) oluşabilir. Sıvı –sıvı kromatografisi kolonu bir rotor üzerine

monte edilir ve dönerek santrifüjlü bir alana maruz bırakılır, bu da sabit fazın hareketsiz kalmasını sağlarken hareketli fazın içinden pompalanmasını sağlar. Hareketli ve sabit fazlar, genellikle 3 veya 4 çözücünden oluşan iki fazlı bir çözücü sisteminin önceden dengelenmiş iki fazıdır ve ayırma farklı dağılım katsayıları tarafından belirlenir. Çözücü sisteminin her iki fazı da sabit faz olarak kullanılabilir ve fazların rolleri bir ayırma çalışması sırasında değiştirilebilir. Sıvı-sıvı kromatografisi ‘nin bu benzersiz özelliği, standart izokratik parti enjeksiyonlarının ötesinde çok sayıda çalışma modunun geliştirilmesine yol açmıştır; bunların çoğu, katı sabit fazlı geleneksel kromatografisi teknikleri kullanılarak gerçekleştirilemez. Mevcut cihazın çalışma modlarının çeşitliliği, sıvı-sıvı kromatografisiyi farklı numune tiplerine ve ayırma görevlerine oldukça uyumlu hale getirir. Teknik, örneğin dar veya geniş polarite aralıklarına sahip karışımların ayrılmasına uygulanabilir, hedefli ayırma veya numune taraması için kullanılabilir ve kesikli veya sürekli bir işlem olarak uygulanabilir. Bununla birlikte, belirli bir ayırma görevi için en uygun çalışma modunun ve buna eşlik eden çalışma parametrelerinin seçimi, deneysel bir deneme-yanılma yaklaşımı kullanıldığında zaman alıcı bir zorluk oluşturabilir (Morley ve Minceva, 2020).

Sıvı kromatografisi günümüzde yaygın olarak uygulanan analitik yöntem haline gelmiştir. Küçük moleküller ve malzemelerin analizi için spektroskopik ve diğer teknikler de dahil olmak üzere çeşitli alternatifler mevcut olsa da sıvı kromatografisi modern yaşam bilimlerinin sınırlarının çözülmesinde giderek daha önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca sıvı kromatografisi, preparatif ve proses uygulamalarının yanı sıra analitik uygulamalarda da eşit performans sunar tek yöntemdir. Analitik bir yöntem olarak sıvı kromatografisinin gelişimi tartışılırken, sıvı kromatografisinin ilk saflaştırma yöntemi olarak uygulandığı ve dolayısıyla bir preparatif yöntem olarak başladığı sıklıkla gözden kaçırılır (Conway, 1990; Berthod, 2002; Pauli ve ark., 2008).

Karşı akım kromatografisi

Karşı akım kromatografisi hem hareketli hem de sabit fazların sıvı olduğu bir sıvı-sıvı bölme kromatografisi işlemidir. Desteksiz bir sıvı-sıvı bölme kromatografisi tekniği olan yüksek hızlı karşı akım kromatografisi numunenin katı desteklerden kaynaklanan adsorptif numune kaybı, deaktivasyon, çözünen piklerin kuyruklanması ve kirlenme gibi bazı komplikasyonları ortadan kaldırır. Yöntem, çeşitli doğal ürünlerin analizinde ve ayrılmasında başarıyla uygulanmıştır. Bugüne kadar karşı akım kromatografisi biyoaktif makromoleküller, sentetik ürünlerin izolasyonu ve saflaştırılması için başarıyla uygulanmıştır (Huang ve ark., 2018). Tarihsel olarak, karşı akım kromatografisi tekniği, 1970’lerin başında Yoichiro Ito, (1971) tarafından Craig’in karşı akım dağıtım yöntemine dayanan hidrostatik aletler santrifüjlü bölme kromatografisi (Centrifugal partition chromatography: CPC) adı altında (Bojczuk ve ark., 2017) ve hidrodinamik aletlerde ise genellikle kolondaki sabit fazı tutmak için helezon bir bobindeki Arşimet vidası kuvvetine dayanan yüksek hızlı veya yüksek performanslı karşı akım kromatografisi (high-speed or high-performance counter current chromatography (HSCCC and HPCCC respectively) aletleri olarak piyasaya sürdü.

Çizelge 1. Literatürde bazı bitkilerden bileşen izolasyonu sırasında uygulanan PİTK'nin koşulları
Table 1. Conditions of PİTK applied during the isolation of components from some plants in the literature

Doğal Ürün	Bileşen	Yöntem	Kaynak
<i>Garciniamangostana</i> perikarp	4 fraksiyon	Silika jel G60 eluent: hekzan: etil asetat (6: 4)	Nugroho ve ark., 2020.
<i>Potentilla Türleri</i>	Antibakteriyel bileşikler	0.5 mm silika tabakası eluent: kloroform, dietil eter, metanol, formik asit (30:10:1:0.2 v ^{v-1})	Józwiak ve ark., 2016.
<i>Cordia Macleodii</i> , <i>Cordia Dichotoma</i> ve <i>Cordia Rothi</i> kabukları	Flavonoid, Kuersetin, Kaempferol Apigenin	Eluent: toluen-etil asetat-GAA- formik asidin (5: 5: 0.5: 1) Ultraviyole (UV) dansimetre 254nm	Nariya ve ark., 2017.
<i>Albizia Grandibracteata</i> , <i>Albizia gummifera</i> , <i>Albizia lebbeck</i> , <i>Albizia schimperiana</i> , <i>Acaciaet balik</i> , <i>Robinia pseudoacacia</i>	Glikosilseramidler	Solvent:n-heksan, kloroform, etil asetat, metanol	Reisberg ve ark., 2017.
<i>Phaeodac tylumtricornutum</i>	Fukoksantin, Diadinoksantindiat Oksantin	Santrifüj İTK, silica jel 60 solvent: methanol:su:NH ₃ (90:10:0.0012)	Tokarek ve ark., 2016.
<i>Elaeocarpus variabilis</i>	Kuersetin	PİTK Silica jel 60 Solvent: Toluen/ Etil Asetat/ Formik Asit (54.35/43.48/2.17, v/v/v) UV 366 nm	Anusiya ve ark., 2020.
Ayçiçeği yaprakları		Solvent:n-hekzan– izopropil asetat – asetik asit (80:19:1, v/v) UV 254 nm	Móricz ve ark., 2018.
<i>Tetragonula fuscobalteata</i> <i>Cameron</i> , <i>Tetragonula laeviceps</i> <i>Smith</i> , <i>Tetragonula pagdeni</i> <i>Schwarz</i> ve <i>Lepidotrigona ventralis</i> <i>Smith bees' propolis</i>	α - mangostins γ -mangostins	PİTK silica jel 60 F254 tabaka, solvent: toluen/etil asetat/formik asit (8:2:0.1, v/v/v)	Chewchinda ve Vongsak, 2019.
<i>Seaparsley</i> , <i>Lemonmyrtle</i> <i>Nativehyme</i> , <i>Saltbush</i> <i>Seablite</i>	Antioksidan	PİTK plaka Solvent: n-heksan, etil asetat ve asetik asit (20:10:1 v/v/v)	Agatonovic-Kustrin ve ark., 2020.
<i>Schisandra chinensis</i> fruits	Organik asitler	Micro PİTK plakasına (silika jel F25410 × 20 cm) etil asetat: metanol: su (70:20:10)	Sobstyl ve ark., 2020
Sızma zeytinyağ	Oleokanthalik asit	PİTK (Silika jel) hekzan:etil asetat (4:6)	Salsano ve ark., 2022
Yer fıstığı, mısır, pirinç, buğday ve kümes hayvanı yemi örnekleri	AFB1, Aflatoxin B1; AFB2, Aflatoxin B2; AFG1, Aflatoxin G1; AFG2, Aflatoxin G2	2,5 × 20 cm ölçülerinde 0,2 kalınlığında silika jel kaplı alüminyum levha Asetonitril, aseton, Toluene, Diklorometan	Salisusu ve ark., 2022
Buğday	Ergosterol	PİTK cam plakalar (silika+indikatör, 1 mm 254; 20 × 20 cm) etil asetat: petrol eteri (6: 4 v/v)	Ibrahim ve ark., 2022
Karides (<i>Pandalus borealis</i>)	Heterosiklik fenolik bileşikler	PİTK (Silika jel), Metanol	Onodenalore ve ark., 2024

