

**BAZI FENOLİK ASİTLERİN
ULTRA YÜKSEK PERFORMANSLI
SIVI KROMATOĞRAFİSİ (UHPLC) İLE
TAYİNİ VE YÖNTEM VALİDASYONU**

Nurlan RASHIDOV

Yüksek Lisans Tezi

Eskişehir 2019

**BAZI FENOLİK ASİTLERİN ULTRA YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI
KROMATOĞRAFİSİ (UHPLC) İLE TAYİNİ VE YÖNTEM VALİDASYONU**

Nurlan RASHIDOV

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Elif Mine ÖNCÜ KAYA

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Haziran 2019

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Nurlan RASHIDOV'un “**Bazı fenolik asitlerin Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (UHPLC) ile tayini ve yöntem validasyonu**” başlıklı tezi 20.06.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek “Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği”nin ilgili maddeleri uyarınca, Kimya Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

<u>Jüri Üyeleri</u>	<u>Unvanı Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Dr. Öğr. Üyesi Elif Mine ÖNCÜ KAYA	
Üye	: Doç. Dr. Erol ŞENER	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Özlem BİÇEN ÜNLÜER	

Prof. Dr. Murat TANIŞLI
Enstitü Müdürü

ÖZET

BAZI FENOLİK ASİTLERİN ULTRA YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (UHPLC) İLE TAYİNİ VE YÖNTEM VALİDASYONU

Nurlan RASHIDOV

Kimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Haziran 2019

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Elif Mine ÖNCÜ KAYA

Bu çalışmada, bazı önemli fenolik asitlerden olan Protokateşik asit (PCA), p-Hidroksibenzoik asit (p-HBZ), Kafeik asit (CAF), Şirincik asit, (SYR) p-Kumarik asit (p-COU), t-Ferulik asit (t-FER), Rozmarinik asit (ROS) ve t-Sinamik asit (t-CIN)'in eriklerde ve bazı gıda takviyelerinde tayini için hızlı ve seçici ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi (UHPLC) yöntemi geliştirilerek validasyonu yapılmıştır. Fenolik asitler, Agilent Zorbax Eclipse Plus C8 (3,0 mm×150 mm×1,8 µm) kolonunda ve A (su:metil alkol:formik asit; 88:10:2; h/h/h), B (su:metil alkol:formik asit; 8:90:2; h/h/h) hareketli fazı kullanılarak UV dedektör ile 280 nm dalga boyu değerinde belirlenmiştir. Akış hızı 0,4 ml/dk ve enjeksiyon hacmi 10 µl'dir. Geliştirilen yöntemin kesinlik, doğruluk, gözlenebilme sınırı (LOD), tayin alt sınırı (LOQ) ve kararlılık parametrelerine göre validasyonu yapılmıştır. Çalışılan fenolik asitler için yüksek korelasyon katsayıları ($r^2 = 0,9991-0,9999$) ile doğrusal grafikler elde edilmiştir. Gün içi ve günler arası kesinlik deneylerinde %3,82'den küçük %BSS değerleri ile yöntem tekrarlanabilir. Deneyler farklı erik türlerinde ve gıda takviye edici olarak kullanılan piknogenol ile supradin tabletlerinde gerçekleştirilmiştir. Erik sularından fenolik asitlerin saflaştırılması için C₁₈-OH kolonu ile katı faz ekstraksiyonu (SPE) yapılmıştır.

Anahtar kelimeler: UHPLC, Fenolik asitler, Katı faz ekstraksiyonu, Yöntem geliştirme, Validasyon.

ABSTRACT

DETERMINATION OF SOME PHENOLIC ACIDS BY ULTRA HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (UHPLC) AND METHOD VALIDATION

Nurlan RASHIDOV

Department of Chemistry

Anadolu University, Graduate School of Sciences, June 2019

Supervisor: Dr. Elif Mine ÖNCÜ KAYA

In this study, fast and selective ultra high performance liquid chromatography (UHPLC) method has been developed and validated for the determination of certain important phenolic acids including Protocatechuic acid (PCA), p-Hydroxybenzoic acid (p-HBZ), Caffeic acid (CAF), Syringic acid, (SYR) p-Coumaric acid (p-COU), t-Ferulic acid (t-FER), Rosmarinic acid (ROS) and t-Cinnamic acid (t-CIN) in plums and food supplements. Phenolic acids were determined by UV detector at a wavelength of 280 nm on Agilent Zorbax Eclipse Plus C8 (3.0 mm×150 mm×1.8 µm) column and using a mobile phase A (water:methanol:formic acid; 88:10:2; v/v/v), B (water:methanol:formic acid; 8:90:2; v/v/v). The flow rate was 0.4 ml/min and the injection volume was 10 µl. The method was validated according to the precision, accuracy, linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ) and stability parameters. High correlation coefficients ($r^2 = 0.9991-0.9999$) were obtained for the phenolic acids. The method was reproducible which were found in intraday and interday precision experiments, with RSD% values less than 3.82%. The experiments were carried out in different plum species and food supplements including pycnogenol and supradyn tablets. Solid phase extraction (SPE) technique with C₁₈-OH column was performed for the purification of phenolic acids from plum juice.

Keywords: UHPLC, Phenolic acid, Solid phase extraction, Method development, Validation.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgilerini ve tecrübelerini benimle paylaşarak bana rehber olup destek veren değerli danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Elif Mine ÖNCÜ KAYA'ya çok teşekkür ederim.

Tezimin değerlendirilmesinde jüri üyesi olarak yer alan Sayın Doç. Dr. Erol ŞENER'e ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Özlem BİÇEN ÜNLÜER'e teşekkür ederim.

Tez süreci boyunca desteklerini hiç esirgemeyen, her zaman yanımda olan Yasin DARI, Hafsa QABA, Ayşegül ÖZBAL, Nurbeliz BESLER ve Emre ODUNCU'ya sonsuz teşekkür ederim.

Nurlan RASHIDOV

Haziran 2019

20/06/2019

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait özgün bir çalışma olduğunu, çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilemeyen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programıyla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

Nurlan RASHIDOV

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Fenolik Asitler.....	3
2.2. Fenolik Asit Tayinlerinde Kullanılan Analitik Yöntemler.....	6
2.3. Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (UHPLC).....	7
2.4. UHPLC Dedektörleri.....	8
2.5. UHPLC'nin Avantajı.....	9
2.6. UHPLC Uygulamaları.....	10
2.7. Örnek Hazırlama.....	12
2.7.1. Katı faz ekstraksiyonu (SPE).....	12
3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER.....	14
3.1. Kullanılan Örnekler.....	14
3.2. Kimyasallar.....	14
3.3. Araç Gereç ve Cihazlar.....	14
3.4. İstatistiksel Analizler.....	15
3.5. Çözeltilerin Hazırlanması.....	15
3.5.1. Standart çözeltilerin hazırlanması.....	15
3.5.2. İç standart çözeltisinin hazırlanması.....	15
3.6. Örnek Hazırlama.....	16
3.6.1. Piknogenol ve Supradin örneklerinin hazırlanması.....	16
3.6.2. Erik suyu örneklerinin hazırlanması.....	17

4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	18
4.1 UHPLC Yöntem Optimizasyon Çalışmaları.....	18
4.2. Gıda Örneklerinin Analize Hazırlanması.....	20
4.3. UHPLC Yöntem Validasyon Çalışmaları.....	23
4.3.1. Doğrusallık ve duyarlılık.....	23
4.3.2. Kesinlik.....	25
4.3.3. Doğruluk.....	29
4.3.4. Kararlılık.....	30
4.4. Geliştirilen UHPLC Yönteminin Örneklerle Uygulanması.....	31
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	33
KAYNAKÇA.....	34
ÖZGEÇMİŞ	

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Önemli fenolik asitlerin yapıları.....	4
Çizelge 2.2. Bazı önemli fenolik asitlerin bulunduğu gıdalar ve canlılar üzerindeki etkileri.....	5
Çizelge 2.3. Fenolik Asit tayinlerinde kullanılan bazı yöntemler.....	6
Çizelge 2.4. SPE yönteminde kullanılan adsorban maddeler ve uygulamaları.	13
Çizelge 3.1. Kromatografik çalışmalarda kullanılan cihazlar.....	14
Çizelge 3.2. Fenolik asit standartlarının stoklarından alınan hacimler ve son derişimleri.....	15
Çizelge 4.1. UHPLC koşulları.....	19
Çizelge 4.2. Fenolik asitlerin tayininde kullanılan gradiyent programı.....	19
Çizelge 4.3. C ₁₈ -OH SPE ve C ₁₈ SPE kolonlarının %Geri Kazanım (%GK) değerleri.....	21
Çizelge 4.4. Fenolik asitlerin regresyon analiz sonuçları	24
Çizelge 4.5. Kesinlik sonuçları.....	26
Çizelge 4.6. Doğruluk sonuçları.....	29
Çizelge 4.7. Kararlılık sonuçları.....	31
Çizelge 4.8. Örneklerde fenolik asitlerin miktarları (mg/kg).....	32

ŞEKİLLER DİZİNİ

		<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1.	Partikül çaplarının azaltılmasının Van Deemter grafiğindeki etkileri.....	7
Şekil 2.2.	UHPLC ve HPLC kromatogramının karşılaştırması.....	10
Şekil 2.3.	SPE yönteminin şematik gösterimi.....	13
Şekil 3.1.	Piknogenol ve Supradin tabletlerinden ekstraksiyon.....	16
Şekil 3.2.	Erik suyu örneklerinden ekstraksiyon.....	17
Şekil 4.1.	Optimum UHPLC koşullarında elde edilen PCA, p-HBZ, CAF, SYR, p-COU, t-FER, ROS ve t-CIN standart fenolik asit çözeltisi ve 7×10^{-5} M IS`ye ait kromatogram.....	20
Şekil 4.2.	Optimum UHPLC koşullarında elde edilen üzüm suyuna ait kromatogram.....	21
Şekil 4.3.	Optimum UHPLC koşullarında elde edilen erik suyuna (9 kodlu) ait kromatogram.....	22
Şekil 4.4.	Optimum UHPLC koşullarında elde edilen erik suyuna (6 kodlu) ait kromatogram.....	22
Şekil 4.5.	Optimum UHPLC koşullarında elde edilen piknogenol film tabletine ait kromatogram.....	22
Şekil 4.6.	Optimum UHPLC koşullarında elde edilen supradin tabletine ait kromatogram.....	23

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
UHPLC	: Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
MS	: Kütle Spektrometresi
UV	: Ultraviyole
FLD	: Floresans Dedektör
ECD	: Elektrokimyasal Dedektör
ICH	: Uluslararası Uyumluluk Konferansı (International Conference of Harmonization)
PCA	: Protokateşik asit
p-HBZ	: p-Hidroksibenzoik asit
CAF	: Kafeik asit
SYR	: Şirincik asit
p-COU	: p-Kumarik asit
t-FER	: t-Ferulik asit
ROS	: Rozmarinik asit
t-CIN	: t-Sinamik asit
IS	: İç Standart
SPE	: Katı Faz Ekstraksiyonu
LOD	: Gözlenebilme Sınırı
LOQ	: Tayin Alt Sınırı
dp	: Partikül Çapı
SS	: Standart Sapma
%BSS	: Yüzde Bağlı Standart Sapma
GK	: Geri Kazanım

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde sigara ve alkol kullanımı, artan çevre kirliliği ve bunun gibi birçok etken, canlılara özellikle de insanlara büyük ölçüde zarar vermektedir. Bununla birlikte yaşam koşullarının zorluğu da stres düzeyinin artmasına sebep olmaktadır. Bunun gibi çevresel ve psikolojik etkiler serbest radikallerin oluşumuna, dolayısıyla insan sağlığında ciddi sorunlara yol açmaktadır. İnsanoğlu, doğal besin ve gıdaları tüketerek yaşam kalitesini arttırmaya ve bitki ya da gıdalardan elde edilen alternatif gıda takviyeleri kullanarak hastalık yapan negatif etkilerin önüne geçmeye çalışmaktadırlar (Hochstein ve Atallah, 1988; Benzie, 2003). İkincil metabolitler olan ve 8000'den fazla bileşiği içeren fenolik asitler, kırmızı, yeşil, sarı, turuncu ve mor renkli meyve ve sebzelerde, bitkilerde ve tedavi amaçlı kullanılan ilaçların içerisinde bulunan doğal antioksidan maddelerdir. Fenolik asitlerin gıdalarda bulunması besinlerin kararlılığını, rengini, tadını, kokusunu, besin değerini ve kalitesini etkilemektedir. Ayrıca fenolik asit içeren pek çok bitki, bazı hastalıkları tedavi etme amacıyla kullanılmaktadır (Robbins, 2003; Pyrzynska ve Sentkowska, 2015; Bonta, 2017). Fenolik asitler, antioksidan özelliklerine bağlı olarak serbest radikal oluşumunu önleyerek biyolojik yapıları zararlı etkilere karşı korumakla birlikte metabolizma düzenleyici ve besleyici özelliklere sahiptir (Güleşçi ve Aygöl, 2016; Fernandez-Panchon vd., 2008; Halliwell ve Gutteridge, 1990). Aynı zamanda antikanserojen etki göstermesi nedeniyle de kanser ve diğer hastalıkların kontrolünde önemli bir role sahiptirler (Ghasemzadeh ve Jaafar, 2011; Gök ve Serteser, 2003; Baser, 2002).

Fenolik asitler yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) (Öztürk, Tunçel ve Tunçel, 2007), gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) (Proestos ve Komaitis, 2013), kapiler elektroforez (CE) (Hernández-Chávez ve Guemes Vera, 2015) ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (LC-MS) (Oszmianski vd., 2018) gibi çeşitli analitik yöntemlerle belirlenebilmektedir. Bu bileşiklerin tayinine yönelik araştırmalarla ilgili kaynaklar incelendiğinde genel olarak sıvı kromatografisini temel alan çalışmalara rastlanmaktadır. Sıvı kromatografik yöntemler ile bu kimyasalları belirlemek için genellikle UV, floresans ve elektrokimyasal detektörler kullanılmaktadır (Aaby vd., 2007; Bolarinwa ve Linseisen, 2005). Son zamanlarda MS detektörlerinin de yaygın bir şekilde kullanıldığı görülmektedir (Kumar, Singh ve Kumar, 2017). Fenolik

asitlerle ilgili literatürde çok sayıda çalışma bulunmaktadır ancak bu maddelerin yararları göz önüne alındığında güvenilir olan yeni analitik yöntemlere her zaman ihtiyaç bulunmaktadır.

