



**BİTKİSEL ÜRÜN MATRİKSLERİNDE
POLİFENOLİK MADDELERİN
YÜKSEK PERFORMANSLI
SIVI KROMATOĞRAFİSİ
YÖNTEMİ İLE TAYİNİ**

**Hafsah QABA
Yüksek Lisans Tezi
Eskişehir 2019**

**BİTKİSEL ÜRÜN MATRİKSLERİNDE POLİFENOLİK MADDELERİN YÜKSEK
PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİ İLE TAYİNİ**

Hafsah QABA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Elif Mine ÖNCÜ KAYA

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Ağustos 2019

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Hafsah QABA'nın "Bitkisel Ürün Matrikslerinde Polifenolik Maddelerin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi ile Tayini" başlıklı tezi 19.08.2019 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. Üy. Elif Mine ÖNCÜ KAYA	
Üye	: Prof. Dr. Duygu YENİCELİ UĞUR	
Üye	: Dr. Öğr. Üy. Arın Gül DAL POÇAN	

Prof. Dr. Murat TANIŞLI
Enstitü Müdürü

ÖZET

BİTKİSEL ÜRÜN MATRİKSLERİNDE POLİFENOLİK MADDELERİN YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİ İLE TAYİNİ

Hafsah QABA

Kimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ağustos 2019

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Elif Mine ÖNCÜ KAYA

Bu çalışmada önemli polifenolik bileşiklerden olan elajik asit (EA) ve rutin'in (RUT) bitkisel ürün matrislerinde tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir. EA ve RUT'un, gıda takviye edici olarak kullanılan sambucol (kara mürver) örneklerinde, bazı pekmezlerde ve nar suyunda fenil kolonu (4,6 mm×100 mm×3 µm) kullanılarak fotodiyot dizisi dedektörü (DAD) ile 254 nm dalga boyu değerinde 18 dakika içerisinde tayini gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak A (su:metil alkol:formik asit; 88:10:2; h/h/h) ve B (su:metil alkol:formik asit; 8:90:2; h/h/h) kullanılmıştır. Akış hızı 1,0 mL/dk ve enjeksiyon hacmi 20 µL'dir. Deneylerde metil paraben ve etil paraben olmak üzere iki tane iç standart (IS) madde kullanılmıştır. Deneylerde matris uyumlu kalibrasyon eğrisi yöntemi uygulanmıştır. EA ve RUT için yüksek korelasyon katsayıları ($r^2 = 0,9916-0,9985$) ile doğrusal grafikler elde edilmiştir. EA ve RUT için gün içi ve günler arası kesinlik deneylerinde %7,4'den küçük yüzde bağıl standart sapma (%BSS) değerleri elde edilmiştir. Geliştirilen yöntem, bitkisel ürün matrislerine başarılı bir şekilde uygulanmıştır.

Anahtar Sözcükler: HPLC, Polifenolik bileşikler, Katı faz ekstraksiyonu (SPE), Yöntem geliştirme, Validasyon.

ABSTRACT

DETERMINATION OF POLYPHENOLIC COMPOUNDS IN PLANT PRODUCT MATRICES BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD

Hafsah QABA

Department of Chemistry

Anadolu University, Institute of Sciences, August 2019

Supervisor: Assisst. Prof. Dr. Elif Mine ÖNCÜ KAYA

In this study, high performance liquid chromatography (HPLC) method has been developed and validated for determination of important polyphenolic compounds including ellagic acid (EA) and rutin (RUT) in the plant product matrices. EA and RUT were determined in sambucol (black elderberry) samples which used as food supplements, some molasses and pomegranate juice by using photodiode array detector (DAD) at 254 nm wavelength value within 18 minutes on a phenyl column (4.6 mm×100 mm×3 µm). A (water:methanol:formic acid; 88:10:2; v/v/v) and B (water:methanol:formic acid; 8:90:2; v/v/v) solutions were used as mobile phase. The flow rate was 1.0 mL/min and the injection volume was 20 µL, respectively. In the experiments two internal standard (IS) substances were used including methyl paraben and ethyl paraben. Matrix-matched calibration curve method was applied in the experiments. Linear graphs were obtained with high correlation coefficients ($r^2=0.9916-0.9985$) for EA and RUT. In intra-day and inter-day precision studies with less than 7.4% RSD% values were obtained for EA and RUT. The developed method has been successfully applied to the plant product matrices.

Keywords: HPLC, Polyphenolic compounds, Solid phase extraction (SPE), 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.

Tüm hayatım boyunca bana inanan, güç ve cesaret veren, sevgileri ve duaları ile her zaman ve her koşulda yanımda olan canım aileme sonsuz teşekkür ederim.

19/8/2019
Hafsah QABA



19/8/2019

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.

Hafsah QABA

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE GENEL BİLGİLER	3
2.1. Polifenolik Bileşikler	3
2.1.1. Fenolik asitler	6
2.1.2. Flavanoidler	8
2.2. Elajik Asit (EA)	11
2.3. Rutin (RUT)	12
2.4. Kara Mürver (<i>Sambucus Nigra L.</i> , black elderberry)	15
2.5. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	17
2.5.1. HPLC kolonları	20
2.6. Katı Faz Ekstraksiyonu (SPE)	22
2.7. Konu İle İlgili Bazı Yapılmış Çalışmalar	24
3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER	30
3.1. Kullanılan Örnekler	30
3.2. Kimyasallar	30
3.3. Araç, Gereç ve Cihazlar	30
3.4. İstatistiksel Analizler	31

3.5. EA ve RUT Deneyleri	31
3.5.1. Standart çözeltilerin hazırlanması	31
3.5.2. İç standart (IS) çözeltilerinin hazırlanması	31
3.6. Örnek Hazırlama	31
3.6.1. Sambucol örneklerinin hazırlanması	31
3.6.2. Nar suyu örneğinin hazırlanması	34
3.6.3. Pekmez örneklerinin hazırlanması.....	34
3.6.4. SPE yöntemi	34
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	36
4.1. HPLC-DAD Yöntem Optimizasyonu	36
4.2. HPLC-DAD Yöntem Validasyon Çalışmaları	38
4.2.1. Doğrusallık ve duyarlılık	38
4.2.2. Kesinlik	40
4.2.3. Doğruluk	42
4.2.4. Kararlılık (Stabilite)	43
4.3. Geliştirilen HPLC-DAD Yönteminin Örneklerle Uygulanması	44
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	49
KAYNAKÇA	51
ÖZGEÇMİŞ	

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Fenolik asitlerin sınıflandırılması ve yapıları	7
Çizelge 2.2. Bazı C18 oktadesilsilan (ODS) RP-HPLC kolonları ve uygulamaları	21
Çizelge 2.3. ACE HPLC kolonları	21
Çizelge 2.4. Konu ile ilgili yapılan çalışmalar	27
Çizelge 3.1. Sambucol (kara mürver) örnekleri	30
Çizelge 4.1. Optimum HPLC koşulları	36
Çizelge 4.2. EA ve RUT tayininde kullanılan gradiyent program	37
Çizelge 4.3. EA ve RUT'un regresyon analiz sonuçları	40
Çizelge 4.4. Kesinlik sonuçları	41
Çizelge 4.5. Doğruluk sonuçları	43
Çizelge 4.6. Kararlılık sonuçları	44
Çizelge 4.7. Bitkisel ürün örneklerinde EA ve RUT'un miktarları (mg/kg)	48

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1.	Basit fenol formülü	5
Şekil 2.2.	Kondanse tanenlerin kimyasal olarak genel gösterimi	5
Şekil 2.3.	Farklı polifenol sınıflarının kimyasal yapıları	6
Şekil 2.4.	Flavanoidlerin alt sınıflarının kimyasal yapıları.....	9
Şekil 2.5.	Flavanoid alt sınıf bileşiklerinden bazı örnekler	10
Şekil 2.6.	Gallik asit ve elajik asit molekül yapıları	11
Şekil 2.7.	Rutin molekül yapısı	13
Şekil 2.8.	HPLC cihazının şematik gösterimi	18
Şekil 2.9.	ACE HPLC kolonu ile diğer kolonlar arasındaki fark	22
Şekil 2.10.	SPE yönteminin uygulamasının şematik gösterimi	24
Şekil 3.1.	Sambucol® şurup örneklerinin analize hazırlanışı	32
Şekil 3.2.	Sambucol® efervesan ve çiğnenebilir tablet örneklerinin analize hazırlanışı	33
Şekil 3.3.	Örneklerin hazırlanmasında kullanılan C18-SPE yönteminin şematik gösterimi	35
Şekil 4.1.	Optimum HPLC-DAD koşullarında elde edilen $5,00 \times 10^{-6}$ M EA ve $2,19 \times 10^{-5}$ M RUT standart çözeltileri ile IS1 ve IS2'ye ait kromatogram.....	38
Şekil 4.2.	Optimum HPLC-DAD koşullarında elde edilen boş yaban mersini pekmezine ait kromatogram	45
Şekil 4.3.	Optimum HPLC-DAD koşullarında elde edilen sambucol® plus şurup örneğine ait kromatogram	45
Şekil 4.4.	Optimum HPLC-DAD koşullarında elde edilen sambucus® nigra (zinc+vitC) efervesan tablet örneğine ait kromatogram	46

Şekil 4.5. Optimum HPLC-DAD koşullarında elde edilen sambucol® kids şurup örneğine ait kromatogram	46
Şekil 4.6. Optimum HPLC-DAD koşullarında elde edilen sambucol® efervesan tablet örneğine ait kromatogram	47
Şekil 4.7. Optimum HPLC-DAD koşullarında elde edilen nar suyu örneğine ait kromatogram	47
Şekil 4.8. Optimum HPLC-DAD koşullarında elde edilen kıızılcık pekmezi örneğine ait kromatogram	48



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ASE	: Hızlandırılmış Sıvı Ekstraksiyonu
CE	: Kapiler Elektroforez
DAD	: Fotodiyot Dizi Dedektör
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EA	: Elajik Asit
EP	: Etil Paraben
ESI	: Elektrosprey İyonizasyon
GC	: Gaz Kromatografisi
GK	: Geri Kazanım
HCl	: Hidroklorik Asit
HILIC	: Hidrofilik Etkileşimli Sıvı Kromatografisi
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HSCCC	: Yüksek Hızlı Ters Akım Kromatografisi
ICH	: Uluslararası Uyum Konferansı
IS	: İç Standart
LC	: Sıvı Kromatografisi
LLE	: Sıvı Sıvı Ekstraksiyonu
LOD	: Gözlenebilme Sınırı
LOQ	: Tayin Alt Sınırı
MAE	: Mikrodalga Destekli Ekstraksiyonu
MEKC	: Miselli Elektrokinetik Kromatografisi
MeOH	: Metil Alkol
MP	: Metil Paraben
MS	: Kütle Spektrometresi
MS-MS	: Tandem Kütle Spektrometresi
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
Q-TOF	: Kuadrupol Uçuş Süresi