Helisel sarmal tüpün, birincil model, tip I, tip II, eksantrik çoklu katman, yüksek hızlı, çapraz eksenli karşı akım dağıtımı ve düşük hızlı dahil olmak üzere birçok farklı kolonların kullanılmasının olumlu olduğu ve hatta yakın zamanda geliştirilen yüksek performanslı karşı akım kromatografisinin devrimli olduğu bulunmuştur (Liang ve ark., 2015).

Bu teknikte sıvı sıvı ekstraksiyonunun otomatikleştirilmiş bir versiyonudur ve bir analitin bir ayırma hunisinde kuvvetli bir şekilde karıştırılarak iki

karışmaz faz arasında tekrar tekrar bölünmesine benzetilmektedir (Berthod ve ark., 2009). Destek katısı üzerine kaplanan bir sıvı sabit fazı oluşturur, diğer sıvı da hareketli fazı oluşturur. Durgun fazda çözünürlüğü yüksek olan bileşenler kolonda uzun süre kalırken, çözünürlüğü düşük olanlar daha kısa süre kalır. Sabit faz ayrılacak bileşen için iyi bir çözücü, fakat hareketli faz için kötü bir çözücüdür ve iki fazın polarlıkları farklı olmalıdır. Hareketli fazın durgun fazdan daha az polar olduğu sistemlere normal faz kromatografisi (normal phase

chromatography); tersi duruma ters faz kromatografi (reversed-phase liquid chromatography) denir (Meng ve ark., 2014). Fiziksel olarak destek katısı üzerine tutturulmuş durgun sıvı, taşıyıcı sıvı tarafından kolayca sürüklenip götürülebilir (kolon kanaması (column bleed)) ve destek katısı üzerindeki durgun fazın miktarı zamanla değişir. Böylece kolonlarla yapılan ayırmaların, tekrarlanabilirliği az olmakta ve kolon kısa zamanda işe yaramaz duruma gelmektedir. Bunu önlemek için sabit faz katı destek üzerine kimyasal olarak bağlanmaktadır. Böylece kolonların ömrü uzun olmakta ve tekrarlanabilir ayırmalar gerçekleşmektedir (Colegate ve Molyneux 2007).

Modern karşı akım kromatografi aparatı hidrodinamik ve hidrostatik denge sistemleri olmak üzere iki ana kategoriye ayrılabilir. Hidrodinamik sistemin iki dönme eksenidir. Bunlar; ana eksen ve bobinler üzerine sarılmış sürekli açık borulara uygulanan değişken bir merkezkaç kuvveti alanı oluşturan bir gezegen hareketi oluşturan bir sistemdir. Bugün bu teknik, yüksek hızlı karşı akım kromatografisi (high-speed countercurrent chromatography (HSCCC) olarak bilinir (Huang ve ark., 2018). Hidrostatik sistemin kullanımı kolonun, kılcal boru ile birbirine bağlanan küçük elüsyon odaları ile karakterize edildiği yalnızca tek bir eksen etrafında dönme ile santrifüjlü bölme kromatografisine özgüdür (Conway, 2011). Ek olarak karşı akım kromatografisi belirli bir kromatografik işlem sırasında akış yönünü tersine çevirme, mobil ve sabit fazları değiştirme kabiliyeti nedeniyle çok yönlü bir kromatografik tekniktir. Yüksek hızlı karşı akım kromatografisinde katı bir destek yoktur ve gezegensel harekette dönmeye sınırlanmış çok katmanlı sarmal boru bobinlerinin özel hareketi nedeniyle sıvı durağan faz mobil fazın akışına karşı korunur (Neves Costa ve Leitão, 2010). Bu nedenle karşı akım kromatografisi, geleneksel katı likit kromatografisine kıyasla büyük avantajlar sağlamaktadır (Snyder ve ark., 2011). Ham ekstraktlar seperasyondan önce kolaylıkla tek bir aşmada fraksiyonlarına ayrılabilen ve verilen numunenin kantitatif geri kazanımı numune denatürasyon riskini büyük ölçüde azalabilmektedir. Alıkonma hacimleri basit bir formül kullanılarak hesaplanabilir, ekonomik, yüksek kapasite, düşük solvent tüketimi ve esnek elüsyon modları sayesinde mükemmel bir preparatif ayırma aracıdır. Diğer bir avantajı da yüksek kapasite ve iki fazlı solvent sistemine benzer normal veya ters fazlı elüsyon modu uygulayabilen sistemlerdir (Berthod ve ark., 2009).