Bu tez kapsamında fenolik asitlerden olan protokateşik asit, p-hidroksibenzoik asit, kafeik asit, şirincik asit, p-kumarik asit, t-ferulik asit, rozmarinik asit ve t-sinamik asit ile çalışılmıştır. Bu amaçla UHPLC ile UV dedektör kullanılarak Eskişehir çevresinden toplanan 10 adet erik örneğinde ve bazı gıda takviyelerinde bu fenolik asitlerin aynı anda hızlı ve seçici olarak tayinleri yapılmıştır. Geliştirilen UHPLC yönteminin validasyonu gerçekleştirilmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER VE GENEL BİLGİLER

2.1. Fenolik Asitler

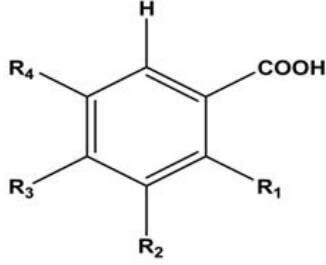
Fenolik asitler, sebze ve meyvelerde yer alarak bulundukları gıdalara eşsiz lezzet ve sağlıklı özellikler kazandıran aromatik ikincil bitki metabolitleridir (Tomas-Barberan ve Espin, 2001). Genel olarak "fenolik asitler" terimi, bir karboksilik asit fonksiyonelliğine sahip olan fenollerini belirtmektedir. Ayrıca bitki polifenollerini ailesine fenolik asitleri dahil etmenin nedeni, polifenollerin biyoöncüleri olmaları ve daha da önemlisi metabolit olmalarından kaynaklanır (Shahidi ve Nacsk, 1995; Elzaawely vd., 2007; Dai ve Mumper, 2010).

Fenolik asitler antioksidan özellikte olmaları nedeniyle insan sağlığı açısından önemli bir rol oynarlar. Bu bileşikler serbest radikallerin oluşumunu engelleyen, kanser riskini azaltan ve karbonhidratlar, proteinler, lipitler ve DNA gibi biyolojik yapıları zararlı etkilere karşı koruyabilen doğal antioksidanlar olarak bilinmektedirler (Halliwell ve Gutteridge, 1990). Antioksidanlar, hücreleri reaktif oksijen türleri olarak bilinen kararsız moleküllerin ve serbest radikallerin neden olduğu zararlardan koruyabilecek maddelerdir. Serbest radikaller, kanser, kalp hastalıkları ve mide problemleri gibi çok sayıda sağlık sorununa neden olabilmektedir. Fenolik asitler, yara ve iltihaplanma önleyici (Lee, Son ve Chang, 1993), antidiyabetik (Vessal, Hemmati ve Vasei, 2003), antiviral (Cody, Middleton ve Harborne, 1986), antioksidan (Ghasemzadeh ve Jaafar, 2011), sitotoksik ve antitümör (Paliwal, Sundaram ve Mitragotri, 2005) gibi çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olmakla birlikte, vitaminler ve enzimlerle insan vücudunun toplam antioksidan savunma sistemine katkıda bulunmaktadır.

Fenolik asitler yapılarına göre 1) hidroksisinamik ve 2) hidroksibenzoik olmak üzere iki farklı şekilde sınıflandırılır (Çizelge 2.1) (Cemeroğlu ve Acar, 1986; Mandal, Chakraborty ve Dey, 2010). Hidroksisinamik asitler bitkisel gıdalarda yaygın olarak bulunurlar ve fenilpropan halkasına bağlanan hidroksil grubunun konumu ve sayısına göre farklı özellik gösterirler. Ancak çok az miktarlarda serbest halde bulunurlar ve çoğunlukla asit türevleri halindedirler. Hidroksibenzoik asitler, hidroksisinamik asitlerden yağ asitlerinin β -oksidasyonu ile analog olan bir reaksiyon zinciri sonucunda oluşmaktadır. Bitkisel gıdaların yapısında genellikle iz miktarlarda bulunur veya hiç bulunmayabilirler. Bunlar arasında salisilik asit, m-hidroksibenzoik asit, p-hidroksibenzoik asit, gallik asit ve vanilik asit vb. sayılabilir. (Öztürk vd., 2002).

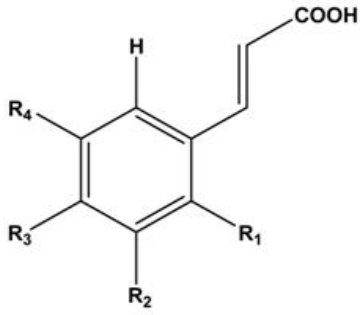
Çizelge 2.1. Önemli fenolik asitlerin yapıları (Saxena, Saxena ve Pradhan, 2012)

Hidroksibenzoik Asitler

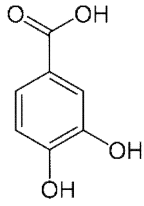


	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Benzoik asit	H	H	H	H
Gallik asit	H	OH	OH	OH
Vanilik asit	H	OCH ₃	OH	H
Salisilik asit	OH	H	H	H

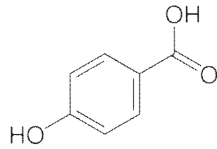
Hidroksisinamik Asitler



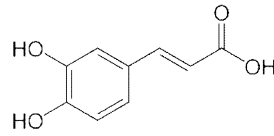
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Sinamik asit	H	H	H	H
Ferulik asit	H	OCH ₃	OH	H
Sinapik asit	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Kafeik asit	H	OH	OH	H



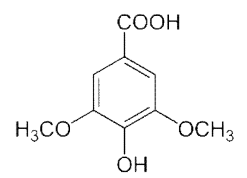
Protokateşik asit



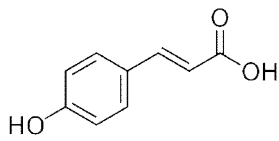
p-Hidroksibenzoik asit



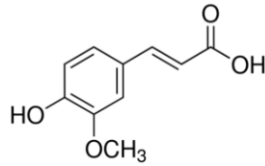
Kafeik asit



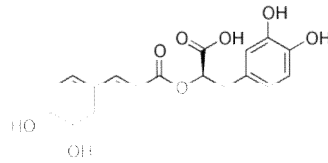
Şirincik asit



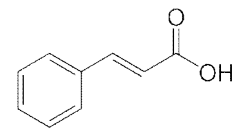
p-Kumarik asit



t-Ferulik asit



Rozmarinik asit



t-Sinamik asit

Bu bileşikler genellikle kardiyovasküler hastalıklar, iltihaplanma ve kanser gibi çeşitli dejeneratif hastalıklara yol açan oksidatif hasara karşı özellikleri bakımından incelenmiştir. Aslında, lösemi hücreleri de dahil olmak üzere, özellikle tümör hücreleri tipik olarak normal hücrelere göre daha yüksek seviyelerde reaktif oksijen türlerine sahiptir ve oksidatif strese duyarlıdır (Battisti vd., 2008). Fenolik asitlerle ilgili hem gıda tüketimi yoluyla doğrudan alımın, hem de mide, bağırsak ve hepatik metabolizma kaynaklı türetilmiş biyoyararlanımın araştırıldığı pek çok çalışma bulunmaktadır (Lafay ve Gil-Izquierdo, 2008). Fenolik asit bileşikleri ve işlevleri, çok sayıda tarımsal, biyolojik, kimyasal ve tıbbi çalışmaya da konu olmuştur (Saxena, Saxena ve Pradhan, 2012). Çizelge 2.2’de bazı önemli fenolik asitlerin bulunduğu gıdalar ve canlılar üzerindeki yararları verilmiştir.

Çizelge 2.2. Bazı önemli fenolik asitlerin bulunduğu gıdalar ve canlılar üzerindeki etkileri (Lafay ve Gil-Izquierdo, 2008; Saxena, Saxena ve Pradhan, 2012).

Fenolik asit	Bulunduğu gıdalar	Etkisi
Protokateşik asit	ahududu, yaban mersini, çilek, üzüm	Karaciğer ve kalp koruyucu,, antiaterosklerotik, hiperlipidemik, antiviral, yaşlanmayı önleme, antiülser, antidiyabetik
p-Hidoksibenzoik asit	darı, soya, greyfurt, biberiye, havuç	Kanser, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve Parkinson gibi hastalıklara karşı koruyucu
Kafeik asit	adaçayı, nane, kekik, elma, patates, zeytin	Anti-iskemi reperfüzyon, anti-tromboz, anti-hipertansif, anti-fibroz, antiviral, antitümör
Şirincik asit	ayçiçeği, pazı, yarpuz, ceviz, sarımsak, pirinç, yulaf	Antidiyabetik, kanser, kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu, karaciğer koruyucu, yaşlanmayı önleme
p-Kumarik asit	nar, kivi, ahududu, ceviz, mercimek, patlıcan, domates	Antiviral, yaşlanmayı önleme, antiülser, antidiyabetik
t-Ferulik asit	patlıcan, domates, ceviz, sarımsak, patates	Karaciğer ve kalp koruyucu, antiaterosklerotik, hiperlipidemik, antiviral, yaşlanmayı önleme
Rozmarinik asit	biberiye, nane, kekik, fesleğen	Anti-hipertansif, anti-fibroz, antiviral, antitümör
t-Sinamik asit	zeytin, kiraz, üzüm, çilek, portakal, tarçın	Antidiyabetik, kanser ve kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu, karaciğer koruyucu, yaşlanmayı önleme

2.2. Fenolik Asit Tayinlerinde Kullanılan Analitik Yöntemler

Fenolik asitlerin tayini spektrofotometrik ve kromatografik esaslı olmak üzere farklı yöntemlerle gerçekleştirilmektedir. Çizelge 2.3’de fenolik asit tayinlerinde kullanılan bazı yöntemler verilmiştir.

Çizelge 2.3. Fenolik Asit tayinlerinde kullanılan bazı yöntemler (Özcan, 2010).

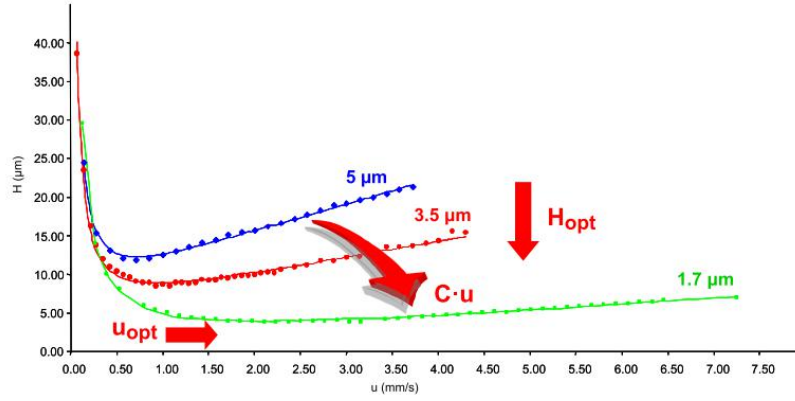
Yöntem Adı	Yöntem Prensibi	Kaynak
Spektrofotometrik yöntemler	Folin-Ciocalteu yöntemi Folin reaktifinin indirgenmesiyle renk değişiminin 660 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülmesi	Gamez-meza vd., 1999
	1-10 Fenantrolin yöntemi Redoks reaksiyonları sonucu ($Fe^{+3}/Phen$) reaktifinin yoğun renkli $[Fe(Phen)_3]$ şelatını oluşturması	Gonzalez vd., 2003
Kromatografik yöntemler	Yüksek basınç sıvı kromatografisi (HPLC) Uçucu olmayan kimyasal ve biyolojik sıvı bileşenlerin sabit ve hareketli faz arasında dağılımı	Markowski ve Plorcharski, 2006
	Kapiler elektroforez (CE) İletken bir çözelti içindeki yüklü-yüksüz parçacıkların veya moleküllerin bir elektriksel alan varlığında göç etmesi	Lima, Duarte ve Esteves, 2007
	Gaz kromatografisi (GC) Gaz halinde bulunan veya kolayca buharlaştırılabilen bileşenlerin birbirinden ayrıştırılması	Minuti ve Pellegrino, 2008

Fenolik asit tayinlerinde bu yöntemler arasında en çok tercih edilen ve en yaygın kullanılan sıvı kromatografisi temeline dayalı olanlardır. Bu tez çalışmasında UHPLC yöntemi kullanıldığından bu yöntem ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

2.3. Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (UHPLC)

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) uzun yıllardır laboratuvarlarda en çok kullanılan yöntemlerden biri olmakla birlikte, yeni dedektör tasarımı, veri işleme ve kolon teknolojisindeki ilerlemeler Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (UHPLC)'nin gelişmesine yol açmıştır. UHPLC hız, yüksek ayırım gücü ve duyarlılık gibi avantajları nedeniyle son dönemde geniş uygulama alanları bulmaktadır (Wu, Naijun ve Thompson, 2006).

Kromatografide ayırma ve kromatografik kolonun verimliliği Van Deemter grafiği ile açıklanabilir (Van Deemter vd., 1956; Swartz ve Murphy, 2005).



Şekil 2.1. Partikül çaplarının azaltılmasının Van Deemter grafiğindeki etkileri (Guillarme ve Veuthey, 2017)

Şekil 2.1’de görüldüğü gibi partikül çaplarının azalması, kolon verimliliğinde büyük bir artışa neden olmaktadır (Guillarme ve Veuthey, 2017). Partikül çapı daha büyük kolonlar istenen doğrusal hıza ulaşmak için daha yüksek akış hızları ve dolayısıyla daha fazla hareketli faz gerektirir (Wren, Stephen ve Pierre, 2006).