RP-HPLC	: Ters Faz Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
RUT	: Rutin
SFC	: Süperkritik Akışkan Kromatografisi
SFE	: Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu
SHCCC	: Yüksek Hızlı Ters Akım Kromatografisi
SPE	: Katı Faz Ekstraksiyonu
SS	: Standart Sapma
UHPLC	: Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
UV	: Mor Ötesi
%BSS	: Yüzde Bağlı Standart Sapma

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Doğal antioksidan kaynağı olan polifenolik bileşikler en yaygın fitokimyasal gruplardan biridir ve bu bileşiklerin insan sağlığı üzerinde olumlu etkilerinin olduğu bilinmektedir. Polifenoller, sekonder metabolitler olduğundan ve antioksidan özellikleri olan çok çeşitli bileşikleri içerdiği için bu bileşikler insan beslenmesinde çok önemli bir yere sahiptir. Bu nedenle, gıdalarda veya besin takviyelerinde fonksiyonel bileşenler olarak kullanılırlar (Gleichenhagen ve Schieber, 2016; Gini ve Jothi, 2018; Motilva, Serra ve Macià, 2013). Genel olarak, nar, üzüm, elma, armut, vişne ve çilek gibi meyveler, sebzeler, tahıllar, kuruyemişler, baklagiller, baharatlar, bitkisel yiyecek ve içecekler, şifalı bitkiler, şaraplar ve meyvelerden üretilen gıdalar insan beslenmesinde yaygın olarak kullanılan polifenol kaynaklarıdır (Abad-Garcia vd., 2007; Motilva, Serra ve Macià, 2013; Amakura vd., 2000; Pandey ve Rizvi, 2009). Bu bileşikler antioksidan, antiapoptotik, antianjiyojenik, antimikrobiyal ve antiviral özelliklere sahiplerdir. Dolayısıyla, bu tür bileşiklerin hem sağlığa yararlı etkileri vardır hem de gıda kalitesini artırmak için gıda katkı maddesi olarak sıklıkla kullanılmaktadırlar (Lin vd., 2016; Carrocho, Morales, ve Ferreira, 2015; Karimi vd., 2010; Zhao vd., 2017). Bitkilere rengini, tadını ve kokusunu veren fenolik bileşikler kanser, kardiyovasküler ve bilişsel hastalıklar gibi oksidatif stres ile ilişkili bazı hastalıkların önlenmesinde de önemli rol oynarlar. Dolayısıyla son yıllarda daha çok flavonoller ve fenolik asitler başta olmak üzere polifenolik bileşikler yoğun olarak incelenmekte ve insan sağlığına faydaları nedeniyle bu alanda yapılan çalışmalar giderek artmaktadır (Jakobek vd., 2007; Dominguez-Rodríguez, Marina ve Plaza, 2017).

Bu tez çalışmasında kullanılan kara mürverde (*Sambucus Nigra*) bulunan biyoaktif bileşikler birincil olarak polifenoller ve antosiyaninlerdir. *Sambucus nigra*'nın meyvesi önemli bir fenolik bileşik kaynağıdır. (Młynarczyk, Tomczak ve Łysiak, 2018; Motilva, Serra ve Macià, 2013; Olejnik vd., 2016).

Kara mürver bitkisinde yüksek miktarda bulunan biyoaktif fenolik bileşiklerin serbest radikal süpürücü yeni antioksidan özellikte olmaları nedeniyle tezde bu bitkiden elde edilmiş takviye edici gıdalarla çalışılmıştır.

Genellikle, polifenollerin analizini gerçekleştirmek için HPLC, ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi (UHPLC), gaz kromatografisi (GC), kapiler elektroforez (CE) ve yakın kızılötesi spektroskopisi (NIR) gibi yöntemler kullanılmaktadır. Ancak, bu biyoaktif maddelerin analizine yönelik nitel ve nicel analiz yaklaşımların araştırılmasına, hızlı, hassas ve güvenilir yöntemlerin geliştirilmesine katkıda bulunan ileri analitik tekniklere her zaman ihtiyaç duyulmaktadır. Onun için polifenollerin analiz etme yöntemlerinin basit, hızlı, çevresel açıdan sürdürülebilir ve kapsamlı olması gerekmektedir (Cong vd., 2017; Plaza vd., 2018). Son yıllarda, bitki örnekleri, yiyecekler, diyet takviyeleri ve farmasötik preparatlardaki polifenollerin belirlemek için yeni yöntemler uygulanmaya başlanmış ve en yaygın olarak kullanılan yöntemler ultraviyole (UV) dedektörü ve kütle veya tandem kütle spektrometrisi (MS/MS-MS) ile birleştirilmiş ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisine dayanmaktadır. Bu yöntemler, bu bileşiklerin ayrılması, tanımlanması ve miktar tayini için en iyi alternatif haline gelmiştir. Polifenollerin nitel ve nicel analizi için en çok tercih edilen yöntem HPLC'dir (Abad-Garcia vd., 2007; Motilva, Serra ve Macia, 2013; Plaza vd., 2018; Yıldırım vd., 2017).

Bu tez kapsamında polifenolik bileşiklerden olan EA (fenolik asitlerden biri) ve RUT (flavonoid bir bileşik) ile çalışılmıştır. 7 farklı kara mürver (sambucol[®], sambucus[®]) örneği, taze nar suyu ve bazı pekmezlerde fenil kolonu kullanılarak ayrılmış ve HPLC ile DAD kullanılarak tayinleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, EA ve RUT analizleri için geliştirilen HPLC-DAD yönteminin validasyonu yapılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER VE GENEL BİLGİLER

2.1. Polifenolik Bileşikler

Polifenolik bileşikler aromatik benzen halkası taşıyan ve yapısında bir veya birden fazla hidroksil grubu (-OH) içeren sekonder metabolitlerdir (Lorrain vd., 2013). Başka bir deyişle, polifenoller, bir veya birkaç hidroksil grubu (-OH) ile bağlanmış bir benzen halkasının fonksiyonel bir yan zincirin eklenmesi ile karakterize edilen heterojen bir grup olan ikincil bitki metabolitleridir (Esteban-Fernandez vd., 2017). Polifenolik bileşikler, yaklaşık 8000 tane doğal olarak oluşan bileşiği içeren çok geniş bir gruptur (Robbins, 2003). Polifenolik bileşikler polifenoller olarak da bilinir. Bu bileşikler hafif asidik özellik taşımaktadırlar. Fenollerin yapısındaki (-OH) alkollerle tepkimesinden esterleri oluşmaktadır. Fenollerin alkollerle tepkimesi kimyasal çalışmalarda önemli bir yere sahiptir (Rebecca ve Robbins, 2009; Lin vd., 2016; Hoge vd., 2019).

Polifenolik bileşikler hemen hemen her bitkide bulunur ve en yaygın fitokimyasal gruplardan biri olarak sayılmaktadır (Gini ve Jothi, 2018). Sebzeler, tahıllar, kuruyemişler, baklagiller, baharatlar, bitkisel yiyecek ve içecekler, şifalı bitkiler, şaraplar (özellikle kırmızı şarap) ve en çok da meyveler olmak üzere meyvelerden üretilen meyve suları, reçeller ve jöleler insan beslenmesinde yaygın olarak kullanılan polifenol kaynaklarıdır (Abad-Garcia vd., 2007; Motilva, Serra ve Macia, 2013; Amakura vd., 2000).

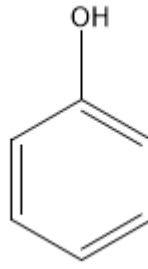
Bitkilerde bulunan polifenolik bileşikler duyuşal özelliklerden (renk, tat, koku, acılık ve burukluk) sorumludurlar. Üzüm, elma, armut, vişne ve çilek gibi meyveler gramında yaklaşık 200-300 mg kadar polifenol içermektedir (Abad-Garcia vd., 2007; Pandey ve Rizvi, 2009).

Sekonder metabolitler olan polifenolik bileşikler, fiziksel, kimyasal ve besinsel özellikleri farklı olan çok çeşitli bileşikleri içerdiklerinden bu bileşikler insan sağlığı açısından çok büyük önem taşımaktadır. Bu bileşikler, doğal gıdalar ve işlenmiş gıdalar gibi neredeyse tüm bitkisel kaynaklı gıdalarda bulunduğundan insan beslenmesinde ayrılmaz bir parçadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalara göre bitki kaynaklı yiyecek ve içeceklerdeki (ilaçlar dahil) polifenolik bileşikler, kansere, kalp ve damar hastalıkları, metabolik ve nörodejeneratif hastalıklara karşı koruyucu etki göstermektedir. Ayrıca, bu bileşikler

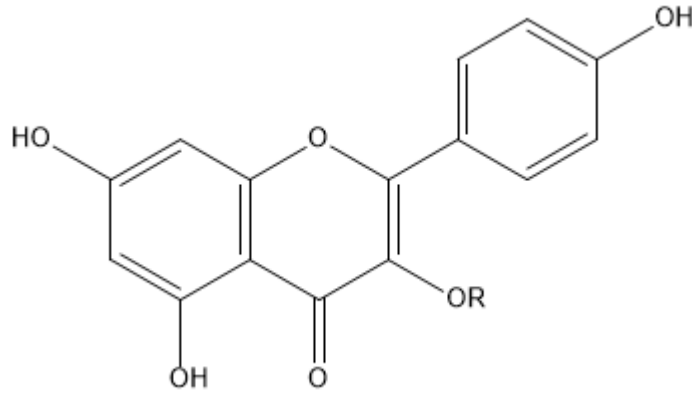
antioksidan, antiinflamatuvar, antiapoptotik, antianjiyojenik, antimikrobiyal ve antiviral etkiler gibi çeşitli faydalı aktivitelerle ilişkilendirilmiştir. Bu bileşiklerin hem sağlığı koruyucu etkileri vardır hem de gıda kalitesini artırmak için gıda katkı maddesi olarak sıklıkla kullanılmaktadırlar (Lin vd., 2016; Caroch, Morales ve Ferreira, 2015; Karimi vd., 2010; Zhao vd., 2017).

Polifenolik bileşikler, kimyasal yapılarına göre ve fenol kısmının benzen halkası üzerindeki hidroksil grubu (-OH) reaksiyonuna bağlı olarak antioksidan özellik taşımaktadır. Bu bileşikler, bitkilerde oksitleyici ajanlara ve serbest radikallere karşı savunma sağlamak amacıyla oluşturulan bileşiklerdir. Antioksidan özellikteki maddeler bir elektronlarını serbest radikallere aktararak, eşleştirilen serbest radikallerin kararlı hale gelmesini ve böylece vücuttaki hücrelere ve dokulara zarar vermesini önlerler (Robbins, 2003; Kamal vd., 2018).