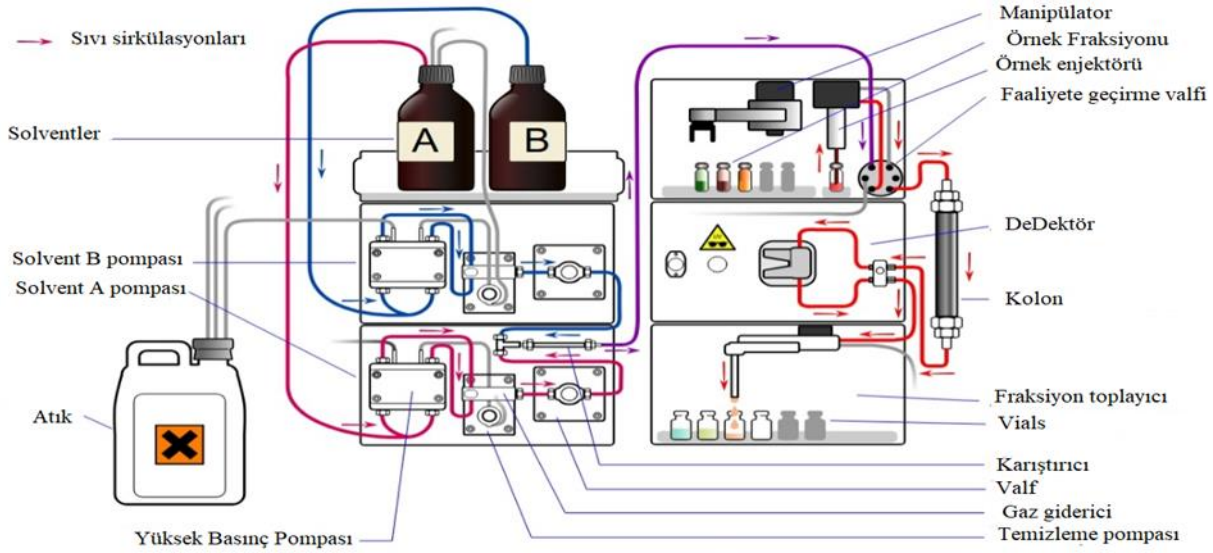
Sonuç olarak, yöntem, doğal ürünlerin ham özütlerden preparatif ayrılması için idealdir. Yukarıdaki avantajları nedeniyle preparatif yüksek hızlı karşı akım kromatografisi, son zamanlarda yapılan çalışmaların bazıları incelendiğinde farmakolojik ilaçları (Steinebach ve ark., 2016) kiral bileşikler (Huang ve ark., 2018) ve üzüm çekirdeklerinden pro-antosiyeninlerin polimerizasyon derecelerine göre ayrıştırılması (Zhang ve ark., 2017), *Lycium Barbarum L.* Meyvelerinden zeaksantin dipalmitat bileşenin saflaştırılmasında (Kan ve ark., 2020), beyaz üzüm kabuğundan polifenollerin ayrıştırılması (Luo ve ark., 2016), soya fasulyesinden izoflavon aglikonlarının verimli biyotransformasyonu (Wang ve ark., 2019) kırmızı şarap ekstraktlarından

polifenollerin ayrıştırılması (Live ark., 2017), tıbbi bitkilerden ve mikroalglerden bileşiklerin izolasyonunda (Fábryová ve ark., 2020) ayırmak için güçlü bir preparatif yöntem olarak kabul edilmiştir. Enstrümanın ve teknolojinin gelişmesiyle birlikte, karşı akım kromatografisi tarafından doğal ürünlerin kimyasal bileşenleri ayırma dikkat çekmekle birlikte ve diğer alanlarda da daha aktif bir rol oynamaktadır (Huang ve ark., 2018).

Preparatif yüksek performanslı sıvı kromatografisi

Gıda endüstrisinde preparatif yüksek performanslı sıvı kromatografisine (HPLC) olan ilgi ve yöntem geliştirme çalışmalarını artırmaktadır. Bu artan ilginin temelinde, özellikle bitki dokularından biyoaktif fenolik bileşiklerin büyük miktarlarda ayrılması için uygun ve etkili yöntemlerin seçiminin bilim camiasında her zaman kritik bir sorun olarak öne çıkması yatmaktadır. Polifenollerin izolasyonunda yaygın olarak kullanılan sıvı-sıvı ekstraksiyonu (Sun, Ferrão ve Spranger, 2003; Sun ve ark., 2006), ince tabaka kromatografisi (Jesionek, Majer-Dziedzic ve Choma, 2015), kolon kromatografisi (Lu ve Foo, 1999; Sun, Belchior, Ricardo-da-Silva ve Spranger, 1999) ve HPLC (Ignat, Volf ve Popa, 2011) gibi geleneksel ayırma yöntemlerinin ise zaman alıcı olması, ikincil kirlilik oluşturmaması, karmaşık işlem basamakları, düşük verim ve yüksek maliyet gibi önemli dezavantajları bulunmaktadır. Bu nedenle, gıda endüstrisinde ve bilimsel araştırmalarda, daha hızlı, verimli ve ekonomik saflaştırma yöntemlerine olan ihtiyaç giderek artmaktadır. Preparatif yüksek performanslı sıvı kromatografisi (preparative high-performance liquid chromatography (prep-HPLC), çözünen maddelerin iki karışmayan faz arasında bölündüğü destekleyici bir serbest sıvı-sıvı bölme sistemi olup, yüksek çözünen yükleme kapasitesi, yüksek geri kazanım, yüksek tekrarlanabilirlik ve düşük çözücü tüketimi gibi çeşitli avantajlar sunar (Ola ve ark., 2009). Ayrıca, bu teknik, geri dönüşümsüz adsorptif numune kaybı ve deaktivasyonu, çözünen piklerinin birikmesi ve kirlenme gibi katı destek matrisinden kaynaklanan komplikasyonları ortadan kaldırarak geleneksel yöntemlere göre büyük bir avantaja sahiptir (Mullen ve ark., 2002). Bu avantajlar, özellikle gıda endüstrisinde saflaştırma süreçlerinin verimliliğini artırmak açısından büyük önem taşımaktadır. Ekonomik değeri yüksek maddelerin ayrılması ve saflaştırılması amacıyla biyokimya ve ilaç sanayi başta olmak üzere pek çok sektörde yaygın biçimde kullanılmakta olan prep-HPLC tekniği kromatografik uygulamaların temel çıkış noktasını temsil eden ve analitik kromatografinin gelişmesi ile yaygın olarak kullanılan bir yöntem haline gelmiştir (Arslan ve ark., 2017).

Hazırlayıcı sıvı kromatografisi, bileşiklerin bir kromatografik kolon ile etkileşimlerine dayalı olarak ayrılması ve saflaştırılması için tasarlanmış bir tekniktir. Yüksek saflığın gerekli olduğu kimya ve biyoloji gibi alanlarda yaygın olarak uygulanır. Sistem, bir solvent rezervuarı, yüksek basınç pompası, enjektör, hazırlayıcı kolon, dedektör ve fraksiyon toplayıcı dahil olmak üzere çeşitli bileşenler içerir ve bileşenlere ait görsel Şekil 5'de gösterilmiştir.



Şekil 5. Preparatif (Hazırlayıcı) HPLC bileşenleri
Figure 5. Preparative HPLC components

Çizelge 2. Analitik, preparatif ve yarı preparatif HPLC tekniklerinin parametreleri (Miliauskas ve ark., 2006)
Table 2. Parameters of analytical, preparative and semi-preparative HPLC techniques (Miliauskas et al., 2006)

Parametre	Analitik	Yarı-Preparatif	Preparatif
Örnek Toplama	Numune dedektörden atığa gidiyor	Numune dedektörden fraksiyon toplayıcıya gider	Numune dedektörden fraksiyon toplayıcıya gider
Kolon Büyüklüğü	120-250 × 2-4.6 mm	120-250 × 8-16 mm	120-250 × 20-62 mm
Partikül Büyüklüğü	>5 µm	5-10 µm	>10 µm
Sabi Faz	>5 g	5-30 g	50-450 g
Akış hızları	0,1-2 ml/min	5-50 mlmin ⁻¹	100-1000 ml min ⁻¹
Örnek Büyüklüğü	0,01-2 mg	0,1-50 mg	1-700 mg

Prep-HPLC tekniğinde analiz sırasında kullanılan akış hızı, kolon uzunluğu, dolgu maddesi, partikül büyüklüğü, kolon çapı gibi faktörler bakımından analitik HPLC tekniğine göre çok daha geniş bir skalaya sahiptir. Preparatif HPLC tekniği uygulama amacına ve saflaştırılacak türün miktarına göre farklı şekillerde isimlendirilmekte (yarı-preparatif, preparatif, pilot, proses) ve bu tekniklerde kullanılan kolon ebatı, kolon uzunluğu gibi deneysel faktörlerin özellikleri değişiklik göstermektedir (Arslan ve ark., 2017). Çizelge 2.'de analitik, preparatif ve yarı preparatif HPLC tekniklerinin karşılaştırılması verilmiştir.