UHPLC sisteminin temel ilkesi HPLC ile aynı, sadece aletsel ve donanım konusunda farklılık göstermektedir. Kullanılan küçük partiküllü kolonlar nedeniyle yüksek basınç gerektirmesinden dolayı pompalar da buna uygun şekilde yapılmıştır. Ayrıca UHPLC’de daha geliştirilmiş modern dedektörler kullanılmaktadır (Dong ve Zhang, 2014).

2.4. UHPLC Dedektörleri

Ultraviyole/görünür bölge (UV), fotodiyot dizi (DAD), floresans (FLD), kırılma indisi (RI) ve elektrokimyasal (ECD) gibi dedektörler UHPLC ile birlikte kullanılmaktadır. Bunların yanı sıra, kütle spektrometresi, evaporatif ışık saçılımı (ELS), nükleer manyetik rezonans spektrometresi, endüktif eşleşmiş plazma kütle spektrometresi ve infrared spektrometresi gibi başka dedektörlerin kullanımı da mümkündür (Nováková ve Vlčková, 2009; Dong ve Zhang, 2014). Aşağıda bu dedektörlerden bazıları açıklanmıştır.

Ultraviyole/görünür bölge (UV)

Bu dedektör, ışığı 190-800 nm aralığında absorbe eden organik bileşikler için kullanılır. Bu dedektör, UV veya görünür aralıktaki belirli dalga boylarına ayarlanabilir. İlaç, yaşam bilimi, çevre, tarım ve petrokimya uygulamalarında çalışma avantajları sağlamaktadır (Hussain ve Shaikh, 2016).

Fotodiyot dizi (DAD) dedektörü

DAD dedektörü 190-800 nm aralığında eşzamanlı iki ve üç boyutlu olarak kesin bileşik tanımlama ve gelişmiş optik algılama sunmaktadır. Bu dedektör ilaç alanında geniş bir uygulamaya sahiptir (Malejko vd., 2016).

Floresans (FLD) dedektörü

FLD dedektörü floresans özellikteki maddelerin yüksek duyarlılık ve seçicilikte tayinlerine olanak sağlar. Polinükleer aromatik hidrokarbonlar, kötüye kullanılan ilaçlar ve bazı vitaminler ile floresans veya fosforesans gibi kemilüminesan özelliklere sahip herhangi bir bileşenin analizi için kullanılmaktadır (Stragierowicz vd., 2017).

Kırılma indisi (RI) dedektörü

Bir maddenin UV absorbansının olmadığı veya sınırlı olduğu durumlarda kullanılan bir dedektördür. RI dedektör ile alkoller, şekerler, yağ asitleri, yardımcı maddeler, ham madde ve farmasötik ilaç ürünleri belirlenebilir. Düşük molekül kütleli polimerlerin karakterizasyonunun yanı sıra, UHPLC’de de uygulama alanı bulmaktadır. Bu dedektörün dezavantajı, duyarlılığının düşük olmasıdır (Hussain ve Shaikh, 2016).

Elektrokimyasal (ECD) dedektör

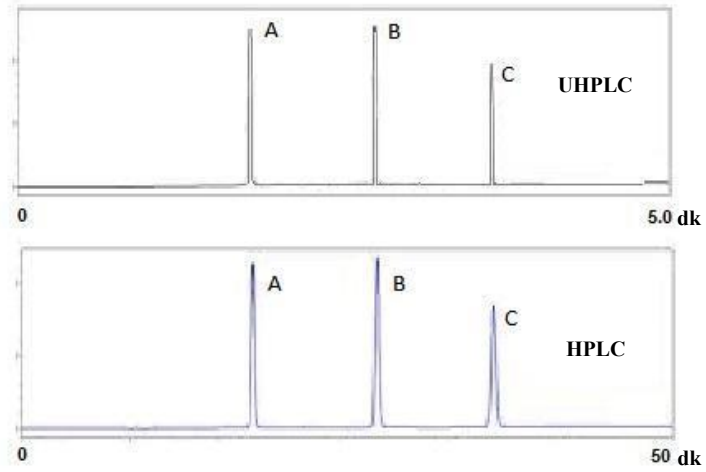
Elektroaktif bileşiklerin analizinde kullanılan elektrokimyasal dedektörler çalışma prensibine göre amperometrik, kulometrik ve voltametrik olarak üçe ayrılır. Elmas, gümüş ve altın gibi çeşitli çalışma elektrotları kullanılarak tayinler yapılmaktadır. Maliyetinin yüksek olması ve sınırlı sayıda madde ile çalışılabilmesi nedeniyle daha az tercih edilmektedir (Hussain ve Shaikh, 2016).

Kütle spektrometresi (MS)

UHPLC, çeşitli alanlarda uygulama bulan maddelerin tanımlanması, miktar tayini ve kütle analizi için kullanılan kütle spektrometresi (MS) ve tandem kütle/kütle spektrometresi (MS-MS) dedektörleri ile birleştirilebilir. Ayrıca bilinmeyen molekülün yapısal aydınlatılması parçalanma ile ortaya çıkarılabilir. Bu dedektör, uygulamasına bağlı olarak çeşitli kütle analizörlerine sahiptir. Bu analizörler tekli kuadrupol, üçlü kuadrupol, iyon tuzacı ve uçuş zamanlı sistemlerdir. Bu dedektörler çok yüksek hassasiyet, seçicilik ve yüksek çözünürlük sağlamaktadır (Swartz, 2005).

2.5. UHPLC'nin Avantajı

UHPLC, yüksek hız, kısa analiz süresi ve daha az çözücü kullanılması açısından geleneksel HPLC'ye göre daha avantajlıdır. Partikül teknolojisinin gelişmesi ile kolonlarda kullanılan 2 µm altındaki partikül boyutları ayırma verimliliğini arttırarak analiz süresinin önemli ölçüde kısalmasını sağlamıştır. Yöntemin hassasiyeti kullanılan dedektörlere göre 3-5 kat daha fazla olabilmektedir (Dong ve Zhang, 2014). Şekil 2'de UHPLC ve HPLC'de elde edilen kromatogramlarda analiz sürelerinin karşılaştırması gösterilmektedir.



Şekil 2.2. UHPLC ve HPLC kromatogramının karşılaştırması (Hussain ve Shaikh, 2016)

UHPLC kullanımı ile yeni metotların optimize edilmesi ve doğrulanması için harcanan zaman büyük ölçüde azalmıştır. Düşük akış hızı ve kısa analiz süresi nedeniyle kullanılan hareketli fazlardaki organik çözücü tüketimi de büyük ölçüde azalmıştır (Taleuzzaman vd., 2015). UHPLC günümüzde daha yüksek ticari fayda, yüksek duyarlılık, çözünürlük, hız ve numune verimi dikkate alındığında geleneksel HPLC'nin yerini almaktadır (Gerber vd., 2004). UHPLC ile geleneksel HPLC'ye göre daha hızlı yöntem geliştirme ve kısa zamanda daha fazla örneğin analizi ile 3-10 kat verimlilik artışı sağlanmaktadır. Yöntem optimizasyonu için kolon ve hareketli faz taramasının hızlı bir şekilde yapılması ve kısa kolonlar sayesinde daha hızlı analiz yapılabilir olması UHPLC'nin bazı avantajlarındandır. Ayrıca kısa ve küçük iç çaplı kolonların kullanılmasıyla örnek hacimleri de azalmıştır (Swartz, 2005).

2.6. UHPLC Uygulamaları

UHPLC yönteminin çok geniş bir uygulama alanı bulunmaktadır. Bu alanlardan bazıları aşağıda açıklanmıştır (Zhu, Goodall ve Wren, 2005).

Farmasötik analiz

Günümüzde UHPLC, farmasötik analizde geniş uygulama alanı bulmaktadır. İlaç maddelerinde ve ilaç ürünü analizinde kullanılan yöntemler iyi geliştirilmeli ve onaylanmalıdır. Ancak bu işlemler geleneksel HPLC'de çok fazla zaman almaktadır. UHPLC, analitik yöntemlerin daha kısa sürede geliştirilmesi ve doğrulanmasına olanak sağlamaktadır. İlaç geliştirmede safsızlık profili, ilaç etken maddesi ve ilaç ürünündeki

safsızlıkların tespit edilerek ölçülmesi gerekmektedir. Bu kapsamda UHPLC tekrar üretilebilirlik, verimlilik ve kısa sürede ayırım özellikleri sayesinde öne çıkmaktadır. UHPLC, numunelerin daha hızlı analizini sağladığından bu avantaj, prosesleri kontrol etmede çok işe yaramaktadır. UHPLC ayrıca, ilaç ürünü formülasyonunda çok önemli testlerden biri olan çözünme testinde de kullanılmaktadır. Bu test, tekdüze güvenilirliği ve partiden partiye yeniden üretilebilirliği sağlamaktadır. İlaç yapım aşamasında, ana metabolitin olabildiğince hızlı bir şekilde belirlenip tanımlandığı ilaç geliştirme sürecinde metabolit çalışmaları gerekmektedir. UHPLC, metabolit ve biyobelirteç tanımlamalarında da kullanılabilmektedir (Srivastava vd., 2010).

Çevre analizi

Çevre analizlerinde kimyasal kirlenmeyi tespit etmek ve tanımlamak için yenilikçi teknikler gerekmektedir. UHPLC ile bu numunelerin analizi daha az zaman ve maliyet ile yapılabilmektedir. UHPLC toprak, hava, tehlikeli atıklar, içme suyu, atık su, pestisit kalıntısı ve perflorlu bileşiklerde organik bileşenlerin tayini için de uygulanmaktadır (Hussain ve Shaikh, 2016).

Gıda analizi

Gıda üreticisi her zaman gıda analizleri için yüksek performanslı bir çözüm arayışı içerisinde. UHPLC yöntemi ile bir gıda numunesinde çeşitli kimyasalların tanımlanarak ürün kalitesi ve gıda güvenliği sağlanır. Ayrıca UHPLC gıda profili oluşturma, gıda ürünlerindeki doğal toksinlerin, vitaminlerin ve pestisit kalıntılarının tanımlanması için de uygulanmaktadır (Hussain ve Shaikh, 2016).

Adli kimya ve toksikoloji

UHPLC, kan, idrar ve oral örneklerden kötüye kullanılan ilaçların tanımlanmasında iyi bir uygulama alanı bulmaktadır. UHPLC ile kannabinoid, opioid ve barbitüratlar tanımlanarak tayin edilebilir. UHPLC'nin çeşitli dedektörlerle birleştirilmesi, mükemmel hassasiyet ve ilaç taramasında kolaylıklar sağlamaktadır (Zhang, Xiaofeng ve Bing, 2008)

Özetle UHPLC, aletsel ve partikül teknolojisindeki ilerlemeler nedeniyle ilaç ve diğer endüstriler için verimliliği artıran, güçlü bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır.

2.7. Örnek Hazırlama

Analiz sırasında örneklerde tayin edilen analitler dışında ortamda başka bileşikler de olduğundan enjeksiyon öncesi örneklerin temizlenmesi ve saflaştırılması gerekmektedir. Örnek hazırlama işlemi çeşitli yöntemlerle yapılabilen önemli bir basamaktır. En fazla kullanılan yöntemlerden biri olan sıvı-sıvı ekstraksiyonunun fazla miktarda çözücü harcanması, çok zaman alması, elde edilen ekstraktın gerekli saflığa sahip olmaması ve yüksek maliyetli olması gibi dezavantajları bulunmaktadır. Bu yüzden daha etkili bir yöntem olan katı faz ekstraksiyonu (solid phase extraction, SPE) sıklıkla kullanılmaktadır (Turner, Subrahmanyam, ve Piletsky, 2009). Bu tez çalışmasındaki deneylerde SPE yöntemi kullanıldığı için aşağıda sadece bu yöntem açıklanmıştır.

2.7.1. Katı faz ekstraksiyonu (SPE)

Bu yöntem çeşitli adsorban maddelerle hazırlanmış küçük kolon veya disklerle gerçekleştirilmektedir. Sıvı örnekleri bozucu maddelerden temizleme, deriştirme veya sonraki deney aşamaları için örnek matriksinin değiştirilmesi amaçlarıyla hazırlanmış olan kolon ve disklerden geçirilmesi esasına dayanmaktadır (Turner, Subrahmanyam ve Piletsky, 2009). Bu yöntemde maddelerin birbirinden ayrılması, analizi yapılacak maddenin molekülleri ile kolondaki adsorban maddedeki etkin gruplar arasındaki moleküller arası etkileşimler sayesinde gerçekleşmektedir. Analizi yapılacak madde molekülleri adsorban maddelerdeki etkin gruplara iyonik, hidrojen, dipol-dipol, dipol-indüklenmiş dipol ve indüklenmiş dipol-indüklenmiş dipol (van der Waals) bağları ile bağlanır. Bu şekilde analit ile matriksteki istenmeyen bileşikler ve çözücüler birbirinden ayrılmaktadır (Zief ve Kiser, 1988).

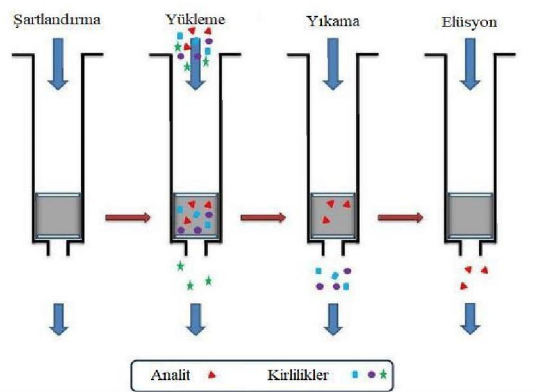
SPE yöntemi özellikle çevre ve gıda, analitik, biyokimya, farmasotik kimya, toksikoloji, adli tıp, organik sentez ve kozmetik vb. alanlarda günümüzde en fazla kullanılan örnek hazırlama yöntemlerinden biri haline gelmiştir (Rossi ve Zhang, 2000). Çizelge 2.4’de SPE yönteminde kullanılan adsorban maddeler ve uygulama alanları özetlenmiştir.