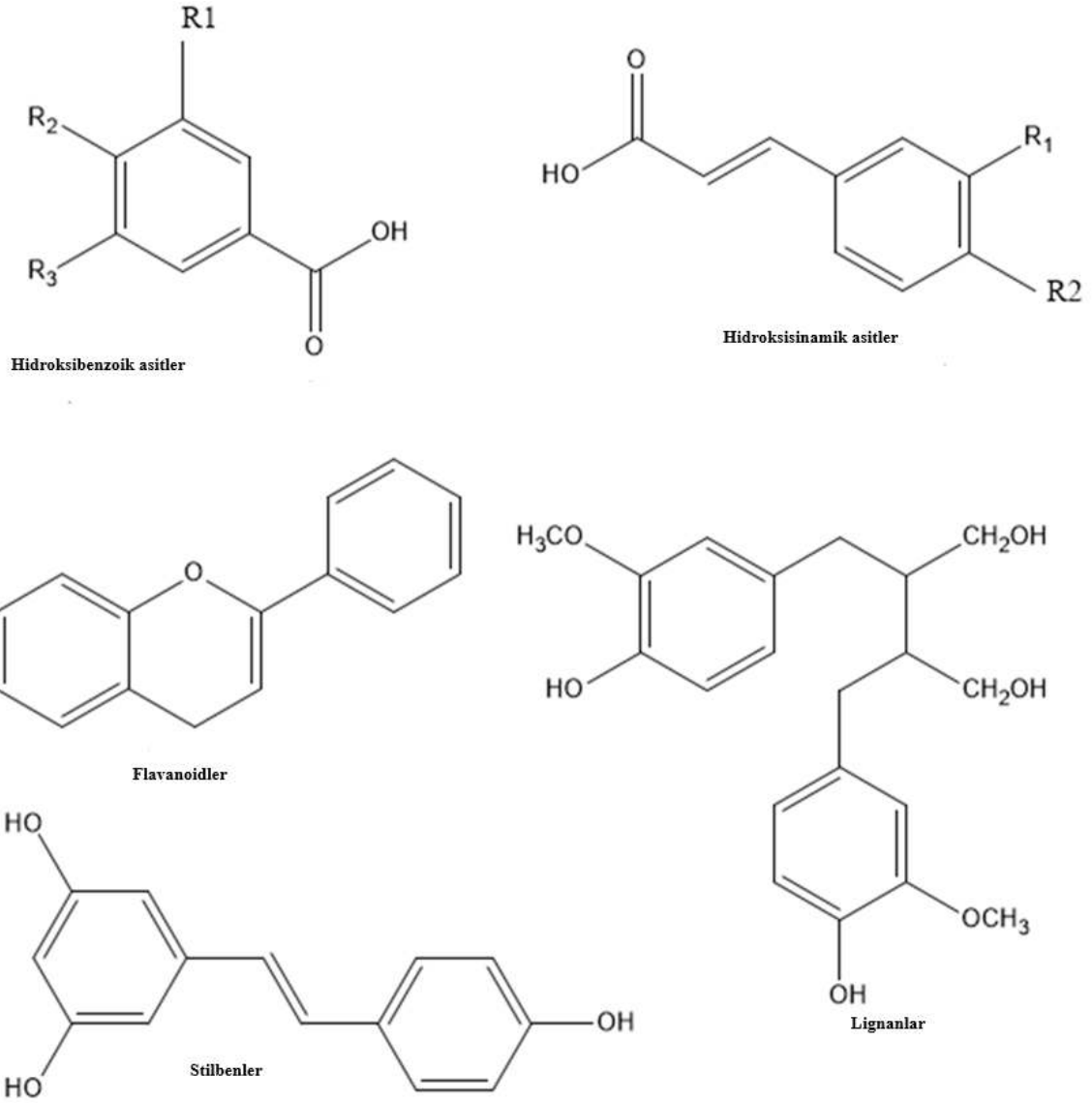
Polifenolik bileşiklerin kimyasal yapıları çeşitlilik göstermektedir. Polifenolik bileşikler küçük tek bir aromatik halka yapısında (Şekil 2.1) olabildiği gibi kondanse yapıya sahip tanenler (Şekil 2.2) gibi karmaşık yapılarda da olabilirler. Evrensel sınıflandırılmaları yoktur. Sınıflandırmanın amacı değişik iskelet yapısındaki fenollerin incelenmesini kolaylaştırmaktır. Bu bileşikler; flavanoidler ve flavanoid olmayanlar (fenolik asitler) şeklinde iki sınıfa ayrılmıştır (Motilva, Serra ve Macià, 2013). Bazı bilim insanları ise polifenolik bileşikler kimyasal yapılarına göre doğal polifenoller, lignanlar, stilbenler, tanenler, fenolik asitler ve flavanoidler (Şekil 2.3) şeklinde sınıflandırmıştır. Çeşitli bitki türlerinde 8000'den fazla polifenolik bileşik tanımlanmıştır ve bunlar tüm doğal polifenollerin %30'u ile %60'ını içeren bitkisel kaynaklı ürünlerinde bol miktarda bulunmaktadır (Hoge vd., 2019; Pandey ve Rizvi, 2009).



Şekil 2.1. Basit fenol formülü



Şekil 2.2. Kondanse tanenlerin kimyasal olarak genel gösterimi



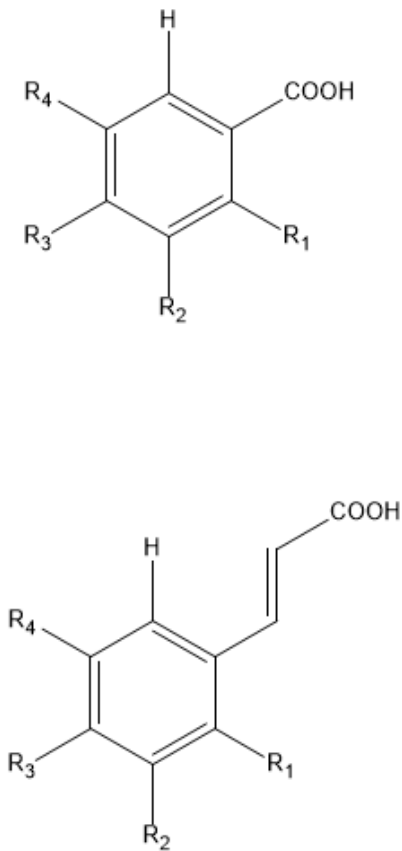
Şekil 2.3. Farklı polifenol sınıflarının kimyasal yapıları

2.1.1. Fenolik asitler

Fenolik asitler aromatik ikincil bitki metabolitleridir ve bitki aleminde yaygın olarak bulunmaktadır. Fenolik asit ismi genellikle bir karboksilik asit işlevselliği gösteren fenoller tanımlar (Robbins, 2003). Fenolik asitler (C₆-C₁) iskeletine dayanan hidroksibenzoik asit türevleri ve (C₆-C₃) iskeletine dayanan hidroksisinamik asit türevleri

olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar (Çizelge 2.1). Hidroksibenzoik asitler; vanilik asit, gallik asit, şirincik asit ve protokateşik asit ve hidroksisinamik asitler ise kafeik asit, p-kumarik asit, sinapik asit ve ferulik asit gibi asitleri içerirler. Hidroksisinamik asitler özellikle; kafeik asit, p-kumarik asit ve sinapik asit, hidroksibenzoik asitlerden daha yaygındır. Gıdalarda fenolik asitler bol miktarda bulunmaktadır. Örneğin; kekik vb. gibi otlarda ve zeytinlerde vanilik asit bulunur. Şarap, çay, karanfil ve kestanede gallik asit; meyve, otlar ve baharatlarda (zencefil) kafeik asit, tahıl, çikolata ve bitkilerde ferulik asit bulunmaktadır (Motilva, Serra ve Macià, 2013; Pandey ve Rizvi, 2009; Jakobek vd., 2007).

Çizelge 2.1. Fenolik asitlerin sınıflandırılması ve yapıları (Pereira vd., 2009)

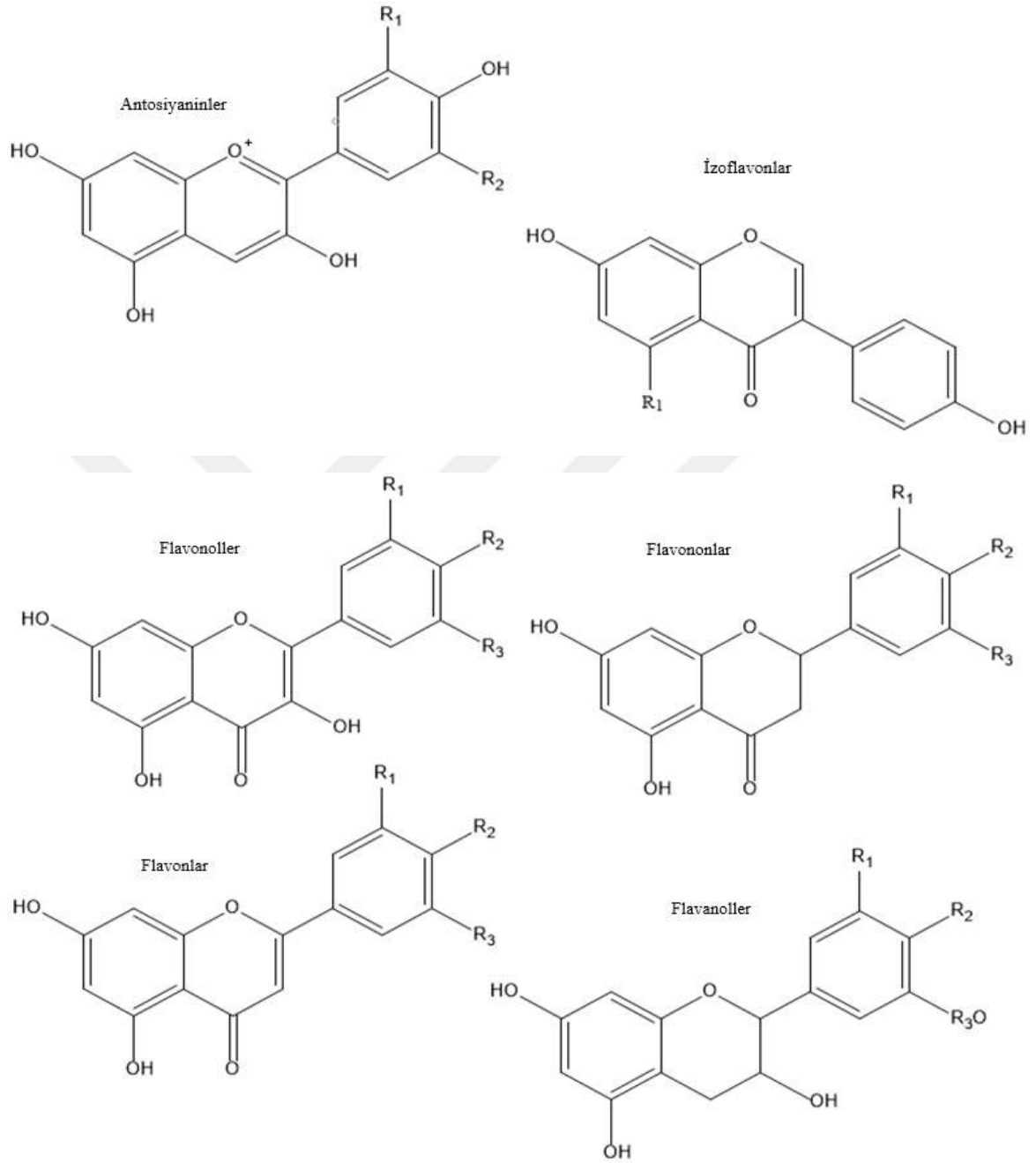


Hidroksibenzoik asitler	R1	R2	R3	R4
Benzoik asit	H	H	H	H
p-Kumarik asit	H	H	OH	H
Vanilik asit	H	OCH3	OH	H
Gallik asit	H	OH	OH	OH
Protokateşik asit	H	OH	OH	H
Şirincik asit	H	OCH3	OH	OCH3
Gentisik asit	OH	H	H	OH
Veratrik asit	H	OCH3	OCH3	H
Salisilik asit	OH	H	H	H