Bu teknik ve operasyonel farklılıklar, analitik ve preparatif HPLC'nin uygulama amaçlarını ve analiz sonrası numune yönetimini de belirgin şekilde ayırmaktadır. Analitik HPLC sistemi ile preparatif HPLC sistemi temelde benzer bileşenlerden oluşur; ancak aralarındaki temel fark, preparatif HPLC'de sabit fazın, partikül büyüklüğünün ve kolon çapı ile uzunluğu gibi bazı ekipmanların daha büyük olmasıdır.

HPLC'nin tercih edilme amacı, hedef moleküllerin gelecekte kullanılmak üzere, numunedeki diğer tüm kirleticilerden en yüksek verim ve saflıkla, maliyet etkin şekilde ve yeterli miktarda izole edilmesidir (Xia ve ark., 2023). Bu amaç, araştırma için saf bileşik elde etmekten, gıda takviyesi, farmasötik veya biyoterapötik ürünlerin üretimine kadar geniş bir yelpazede değerlendirilebilir. Saflaştırılacak materyaller ise fermantasyon sıvıları gibi

basit karışımlardan, doğal ürünler gibi daha karmaşık matrislere kadar değişkenlik gösterebilir. Analitik HPLC genellikle bileşiklerin tanımlanması ve miktar tayini için kullanılırken, preparatif HPLC daha büyük ölçekli saflaştırma işlemlerinde tercih edilir ve kolon kapasitesi ile yükleme miktarı çok daha fazladır. Ayrıca, preparatif HPLC'de fraksiyon toplama ve otomasyon gibi ek donanımlar bulunabilir. Sonuç olarak, iki sistemin temel farkı, ölçek ve uygulama amacından kaynaklanmakta olup, her ikisi de yüksek seçicilik ve verimlilik sunmaktadır. Bu temel farklılıklar, her iki sistemin analiz sürecindeki işlevlerini ve numune yönetimini de doğrudan etkilemektedir.

Analitik HPLC'de, numune karışımındaki bileşiklerin elde edilen kromatogramı bilinen bir bileşik ile karşılaştırılarak tanımlanması ve alıkonma zamanlarının izlenmesi esas alınır (Huber ve Majors, 2007). Preparatif HPLC'de ise bileşik veya molekül fraksiyonunuzu saflaştırmak ve toplamak olduğundan analiz sonunda numunenin toplanması gereklidir. Ancak analitik HPLC'de çalışma prensibinde kalitatif ve kantitatif analiz olduğu için analitik HPLC'de numunenin geri kalanı basitçe atığa veya kütle spektrometresi veya yüklü aerosol dedektörü gibi yıkıcı bir detektöre yönlendirilir (Huber ve Majors, 2007). Preparatif likit kromatografisi genellikle verimin önemli olmasından dolayı numune hacimlerinde farklılıklara neden olur. Bu durumda laboratuvar ölçeğinde miligram ile gram aralığındaki bileşikler saflaştırılabilmek

için numune hacmi (ml-Lt) oldukça büyük kullanılmaktadır. Analitik likit kromatografisinde numune hacimleri (birkaç mikrolitre veya daha az) küçük olma eğilimindedir (Huber ve Majors, 2007). Preparatif HPLC sistemlerinde saf olarak izole edilecek ürün miktarı, örneklerin niteliğine ve sayısına bağlı olarak değişkenlik gösterir. Yarı preparatif ve preparatif uygulamalarda, daha büyük kolonlar kullanılarak yüksek hacimli ve büyük ölçekli ayırmalar gerçekleştirilebilir. Analitik ve preparatif likit kromatografisi arasındaki en belirgin farklardan biri, sistemde oluşan geri basınçlardır. Analitik HPLC’de, küçük kolon çapları ve partikül boyutları ile nispeten yüksek akış hızları kullanıldığında, sistemde oluşan karşı basınçlar genellikle 100-1500 bar arasında değişebilir ve bu nedenle sistemin ve pompaların bu yüksek basınca dayanıklı olması gerekir. Buna karşılık, preparatif HPLC’de daha büyük kolon çapları ve partikül boyutları tercih edildiğinden, sistemde oluşan geri basınçlar

genellikle çok daha düşüktür ve çoğunlukla 10 bar ve altındadır (Plumb ve ark., 2007). Bu düşük basınçlar, preparatif sistemlerin daha büyük hacimli örnekleri işleyebilmesine ve uzun süreli çalışmalarda sistemin güvenilirliğinin artmasına olanak tanır. Ayrıca, kullanılan ek modüller ve otomasyon düzeyi de analitik ve preparatif likit kromatografi sistemlerinde önemli ölçüde farklılık göstermektedir. Başlangıçta belirtildiği gibi, preparatif likit kromatografisinin temel amacı molekülleri saflaştırmak ve toplamak olduğundan, bu sistemlerde fraksiyon toplayıcılar standart bir modül olarak yer alır. Buna karşılık, analitik likit kromatografisinde fraksiyon toplayıcı kullanımı yaygın değildir ve genellikle yalnızca özel uygulamalarda tercih edilir. Preparatif sistemlerde, numune sayısı az ancak hacimleri büyük olduğundan, numune enjeksiyonu çoğunlukla bir numune halkası veya peristaltik pompa ile manuel olarak gerçekleştirilir (Xiu-Man ve ark., 2016).

Çizelge 3. Literatürde bazı doğal ürünlerden bileşen izolasyonu sırasında uygulanan prep-HPLC koşulları

Table 3. Prep-HPLC conditions applied during the isolation of components from some natural products in the literature