Çizelge 2.4. SPE yönteminde kullanılan adsorban maddeler ve uygulamaları (Yavuz ve Aksoy, 2006).

Adsorban	Uygulama
Oktadesil (C₁₈)	Polar olmayan bileşiklerin ters faz ekstraksiyonu: Suistimal edilmiş ilaçlar, antiepileptikler, antibiyotikler, aromatikler, barbitüratlar, benzodiazepinler, kafein, karbonhidratlar, karboksilik asit, karotenoidler, kolesterol esterleri, esansiyel yağlar, yağ asitleri, gıda koruyucuları, fungusitler, hidrokarbonlar, hipnotikler, lidokain, yağlar, suda eriyen vitaminler, fenoller, sedatifler, steroidler, sülfonamidler, tetrasiklinler, teofilin, trisiklik antidepresanlar, trigliseridler
C₁₈-OH	Polar olmayan bileşiklerin ters faz ekstraksiyonu: Vitaminler, yağda çözünen bileşikler, steroidler/hormonlar, fenolik bileşikler
Oktil (C₈)	Orta derecede polar bileşiklerin ters faz ekstraksiyonu: pestisitler, PAH'lar, PCB'ler ve oktadesil (C ₁₈) tarafından güçlü şekilde tutulan bileşikler
Fenil (C₆H₅)	Polar olmayan bileşiklerin ters faz ekstraksiyonu: Az tutulan hidrofobik bileşikler
Siyano (CN)	Polar bileşiklerin normal faz ekstraksiyonu: Aminler, benzil alkol, suda eriyen vitaminler, PAH'lar, PCB'ler, pestisitler, fenoller, şeker alkolleri

C₁₈-OH dolgu materyali, silika yüzeyindeki silanollerin daha aktif olmasını sağlayan oktadesil bağlı fazların uçsuz bir versiyonudur. Bu düşük yük C₁₈, metabolitlerin fraksiyonlanmasına izin veren ve uçtaki C₁₈'e kıyasla bazik bileşiklerin tutulumunu artıran iyi kontrollü silanol aktivitesine sahiptir (Yavuz ve Aksoy, 2006).

SPE yöntemi şartlandırma, yükleme, yıkama ve elüsyon aşamaları ile gerçekleştirilmektedir. Öncelikle SPE kolonu uygun bir çözücü ile şartlandırılır, daha sonra sıvı örnek kolona yüklenir ve yıkama işlemiyle kolon kirliliklerden temizlenir. Son olarak analitin kolondan elüsyonu gerçekleştirilir (Yavuz ve Aksoy, 2006; Nováková ve Vlčková, 2009).



Şekil 2.3. SPE yönteminin şematik gösterimi (Peterson, 2016)

3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Örnekler

Fenolik asit tayinlerinde kullanılan erikler Eskişehir çevresinde bulunan çiftçi bahçelerinden toplanmıştır. Bu erik türlerinin numaralandırılmaları şu şekilde yapılmıştır: 1. Fortune (Eskişehir), 2. Fortune (Sarıcakaya), 3. Friar (Eskişehir), 4. Friar (Sarıcakaya), 5. Black Amber (Eskişehir), 6. Black Amber (Sarıcakaya), 7. Angeleno (Eskişehir), 8. Angeleno (Sarıcakaya), 9. Black Diamond (Eskişehir), 10. Black Diamond (Sarıcakaya). Bu erikler, katı meyve suyu sıkacağından sıkıldıktan sonra -20°C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir. Analizlerde kullanılan diğer örnekler; piknogenol (30 mg, pycnogenol) (Solgar, Türkiye) ve supradin (Supradyn Energy, Focus, Ginseng) (Bayer, Türkiye) eczaneden temin edilmiştir.

3.2. Kimyasallar

Bu tez çalışmasında kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıktadır. Deneylerde kullanılan metil alkol (MeOH) ($\geq 99,9\%$; gradiyent saflıkta), formik asit ($\geq 99,9\%$; gradiyent saflıkta), protokateşik asit, p-hidroksibenzoik asit, kafeik asit, şirincik asit, p-kumarik asit, t-ferulik asit, rozmarinik asit, t-sinamik asit ve etil paraben Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, A.B.D.) firmasından satın alınmıştır.

3.3. Araç, Gereç ve Cihazlar

Kromatografik çalışmalarda kullanılan cihazlar çizelge 3.1’de gösterilmiştir. Katı-faz ekstraksiyonu deneylerinde C₁₈ (3 ml; Supelco, A.B.D.) ve C₁₈-OH (500 mg, 3 ml; Agilent, Waldbronn, Almanya) kolonları ve örneklerin süzülmesi için 0,2 µm gözenek çaplı Sartorius (Almanya) markalı selüloz asetat şırınga filtreleri kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan ultra saf su Arium comfort (Hollanda) markalı su saflaştırma cihazından temin edilmiştir.

Çizelge 3.1. Kromatografik çalışmalarda kullanılan cihazlar

UHPLC cihazı	Agilent 1290 Infinity (Waldbronn, Almanya)
UV dedektör	Agilent 1290 VWD
Kolon	Agilent Zorbax Eclipse Plus-C8 (3,0 mm×150 mm×1,8 µm)
Ultrasonik banyo	Bandelin Sonorex (Almanya)
Vortex cihazı	Daigger Scientific Industries (A.B.D.)

3.4. İstatistiksel Analizler

Çalışmadaki hesaplamalar Microsoft excel ve GraphPad Prism v.6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) programları ile yapılmıştır.

3.5. Çözeltilerin Hazırlanması

3.5.1. Standart çözeltilerin hazırlanması

Fenolik asit standartlarından uygun miktarlarda tartılarak %50 (h/h) metil alkol ile ana stok çözeltiler hazırlanmıştır. Bu stok çözeltilerin derişimleri PCA için $6,48 \times 10^{-3}$ M, p-HBZ için $7,24 \times 10^{-3}$ M, CAF için $5,55 \times 10^{-3}$ M, SYR için $2,52 \times 10^{-3}$ M, p-COU için $6,09 \times 10^{-3}$ M, t-FER için $5,14 \times 10^{-3}$ M, ROS için $2,77 \times 10^{-3}$ M ve t-CIN için $6,74 \times 10^{-3}$ M'dır. Fenolik asitlerin tek tek hazırlanan bu ana stok çözeltilerinin her birinden belli bir hacimde alınarak %50 (h/h) metil alkol ile 15 ml'ye seyreltilmiştir. Çizelge 3.2'de Fenolik asit standartların ana stoklarından alınan hacimler ve son çözeltideki derişimleri verilmiştir. Çözeltiler 0,2 µm gözenek çaplı şırınga filtrelerinden süzülerek deneylerde kullanılabilece kadar -20°C'de saklanmıştır.

Çizelge 3.2. Fenolik asit standartlarının stoklarından alınan hacimler ve son derişimleri

Fenolik asit	Ana stokdan alınan hacim (µl)	Son derişim
PCA	694	$3,00 \times 10^{-4}$ M
p-HBZ	829	$4,00 \times 10^{-4}$ M
CAF	405	$1,50 \times 10^{-4}$ M
SYR	893	$1,50 \times 10^{-4}$ M
p-COU	234	$9,50 \times 10^{-5}$ M
t-FER	438	$1,50 \times 10^{-4}$ M
ROS	812	$1,50 \times 10^{-4}$ M
t-CIN	129	$5,80 \times 10^{-5}$ M

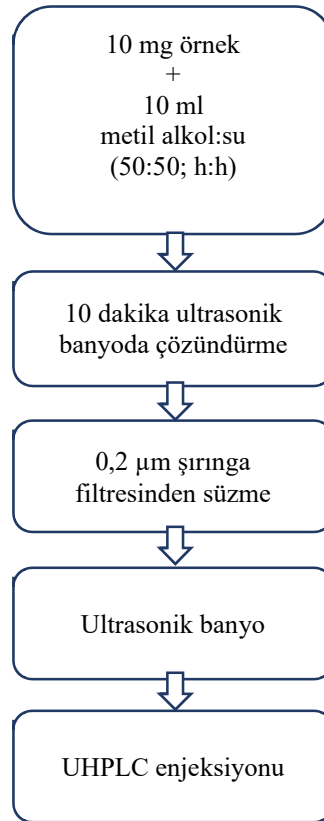
3.5.2. İç standart çözeltisinin hazırlanması

Deneylerde iç standart (IS) olarak etil paraben kullanılmıştır. Uygun miktarda etil paraben tartıldıktan sonra üzerine 5 ml %50 (h/h) metil alkol/su eklenerek derişimi $5,99 \times 10^{-3}$ M olan çözelti hazırlanmıştır. Daha sonra bu çözelti UHPLC deneylerinde kullanılmak üzere son derişimi 7×10^{-5} M olacak şekilde %50 (h/h) metil alkol/su ile seyreltilmiştir.

3.6. Örnek Hazırlama

3.6.1. Pknogenol ve Supradin örneklerinin hazırlanması

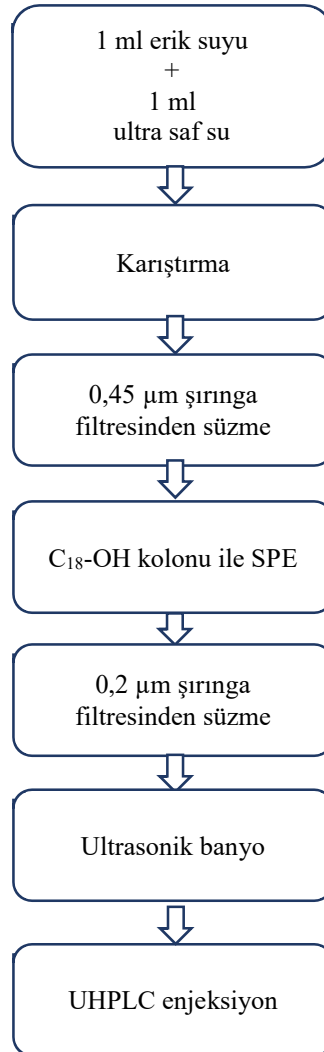
Pknogenol film tablet halinde olduğundan herhangi bir öğütme işlemi yapılmamıştır. Supradin tableti ise havanda öğütülerek toz haline getirilmiştir. Örneklerden 10 mg tartılarak 10 ml metil alkol:su (50:50; h/h) eklenmiş ve vortex cihazıyla karıştırılmıştır. Daha sonra 10 dakika ultrasonik banyoda tutularak 0,2 µm'lik şırınga filtresinden süzölmüştür. Çözeltiden 200 µl alınarak, 100 µl IS ve 700 µl %50 metil alkol/su eklenerek karıştırılmış ve ultrasonik banyoda gaz giderme işleminden sonra UHPLC cihazına enjeksiyon yapılmıştır. Pknogenol ve Supradin örneklerinin ekstraksiyonu şekil 3.1'de şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 3.1. Pknogenol ve Supradin tabletlerinden ekstraksiyon

3.6.2. Erik suyu örneklerinin hazırlanması

1 ml erik suyu örneğine 1 ml ultra saf su eklendikten sonra vortex cihazıyla 5 dakika karıştırılmıştır. Örnekler 0,45 μm 'lik şırınga filtresinden süzölmüştür. Örneklerin saflaştırılması ve temizlenmesi için SPE yöntemi uygulanmıştır. Ekstraksiyonda kullanılan $\text{C}_{18}\text{-OH}$ kolonun şartlandırılması için 2 ml metil alkol ve 2 ml hacimce %2'lik HCl kullanılmıştır. Daha sonra SPE kolonundan örnek geçirilmiş ve 2 ml hacimce %2'lik HCl ile yıkama yapılmıştır. Son olarak 2 ml metil alkol ile örnek SPE kolonundan elüe edilerek 0,2 μm 'lik şırınga filtreden süzölmüştür. Bu işlemler sonrasında elüattan 200 μl alınarak 100 μl IS ve 700 μl %50 metil alkol eklenerek karıştırılıp ultrasonik banyoda gazı giderildikten sonra UHPLC cihazına enjeksiyon yapılmıştır. Şekil 3.2'de erik suyu örneklerinden ekstraksiyon yöntemi şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Erik suyu örneklerinden ekstraksiyon

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 UHPLC Yöntem Optimizasyon Çalışmaları

UHPLC yöntem optimizasyonu çalışmalarında, aletsel ve deneysel parametrelerin değiştirilmesi ile fenolik asitlerden PCA, p-HBZ, CAF, SYR, p-COU, t-FER, ROS, t-CIN'in aynı anda tayinleri için en uygun olan koşullar belirlenmiştir. Bu amaçla çeşitli akış hızları, sıcaklık, enjeksiyon hacmi, farklı hareketli fazlar ve bileşimleri ile farklı özelliklerde UHPLC kolonları ve dalga boyu gibi parametreler araştırılmıştır. Ayrıca deneylerde IS olarak metil paraben, etil paraben, propil paraben, bütül paraben, parasetamol gibi farklı maddeler denenmiştir. Bu denemeler sonucunda metil paraben, bütül paraben ve parasetamol tayini yapılan fenolik asitlerin alıkonma zamanlarıyla örtüştüğünden ve dolayısıyla pik alanlarının hesaplanmasında sorun oluşturmamasından dolayı bu maddelerin IS olarak kullanımından vazgeçilmiştir. Sonuç olarak erik suyu örnekleri ve takviye edici tabletletin kromatogramları da göz önünde bulundurularak etil paraben en uygun IS olarak belirlenmiştir.

Optimizasyon çalışmalarında, Poroshell 120 EC-C18 (3,0 mm×100 mm×2,7 µm), Poroshell 120 SB-AQ (3,0 mm×100 mm×2,7 µm), Zorbax Eclipse Plus-C18 (3,0 mm×150 mm×1,8 µm), Zorbax Extend C18 (2,1 mm×100 mm×1,8 µm), Zorbax Eclipse Plus-C18 (2,1 mm×50 mm×1,8 µm), Kinetex F5 100 °A (2,1 mm×150 mm×2,6 µm), Kinetex Bifenil 100 °A (2,1 mm×150 mm×2,6 µm) gibi farklı kolonlar denenmiştir. PCA, p-HBZ, CAF, SYR, p-COU, t-FER, ROS, t-CIN ve IS için en iyi ayırım Zorbax Eclipse Plus-C8 (3,0 mm×150 mm×1,8 µm) kolonunda elde edilmiştir.