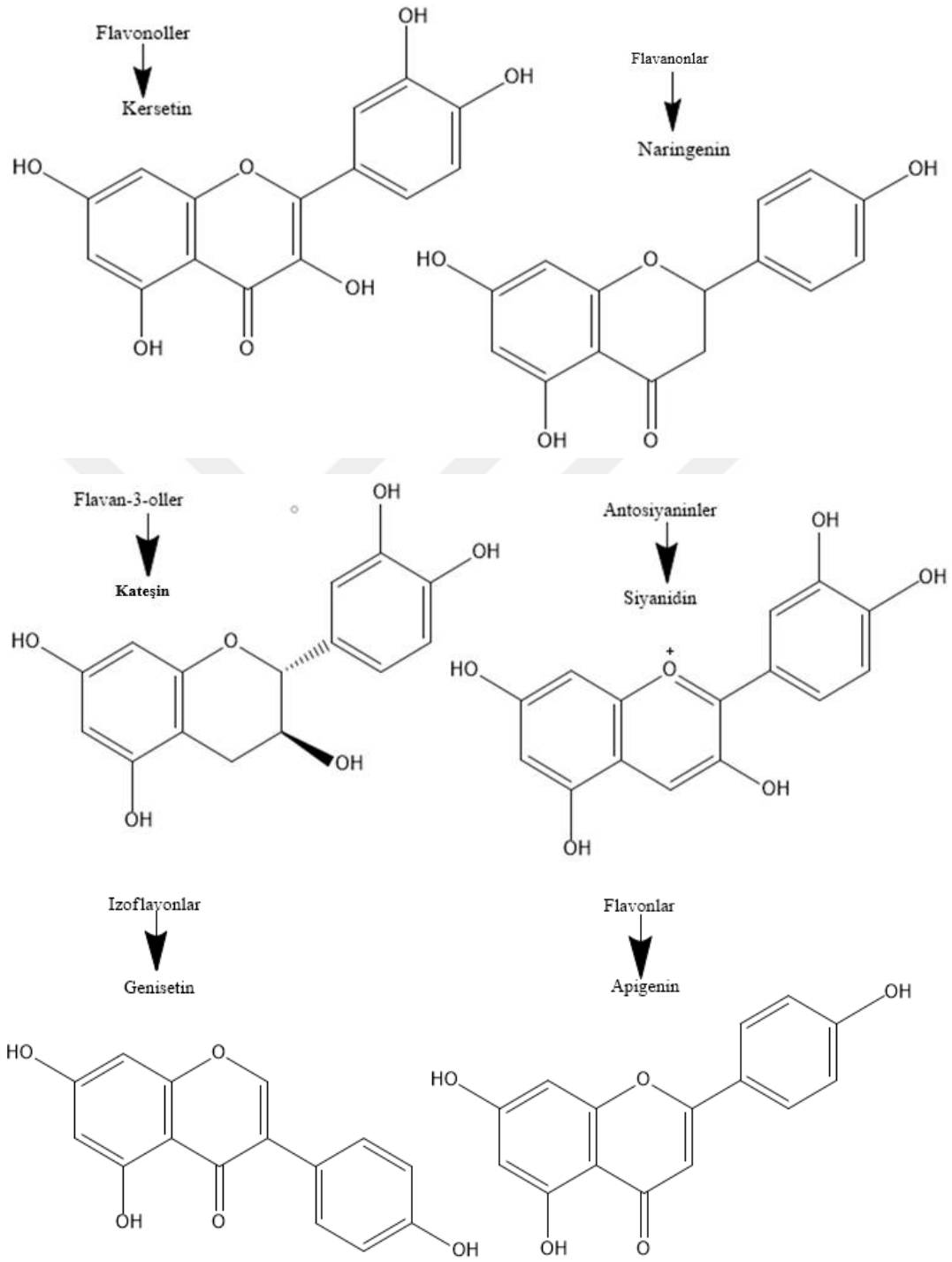
Hidroksisinamik asitler	R1	R2	R3	R4
Sinamik asit	H	H	H	H
o-Kumarik asit	OH	H	H	H
m-Kumarik asit	H	OH	H	H
p-Kumarik asit	H	H	OH	H
Ferulik asit	H	OCH3	OH	H
Sinapik asiti	H	OCH3	OH	OCH3
Kafeik asit	H	OH	OH	H

2.1.2. Flavanoidler

Flavanoidler üç karbonlu bir köprü (C6-C3-C6 iskeleti) ile bağlanmış iki aromatik halkadan oluşan polifenol bileşiklerini oluşturmaktadır. Flavanoidler, flavonlar, flavanoller, flavanonlar, izoflavonlar ve antosiyanidinler olarak alt gruplara ayrılırlar. (Şekil 2.4 ve 2.5) Flavanoller (kamferol, kersetin ve mirisetin gibi) flavanoidlerin en yaygın türüdür ve bunlar o-glikozitler olarak bulunmaktadır. Kamferol çay, baklagil ve baharat; kersetin sebze (daha çok soğan), çikolata, kara mürver ve baharatlarda bulunur. Flavanoidlerin yapısal olarak en karmaşık alt sınıfı olan flavanollerden özellikle kateşinler kakao türevlerinde, bitter çikolata ve sütlü çikolata, kırmızı üzüm gibi kırmızı meyveler ve kırmızı şarap gibi gıda kaynaklarında bulunmaktadır. Kırmızı şarap, kiraz, yaban mersini, kırmızı ve mor çoğu meyve veya sebze aynı zamanda renginden de sorumlu olan önemli miktarda antosiyanidinin şekerle birleşmiş hali içermektedir (Motilva, Serra ve Macià, 2013; Hoge vd., 2019; Pandey ve Rizvi, 2009).



Şekil 2.4. Flavanoidlerin alt sınıflarının kimyasal yapıları (Pandey and Rizvi, 2009)

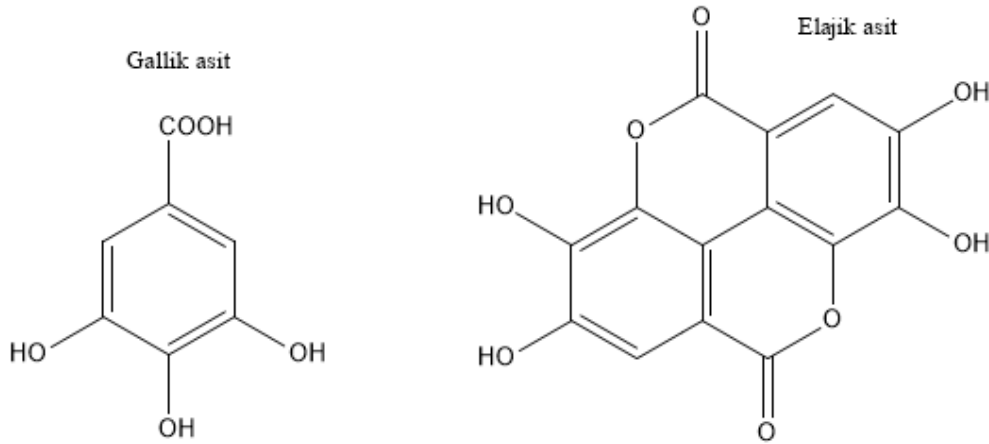


Şekil 2.5. Flavanoid alt sınıf bileşiklerinden bazı örnekler (Tsao, 2010)

Bu tez çalışmasında polifenolik bileşik sınıfında yer alan fenolik asitlerden biri olan elajik asit (EA) ve flavanoid grubunda yer alan rutin (RUT) ile çalışılmıştır.

2.2. Elajik Asit (EA)

Elajik asit (EA) (Şekil 2.6) gallik asidin dimerik türevi; dört hidroksil grubu ve hidrofilik kısmı temsil eden iki lakton halkalı kaynaşık dört halka yapısından oluşmaktadır. EA heksahidroksidifenik asidin bir dilaktonu ve nardaki ana aktif bileşik olarak tanımlanmıştır (Davalos vd, 2019; Wang, Chou ve Su, 2017). EA kırmızı ahududu, çilek, yaban mersini gibi meyvelerde, fındık ve ceviz gibi gıdalarda doğal olarak bulunan bir fenolik asit bileşiğidir (Amakura vd., 2000; Ratnam, Bhardwaj ve Kumar, 2006).



Şekil 2.6. Gallik asit ve elajik asit molekül yapıları

EA güçlü bir antioksidan aktiviteye sahip olmakla birlikte sağlığa olan faydaları nedeniyle dünya çapında popülerlik kazanmaktadır. Çok sayıdaki fitokimyasal maddeler arasında en güçlü antioksidan elajik asittir. Ayrıca, antikanserojenik, antimutajenik, antiviral, cilt beyazlatıcı, antitümör etkileri, kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi, diyabetin azaltılması ve östrojen karşıtı faaliyetlere dahil olmak üzere insan sağlığı için çok çeşitli yararlar sağlamaktadır. EA'nın oksidatif stres, kanser ve yaşlanma gibi birçok hastalığa

karşı potansiyel önleyici ve tedavi edici etkilere sahip olduğu kanıtlanmıştır (Ratnam, Bhardwaj ve Kumar, 2006; Amakura vd., 2000; Wang, Chou ve Su, 2017). Ek olarak, EA bitki kaynaklı polifenol mide ülseri tedavisinde de kullanılmaktadır (Ranade, Ranpise ve Ramesh, 2015).