Gıda Ürünü / Kaynak	İzole Edilen Hedef Bileşik(ler)	Preparatif HPLC Koşulları (Solvent, Akış Hızı, vb.)	Kaynak
Keten tohumu yağı	Siklolinopeptitler (linosorblar)	Mobil Faz: %40’lık asetonitril/su, ve %80’lik bir son asetonitril, Kolon: Kinetex® Phenyl-hexyl column (250 mm × 21.2 mm, 5 µm Akış Hızı:16 mL/dakika Dedektör: PDA detector	Liu ve ark., 2021
Ganoderma amboinense (Mantar)	Asetilkolinesteraz inhibitörleri Ganoderik asitler I, C, G, B, K, A, D, F,	Yarı preparatif HPLC Mobil Faz: n-hekzan: etil asetat: metanol: su (4.0:6.0:4.0:6.0, h/h/h/h), 25–60% A (0–50 dk), 60–100% A Akış hızı: 0.6 mL/min Dedektör: PDA dedektörü (270 nm)	Hou ve ark., 2024
Curcuma longa özütleri (Zerdeçal)	Kurkuminoidler (kurkumin, demetoksi...)	Mobil Faz: Asetonitril-fosfat (54:46 v/v, 0,1 mM) Kolon: C18 column { 150 mm × 4.6 mm, 5 µM (meter) Akış hızı: 1,0 mL/dak akış hızı, Dedektör:UV/Vis dedektörü (385 nm)	Mohammed ve ark., 2024
Üzüm kabuğu	Gallik asit, prosiyanidin B2-3-O-gallat,	Mobil Faz: Su:formik asit; 99,8:0,2, v/v) ve (asetonitril: formik asit; 99,8:0,2, v/v Kolon: YMC-Pack ODS-A (250 10mm, 5 lm) ve sıcaklık 30°C. Akış hızı: 3.0ml/min, Dedektör: UV/Vis dedektörü	Luo ve ark., 2016
Malus pumila Mill. yaprağı	Polifenoller (floridzin, kuersetin...)	Mobil Faz: Metanol (çözücü A) ve %0,1 formik asit (çözücü B)/su Akış hızı: 1,0 mL/dak, Dedektör: UV/Vis dedektörü	Lu ve ark., 2024
Panax quinquefolium L. (Amerikan ginsengi)	Ginsenosidler	Mobil Faz: Asetonitril:su çözücüsü (36:64, v/v) Kolon: 5 µm YMC C18 kolonu (10,0 × 250 mm), Akış Hızı:3,0 ml/dak Dedektör:UV/Vis dedektörü (203 nm)	Cui ve ark., 2023
Rubus suavissimus yaprakları	α-glukozidaz inhibitörleri	Preparatif HPLC; Mobil Faz: Asitlendirilmiş su (%0,4 asetik asit, A) ve metanol (B) Kolon: YMC-Pack ODS-A kolon (250 × 20 mm iç çap, 5 µm) Akış hızı: 3,0 mL/dakika akış hızı Dedektör:UV/Vis dedektörü (280nm)	Liu ve ark., 2020
Momordica charantia meyveleri	Charantin (stigmasterol glikozit (STG) ve β-sitosterol glikozit (BSG))	Mobil Faz: Metanol: su (98:02, v/v), Kolon: C18 kolonu (250 mm × 20 mm, 10 µm, Gözenek boyutu 100 A0) Akış hızı: 15,0 mL/dakika akış hızı Dedektör: UV/Vis dedektörü (210nm)	Desai ve ark., 2021
Üzüm (Vitis vinifera L.) posası	Antosiyenin monomerleri	Yarı preparatif HPLC Mobil Faz: Su/asetonitril/formik asit (92/6/2,v/v/v)(A)ve su/asetonitril/formik asitten (44/54/2, v/v/v) (B) Kolon: C18 kolonu(9,4×250mm,5 µm) Akış hızı: 4,0 mL/dakika akış hızı Dedektör:UV/Visdedektörü (525nm)	Zhao ve ark., 2020

Analitik likit kromatografisinde ise, yüksek örnek sayısı ve düşük hacimler nedeniyle otomatik örnekleyiciler yaygın olarak kullanılır. Ayrıca, preparatif likit kromatografisinde saflaştırılan bileşiğin ileride kullanılabilmesi için genellikle UV, floresans veya kırılma indisi gibi tahribatsız dedektörler tercih edilmektedir (Armutcu ve ark., 2019).

Tüm bu gelişmeler ışığında, preparatif HPLC, hem endüstriyel hem de araştırma amaçlı uygulamalarda, yüksek saflıkta ve miktarda ürün elde edilmesini sağlayan, sürekli gelişen ve yenilikçi bir ayırma tekniği olarak öne çıkmaktadır. Özellikle gıda endüstrisinde, biyoaktif bileşiklerin izolasyonu ve saflaştırılmasında sunduğu hız, verimlilik ve maliyet avantajları sayesinde, gelecekte de önemini artırarak sürdüreceği öngörülmektedir. Bu avantajlar, literatürde çeşitli doğal ürünlerden izole edilen hedef bileşenler ve bunlara ilişkin kullanılan preparatif HPLC koşullarında da açıkça görülmektedir (Çizelge 3).

Sonuç

Hazırlayıcı (preparatif) ve analitik kromatografi tekniklerinin disiplinler arası alanlardaki artan önemi, bileşik izolasyonu ve saflaştırma süreçlerinin hem araştırma hem de endüstriyel düzeyde yeniden şekillendiğini gösterilmiştir. Özellikle gıda analizlerinde, karmaşık matrislerde bulunan biyoaktif bileşiklerin, doğal pigmentlerin, vitaminlerin ve lipidlerin yüksek saflıkta elde edilmesi amacıyla preparatif kromatografi yöntemleri kritik bir rol üstlenilmiştir. Gıda ürünlerinde otantisite belirleme, kalite kontrol ve hedefli/hedefsiz analizlerde bu teknikler, yüksek seçicilik ve duyarlılıkları sayesinde güvenilir sonuçlar sağlanmıştır. Preparatif yöntemlerin düşük solvent kullanımı, kısa işlem süresi ve yüksek ölçeklenebilirlik gibi avantajları; hem laboratuvar hem de endüstriyel uygulamalarda verimlilik açısından büyük olanaklar sunulmuştur. Bu çalışmada detaylandırılan yöntemsel farklılıklar, kromatografinin sadece analitik bir araç değil, aynı zamanda stratejik bir üretim ve kalite kontrol yöntemi olarak da konumlandığını ortaya koymuştur. Bu bağlamda, kromatografi tekniklerinin evrimi yalnızca laboratuvar düzeyinde değil, aynı zamanda gıda sanayisinin üretim, kontrol ve Ar-Ge süreçlerinde de devrim niteliğinde dönüşümlere destek vermesi beklenmektedir.

Beyan

Etik Kurul Onayı

Bu makale etik kurul onayı gerektirmemektedir.

Çıkar Çatışması

Bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Kaynaklar

Agatonovic-Kustrin, S., Doyle, E., Gegechkori, V., & Morton, D. W. (2020). High-performance thin-layer chromatography linked with image analysis for the investigation of the contents of hydroquinone in commercial skin whitening creams. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 147, 105279. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105279>

Akash, M. S. H., & Rehman, K. (2025). Comprehensive insights into thin layer chromatography. In *Essentials of Pharmaceutical Analysis* (pp. 577–619). Springer Nature Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-96-5996-8_12

Ametaj, B. N., Ametaj, A., Wright, A. D., & Walia, H. S. (2023). Identification of novel, bioactive natural products from plant extracts isolated by preparative thin-layer chromatography. *Pharmaceuticals*, 16(7), 971. <https://doi.org/10.3390/ph16070971>

Anusiya, G., Bharathi, S., Mukesh, P. K., & Sainandhini, G. (2020). Extraction and molecular characterization of biological compounds from water hyacinth. *Journal of Medicinal Plants*, 8(5), 14–19. <https://doi.org/10.22271/plants.2020.v8.i5a.1189>

Arora, S., & Sharma, K. (2024). Development and validation of HPTLC method for flavonoids quantification in medicinal plants. *Journal of Analytical Science and Technology*, 15(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s40543-024-00345-3>

Asghar, M. A., Ahmed, A., Zahir, E., Asghar, M. A., Iqbal, J., & Walker, G. (2017). Incidence of aflatoxins contamination in dry fruits and edible nuts collected from Pakistan. *Food Control*, 78, 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.02.058>