Fenolik asitler için en uygun hareketli fazı bulmak için yapılan çalışmalarda su ve metil alkol karışımlarının farklı oranları ile formik asit ve asetik asit gibi farklı asitler ile deneyler gerçekleştirilmiştir. Sonuçta en uygun hareketli faz A fazı (su:metil alkol:formik asit; 88:10:2; h/h/h) ve B fazı (su:metil alkol:formik asit; 8:90:2; h/h/h) olarak bulunmuştur (Öztürk, Tunçel, ve Tunçel, 2007).

Çalışmada PCA, p-HBZ, CAF, SYR, p-COU, t-FER, ROS ve t-CIN için 254 nm, 272 nm ve 280 nm dalga boyları denenmiştir. En iyi sonuçlar 280 nm dalga boyu değerinde elde edilmiştir. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucu belirlenen en uygun kromatografik koşullar Çizelge 4.1'de verilmiştir. Ayrıca UHPLC deneylerinde fenolik asitlerin ayırımında gradiyent program da uygulanmıştır (Çizelge 4.2).

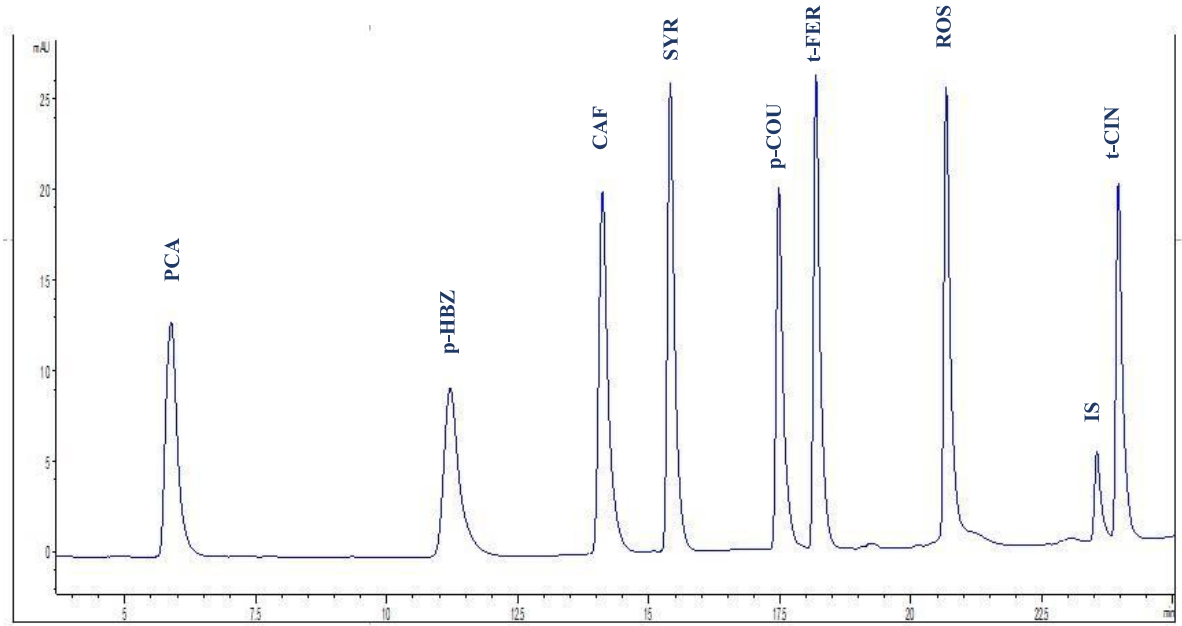
Çizelge 4.1. *UHPLC koşulları*

Kolon:	Zorbax Eclipse Plus-C8 (3,0 mm×150 mm×1,8 µm)
Kolon sıcaklığı:	25°C
Hareketli faz:	A fazı (su:metil alkol:formik asit; 88:10:2; h/h/h) B fazı (su:metil alkol:formik asit; 8:90:2; h/h/h)
Akış hızı:	0,4 ml/dk
Enjeksiyon hacmi:	10 µl
UV dedektör dalga boyu:	280 nm
Oto örnekleyici sıcaklığı:	4°C

Çizelge 4.2. *Fenolik asitlerin tayininde kullanılan gradiyent programı*

Zaman (dk)	A (%)	B (%)
0	100	0
8	100	0
13	75	25
18	55	45
19	55	45
26	15	85
29	100	0
31	100	0

Şekil 4.1’de optimum UHPLC koşullarında elde edilen 7×10^{-5} M IS içeren PCA, p-HBZ, CAF, SYR, p-COU, t-FER, ROS ve t-CIN standart fenolik asit çözeltisine ait kromatogram görülmektedir. Geliştirilen UHPLC yöntemi ile 8 fenolik asit ve IS aynı anda 24 dakika içerisinde ayrılmıştır. Belirlenen optimum UHPLC koşullarında PCA 5,9 dk, p-HBZ 11,2 dk, CAF 14,1 dk, SYR 15,4 dk, p-COU 17,4 dk, t-FER 18,1 dk, ROS 20,5 dk, IS 23,4 dk ve t-CIN 23,8 dk’da ayrılmıştır.



Şekil 4.1. Optimum UHPLC koşullarında elde edilen PCA, p-HBZ, CAF, SYR, p-COU, t-FER, ROS ve t-CIN standart fenolik asit çözeltisi ve $7 \times 10^{-5} M$ IS'ye ait kromatogram

4.2. Gıda Örneklerinin Analize Hazırlanması

Geliştirilen UHPLC yönteminde erik suyu örneklerinin analizleri için en uygun ekstraksiyon yönteminin bulunması amacıyla çeşitli denemeler yapılmıştır. Gıda örneklerinin analize hazırlanması için C_{18} -OH SPE kolonu ve C_{18} SPE kolonu ile iki farklı ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Bu SPE kolonları ile yapılan ekstraksiyon yöntemi tezin “3.6.2. Erik suyu örneklerinin hazırlanması” bölümünde açıklanmıştır.

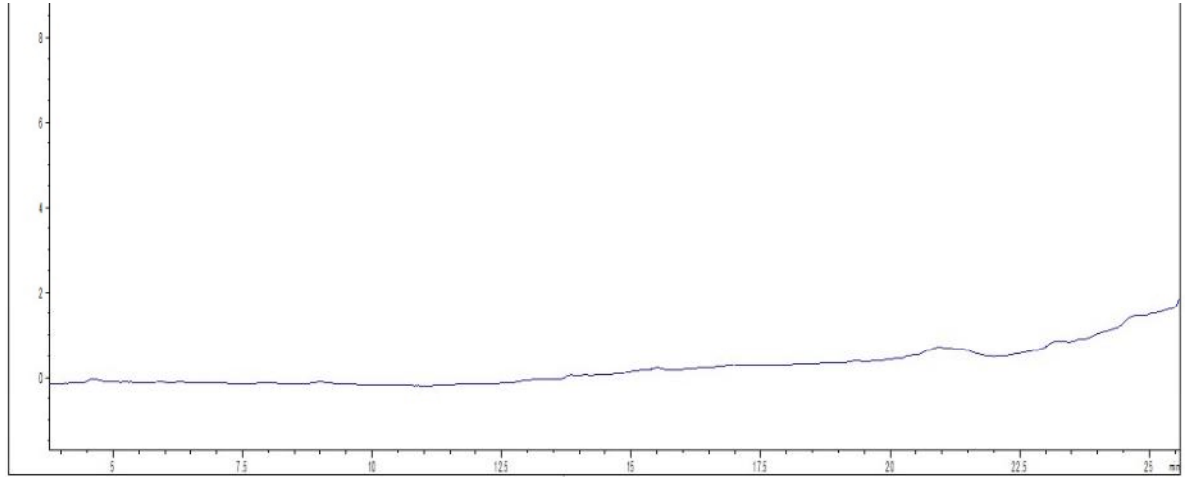
Tez çalışmasında uygulanan SPE yöntemleri sonucunda elde edilen %Geri Kazanım (%GK) sonuçları Çizelge 4.3’de verilmiştir. %GK değerleri, boş matriks olarak kullanılan üzüm suyu üzerine $1,50 \times 10^{-5} M$ fenolik asit standart karışımı çözeltisi eklenerek C_{18} -OH SPE kolonu ve C_{18} SPE kolonu ile belirtilen çözücülerle ekstraksiyon işlemleri yapılarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.3. *C₁₈-OH SPE ve C₁₈ SPE kolonlarının %Geri Kazanım (%GK) değerleri*

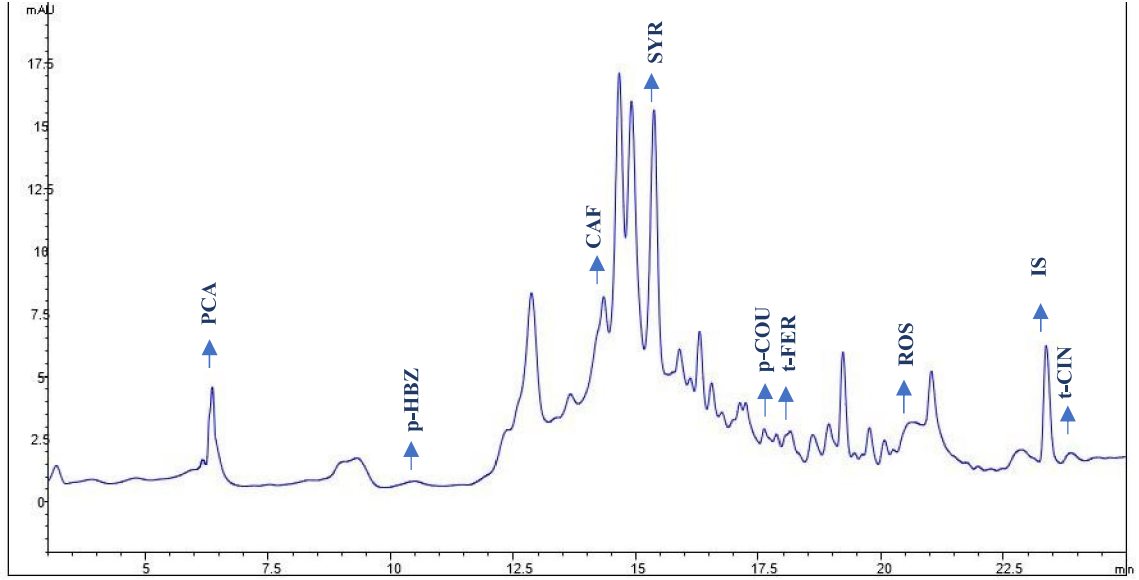
Fenolik asit	C ₁₈ -OH SPE	C ₁₈ SPE
	%GK	%GK
PCA	95	71
p-HBZ	99	97
CAF	98	81
SYR	94	65
p-COU	96	96
t-FER	96	99
ROS	95	54
t-CIN	99	96

Çizelge 4.3'den de görüldüğü gibi C₁₈-OH SPE kolonu ile C₁₈ SPE kolonuna göre daha yüksek %Geri Kazanım değerleri elde edilmiştir. Bu yüzden deneylerde C₁₈-OH SPE kolonu ile devam edilmiştir.

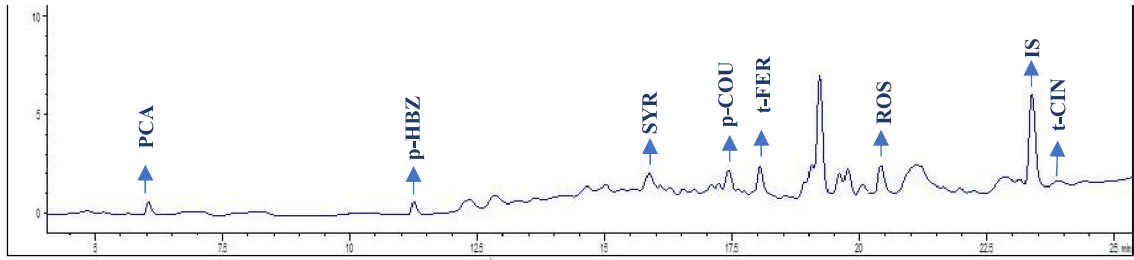
Aşağıda optimum UHPLC koşullarında üzüm suyu, erik suları (9 ve 6 kodlu), piknogenol ve supradin örneklerinde fenolik asitlerin tayinine ait kromatogramlar verilmiştir (Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6).