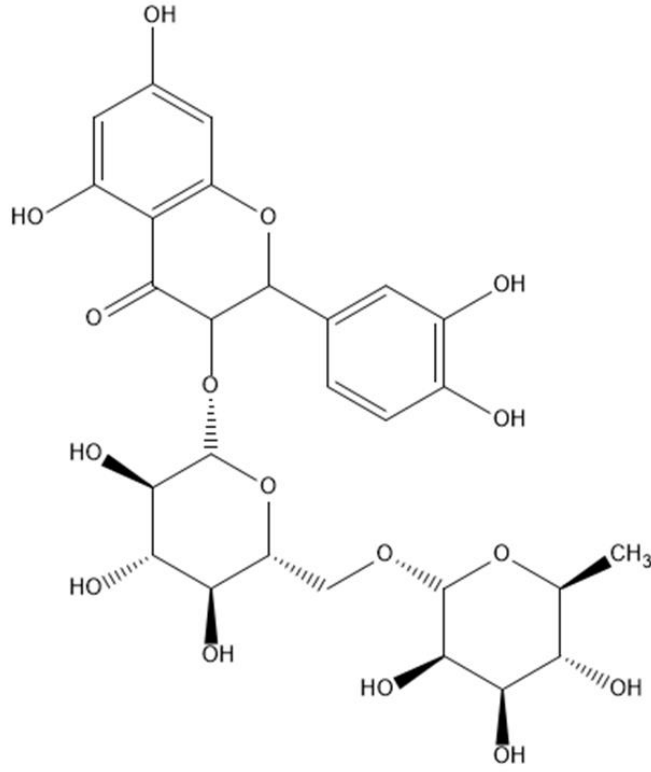
EA'nın gıda teknolojisinde gıda kalitesini arttırmak için ve gıda endüstrisinde tıbbi ilaç ve kozmetik kullanımlarından dolayı sağlık endüstrisinde büyük potansiyele sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Dolayısıyla, EA gıda katkı maddesi olarak da kullanılmaktadır (Verotta vd., 2018).

EA'nın sudaki çözünürlüğü çok düşük olan ve düşük hidroliz katsayısına sahip bir bileşiktir. EA'nın düşük biyoyararlanımının ana faktörlerinden biri, sulu çözeltisindeki zayıf çözünme eğiliminden ve ince bağırsakta bulunan enterosit epitel membranının düşük geçirgenliğinden kaynaklanmaktadır (Amakura vd., 2000; Dávalos vd., 2019).

EA için sıvı-sıvı ekstraksiyonu, katı faz ekstraksiyonu (SPE) ve gradiyent elüsyonu içeren birçok analitik yöntem bildirilmesine rağmen hala yeni yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. EA ile ilgili yapılmış çalışmalar en çok kullanılan yöntem farklı dedektörler ile birleştirilmiş HPLC'dir. Ayrıca, EA'nın bildirilen HPLC koşullarında pikin zirvesinin bozulması ve genişlemesi gibi problemler ortaya çıkabilmektedir (Szmagara vd., 2019; Amakura vd., 2000).

2.3. Rutin (RUT)

Rutin (RUT) (3,4,5,7 – tetrahidroksi – flavon –3– rutinosid veya kersetin – 3- O – rutinosid bitkilerde yaygın olarak bulunan bir biyoaktif flavanoid ve antioksidan aktiviteye sahip bir flavanol glikozittir (Şekil 2.7) (Kicel vd., 2015; Attia, 2016; Karabiberoğlu ve Dursun, 2018; Gullon vd., 2017).



Şekil 2.7. Rutin molekül yapısı

RUT kimyasal yapısında birden fazla fenolik hidroksil grubu olduğundan son zamanlarda fonksiyonel bir gıda olarak araştırılmaktadır. RUT ilk olarak *Ruta graveolens* (bahçe sedef otu) bitkisinde tespit edilmiştir. Ancak günümüzde, endüstriyel üretim için yeterli miktarda RUT'un *Styphnolobium japonicum* L. (*Fabaceae*), (*Japon soforası*) *Fagopyrum esculentum* Moench (*Polygonaceae*), (karabuğday) ve *Eucalyptus spp.* L'onu. (Mersingiller) gibi çeşitli tıbbi bitkilerden elde edilebileceği bilinmektedir (Vu vd., 2018; Kicel vd., 2015).

RUT siyah çay, soğan, domates, limon, elma, portakal, çilek, turunçgil ve greyfurt gibi sebze ve meyvelerde bulunur ve sağlığa olumlu etkilerinin olduğu bilinmektedir. Aynı zamanda Çin'de birçok geleneksel ilaçta (Trombosit agregasyonunun inhibisyonu gibi) bulunmaktadır (Kicel vd., 2015; Attia, 2016; Sghaiera vd., 2016). Japonya'da kullanılan kara buğday sadece geleneksel bir gıda değil, aynı zamanda tıbbi gıdaların bir bileşeni olarak da

yetiştirilir çünkü kara buğdayın tıbbi kullanım için bir RUT kaynağı olarak ekildiği bilgisi 1940'lara dayanmaktadır. Ayrıca, bugüne kadar, 70'den fazla bitki türünün RUT içerdiği bildirilmiştir. *Polygonaceae* familyasından çıkan kara buğday (*Fagopyrum esculentum Moench*), doğal RUT'ların ana kaynağı olarak bildirilmektedir (Gullon vd., 2017; Glavac vd., 2017).

RUT ile ilgili yapılan araştırmalar; RUT'un antioksidan, antienflamatuar, antialerjik, antidiyabetik, antimikrobiyal ve nötroprotektif özelliklerinin olduğunu ve koroner kalp hastalığı, kanser ve diyabet gibi çeşitli kronik hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde rol oynadığını ortaya koymaktadır. Günümüzde RUT, yıllık 3600 ton üretim kapasitesine sahip ekonomik olarak en önemli doğal bileşiklerden biridir. Ayrıca şu anda ABD'de RUT içeren 860'ın üzerinde ürün pazarlanmaktadır (Gullon vd., 2017; Kicel vd., 2015).

Güçlü bir antioksidan olan RUT'un diğer biyolojik aktiviteleri arasında; antihipertansif aktivitesi, antitrombojenik aktivitesi, parkinson hastalığı tedavisi, alzheimer hastalığının önlenmesi, kanser ve diyabet gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde farmakolojik faydaları yer almaktadır. Bununla birlikte; bağırsak duvarı boyunca düşük çözünürlük ve geçirgenlik, oral uygulama için tedavi edici olarak RUT kullanımını sınırlandırmaktadır (Gullon vd., 2017; Vu vd., 2018).

RUT memeli sistemlerinde hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak birçok biyokimyasal ve farmakolojik aktivite de uygulandığı için bir hiyalüronidaz inhibitörü olarak kılcal kırılabilirliği azaltılmasını, kronik venöz yetmezliğin tedavisini, mikro-vasküler kan akışının iyileştirilmesinde bildirilmiştir. Ayrıca, RUT antioksidan özelliği nedeniyle, deoksiribonükleik asit (DNA) ve hücrelerin oksidatif hasarını önleyebilmektedir. Ayrıca, özellikle varisli damarlar, iç kanama veya hemoroitler gibi çeşitli hastalıkların tedavisi için RUT reçetesi önerilmektedir. Oral dozlar günde 500 mg ile 2000 mg arasındadır ve 6 ay kadar uzun süreler boyunca güvenle devam ettirilebilmektedir. Ek olarak, RUT düşük liposolübilitesi (yağda çözünme) nedeniyle topikal uygulamalar için kullanılmaktadır (Gullon vd., 2017; Kicel vd., 2015; Karabiberoğlu ve Dursun, 2018).

RUT'un ana dezavantajları, suda çözünürlüğünün düşük olmasından kaynaklanan zayıf biyoyararlanımı, stabilite ve sınırlı membran geçirgenliğidir (Gullon vd., 2017).

Flavanoid bileşiklerin nitel ve nicel analizi yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), gaz kromatografisi (GC), kapiler elektroforez (CE) ve miselli elektrokinetik kromatografisi (MEKC) gibi yöntemlerle gerçekleştirilmektedir. Flavonoid bileşiklerin analizi için diğer alternatifler arasında hidrofilik etkileşimli sıvı kromatografisi (HILIC), yüksek hızlı ters akım kromatografisi (HSCCC), ultra yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (UHPLC), süper kritik sıvı kromatografisi (SFC) teknikleri bulunmaktadır. Flavanoidlerin kompleks ekstraktlarda analizi için, HPLC’de UV-Vis dedektörü, EC için IR ve UV-Vis sistemleri kullanılabilir. Son zamanlarda, kütle spektrometresi (MS) veya nükleer manyetik rezonans (NMR) yöntemleri artan bir önem kazanmıştır ve günümüzde flavonoid bileşiklerin yapısal aydınlatılmasında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bunların yanı sıra LC-MS veya GC-MS gibi farklı MS dedektörlerine bağlı kromatografi teknikleri de doğal ürünlerdeki kompleks flavanoid bileşiklerinin tayini için kullanılabilir. İlaçlarda, yiyeceklerde ve klinik örneklerde RUT tayini için basit, hızlı, ucuz ve çevre dostu bir yöntem geliştirmek çok önemlidir. HPLC, RUT gibi çeşitli flavonoidlerin tanımlanması ve tayin edilmesinde en çok kullanılan analitik bir yöntemdir. HPLC koşulları temel olarak C18 ters fazlı kolon, ikili çözücü gradiyenti DAD, MS veya NMR gibi farklı dedektör sistemleri kullanılarak yapılmaktadır (Karabiberoğlu ve Dursun, 2018; Gullon vd., 2017).

2.4. Kara Mürver (*Sambucus Nigra L.*, black elderberry)

Kara mürver olarak adlandırılan *Sambucus Nigra L.*, Avrupa, Asya, Kuzey Afrika, ABD’nin güneş ışığına maruz kalan bölgelerinde, Yeni Zelanda ve Avustralya’nın güneyi de dahil olmak üzere dünyanın çeşitli yerlerinde bulunmaktadır. *Sambucus L.* cinsi, meyveli 7 farklı cinsten oluşan yaygın olarak Adoxaceae ya da eski adıyla Caprifoliaceae familyasına aittir. *Sambucus L.* taksonomi sistemine bağlı olarak 5-30 tür ve 6-11 alt tür içermektedir. En sık görülen tür *Sambucus Nigra L.*’dir. Yaygın isimleri arasında mürver, kara mürver, cüce mürver, Avrupalı mürver, Avrupa mürver, Avrupalı kara mürver ve yaban mersini bulunmaktadır. Kara mürver’in (*S. Nigra L.*) 3 alt türü vardır: *S. Nigra L. ssp. Nigra*, *S. Nigra L. ssp. Canadensis* ve *S. Nigra L. ssp. Cerulea*. Kara mürverin kimyasal bileşimi zengindir ve bu bileşim çeşitleri, yer, olgunlaşma evresi ve iklim koşulları gibi faktörlere bağlıdır.