Ashaolu, T. J., Karaça, A. C., Rashidinejad, A., & Jafari, S. M. (2025). Recent advancements in curcumin extraction, chemical/bio-synthesis, purification, and food applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 65(14), 2714–2730. <https://doi.org/10.1080/10408398.2024.2349725>

Azadniya, E., & Morlock, G. E. (2019). Automated piezoelectric spraying of biological and enzymatic assays for effect-directed analysis of planar chromatograms. *Journal of Chromatography A*, 1602, 458–466. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.05.043>

Banerjee, S., & Sen, S. (2022). Application of HPTLC for simultaneous estimation of flavonoids in traditional medicines. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 13(3), 1060–1066. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.13\(3\).1060-66](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.13(3).1060-66)

Carta, G., & Jungbauer, A. (2020). Protein chromatography: Process development and scale-up. *John Wiley & Sons*. <https://doi.org/10.1002/9783527824045>

Chatterjee, S., & Bhattacharya, S. (2023). Development and validation of HPTLC method for simultaneous estimation of flavonoids in medicinal plants. *Journal of Planar Chromatography*, 36(3), 190–197. <https://doi.org/10.1007/s00764-023-00287-4>

Chewchinda, S., & Vongsak, B. (2019). Development and validation of a high-performance thin layer chromatography method for the simultaneous quantitation of α - and γ -mangostins in Thaistingless bee propolis. *Revista Brasileira De Farmacognosia*, 29, 333–338. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.12.004>

Choudhary, M., & Singh, D. (2023). HPTLC analysis of bioactive compounds in herbal extracts. *Journal of Planar Chromatography*, 36(2), 123–129. <https://doi.org/10.1007/s00764-023-00272-x>

Colegate, S. M., & Molyneux, R. J. (2007). Bioactive natural products detection, isolation and structural determination. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420006889>

Cortés-Herrera, C., Artavia, G., Leiva, A., & Granados-Chinchilla, F. (2018). Liquid chromatography analysis of common nutritional components, in feed and food. *Foods*, 8(1), 1. <https://doi.org/10.3390/foods8010001>

Coşkun, O. (2016). Separation techniques: Chromatography. *Northern Clinics of Istanbul*, 3(2), 156. <https://doi.org/10.14744/NCI.2016.32757>

Dar, A. A., Sangwan, P. L., Singh, N., & Kumar, A. (2019). Method validation and simultaneous quantification of five triterpenoids from *Codonopsis ovata* by high-performance thin-layer chromatography. *JPC—Journal of Planar Chromatography—Modern TLC*, 32(3), 251–256. <https://doi.org/10.1556/1006.2019.32.3.11>

- Das, S., & Ghosh, R. (2020). HPTLC based fingerprinting and quantification of bioactive constituents in medicinal plants. *Pharmacognosy Journal*, 12(3), 639–645. <https://doi.org/10.5530/pj.2020.12.95>
- de Araújo Gomes, A., Azcarate, S. M., Špánik, I., Khvalbota, L., & Goicoechea, H. C. (2023). Pattern recognition techniques in food quality and authenticity: A guide on how to process multivariate data in food analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 164, 117105. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117105>
- Deventer, K., Pozo, O. J., Verstraete, A. G., & Van Eenoo, P. (2014). Dilute-and-shoot-liquid chromatography-mass spectrometry for urine analysis in doping control and analytical toxicology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 55, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.10.012>
- Ettre, L. S. (1993). Nomenclature for chromatography (IUPAC recommendations 1993). *Pure and Applied Chemistry*, 65(4), 819–872. <https://doi.org/10.1351/pac199365040819>
- Fuchs, B., Süß, R., Teuber, K., Eibisch, M., & Schiller, J. (2011). Lipid analysis by thin-layer chromatography—a review of the current state. *Journal of Chromatography A*, 1218(19), 2754–2774. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.11.066>
- Gad, H. A., & El-Ahmady, S. H. (2021). High-performance thin-layer chromatography (HPTLC): A powerful analytical technique in pharmaceutical analysis. *Journal of AOAC International*, 104(4), 943–953. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.20-0263>
- Gavage, M., Delahaut, P., & Gillard, N. (2021). Suitability of high-resolution mass spectrometry for routine analysis of small molecules in food, feed and water for safety and authenticity purposes: A review. *Foods*, 10(3), 601. <https://doi.org/10.3390/foods10030601>
- Gupta, N., & Kumar, S. (2021). Development and validation of HPTLC method for simultaneous estimation of bioactive compounds in herbal extracts. *Pharmacognosy Magazine*, 17(74), 375–381. https://doi.org/10.4103/pm.pm_148_20
- Gupta, R., & Mehta, D. (2024). HPTLC analysis of polyphenols in medicinal plants. *Journal of Herbal Medicine*, 38, 102180. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2023.102180>
- Hameed, K., Khan, M. S., Fatima, A., Shah, S. M., & Abdullah, M. A. (2023). Exploring the world of thin-layer chromatography: A review. *Asian Journal of Applied Chemistry Research*, 14(3), 23–38. <https://doi.org/10.9734/Ajacr/2023/V14i3268>
- Harvey, D. J. (2012). Analysis of carbohydrates and glycoconjugates by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: An update for 2007–2008. *Mass Spectrometry Reviews*, 31(2), 183–311. <https://doi.org/10.1002/mas.20333>
- Herrero, M., Ibanez, E., Cifuentes, A., & Bernal, J. (2009). Multidimensional chromatography in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 1216(43), 7110–7129. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.08.014>
- Hussain, S. Z., Maqbool, K., & Naseer, B. (2019). High performance thin layer chromatography: principle, working and applications. *International Journal of Research in Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4, 83–88.
- Jain, A., & Sharma, R. (2023). HPTLC method development and validation for natural antioxidants in medicinal plants. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 46(2), 81–89. <https://doi.org/10.1080/10826076.2022.2122345>
- Jandera, P. (2011). Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: A review. *Analytica Chimica Acta*, 692(1–2), 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.02.047>
- Jenkinson, C., Taylor, A., Storbeck, K. H., & Hewison, M. (2018). Analysis of multiple vitamin D metabolites by ultra-performance supercritical fluid chromatography-tandem mass spectrometry (UPSFC-MS/MS). *Journal of Chromatography B*, 1087, 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.04.025>
- Johnson, M. A., & Patel, R. (2022). Application of HPTLC in quality control of herbal products. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 56(10), 976–985. <https://doi.org/10.1007/s11094-022-02744-7>
- Jóźwiak, G. W., Majer-Dziedzic, B., Jesionek, W., Zieliński, W., & Waksmundzka-Hajnos, M. (2016). Thin-layer chromatography: direct bioautography as a method of examination of antimicrobial activity of selected *Potentilla* species. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 39(5–6), 281–285. <https://doi.org/10.1080/10826076.2016.1163466>
- Kaczor, A., Kubica, P., & Grzelak, J. (2020). Analysis of polyphenols in nutritional supplements using HPTLC and multivariate statistical methods. *Pharmaceuticals*, 13(12), 464. <https://doi.org/10.3390/ph13120464>
- Kaliňák, M., Barátová, V., Gallová, E., Ondrušová, Z., & Hudecová, D. (2013). Secondary metabolite production of *Epicoccum* sp. isolated from lignite. *Acta Chimica Slovaca*, 6(1), 42–48. <https://doi.org/10.2478/acs-2013-0008>
- Kanwal, S., & Parveen, S. (2021). Quantitative determination of curcumin in turmeric samples by HPTLC method. *Journal of Chromatographic Science*, 59(6), 488–494. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmab038>
- Khandelwal, P., & Singh, M. (2024). Development of HPTLC method for quantification of flavonoids and phenolics in traditional herbs. *Journal of Herbal Medicine*, 36, 101696. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2023.101696>
- Kim, K. W., Lee, K. H., Ha, W. S., Kim, Y., & Jang, Y. P. (2025). Isolation of natural products using preparative TLC. In *Natural Product Isolation and Identification: Methods and Protocols* (pp. 259–269). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-4350-1_17
- Kumar, A., & Singh, N. (2021). Development and validation of HPTLC method for quantification of flavonoids in herbal formulations. *Asian Journal of Pharmaceutical Analysis*, 11(3), 30–35.
- Kumar, M., & Singh, N. (2024). Development of HPTLC method for simultaneous quantification of phenolics in herbal extracts. *Journal of Chromatographic Science*, 62(1), 44–50. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmab158>
- Kumar, P., & Singh, R. (2021). A validated HPTLC method for simultaneous estimation of natural flavonoids in herbal extracts. *Journal of Chromatographic Science*, 59(12), 1072–1078. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmab101>
- Kumar, S., & Sharma, A. (2023). Quantitative determination of flavonoids in medicinal plants by HPTLC. *Pharmacognosy Reviews*, 17(33), 15–21. https://doi.org/10.4103/phrev.phrev_44_22
- Li, X., & Wang, Y. (2023). Quantitative HPTLC analysis of antioxidant compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 406, 134834. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134834>
- Li, Y., Zhao, C., Lu, C., Zhou, S., Tian, G., He, L., ... Zheng, J. (2021). Simultaneous determination of 14 bioactive citrus flavonoids using thin-layer chromatography combined with surface enhanced Raman spectroscopy. *Food Chemistry*, 338, Article 128115. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128115>
- Liu, Z., Zhang, M., Chen, P., Harnly, J. M., & Sun, J. (2022). Mass spectrometry-based nontargeted and targeted analytical approaches in fingerprinting and metabolomics of food and agricultural research. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(36), 11138–11153. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c01878>
- Luo, L., Cui, Y., Zhang, S., Li, L., Li, Y., Zhou, P., & Sun, B. (2016). Preparative separation of grape skin polyphenols by high-speed counter-current chromatography. *Food Chemistry*, 212, 712–721. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.009>