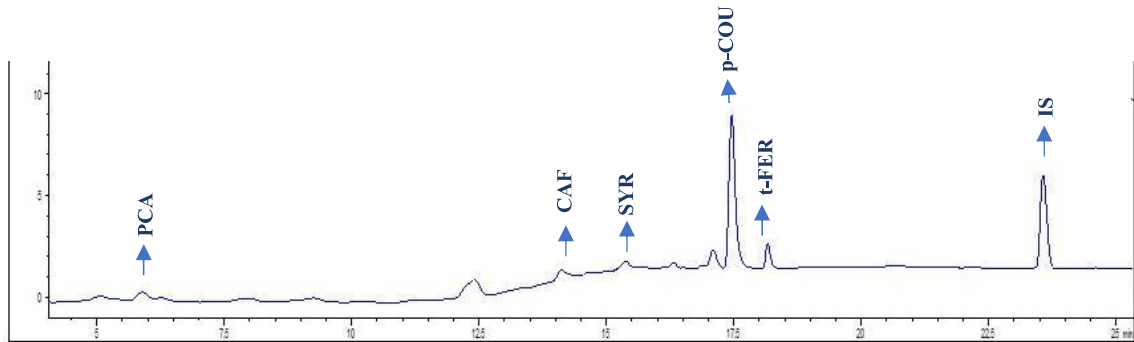
Şekil 4.2. *Optimum UHPLC koşullarında elde edilen üzüm suyuna ait kromatogram*



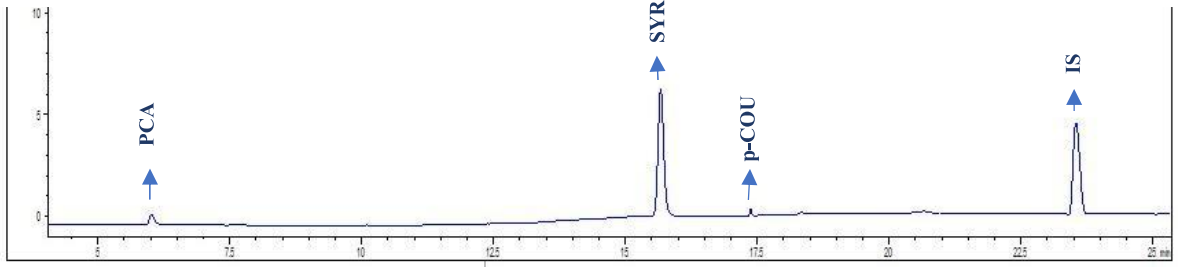
Şekil 4.3. Optimum UHPLC koşullarında elde edilen erik suyuna (9 kodlu) ait kromatogram



Şekil 4.4. Optimum UHPLC koşullarında elde edilen erik suyuna (6 kodlu) ait kromatogram



Şekil 4.5. Optimum UHPLC koşullarında elde edilen pignogenol film tabletine ait kromatogram



Şekil 4.6. Optimum UHPLC koşullarında elde edilen supradin tabletine ait kromatogram

Optimize edilen bu UHPLC koşulları ile yöntem validasyon çalışmaları yapılmıştır.

4.3. UHPLC Yöntem Validasyon Çalışmaları

Fenolik bileşikler için geliştirilen UHPLC yöntemi, Uluslararası Uyumluluk Konferansı (International Conference on Harmonization, ICH)'na göre doğrusallık, gözlenebilme sınırı (LOD), tayin alt sınırı (LOQ), kesinlik, doğruluk ve kararlılık parametreleri araştırılarak valide edilmiştir (ICH, 1996).

4.3.1. Doğrusallık ve duyarlılık

UHPLC-UV yönteminin doğrusallığı, her biri son derişimi 7×10^{-6} M IS içeren fenolik bileşiklerin standart çözeltilerinin yedi noktalı kalibrasyon grafikleri ile gösterilmiştir. PCA için $3,00 \times 10^{-7}$ – $3,00 \times 10^{-5}$ M; p-HBZ için $4,00 \times 10^{-7}$ – $4,00 \times 10^{-5}$ M; CAF için $1,50 \times 10^{-7}$ – $1,50 \times 10^{-5}$ M; SYR için $1,50 \times 10^{-7}$ – $1,50 \times 10^{-5}$ M; p-COU için $9,50 \times 10^{-8}$ – $9,50 \times 10^{-6}$ M; t-FER için $1,50 \times 10^{-7}$ – $1,50 \times 10^{-5}$ M; ROS için $1,50 \times 10^{-7}$ – $1,50 \times 10^{-5}$ M ve t-CIN için $5,80 \times 10^{-7}$ – $5,80 \times 10^{-5}$ M derişim aralıklarında olan çözeltilerin üç ayrı günde ve 4'er kez enjeksiyonları yapılmıştır. Deneylerde standartların ve iç standardın pik normalizasyon (PN) oranları ($R = \text{PN}_{\text{Std}}/\text{PN}_{\text{IS}}$, $\text{PN} = \text{pik alanı}/\text{pik alıkonma zamanı}$) kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır. Yöntemin gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin alt sınırı (LOQ) aşağıda verilen eşitlikler ile hesaplanmıştır.

$$\text{LOD} = 3,3 \times \text{standart sapma (SS)}/\text{eğim (m)}$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \text{standart sapma (SS)}/\text{eğim (m)}$$

Bu formüllerde yer alan SS= düşük derişimdeki madde çözeltilisinin standart sapma değeri ve m= kalibrasyon eşitliğinin eğim değeridir.

Çizelge 4.4’de fenolik asitlerin her biri için regresyon analiz sonuçları verilmiştir. Ayrıca Çizelge 4.4’de gıda örnekleri için geliştirilen UHPLC yöntemi ile belirlenen LOD ve LOQ değerleri de bulunmaktadır. Gıda örnekleri için geliştirilen bu yöntem ile yapılan istatistiksel hesaplamalar sonucunda fenolik asitler için yüksek korelasyon katsayıları ile doğrusal grafikler elde edilmiştir.

Çizelge 4.4. Fenolik asitlerin regresyon analiz sonuçları

Fenolik Asit	Gün içi (n=4)			Günler arası (n=12)
	1. Gün	2. Gün	3. Gün	
<u>PCA</u>				
Eğim±SS	631705 ± 1532	655247 ± 1972	661196 ± 1523	650868 ± 1941
Kesim±SS	-0,07193 ± 0,01912	-0,05837 ± 0,02461	-0,1296 ± 0,01901	-0,08619 ± 0,02423
r ²	0,9999	0,9998	0,9999	0,9993
LOD				1,02×10 ⁻⁸ M
LOQ				3,09×10 ⁻⁸ M
<u>p-HBZ</u>				
Eğim±SS	242332 ± 919,0	249098 ± 1439	245631 ± 612,2	246012 ± 706,7
Kesim±SS	-0,08102 ± 0,01530	-0,1466 ± 0,02395	-0,06617 ± 0,01019	-0,09932 ± 0,01176
r ²	0,9997	0,9991	0,9998	0,9994
LOD				1,29×10 ⁻⁷ M
LOQ				3,90×10 ⁻⁷ M
<u>CAF</u>				
Eğim±SS	657461 ± 3981	663323 ± 2710	658918 ± 2379	660158 ± 1787
Kesim±SS	-0,04800 ± 0,02485	-0,003746 ± 0,01691	-0,01347 ± 0,01485	-0,01957 ± 0,01115
r ²	0,9993	0,9996	0,9997	0,9995
LOD				2,77×10 ⁻⁸ M
LOQ				8,39×10 ⁻⁸ M
<u>SYR</u>				
Eğim±SS	594382 ± 2656	606851 ± 3418	610465 ± 1007	604775 ± 1820
Kesim±SS	0,01274 ± 0,01658	0,04937 ± 0,02133	0,01459 ± 0,006283	0,02699 ± 0,01136
r ²	0,9996	0,9992	0,9999	0,9993
LOD				9,42×10 ⁻⁹ M
LOQ				2,86×10 ⁻⁸ M

Çizelge 4.4. devam Fenolik asitlerin regresyon analiz sonuçları

Fenolik Asit	Gün içi (n=4)			Günler arası (n=12)
	1. Gün	2. Gün	3. Gün	
<u>p-COU</u>				
Eğim±SS	630580 ± 1812	629620 ± 3324	647107 ± 2341	636141 ± 1890
Kesim±SS	-0,02332 ± 0,007162	-0,003866 ± 0,01314	-0,02516 ± 0,009254	-0,01640 ± 0,007473
r ²	0,9998	0,9993	0,9997	0,9993
LOD				1,44×10 ⁻⁸ M
LOQ				4,35×10 ⁻⁸ M
<u>t-FER</u>				
Eğim±SS	461767 ± 1237	462384 ± 2660	474306 ± 1335	466680 ± 1331
Kesim±SS	-0,01047 ± 0,007719	-0,005542 ± 0,01660	-0,02540 ± 0,008334	-0,01473 ± 0,008307
r ²	0,9999	0,9991	0,9998	0,9994
LOD				1,06×10 ⁻⁸ M
LOQ				3,22×10 ⁻⁸ M
<u>ROS</u>				
Eğim±SS	403680 ± 1740	403646 ± 1505	406486 ± 1647	404651 ± 935,8
Kesim±SS	-0,03062 ± 0,01086	-0,02168 ± 0,009395	-0,03496 ± 0,01028	-0,02861 ± 0,005841
r ²	0,9996	0,9996	0,9996	0,9996
LOD				2,33×10 ⁻⁸ M
LOQ				7,07×10 ⁻⁸ M
<u>t-CIN</u>				
Eğim±SS	686949 ± 3389	688698 ± 3050	687218 ± 3727	687104 ± 2113
Kesim±SS	0,03397 ± 0,008179	0,05855 ± 0,007360	0,06643 ± 0,008996	0,05086 ± 0,005099
r ²	0,9995	0,9995	0,9992	0,9993
LOD				1,24×10 ⁻⁸ M
LOQ				3,76×10 ⁻⁸ M

r²: regresyon katsayısı, SS: standart sapma

4.3.2. Kesinlik

Yöntemin kesinliği, günler içi ve günler arası tekrar edilebilirlik ile değerlendirilmiştir. Bu amaçla fenolik bileşiklerin farklı derişim aralıklarındaki çözeltileri her birinde 7×10⁻⁶ M IS olacak şekilde 3 set olarak hazırlanmış, 3 gün ve 6’şar kez (n=6) enjeksiyonları yapılmıştır. Kesinlik, yüzde bağıl standart sapma (%BSS) ile verilmiştir. Kesinlik ile ilgili sonuçlar Çizelge 4.5’de verilmiştir. Çizelge 4.5 incelendiğinde fenolik bileşikler için gün içi ve günler arası deneylerden elde edilen %BSS değerlerinin %3,82’den küçük olduğu bulunmuştur. Böylelikle yöntemin tekrarlanabilirliğinin iyi olduğu söylenebilir.

Çizelge 4.5. Kesinlik sonuçları

PCA Derişimi (M)		Gün içi (n=6)			Günler arası (n=18)
		1. Gün	2. Gün	3. Gün	
$9,00 \times 10^{-7}$	$\bar{X}$	0,5124	0,537	0,5351	0,5282
	SS	0,0169	0,006	0,0035	0,0149
	%BSS	3,2910	1,063	0,6474	2,8256
$4,50 \times 10^{-6}$	$\bar{X}$	2,9342	2,988	2,9558	2,9594
	SS	0,0378	0,042	0,0159	0,0376
	%BSS	1,2879	1,402	0,5365	1,2708
$1,50 \times 10^{-5}$	$\bar{X}$	9,9862	10,148	10,1199	10,0847
	SS	0,2012	0,147	0,1042	0,1544
	%BSS	2,0145	1,447	1,0295	1,5309

p-HBZ Derişimi (M)		Gün içi (n=6)			Günler arası (n=18)
		1. Gün	2. Gün	3. Gün	
$1,20 \times 10^{-6}$	$\bar{X}$	0,2234	0,2138	0,2223	0,2198
	SS	0,0060	0,0056	0,0072	0,0071
	%BSS	2,7060	2,6221	3,2206	3,2303
$6,00 \times 10^{-6}$	$\bar{X}$	1,4706	1,4401	1,4633	1,4580
	SS	0,0287	0,0400	0,0122	0,0289
	%BSS	1,9531	2,7788	0,8354	1,9799
$2,00 \times 10^{-5}$	$\bar{X}$	4,9983	4,9264	4,9273	4,9506
	SS	0,0554	0,0322	0,1132	0,0742
	%BSS	1,1093	0,6539	2,2968	1,4989

Çizelge 4.5. devam Kesinlik sonuçları

CAF Derişimi (M)		Gün içi (n=6)			Günler arası (n=18)
		1. Gün	2. Gün	3. Gün	
$4,50 \times 10^{-7}$	$\bar{X}$	0,2959	0,2886	0,2855	0,2900
	SS	0,0097	0,0098	0,0030	0,0084
	%BSS	3,2775	3,3898	1,0586	2,9071
$2,25 \times 10^{-6}$	$\bar{X}$	1,5733	1,6028	1,6073	1,5944
	SS	0,0232	0,0352	0,0012	0,0265
	%BSS	1,4737	2,1986	0,0768	1,6619
$7,50 \times 10^{-6}$	$\bar{X}$	5,2837	5,2054	5,3463	5,2784
	SS	0,0692	0,0618	0,0514	0,0809
	%BSS	1,3092	1,1868	0,9623	1,5332

SYR (M)		Gün içi (n=6)			Günler arası (n=18)
		1. Gün	2. Gün	3. Gün	
$4,50 \times 10^{-7}$	$\bar{X}$	0,2724	0,2845	0,2650	0,2740
	SS	0,0067	0,0040	0,0095	0,0105
	%BSS	2,4411	1,4168	3,5754	3,8250
$2,25 \times 10^{-6}$	$\bar{X}$	1,3623	1,4101	1,3885	1,3870
	SS	0,0252	0,0271	0,0149	0,0288
	%BSS	1,8468	1,9244	1,0748	2,0758
$7,50 \times 10^{-6}$	$\bar{X}$	4,6244	4,5872	4,6193	4,6103
	SS	0,0529	0,0305	0,0321	0,0387
	%BSS	1,1433	0,6643	0,6957	0,8387

p-COU (M)		Gün içi (n=6)			Günler arası (n=18)
		1. Gün	2. Gün	3. Gün	
$2,85 \times 10^{-7}$	$\bar{X}$	0,1742	0,1663	0,1623	0,1676
	SS	0,0049	0,0016	0,0019	0,0059
	%BSS	2,8064	0,9917	1,1997	3,5402
$1,43 \times 10^{-6}$	$\bar{X}$	0,9144	0,9243	0,9238	0,9208
	SS	0,0144	0,0210	0,0066	0,0140
	%BSS	1,5755	2,2670	0,7145	1,5194
$4,75 \times 10^{-6}$	$\bar{X}$	3,1337	3,1605	3,1410	3,1451
	SS	0,0178	0,0587	0,0429	0,0393
	%BSS	0,5675	1,8562	1,3660	1,2492