Ayrıca, kara mürver 2011'de ABD'deki ilaç ve gıda pazarında en çok satılan 18. bitkisel diyet takviyesi olarak yer almış ve Avrupa bitki yetiştiricileri birliği tarafından 2010 yılında yayınlanan rapora göre en çok kullanılan şifalı bitki olmuştur (Ribeiro, Estevinho ve Rocha, 2019; Młynarczyk, Tomczak ve Łysiak, 2018).

Genellikle, bitkilerin antioksidan kapasiteleri sahip oldukları fenolik bileşiklerin ve özellikle de flavonoidlerin varlığı ile ilgilidir. Kara mürver (*Sambucus Nigra L.*), çoğunlukla şeker, organik asit, antosiyanin ve kersetinden oluşan yaprak döken bir çalıdır (Ribeiro, Estevinho ve Rocha, 2019; Olejnik vd., 2016). Kara mürver özellikle farmasötik ve gıda amaçlı olarak kullanılan en eski şifalı ve ilgi çekici olan tıbbi bitkilerden biridir. Kara mürver meyvesi, çiçekleri, kabuğu ve rizomları biyolojik olarak aktif bileşenler, özellikle polifenoller (çoğunlukla antosiyaninler, flavonoller, fenolik asitler ve proantosiyanidinler) bakımından zengin olarak kabul edilmektedir (Olejnik vd., 2016; Fazio vd., 2013).

Kara mürver, meyvelerinin polifenolik içerikleri ve bununla ilişkili sağlığa yararları nedeniyle süper gıdalar olarak kabul edilen en önemli biyoaktif bileşik grubundandır. Kara mürver meyvelerinde bulunan ana polifenolik bileşikler klorojenik asit, neoklorojenik asit, kriptoklorojenik asit, kersetin, kersetin-3-rutinosid (RUT), kersetin-3-glukozit (izofersitrin), kaempferol-3-rutinosid, kaempferol-glukor-amin (3)-3-rutinosid ve isorhamnetin-3-glukozit'tir (Młynarczyk, Tomczak ve Łysiak, 2018; Spínola vd., 2019).

Son yıllarda geleneksel bitki temelli ilaçların geliştirilmesine ilgi artmaktadır. Tıbbi bir bitki olarak çok uzun bir geçmişe sahip kara mürver ekstreleri çeşitli tedavi edici ve tıbbi üstünlükleri olan polifenoller bakımından zengindir bu yüzden birçok kullanım alanları vardır. Dolayısıyla, kara mürver türevli ürünlerin, hem sağlıklı organizmalarda hem de hastalık durumunda savunma mekanizmalarını düzenleme potansiyeli birçok çalışmada bildirilmiştir (Olejnik vd., 2016; Ribeiro, Estevinho ve Rocha, 2019). Kara mürver meyve ve çiçekleri uzun süredir ateş düşürücü ve diüretik ajanlarda kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde, kara mürver meyvesi veya çiçekleri kullanılarak üşüme, grip ve diğer bulaşıcı hastalıklara karşı çeşitli ilaçlar geliştirilmektedir. Kara mürver meyvesi veya çiçekleri, şurup, damla, tablet, kapsül, pastil, aerosol, emülsiyon veya süspansiyon vb. formundaki diyet takviyelerinin bileşenleri olarak kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra, kara mürverler çeşitli

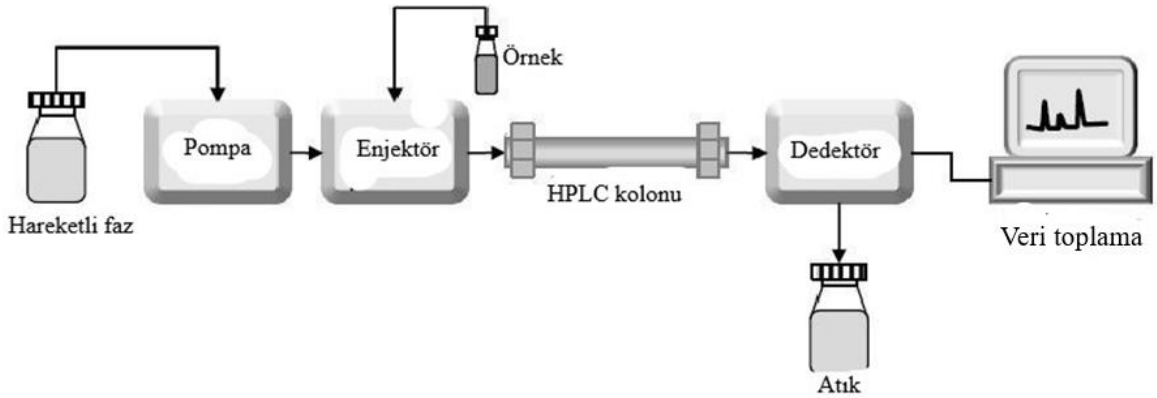
hastalıklarda geleneksel bir çare olarak bilinir ve halk hekimliğinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Öncelikle, soğuk algınlığı, ateşli hastalıklar, öksürük, burun tıkanıklığı, mukoza deşarjı ve grip ile ilgili ortak semptomların tedavisinde ve ayrıca bağışıklık sistemini güçlendirerek hastalık önleyici olarak kullanılmaktadır. Ek olarak, antosiyaninler bakımından zengin olan kara mürver, farklı endüstrilerde doğal renklendirici olarak da kullanılmaktadır. Özellikle kara mürver meyvesi, gıda maddesi renklendiricisi, farmasötikler, konsantre maddeler, meyve suları, şuruplar, reçeller, jöleler, tozlar ve diğer gıda konserveleri, turtalar, kekler veya tatlılar içerisinde ve ayrıca alkollü içeceklerin üretimi için de kullanılmaktadır (Młynarczyk, Tomczak ve Łysiak, 2018; Fazio vd., 2013).

Mürverlerin diğer önemli bir türü *Sambucus ebulus* (Cüce mürver veya cüce yaşlı), ağırlıklı olarak Avrupa, Kuzey Afrika ve Batı Asya'ya yayılan çok yıllık otsu bir bitkidir. Cüce mürverin, şeker ve lif bakımından zengin olduğu bilinmektedir ve aynı zamanda yüksek değerli antosiyanin ile flavonoidler de içermektedir. Genel olarak, mürverlerin popülaritesi sadece besinsel değerlerinden değil, aynı zamanda sağlık koşullarını iyileştiren etkilerinden de kaynaklanmaktadır. *Sambucus ebulus* preparatları, anti-enflamatuar, kolon kanserinde anti-neoplastik aktivite, antiülserojenik, antidiyabetik, antimikrobiyal (antiviral de dahil), yara iyileştirici ve antioksidan özellikleri göstermektedir. Bununla birlikte, cüce yaşlı, Batı Avrupa, Balkan Yarımadası ve Orta Doğu halklarının halk hekimliğinde önemli bir yere sahip popüler bir tıbbi bitkidir. Dolayısıyla, Doğu halk tıbbında, *Sambucus ebulus*, ısırık, yanık, bulaşıcı yara, ödem, egzema, ürtiker, artrit ve boğaz ağrısını tedavi etmek için hastalara geleneksel olarak uygulanmaktadır. Diğer *Sambucus* bazlı ürünler arasında yer alan Sambucol® artık piyasada yaygın bir şekilde bulunmakta ve bağışıklık sistemini ek olarak desteklemektedir (Zahmanov vd., 2015).

2.5. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

HPLC çok farklı formlara sahiptir ve birçok laboratuvarında birincil analiz yöntemidir. HPLC, karışımın her bir bileşenini tanımlamak, ayırmak, ölçmek veya saflaştırmak amacıyla, analitik kimya ve biyokimyada çok fazla kullanılan kromatografik bir yöntemidir (Thomas, 2019; Bayne ve Carlin, 2010). Bir HPLC sisteminin temel bileşenleri (Şekil 2.8); çözücü

rezervuarı (hareketli faz içerikleri içinde bulunur), çözücü verme ve gradiyent oluşturma sistemi (pompa), enjektör (yüksek tekrarlanabilirlik ve yüksek basınç altında (4000 psi'ye kadar) sıvı numunenin 0,1-100 ml hacim aralığında enjeksiyonunu sağlamalıdır), sistemin kalbi ve ayrılmanın gerçekleştiği yer olan kolon (paslanmaz çelikten yapılır, 50 ila 300 mm uzunluğundadır ve 2 ila 5 mm arası bir iç çapı, 3-10 µm partikül büyüklüğüne sahip sabit bir faz ile doldurulur), dedektör (analitleri, kromatografik kolondan ayrıldıklarında kromatogramda pik şeklinde zamana bağlı olarak tespit eder), veri sistemi ve kaydedici (detektörden gelen sinyaller, grafik kaydedicilerde toplanır) bileşenlerinden oluşmaktadır (Giri, 2019; Weston ve Brown, 1997).



Şekil 2.8. HPLC cihazının şematik gösterimi (Giri, 2019)

HPLC'de analit moleküllerindeki ayrılmanın temeli, bir katı sabit faz ile bir sıvı hareketli faz arasındaki diferansiyel afinitelerine dayanmaktadır. HPLC'de, bir bileşiğin tanımlanması alıkonma süresine yani her bir bileşenin kolonda harcadığı zamana dayanmaktadır. HPLC yöntemi sabit faz sistemine bağlı olarak iki sınıfa ayrılmaktadır, bunlar normal faz kromatografisi ve ters faz kromatografisidir. Normal faz (NP) kullanıldığında, analitlerin ayrılması polar silika mikropartikülleri ve polar olmayan bir organik hareketli faz arasında gerçekleşmektedir. Ters faz (RP), yaygın olarak tercih edilen bir kromatografi yöntemidir. RP-HPLC'de, sabit faz polar olmayan bir matriksten oluşur ve elüsyon bir polar hareketli faz ile (metanol, izopropanol, su veya asetronitril gibi çözücüler)

ile gerçekleştirilmektedir (Settle, 1997; Christian, Dasgupta ve Schug, 2014; Marvin ve McMaster, 2007; Giri, 2019).

HPLC, analitik ayırma tekniklerinin en yaygın kullanılanıdır. Yöntemin popülaritesinin sebebi duyarlılığı, hassas nicel tayinlere uyarlanabilirliği, uçucu olmayan türleri veya termal olarak hassas olan maddeleri ayırmaya uygunluğudur. Bundan dolayı, günümüzde HPLC'nin birçok kullanım alanı bulunmaktadır. Örneğin; kimya endüstrisinde hammaddelerin, ara ürünlerin ve bitmiş ürünlerin kalite kontrolünde HPLC kullanılmaktadır. Bununla birlikte, gıda endüstrisinde HPLC uygulamaları, pestisit kalıntılarının analizini, besinlerin veya katkı maddelerinin analizini kapsamaktadır. Ayrıca, klinik analizde, HPLC ile terapötik ilaç izleme yapılmaktadır (Skoog, Holler ve Nieman, 1998; Uwe, 1997).