- Marrubini, G., Appelblad, P., Maietta, M., & Papetti, A. (2018). Hydrophilic interaction chromatography in food matrices analysis: An updated review. *Food Chemistry*, 257, 53–66. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.008>
- Meena, R., & Singh, M. (2021). Simultaneous quantification of flavonoids and phenolics in herbal extracts by HPTLC. *Phytochemistry Letters*, 39, 84–89. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2020.11.012>
- Mehta, D., & Bhatt, P. (2024). High-performance thin-layer chromatography for quantitative analysis of plant phenolics. *Phytochemical Analysis*, 35(1), 24–31. <https://doi.org/10.1002/pca.3162>
- Milman, B. L. (2015). General principles of identification by mass spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 69, 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.12.009>
- Mishra, V., & Kumar, A. (2023). HPTLC fingerprinting and quantitative estimation of phenolics and flavonoids in herbal extracts. *Asian Journal of Chemistry*, 35(5), 1057–1063. <https://doi.org/10.14233/ajchem.2023.26596>
- Móricz, Á. M., Ott, P. G., Yüce, I., Darcsi, A., Béni, S., & Morlock, G. E. (2018). Effect-directed analysis via hyphenated high-performance thin-layer chromatography for bioanalytical profiling of sunflower leaves. *Journal of Chromatography A*, 1533, 213–220. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.12.034>
- Morley, R., & Minceva, M. (2021). Liquid–liquid chromatography: Current design approaches and future pathways. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 12(1), 495–518. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-101420-033548>
- Morlock, G. E., & Klingelhofer, I. (2014). Liquid chromatography–bioassay–mass spectrometry for profiling of physiologically active food. *Analytical Chemistry*, 86(16), 8289–8295. <https://doi.org/10.1021/ac501723j>
- Nariya, P. B., Shukla, V. J., Acharya, R., & Nariya, M. B. (2017). Isolation and simultaneous determination of three biologically active flavonoids from some indigenous Cordia species by thin-layer chromatography with UV absorption densitometry method. *JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*, 30(4), 264–270. <https://doi.org/10.1556/1006.2017.30.4.5>
- Neagu, A. N., Jayathirtha, M., Baxter, E., Donnelly, M., Petre, B. A., & Darie, C. C. (2022). Applications of tandem mass spectrometry (MS/MS) in protein analysis for biomedical research. *Molecules*, 27(8), 2411. <https://doi.org/10.3390/molecules27082411>
- Nugroho, T. T., Puja, K., Eryanti, Y., & Miranti, M. (2020). Fractionation of Garcinia mangostana fruit pericarp cellulase assisted extracts by preparative thin layer chromatography and high-performance liquid chromatography. *Jurnal Natur Indonesia*, 18(31), 31–42. <https://doi.org/10.31258/Jnat.18.1.31-42>
- Nyireddy, S. (2004). Planar chromatography. In *Journal of Chromatography Library* (Vol. 69, pp. 253–296). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/s0301-4770\(04\)80012-5](https://doi.org/10.1016/s0301-4770(04)80012-5)
- Patel, D., & Shah, A. (2022). High-performance thin layer chromatography method for estimation of flavonoids in medicinal plants. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 12(3), 230–238. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2021.10.005>
- Patel, M., & Joshi, P. (2024). Development and validation of HPTLC method for quantification of polyphenols in medicinal plants. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 14(2), 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2023.11.005>
- Paul, S., & Singh, G. (2023). Simultaneous quantification of bioactive compounds in medicinal plants by HPTLC. *Journal of Analytical Science and Technology*, 14(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s40543-023-00324-x>
- Rabel, F., & Sherma, J. (2017). Review of the state of the art of preparative thin-layer chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 40(4), 165–176. <https://doi.org/10.1080/10826076.2017.1294081>
- Rabel, F., & Sherma, J. (2017). Review of the state of the art of preparative thin-layer chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 40(4), 165–176. <https://doi.org/10.1080/10826076.2017.1294081>
- Raghunath, A., Mahadik, K. R., & Kadam, D. M. (2022). Development and validation of HPTLC method for determination of flavonoids in Citrus limon peel extract. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 12(2), 239–245. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2021.07.009>
- Reddy, K. S., & Rao, S. (2022). Simultaneous quantification of natural antioxidants in medicinal plants by HPTLC. *Journal of AOAC International*, 105(1), 98–104. <https://doi.org/10.1093/jaoacint/qsab117>
- Reisberg, M., Arnold, N., Bisrat, D., Asres, K., Neubert, R. H., & Dräger, B. (2017). Quantification of glycosylceramides in plants by automated multiple development–high-performance thin-layer chromatography. *JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*, 30(6), 460–466. <https://doi.org/10.1556/1006.2017.30.6.1>
- Rudrapal, M., Khairnar, S. J., & Patil, C. A. (2020). HPTLC analysis of phenolic compounds in medicinal plants: A comprehensive review. *Journal of Planar Chromatography*, 33(6), 424–433. <https://doi.org/10.1007/s00764-020-00127-5>
- Sarker, S. D., Latif, Z., & Alexander, I. (2006). Gray Natural Products Isolation. <https://doi.org/10.1385/1-59259-955-9:1>
- Schröter, J., Süß, R., & Schiller, J. (2016). Preparative thin layer chromatography of (phospho) lipids. In *Encyclopedia of Lipidomics* (pp. 1–8). Springer. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7864-1_64-1
- Schwanck, W., Pellissier, E., & Morlock, G. (2018). Analysis of unauthorized Sudan dyes in food by high-performance thin-layer chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(22), 5641–5651. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-0945-6>
- Sereshti, H., Poursorkh, Z., Aliakbarzadeh, G., & Zarre, S. (2018). Quality control of saffron and evaluation of potential adulteration by means of thin layer chromatography-image analysis and chemometrics methods. *Food Control*, 90, 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.02.026>
- Sharma, A., & Kumar, S. (2020). HPTLC method development and validation for flavonoids in herbal formulations. *Pharmacognosy Journal*, 12(5), 1144–1150. <https://doi.org/10.5530/pj.2020.12.163>
- Sharma, K., Gupta, S., & Saini, V. (2019). An efficient method for the quantification of natural flavonoids using HPTLC technique. *Pharmaceutical Methods*, 10(2), 70–74.
- Sharma, S., & Arora, S. (2022). Advances in HPTLC technique for analysis of natural products: A review. *Pharmacognosy Reviews*, 16(31), 25–36. https://doi.org/10.4103/phrev.phrev_35_21
- Sharma, S., & Singh, D. (2022). HPTLC fingerprinting and quantitative analysis of bioactive compounds in herbal extracts. *Phytochemistry Letters*, 45, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2021.11.012>
- Sharma, V., & Gupta, S. (2023). Simultaneous estimation of flavonoids in herbal extracts using HPTLC. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 12(2), 40–45.
- Shastri, R., & Bhatt, P. (2023). Development and validation of HPTLC method for simultaneous estimation of phenolic acids in herbal extracts. *Asian Journal of Pharmaceutical Analysis*, 13(1), 27–32. <https://doi.org/10.1208/s12249-023-02699-2>
- Sherma, J. (2019). Thin-layer chromatography in the determination of synthetic and natural colorants in foods. In *Advances in Chromatography* (pp. 109–135). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780429026171-4>