Çizelge 4.5. devam Kesinlik sonuçları

t-FER		Gün içi (n=6)			Günler arası (n=18)
		1. Gün	2. Gün	3. Gün	
$4,50 \times 10^{-7}$	$\bar{X}$	0,2080	0,1965	0,1934	0,1993
	SS	0,0064	0,0018	0,0014	0,0075
	%BSS	3,0833	0,9259	0,7036	3,7517
$2,25 \times 10^{-6}$	$\bar{X}$	1,0536	1,0724	1,0715	1,0658
	SS	0,0188	0,0229	0,0106	0,0182
	%BSS	1,7824	2,1396	0,9901	1,7098
$7,50 \times 10^{-6}$	$\bar{X}$	3,6029	3,5601	3,5989	3,5873
	SS	0,0590	0,0333	0,0177	0,0406
	%BSS	1,6382	0,9349	0,4915	1,1307

ROS (M)		Gün içi (n=6)			Günler arası (n=18)
		1. Gün	2. Gün	3. Gün	
$4,50 \times 10^{-7}$	$\bar{X}$	0,1939	0,1969	0,1949	0,1953
	SS	0,0059	0,0042	0,0010	0,0039
	%BSS	3,0366	2,1463	0,4958	1,9933
$2,25 \times 10^{-6}$	$\bar{X}$	0,9407	0,9799	0,9568	0,9592
	SS	0,0059	0,0193	0,0165	0,0215
	%BSS	0,6314	1,9708	1,7287	2,2405
$7,50 \times 10^{-6}$	$\bar{X}$	3,1920	3,2019	3,1496	3,1812
	SS	0,0201	0,0278	0,0497	0,0386
	%BSS	0,6287	0,8681	1,5778	1,2138

t-CIN (M)		Gün içi (n=6)			Günler arası (n=18)
		1. Gün	2. Gün	3. Gün	
$1,74 \times 10^{-7}$	$\bar{X}$	0,0856	0,0850	0,0830	0,0845
	SS	0,0018	0,0012	0,0008	0,0017
	%BSS	2,1467	1,4583	0,9435	1,9821
$8,70 \times 10^{-7}$	$\bar{X}$	0,5647	0,5658	0,5618	0,5641
	SS	0,0050	0,0067	0,0053	0,0053
	%BSS	0,8931	1,1878	0,9513	0,9386
$2,90 \times 10^{-6}$	$\bar{X}$	1,9727	1,9713	1,9892	1,9778
	SS	0,0137	0,0106	0,0082	0,0129
	%BSS	0,6948	0,5353	0,4127	0,6521

$\bar{X}$: ortalama; SS: standart sapma; %BSS: yüzde bağıl standart sapma

4.3.3. Doğruluk

UHPLC yönteminin doğruluk çalışmaları, boş örnek matriksi olarak seçilen üzüm suyu üzerine ekstraksiyon işlemi öncesinde derişimi bilinen fenolik asit standart çözeltileri eklenerek %Geri Kazanım değerlerinin hesaplanması yolu ile gerçekleştirilmiştir. %Geri Kazanım değerlerinin hesaplanması için üzüm suyuna 3 farklı derişimde standart fenolik asit çözeltileri eklenmiştir. Geri kazanım deneyleri her bir derişim için iki paralel olarak yapılmış ve çözeltiler üçer kez enjekte edilmiştir. %Geri Kazanım değerleri aşağıda gösterilen eşitlik ile hesaplanmıştır.

$$\% \text{Geri Kazanım} = (X \text{ ölçülen değer} / X \text{ gerçek değer}) \times \%100$$

Çizelge 4.6. Doğruluk sonuçları (n: deney sayısı, l: enjeksiyon sayısı)

	Matrikse eklenen derişim (M)	%Geri Kazanım (n=2, l=3)	SS	%BSS
PCA	$7,50 \times 10^{-6}$	99	2,2198	2,2483
	$1,50 \times 10^{-5}$	94	1,4692	1,5293
	$3,00 \times 10^{-5}$	96	1,5671	1,6122
p-HBZ	$1,00 \times 10^{-5}$	94	1,4325	1,5036
	$2,00 \times 10^{-5}$	96	2,6320	2,7313
	$4,00 \times 10^{-5}$	94	0,8948	0,9500
CAF	$3,75 \times 10^{-6}$	97	1,4064	1,4446
	$7,50 \times 10^{-6}$	95	0,8368	0,8846
	$1,50 \times 10^{-5}$	95	1,2192	1,2767
SYR	$3,75 \times 10^{-6}$	95	1,9551	2,0447
	$7,50 \times 10^{-6}$	92	1,4179	1,5103
	$1,50 \times 10^{-5}$	98	0,6752	0,6860
p-COU	$2,38 \times 10^{-6}$	94	2,6907	2,8343
	$4,75 \times 10^{-6}$	93	1,7562	1,8795
	$9,50 \times 10^{-6}$	96	1,4100	1,4634
t-FER	$3,75 \times 10^{-6}$	94	2,5551	2,6926
	$7,50 \times 10^{-6}$	96	2,4667	2,5447
	$1,50 \times 10^{-5}$	93	1,0945	1,1697
ROS	$3,75 \times 10^{-6}$	95	2,2012	2,3095
	$7,50 \times 10^{-6}$	92	1,3791	1,4809
	$1,50 \times 10^{-5}$	96	1,3413	1,3875
t-CIN	$1,45 \times 10^{-6}$	97	1,8603	1,9125
	$2,90 \times 10^{-6}$	96	1,9398	2,0164
	$5,80 \times 10^{-6}$	96	0,6761	0,7043

Doğruluk ile ilgili verilerin hesaplanmasında doğrusallık sonucunda elde edilen kalibrasyon eğrilerinin denklemleri kullanılmıştır. Çizelge 4.6'da fenolik asitlerin doğruluk sonuçları %Geri Kazanım, standart sapma ve %BSS'lar ile verilmiştir. Buna göre elde edilen yüksek %Geri Kazanım değerleri (%92-99), örnek matriksinin tez kapsamında çalışılan fenolik asitlerin tayinlerine olumsuz bir etki yapmadığını yani yöntemin doğruluğunu göstermektedir.

4.3.4. Kararlılık

Fenolik asitlerin her biri için kısa dönem, uzun dönem ve dondurma-çözdürme kararlılıkları 2 farklı derişimde ve 3 kez enjeksiyonları yapılarak incelenmiştir. Kısa dönem kararlılığı için hazırlanan çözeltiler 24 saat karanlıkta ve oda sıcaklığında bekletilmiştir. Uzun dönem kararlılık çalışmalarında hazırlanan çözeltiler 15 gün süreyle -20°C'de tutulmuştur. Dondurma-çözdürme kararlılıkları ise çözeltilerin üç döngü olarak -20°C'de dondurulması ve daha sonra oda sıcaklığında çözülmesi ile gerçekleştirilmiştir. Analiz öncesi tüm çözeltiler 0,2 µm'lik şırınga filtresinden süzölmüştür. Fenolik asitlerin farklı saklama koşullarındaki kararlılıkları için hesaplanan %Geri Kazanım ve %BSS değerleri Çizelge 4.7'de gösterilmiştir. Çizelge 4.7'deki %Geri Kazanım verileri incelendiğinde fenolik asitlerin belirtilen koşullarda kararlı oldukları bulunmuştur.

Çizelge 4.7. Kararlılık sonuçları

	Derişim (M)	Kısa Dönem Kararlılık (24 saat, oda sıcaklığında)		Uzun Dönem Kararlılık (15 gün, -20°C)		Dondurma-Çözdürme Kararlılığı (3 döngü)	
		%Geri Kazanım (ortalama±SS)	%BSS	%Geri Kazanım (ortalama±SS)	%BSS	%Geri Kazanım (ortalama±SS)	%BSS
PCA	$9,00 \times 10^{-7}$	86,02±0,02	3,27	92,99±0,01	1,19	94,91±0,01	2,00
	$1,50 \times 10^{-5}$	93,00±0,05	0,59	96,47±0,02	0,17	97,36±0,02	0,11
p-HBZ	$1,20 \times 10^{-6}$	91,19±0,01	2,84	90,53±0,06	2,94	96,20±0,01	2,38
	$2,00 \times 10^{-5}$	93,36±0,01	0,22	95,31±0,02	0,31	98,07±0,01	0,25
CAF	$4,50 \times 10^{-7}$	84,30±0,01	2,40	93,20±0,01	2,24	97,29±0,01	1,16
	$7,50 \times 10^{-6}$	89,30±0,07	1,45	91,96±0,03	0,65	94,65±0,04	0,86
SYR	$4,50 \times 10^{-7}$	93,28±0,01	1,63	94,78±0,01	1,43	98,81±0,01	1,58
	$7,50 \times 10^{-6}$	93,65±0,04	1,01	97,23±0,03	0,57	98,57±0,05	1,02
p-COU	$2,85 \times 10^{-7}$	86,01±0,01	3,69	98,77±0,01	2,19	102,03±0,01	1,06
	$4,75 \times 10^{-6}$	91,05±0,01	0,11	93,76±0,02	0,69	99,11±0,04	0,12
t-FER	$4,50 \times 10^{-7}$	94,16±0,01	2,40	95,22±0,01	4,20	100,77±0,01	3,95
	$7,50 \times 10^{-6}$	89,27±0,05	1,44	91,44±0,01	0,24	95,25±0,03	0,70
ROS	$4,50 \times 10^{-7}$	84,28±0,01	0,96	97,80±0,01	3,38	99,70±0,01	1,43
	$7,50 \times 10^{-6}$	92,81±0,02	0,47	94,88±0,01	0,18	99,96±0,01	0,35
t-CIN	$1,74 \times 10^{-7}$	84,94±0,01	3,22	95,02±0,01	2,94	99,19±0,01	1,62
	$2,90 \times 10^{-6}$	92,14±0,01	0,77	94,10±0,01	0,38	98,59±0,01	0,14

4.4. Geliştirilen UHPLC Yönteminin Örneklere Uygulanması

Fenolik asitlerin aynı anda tayinleri için geliştirilen ve validasyonu yapılan UHPLC yöntemi farklı erik suları, piknogenol ve supradin gibi çeşitli örneklere uygulanmıştır. Çizelge 4.8’de analiz edilen örneklerde fenolik asitlerin miktarları ile ilgili sonuçlar verilmiştir. Deneyler 2 paralel olarak yürütülmüş ve örneklerin 3’er kez enjeksiyonları yapılmıştır. Çizelge 4.8’den de görüldüğü gibi erik çeşitlerinde düşük miktarlarda da olsa tez kapsamında çalışılan fenolik asitlerin çoğu belirlenmiştir. 5 ve 6 kodlu erik türlerinde kafeik asit belirlenememiştir. Ayrıca 10 kodlu erikte p-HBZ bulunamamıştır. Piknogenolde, PCA, CAF, SYR, p-COU ve t-FER miktarları 270,52-2696,86 mg/kg arasında belirlenmiştir. Supradin tabletinde ise PCA, SYR, p-COU ve t-FER 80,75-2896,96 mg/kg olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.8. Örneklerde fenolik asitlerin miktarları (mg/kg)

		PCA	p-HBZ	CAF	SYR	p-COU	t-FER	ROS	t-CIN
Erik suyu -1	$\bar{X}$	56,91	3,38	16,88	1,51	0,93	1,50	3,34	0,07
	SS	0,13	0,03	0,07	0,02	0,01	0,02	0,03	0,002
	%BSS	0,23	0,80	0,40	1,55	1,31	1,64	0,82	3,75
Erik suyu -2	$\bar{X}$	48,32	4,10	5,76	0,61	0,35	5,97	1,91	0,09
	SS	0,09	0,06	0,03	0,01	0,01	0,05	0,02	0,004
	%BSS	0,19	1,36	0,57	1,91	1,73	0,85	0,99	3,90
Erik suyu -3	$\bar{X}$	26,09	2,10	2,65	1,38	0,58	1,33	2,58	0,07
	SS	0,03	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,003
	%BSS	0,13	0,27	0,39	0,52	3,14	0,95	0,51	3,78
Erik suyu -4	$\bar{X}$	25,06	6,87	3,52	0,57	0,89	0,44	2,89	0,11
	SS	0,03	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,04	0,004
	%BSS	0,13	0,22	0,16	2,15	0,65	1,42	1,25	3,15
Erik suyu -5	$\bar{X}$	1,07	0,84	—	0,44	0,16	1,70	2,21	0,09
	SS	0,01	0,01	—	0,01	0,01	0,01	0,01	0,003
	%BSS	1,19	0,85	—	1,84	3,84	0,43	0,43	3,27
Erik suyu -6	$\bar{X}$	0,92	1,39	—	0,25	0,61	1,26	2,34	0,07
	SS	0,01	0,01	—	0,01	0,01	0,01	0,01	0,003
	%BSS	0,63	1,00	—	3,98	2,28	0,58	0,56	3,89
Erik suyu -7	$\bar{X}$	7,84	1,43	1,01	0,31	0,20	0,23	3,02	0,07
	SS	0,03	0,03	0,01	0,01	0,01	0,01	0,05	0,003
	%BSS	0,32	1,91	0,94	2,15	3,53	2,76	1,63	4,33
Erik suyu -8	$\bar{X}$	4,67	2,19	0,50	0,31	0,16	0,24	2,72	0,07
	SS	0,02	0,03	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,002
	%BSS	0,47	1,24	2,39	2,06	4,19	2,99	0,44	2,93
Erik suyu -9	$\bar{X}$	5,27	0,83	0,93	11,21	0,23	1,01	3,08	0,20
	SS	0,03	0,03	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,005
	%BSS	0,64	3,26	0,62	0,10	3,60	0,64	0,44	2,50
Erik suyu-10	$\bar{X}$	2,47	—	0,32	1,39	0,16	0,59	1,44	0,07
	SS	0,03	—	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,002
	%BSS	1,36	—	2,63	0,49	3,52	1,23	0,95	3,48
Piknogenol	$\bar{X}$	653,40	—	396,09	270,52	2696,86	828,57	—	—
	SS	6,41	—	5,86	4,96	3,92	6,36	—	—
	%BSS	0,98	—	1,48	1,83	0,15	0,77	—	—
Supradin	$\bar{X}$	377,77	—	—	2896,96	80,76	131,62	—	—
	SS	5,68	—	—	6,92	4,60	3,55	—	—
	%BSS	1,50	—	—	0,24	5,69	2,70	—	—

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında günümüzde serbest radikallerin insan sağlığına verdiği zararları engelleyebilen antioksidan özellikteki fenolik asitlerin UHPLC yöntemi ile 10 farklı erikte ve takviye edici tabletlerde (supradin ve piknogenol) tayinleri yapılmıştır. Bu kapsamda önemli fenolik asitlerden olan PCA, p-HBZ, CAF, SYR, p-COU, t-FER, ROS ve t-CIN'in aynı anda tayinleri için yeni, basit ve hızlı bir UHPLC yöntemi geliştirilerek ICH (1996)'a göre validasyonu yapılmıştır. Çalışılan bu fenolik asitler tez çalışmasında 25 dakikalık bir sürede ayrılmışlardır. Geliştirilen bu yöntem, kesinlik, doğruluk, gözlenebilme sınırı (LOD), tayin alt sınırı (LOQ) ve kararlılık validasyon parametreleri yardımı ile değerlendirilmiş ve sonuçlar uygun bulunmuştur.