Polifenolik bileşiklerin araştırılması, tanımlanması ve tayini için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bunların arasında; CE, NMR, HSCCC, SFC, GC, HPLC ve UHPLC gibi teknikler polifenolik bileşiklerin nitel ve nicel analizi için çeşitli analitik yöntemler olarak bildirilmiştir (Lamuela-Raventós vd., 2014; Romani vd., 2000).

Son yıllarda bitkilerde ve yiyeceklerde bulunan fenolik asitlerin ve flavonoidlerin belirlenmesi için en sık kullanılan yöntem HPLC'dir. Genellikle, HPLC'de fenolik asitleri ve bunların glikozitlerini ayırmak için 100-300 mm uzunluğunda ve 2-4,6 mm iç çapı aralığında değişen ters faz C18 bağlı silika kolonları kullanılmaktadır. Bazen C8 kolonlar da fenolik asitleri ayırmak için kullanılmaktadır. Bununla birlikte, dereceli gradiyent programının kullanılması, yapısal olarak çeşitli fenolik bileşiklerin ayrılması için gereklidir. Gradiyent elüsyon genellikle, sulu asitlendirilmiş polar çözücü veya sulu bir tampon içeren bir A çözücüsü ile ve saf veya asitlendirilmiş metanol veya asetonyitril gibi bir organik çözücü içeren bir B çözücü ile yapılmaktadır (Nour, Trandafir ve Cosmulescu, 2013; Kalili, vd., 2010; Lamuela-Raventós vd., 2014).

Genel olarak, polifenolik bileşiklerin analiz etme yöntemlerinin basit, hızlı ve çevre dostu olması gerekmektedir. Polifenolik bileşikleri doğal kompleks numunelerden tayin etmek için en yaygın olarak UV dedektörlü HPLC kullanılmaktadır. UV dedektörleri basit ve en sık kullanılan HPLC dedektörüdür. Farklı UV dedektör tipleri vardır. Bunlar, sabit dalga boyu, çoklu dalga boyu ve DAD dedektörleridir. Günümüzde polifenolik bileşikleri

karakterize ve tayin etmek için en iyi analitik yöntemlerin UV-DAD ile birleştirilmiş HPLC-UV-DAD ve/veya MS/MS-MS ile birleştirilmiş RP-HPLC-MS olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, polifenolik bileşiklerin analizini gerçekleştirmek için spektrofotometrik yöntemler de kullanılır, çünkü bu yöntemler numunedeki toplam polifenol içeriğinin veya bunların antioksidan kapasitelerinin nispeten hızlı bir şekilde tahmin edilmesini sağlamaktadır (Plaza vd., 2018; Abad-Garcia vd., 2007; Lamuela-Raventós vd., 2014).

2.5.1. HPLC kolonları

HPLC deneylerinde farklı uygulamalar için farklı markalara ait çok çeşitli kolonlar bulunmaktadır. Çizelge 2.2’de C18 kolonlarından bazıları verilmiştir. Bu tez çalışmasında deneylerde ACE markalı fenil kolonu kullanıldığından bu kolonlardan kısaca bahsedilmiştir. ACE ultra inert HPLC kolonları, asidik, bazik ve nötr moleküllerle çok iyi sonuçlar veren çeşitli partikül boyutları, bağlı kimyasallar ve kolon boyutları bulunan en zorlu kromatografik uygulamaları bile karşılayacak şekilde tasarlanmıştır (Çizelge 2.3). ACE HPLC kolonları farklı partikül boyutları (3, 5, 10 ve 15 μm), gözenek boyutları (100-300 Å) ve yüzey kimyasalları (C18, C8, C4, CN, Fenil, AQ, SIL ve C18-HL) olacak şekilde temin edilebilmektedir. Ultra yüksek saflıkta, ultra inert ACE kolonları yüksek tekrarlanabilirlik ve yüksek performans (200.000 plaka/m’ye kadar) sağlamaktadır (<http-1>).

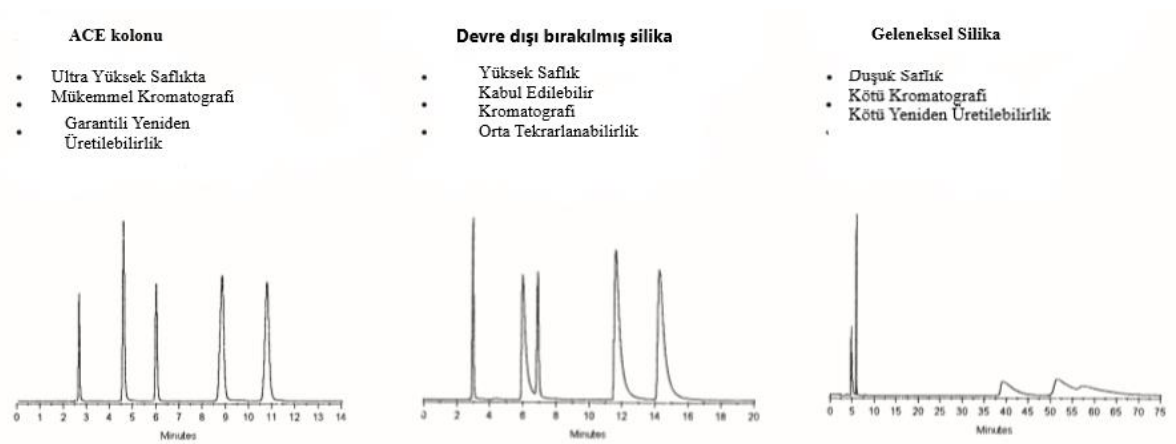
Çizelge 2.2. Bazı C18 oktadesilsilan (ODS) RP-HPLC kolonları ve uygulamaları (Bayne ve Carlin, 2010)

Kolon Tipi	Üretici Firma	%Karbon Yüğü	Uygulamalar
ODS-H	Capital HPLC	18	Asit ve baz karışımları
ODS-L	Capital HPLC	15	Yüksek polar analitler (E.G., Şeker)
Zorbax RX C18	Agilent	12	Asit ve baz karışımları
Luna C18	Phenomenex	17,5	Tüm adli uygulamalar
Hypersil C18	Thermo Scientific	10	pH 1-11: geniş asidik ve bazik analitler
Nova-Pak C18	Waters	7	Asit ve baz karışımları
Inertsil ODS-3	GL Sciences	15	Çok temel analitler
Inertsil ODS-2	GL Sciences	18,5	Hidrojen bağı içeren aminler ve temel ilaçlar

Çizelge 2.3. ACE HPLC kolonları (<http-1>)

Faz	Fonksiyonel Grubu	Endcapped	Partikül Büyüklüğü (µm)	Gözenek Büyüklüğü (Å)	Yüzey Alanı (m ² /g)	Karbon Yüğü (%)
C18	Oktadesil	Evet	3,5,10	100	300	15,5
C8	Oktil	Evet	3,5,10	100	300	9,0
C4	Butil	Evet	3,5,10	100	300	5,5
CN	Siyano	Evet	3,5,10	100	300	5,5
Ph	Fenil	Evet	3,5,10	100	300	9,5
AQ	Özel	Evet	3,5,10	100	300	14,0
SIL	Bağı olmayan	-	3,5,10	100	300	-
C18-HL	Oktadesil	Evet	3,5,10,15	90	400	20,0

Fenil kolon aromatik, amin veya polar bileşikler için alternatif seçicilik sunmaktadır. ACE kolonlarının, diğer popüler baz deaktivasyonlu kolonlara kıyasla daha iyi bir pik şekli ve kolon verimliliği sağladığı belirtilmiştir (Şekil 2.9) (<http-1>).



Şekil 2.9. ACE HPLC kolonu ile diğer kolonlar arasındaki fark (<http-1>)

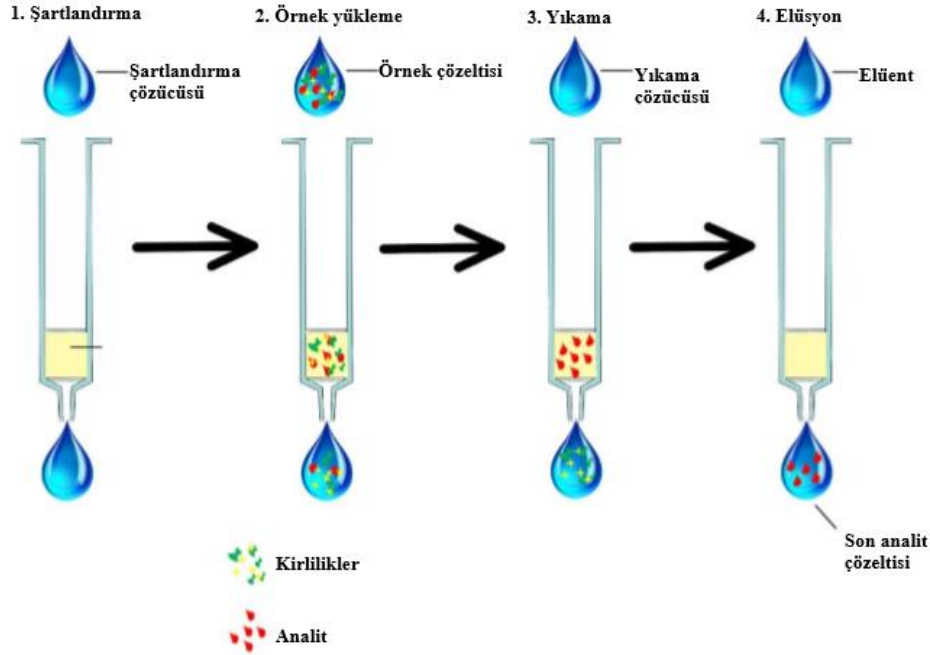
2.6. Katı Faz Ekstraksiyonu (SPE)

Polifenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için en yaygın olarak metanol, etanol, aseton ve etil asetat kullanılmaktadır. Çözücü ile ekstraksiyon yöntemi, genel olarak uygulanabilirliği, verimliliği ve kullanım kolaylığı nedeniyle bitki örneklerinde kullanılmaktadır (Safdar vd., 2017). Bununla birlikte polifenolik bileşiklerin saflaştırılması ve izole edilmesi için farklı ekstraksiyon yöntemleri uygulanmaktadır. Bunların arasında sıvı sıvı ekstraksiyonu (LLE), SPE, ASE, ultrason destekli ekstraksiyonu (UAE), mikrodalga destekli ekstraksiyonu (MAE) ve SFE kullanılmaktadır. SPE ile LLE’de karşılaşılan problemlerin çoğu önlenmektedir. Ancak SPE, LLE’den daha hızlı, kolay, ucuz, az çözücü kullanımı sağlaması ve kolay otomasyona sahip olması nedeniyle LLE’ye alternatif olarak ortaya çıkmıştır (Motilva, Serra ve Macia, 2013; Szmagara vd., 2019).