- Sherma, J., & Fried, B. (Eds.). (2003). Handbook of thin-layer chromatography. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780203912430>
- Singh, A., & Choudhary, M. (2024). Development and validation of HPTLC method for quantification of polyphenols in herbal formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 231, 115290. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115290>
- Singh, D., & Kaur, R. (2021). HPTLC analysis of polyphenols in plant extracts and herbal formulations. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 10(3), 240–246.
- Singh, P., & Sharma, S. (2022). Development of HPTLC method for quantification of phenolics in herbal extracts. *Phytochemical Analysis*, 33(5), 382–388. <https://doi.org/10.1002/pca.3092>
- Singh, R., & Kumar, P. (2022). HPTLC fingerprinting of phenolic compounds in medicinal plants. *Pharmaceutical Methods*, 13(1), 20–26.
- Singh, S., & Yadav, S. (2023). Quantitative estimation of flavonoids in medicinal plants by HPTLC method. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 15(3), 656–661.
- Soares Maciel, V., de Toffoli, A. L., & Lanças, F. M. (2018). Recent trends in sorption-based sample preparation and liquid chromatography techniques for food analysis. *Electrophoresis*, 39(13), 1582–1596. <https://doi.org/10.1002/elps.201800009>
- Štefanac, T., Grgas, D., & Landeka Dragičević, T. (2021). Xenobiotics—division and methods of detection: A review. *Journal of Xenobiotics*, 11(4), 130–141. <https://doi.org/10.3390/jox11040009>
- Strocchi, G., Bagnulo, E., Ruosi, M. R., Ravaioli, G., Trapani, F., Bicchi, C., ... & Liberto, E. (2022). Potential aroma chemical fingerprint of oxidised coffee note by HS-SPME-GC-MS and machine learning. *Foods*, 11(24), 4083. <https://doi.org/10.3390/foods11244083>
- Sun, Y., Wang, H., Wang, W., Hu, B., Zhou, L., Ye, H., & Zeng, X. (2018). Changes in molecular structure of chickpea starch during processing treatments: A thin layer chromatography study. *Food Chemistry*, 243, 186–191. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.096>
- Talebi, M., Samavati, R., & Mirzaei, S. (2018). Development and validation of HPTLC method for simultaneous quantification of rutin and quercetin in *Eclipta prostrata*. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 8(5), 324–329. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.05.003>
- Tenório, C. J. L., Ferreira, M. R. A., & Soares, L. A. L. (2022). Recent advances on preparative LC approaches for polyphenol separation and purification: Their sources and main activities. *Trends in Food Science & Technology*, 128, 129–146. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.08.004>
- Tiwari, S., & Talreja, S. (2022). Thin layer chromatography (TLC) vs. paper chromatography: A review. *Acta Scientifica Pharmaceutical Sciences*, 6(9). <https://doi.org/10.31080/asps.2022.06.0894>
- Tokarek, W., Listwan, S., Krawczyk, K., Pajdzik, K., Porebska, Z., Stopa, K., et al. (2016). The influence of heavy metals on *Phaeodactylum tricornutum* growth—a preliminary study. *Contemporary Problems of Power Engineering and Environmental Protection*, 161. <https://doi.org/10.11159/icepr18.147>
- Tranchida, P. Q., Donato, P., Cacciola, F., Beccaria, M., Dugo, P., & Mondello, L. (2013). Potential of comprehensive chromatography in food analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 52, 186–205. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.07.008>
- Ubale, H. H., Dashrath, B. O., Swapnil, C., Raghunath, P. T., & Atar, A. A. (2024). A brief review on different chromatography techniques. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 13(20), 150–159. <https://doi.org/10.23880/oajpr-16000294>
- Vega, M. (2000). Food additives - Thin-layer (planar) chromatography. In I. D. Wilson (Ed.), *Encyclopedia of Separation Science* (pp. 2838–2842). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B0-12-226770-2/02731-9>
- Verma, R., & Singh, M. (2021). Simultaneous estimation of flavonoids and phenolics in herbal extracts by HPTLC. *Journal of Chromatographic Science*, 59(9), 789–795. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmab074>
- Wasowski, C., & Lehmann, J. (2018). HPTLC fingerprinting and quantification of flavonoids in medicinal plants. *Journal of Natural Products*, 81(7), 1809–1815. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00245>
- Yetim, H., & Çam, M. (2012). Enstrümental gıda analizleri. Erciyes Üniversitesi. <https://doi.org/10.25308/Aduziraat.1010095>