UHPLC son zamanlarda gelişmiş kolon teknolojisi ve kısa sürede ayırım gibi üstünlükleri nedeniyle fenolik asitlerin tayininde HPLC'ye kıyasla daha fazla tercih edilmektedir. (Dong ve Zhang, 2014). Cihazda akış hızı ve zamana bağlı olarak daha az çözücü harcanması da önemli avantajlarından biridir (Taleuzzaman vd., 2015). Spektrofotometrik yöntemlerle (Gamez-meza vd., 1999) kıyaslandığında daha hassas ve seçici bir yöntem olması, GC'ye oranla daha iyi tekrarlanabilirlik sunması ve aynı zamanda matriks girişim sorunlarının daha az olması (Minuti ve Pellegrino, 2008) tez çalışmasında UHPLC yönteminin tercih edilmesinin en önemli faktörlerindendir.

Erik örneklerinin saflaştırılmasında literatürden farklı olarak ilk defa C₁₈-OH SPE yöntemi kullanılmış ve C₁₈ SPE'ye göre daha iyi sonuçlar elde edilmiştir.

Bu tez kapsamında geliştirilmiş ve valide edilmiş bu yöntem gıda ve gıda takviye örneklerine başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Ayrıca bu yöntem, fenolik asitlerin gıda kontrol laboratuvarlarında hızlı bir şekilde analizleri için önerilebilir.

KAYNAKÇA

- Aaby, K., Ekeberg, D., Skrede, G. (2007). Characterization of phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruits by different HPLC detectors and contribution of individual compounds to total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 55(11), 4395-406.
- Baser, K.H.C. (2002). Fonksiyonel Gıdalar ve Nutrasötikler. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Eskişehir.
- Battisti, V., Maders, L.D., Bagatini, M.D., Santos, K.F., Spanevello, R.M., Maldonado, P.A., Brulé, A.O., Araújo, Mdo C., Schetinger, M.R. ve Morsch, V.M. (2008). Measurement of oxidative stress ve antioxidant status in acute lymphoblastic leukemia patients. *Clinical Biochemistry*, 41, 511-518.
- Benzie, I.F.F. (2003). Evolution of dietary antioxidants. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 136, 113-126.
- Bolarinwa, A. ve Linseisen, J. (2005). Validated application of a new high-performance liquid chromatographic method for the determination of selected flavonoids and phenolic acids in human plasma using electrochemical detection. *Journal of Chromatography B*, 823(2), 143-151.
- Bonta, R.K. (2017). Application of HPLC and ESI-MS techniques in the analysis of phenolic acids and flavonoids from green leafy vegetables (GLVs). *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 7, 349–364.
- Cemeroğlu, B. ve Acar, J. (1986). Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi. Gıda Teknolojisi Derneği, Yayın No:6, Ankara.
- Cody, V., Middleton, E. ve Harborne, J.B. (1986). Plant flavonoids in biology ve medicine: Biochemical, pharmacological ve structure activity relationship. *Alan. Res. Liss. Inc.*, 21, 521-536.

- Dai, J. ve Mumper, R.J. (2010). Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15, 7313-7352.
- Dong, M.W. ve Zhang, K. (2014). Ultra-high-pressure liquid chromatography (UHPLC) in method development. *Trends Analytical Chemistry*, 63, 21-30.
- Elzaawely, A.A., Xuan, T.D., Koyama, H. ve Tawata S. (2007). Antioxidant activity and contents of essential oil and phenolic compounds in flowers and seeds of *A. Zerumbet* (Pers.). *Food Chemistry*, 104, 1648-1653.
- Fernandez-Pancho, M.S., Villano, D., Troncoso, A.M. ve Garcia-Parrilla, M.C. (2008). Antioxidant activity of phenolic compounds: From in vitro results to in vivo evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, 649-671.
- Gamez-meza, N., Nordega-Rodriguez, J.A., Medina-Juarez, L.A., Ortega-Garcia, J., Cazarez-Casanova, R. ve Angulo-Guerrero, O. (1999). Antioxidant activity in soybean oil of extracts from thompson grape bagasse. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76, 1445-1454.
- Gerber, F., Krummen, M., Potgieter, H., Roth, A., Siffrin, C. ve Spoendlin, C. (2004). Practical aspects of fast reversed-phase high-performance liquid chromatography using 3 microm particle packed columns and monolithic columns in pharmaceutical development and production working under current good manufacturing practice. *Journal of Chromatography A*, 1036, 127-133.
- Ghasemzadeh, A. ve Jaafar, H.Z.E. (2011). Anticancer ve antioxidant activities of Malaysian young ginger (*zingiber officinale* Roscoe) varieties grown under different CO₂ concentration. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5, 3247-3255.
- Gonzalez, M., Guzman, B., Rudyk, R., Romano, E. ve Molina, M.A.A. (2003). Spectrophotometric detection of phenolic compounds in propolis. *Latin American Journal of Pharmacy*, 22(3), 243-248.

- Gök, V. ve Serteser, A. (2003). Doğal Antioksidanların Biyoyararlılığı. 3. Gıda Mühendisliği Kongresi, Ankara.
- Guillarme, D. ve Veuthey, J.L. (2017). Theory and practice of UHPLC and UHPLC MS. Handbook of Advanced Chromatography/Mass Spectrometry Techniques, 1-38.
- Güleşçi, N. ve Aygöl, İ. (2016). Beslenmede yer alan antioksidan ve fenolik madde içerenli çerezler. Gümüşhane University Journal of Health Sciences, Gümüşhane.
- Halliwell, B. ve Gutteridge, J.M.C. (1990). Role of free radicals ve catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods Enzymology*, 186, 80-85.
- Hernández-Chávez, J.F. ve Guemes Vera, N. (2015). Phenolic acids identification by capillary electrophoresis in *Lupinus ssp.* flours for application in the foods. *International Food Research Journal*, 22(5), 1740-1750.
- Hochstein, P. ve Atallah, A.S. (1988). The nature of oxidant and antioxidant Ssystems in the inhibition of mutation and cCancer. *Mutation Research*, 202, 363-75.
- Hussain, S. ve Shaikh, T. (2016). Ultra-performance liquid chromatography (UPLC): A new trend in analysis. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 5(3), 387-394.
- ICH (International Conference on Harmonization) topic Q2B. (1996). Validation of analytical procedures: Methodology. ICH Harmonized Tripartite Guidelines. ICH, Geneva, Switzerland, CPMP/ICH/281/95.
- Kumar, S., Singh, A. ve Kumar, B. (2017). Identification and characterization of phenolics and terpenoids from ethanolic extracts of *Phyllanthus* species by HPLC-ESI-QTOF MS/MS. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 7, 214-222.
- Lafay, S. ve Gil-Izquierdo, A. (2008). Bioavailability of phenolic acids. *Phytochemical Analysis*, 7, 301-311.

- Lee, S.J., Son, K.H. ve Chang, H.W. (1993). Anti-inflammatory activity of naturally occurring flavone and flavonol glycosides. *Archives of Pharmacal Research*, 16, 25-28.
- Lima, L.D.L., Duarte, A.C. ve Esteves, V.I. (2007). Optimization of phenolic compounds analysis by capillary electrophoresis. *Talanta*, 72, 1404-1409.
- Malejko, J., Nalewajko-Sieliwoniuk, E., Szabunko, J. ve Nazaruk, J. (2016). Ultra-high-pressure liquid chromatography (UHPLC) with photodiode array and chemiluminescence detection for the determination of polyphenolic antioxidants in *Erigeron acris* L. Extracts. *Phytochemical Analysis*, 27(5), 277-83.
- Mandal, S.M., Chakraborty, D. ve Dey, S. (2010). Phenolic acids act as signaling molecules in plant–microbe symbioses. *Plant Signal Behaviors*, 5, 359-368.
- Markowski, J. ve Plocharski, W. (2006). Determinaton of phenolic compounds apples and processed apple products. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Reserch*, 14 (2), 133-142.
- Minuti, L. ve Pellegrino, R. (2008). Determination of phenolic compounds in wines by novel matrix solid-phase dispersion extraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1185, 23–30.
- Nováková, L. and Vlčková, H. (2009). A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. *Analytica Chimica Acta*, 656 (1–2), 8–35.
- Oszmianski, J., Lachowicz, S., Glawdel, E., Cebulak, T. ve Ochmian, I. (2018). Determination of phytochemical composition and antioxidant capacity of 22 old apple cultivars grown in Polve. *European Food Research and Technology*, 244(4), 647-662.

- Özcan, H.M. (2010). Fenolik bileşiklerin tayinine yönelik amperometrik esaslı biyosensör hazırlanması. Trakya Üniversitesi. Edirne.
- Öztürk, N., Tunalier, Z., Koşar, M. ve Başer, K.H. (2002). Petroselinum Crispum, Anethum Graveolens ve Eruca Satıva'nın Antioksidan Etki ve Fenolik Bileşikler Yönünden İncelenmesi. Bitkisel İlaç Hammadeleri Toplantısı, Bildiriler, Eskişehir.
- Öztürk, N., Tunçel, M. ve Tunçel, N.B. (2007). Determination of phenolic acids by a modified HPLC: Its application to various plant materials. *Journal of Liquid Chromatography&Related Technologies*, 30, 587-596.
- Paliwal, S., Sundaram, J. ve Mitragotri, S. (2005). Induction of cancer-specific cytotoxicity towards human prostate ve skin cells using quercetin ve ultrasound. *British Journal of Cancer*, 92, 499-502.
- Peterson, C.K. (2016). Influence of siderophore-iron complexation on the growth of the diatom *Skeletonema costatum*: a mass spectroscopy approach. Norwegian University of Science and Technology. Norway.
- Proestos, C., Komaitis, M. (2013). Analysis of naturally occurring phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC coupled to diode array detector (DAD) and GC-MS after Silylation. *Foods*, 2, 90-99.
- Pyrzyska, K. ve Sentkowska, A. (2015). Recent developments in the HPLC separation of phenolic food compounds. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 45, 41-51.
- Robbins, R.J. (2003). Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology, Food Composition Laboratory, Beltsville Human Nutrition Research Center, USA, 10, 2866-87.

- Rossi, D.T. ve Zhang, N. (2000). Automating solid-phase extraction: Current aspects and future prospects. *Journal of Chromatography A*, 885, 97-113.
- Saxena, M., Saxena, J. ve Pradhan, A. (2012). Flavonoids and phenolic acids as antioxidants in plants and human health. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 16(2), 28, 130-134.
- Shahidi, F. ve Nacs, M. (1995). Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects, and Application. *Technomic Publishing Company Inc Lancaster*. 27, 245-278.
- Srivastava, B., Sharma, B.K., Baghel, U.S. ve Yashwant, Sethi N. (2010). Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): A Chromatography Technique. *International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance*. 2, 19-25.
- Stragierowicz, J., Darago, A., Brzezinski, S. ve Kilanowicz, A. (2017). Optimization of UPLC with fluorescence detector (FLD) method for the quantitative determination of selected neurotransmitters in rat brain. *Medycyna Pracy*, 68(5), 583-591.
- Swartz, M.E. (2005). UPLC: An Introduction and Review, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 28,7-8, 1253-1263.
- Swartz, M.E. ve Murphy, B. (2005). New frontiers in chromatography. *American Laboratory*, 37, 22-27.
- Taleuzzaman, M., Ali, S., Gilani, S.J., Imam, S.S. ve Hafeez, A. (2015). Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC)—A review. *Austin Journal of Analytical and Pharmaceutical Chemistry*. 2 (6), 1056.
- Tomas-Barberan, F. ve Espin, J.C. (2001). Phenolic compounds ve related enzymes as determinants of quality of fruits ve vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 853-876.

- Turner, N.W., Subrahmanyam, S. ve Piletsky, S.A. (2009). Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta*, 632, 168–180.
- Van Deemter, J.J., Zuiderweg, F.J., Swartz, E. ve Klinkenberg, A. (1956). *Chemical Engineering Science*, 5, 271.
- Vessal, M., Hemmati, M. ve Vasei, M. (2003). Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin induced diabetic rats. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 135, 357-364.
- Wren, S.A.C. ve Pierre, T. (2006). Use of ultra-performance liquid chromatography in pharmaceutical development. *Journal of Chromatography A*, 1119(1), 140-146.
- Wu, N. ve Thompson, R. (2006). Fast ve efficient separations using reversed phase liquid chromatography. *Journal of liquid chromatography&Related Technologies*, 29 (7-8), 949-988.
- Yavuz, O. ve Aksoy, A. (2006). Örnek hazırlamada katı faz ekstraksiyonu. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 20(3), 259-269.
- Zhang, B., Xiaofeng L., ve Bing, Y. (2008). Advances in HPLC detection–towards universal detection. *Analytical ve bioanalytical chemistry*, 390(1), 299-301.
- Zhu, J., Goodall, D.M. ve Wren, S.A.C. (2005). Ultra-High Performance Liquid Chromatography and Its Applications. *LC-GC*, 23, 54-72.
- Zief, M. ve Kiser, R. (1988). Solid Phase Extraction for Sample Preparation. *Baker JT*, Phillipsburg, NJ.