SPE, bir çözücüden bir tip analiti izole etmek için bir katı faz ve bir sıvı faz kullanan bir ekstraksiyon yöntemidir. SPE, hem temizleme prosedürü olarak kullanılan bir ekstraksiyon yöntemidir hem de bitki, biyolojik, çevresel, gıda ve farmasötik numunelerde ön deriştirme sağlayan bir yöntemdir. Genellikle örnekteki analitlerin miktarını ölçmek için kromatografik veya başka bir analitik yöntem kullanmadan önce yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, SPE yöntemi, sadece organik bileşiklerin izlerini çevresel numunelerden çıkarmak için değil aynı zamanda ilgilenilen analitleri içeren daha temiz bir

ekstrakt elde etmek amacıyla karmaşık matrislerin engelleyici bileşenlerini çıkarmak için uygulanmaktadır (Lamuela-Raventós vd., 2014; Zwir-Ferenc ve Biziuk, 2006).

SPE en çok kullanılan ekstraksiyon tekniğidir ve geniş bir uygulama alanı olması nedeniyle kullanılacak çözücüler ve protokolde yer alan basamaklar dikkatli bir şekilde optimize edilmelidir (Fontanals vd., 2019). SPE yönteminin (Şekil 2.10) şartlandırma çözeltisi ile SPE kolonunu şartlandırmak, SPE katı fazına (kolon, kartuş) bir numune çözeltisini yüklemek, istenmeyen bileşenleri yıkama çözücüsü ile yıkamak ve sonra istenen analitleri bir çözücü ile (elüent) toplama tüpüne elüe etmek aşamaları bulunmaktadır. SPE’de sıvı kromatografi kolonlarında kullanılan aynı tip sabit fazlar kullanılmaktadır. Sabit faz, bir hamur veya cam yününün üstünde bir cam veya plastik kolonda bulunmaktadır. Alkille bağlanmış silika yaygın olarak analitleri izole etmek ve saflaştırmak için kullanılmaktadır. Polifenolik bileşikler için ise en çok ters fazlı HLB, MCX ve MAX SPE kolonları tercih edilmektedir. Ticari SPE kartuşları 1-10 mL kapasiteye sahiptir (Lamuela-Raventós vd., 2014; Zwir-Ferenc ve Biziuk, 2006).



Şekil 2.10. SPE yönteminin uygulamasının şematik gösterimi (Sandoval-Riofrio, 2016)

2.7. Konu İle İlgili Bazı Yapılmış Çalışmalar

Kara mürverlerde EA ve RUT analizleri ile ilgili literatür taraması yapıldığında bununla ilgili az sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Genellikle, bu çalışmalar HPLC ile PR C18 kolon kullanılarak yapılmıştır. Litratürde fenil HPLC kolonu kullanarak EA ve RUT tayinine yönelik herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çizelge 2.4’de kara mürverler, nar gibi çeşitli meyvelerde ve bitkilerde polifenolik bileşiklerin tayinleri ile ilgili çalışmalar özetlenmiştir.

Fazio vd., (2013) HPLC-UV ve HPLC-ESI-MS/MS yöntemleri ile *Sambucus* ve *Rubus* türlerinin tohumlarında EA, kersetin-3-rutinosid (RUT) ve siyanidin gibi çeşitli flavanoid bileşikleri analiz etmişlerdir. IS olarak metil tridekanoat kullanılmış ve UV dedektörü 280 nm’ye ayarlanmıştır.

Olejnik vd., (2016) HPLC-DAD/ESI/MS ve ACE C18 kolonu kullanarak kara mürver meyve ekstraktında RUT ve bazı flavanoidleri 280, 320, 360 ve 520 nm’de tespit etmişlerdir. Ancak EA’yı belirlememişlerdir.

Spinola vd., (2019)’nın yaptığı çalışmada Madeir Adası’nın farklı bölgelerinden *E.umbellata* ve *Sambucus lanceolate* (yaprak ve meyveleri) toplanmış ve 36 fenolik bileşik HPLC-DAD-ESI/MS yöntemi ile tayin edilmiştir. RUT ve EA tespit edilmemiş ancak 7 tane EA türevleri ve ellagitaninler belirlenmiştir.

Nar Orta Doğu’da yaklaşık iki bin yıl önce ilk defa Çin’de ekilmiş ve yetiştirilmiştir. Çin’deki en büyük nar üretim merkezlerden biri olan *Shaanxi Lintong*, zengin nar kaynakları ile ünlüdür. Nar meyvelerinin çoğu taze olarak yenir ve bazıları meyve suyu ve şaraba dönüştürülür. Nar meyvesi ve kabukları EA ve RUT dahil olmak üzere birçok polifenollerce zengin bir bileşiktir. Bütün meyvenin yaklaşık % 40’ını oluşturan nar kabuğu, nar suyu ve nar şarap endüstrisinin yan ürünüdür. Nar kabuğu ekstraktlarının dikkat çekici antioksidan, antibakteriyel, antienflamatuar ve hipolipidemik biyoaktivitelere sahip olduğu bildirilmiştir. Nar kabuğu ekstraktının gallik asit, EA, klorojenik asit, kafeik asit, kateşin, epikateşin, RUT ve kersetin gibi polifenolik bileşiklerce zengin olduğu bildirilmiştir (Li vd; 2015).

RUT ve EA’nın nar numunelerindeki tayini ile ilgili literatür taraması yapıldığında hem EA hem de RUT’un tayinini içeren az sayıda çalışmaya rastlanmıştır.

Li vd., (2015) Çin’in Shaanxi Lintong şehrinde bulunan farklı meyve bahçelerinden toplanan 10 çeşit taze nar örneklerinin kabuklarında nar kabuğu ekstraktı üzerinde yapılmıştır. HPLC-UV yöntemi ile nar kabukları içerisinde bulunan punikalajin, kateşin, EA, epikateşin, RUT, klorojenik asit ve kafeik asit gibi polifenolik bileşikler 280 nm’de belirlenmişlerdir.

Wang, Chou ve Su., (2017) tarafından yapılan çalışmada BIOMED bitkisel araştırma biyomedikal grubundan temin edilen nar ekstraktında EA’nın HPLC-DAD/MS/MS kullanarak 254 nm’de tayini yapılmıştır.

Kamal vd., (2018) farklı nar pekmezi numunelerinde HPLC-PDA yöntemini kullanarak C vitamini, gallik asit, RUT ve EA’nın miktarı 254 nm’de tayin etmiştir.

Verotta vd., (2018) HPLC-UV ile fermante nar atıklarında EA analizi gerçekleştirmişlerdir. Uyarılma dalga boyları olarak 254, 280, 320, 350, 400 veya 529 nm kullanılmış ve sonuç olarak fermante nar atıklarının EA kaynağını olduğu rapor edilmiştir.

Amakura vd., (2000) geliştirdikleri HPLC-DAD yöntemi ile 360 nm dalga boyunda ananas, nar, dut ve fueijoa meyvelerinde EA tayini yapmışlardır.

Abad-Garcia vd., (2007) RP-HPLC-DAD yöntemi ile C18 kolonu kullanarak taze çilek, elma ve mandalina gibi meyve sularında RUT (280 nm'de) ve EA (254 nm'de) dahil bazı polifenolik bileşiklerin analizini gerçekleştirmişlerdir.

Simirgiotis, Bórquez ve Hirschmann, (2013) tarafından yapılan çalışmada *Luma L. apiculata* meyve ve yapraklarında 31 polifenolik bileşiği HPLC-DAD ve HPLC-ESI/MS kullanarak 280, 320 ve 520 nm'de karakterizasyonu yapılmıştır. Çalışmalarda kurutulmuş *L. apiculata* meyveleri matriks olarak kullanılmış ve GK değerleri hesaplanmıştır.

Mesquita ve Monteiro, (2018) portakal sularında hesperidin, narirutin, eriocitrin, nobiletin, RUT ve mandaletin gibi polifenolik bileşikleri DAD kullanarak 210-400 nm dalga boyu aralığında izlemiş ve kromatogramlar 255, 270 ve 280 nm'de elde edilmiştir. IS olarak benzoik asit kullanılmıştır.

Çizelge 2.4. Konu ile ilgili yapılan çalışmalar

Çalışılan polifenolik bileşikler	Örnek	Ekstraksiyon yöntemi	Yöntem	Kolon	Doruğsal aralık	LOD/LO Q	Kaynak
Hidroksisinamik asitler: sinapik asit-O- (pentosil) heksosit, Sinapik asit türevi ve kafeik asit türevi Flavanoller: kersetin Flavan-3-ol: gallo (epi) kateşin Elajik asit türevleri /elajitanninler: EA-O-heksosid	E.umbellata ve Sambucus lanceolata'nın meyve ve yaprakları	Metanol/su (80:20, h/h) %7 asetik asit	HPLC-DAD-ESI/MS	Phenomenex Gemini C18 (250×3 mm, 5 µm)	5-100 mg/l	-/-	Spinola vd., 2019
klorojenik asit, neoklorojenik asit, kriptoklorojenik asit, kersetin, kersetin-3-rutinosid (RUT), kersetin-3-glukozit (izofersitrin), kaempferol-3-rutinosid, kaempferol-glukor-amin (3) -3-rutinosid ve isorhamnetin-3 glukozit	Avrupa kara mürver meyvesi ve çiçekleri	Metanol ekstraksiyonu Çözücü ekstraksiyonu SPE vs	HPLC-UV ve HPLC-ESI-MS/MS HPLC-MS-MS/MS	-	-	-/-	Młynarczyk, Tomczaka ve Łysiak., 2018
4-Hidroksibenzoik asit glukozit, Polimerler - hidrolize tanenler, klorojenik asit, siyanidin-3,5-O-diglukozit, siyanidin-3-O-sambubiosil-5-O-glukozit (ko-elüsyon), pelargonidin-3-O- glukozit, kersetin-3-O-glukozit, RUT ve kersetin	Sambucus nigra L. (Mürver) meyveleri	Dondurularak kurutulmuş mürver tozunun, deiyonize su içinde süspansiyonu.	HPLC-DAD/ESI/MS	ACE C18 (150×2,1 mm, 5 µm)	-	-/-	Olejniak vd., 2016
Elajik asit, Siyanidin 3-sambubiosid-5-glukozit, Pelargonidin-3-rutinosid, RUT, kersetin-3-glukozit, Siyanidin 3-glukozit, galloil-HHDP glikoz ve galloil-bis-HHDP glikozit	Sambucus ve Rubus türlerinin tohumları (R. Ulmifolius ve nigra L.'nin olgun meyveleri)	Metanol ekstraksiyonu	HPLC-UV ve HPLC-ESI-MS/MS	RP Supelco C18 (150×2,1 mm, 5 µm)	-	-/-	Fazio vd., 2013

Çizelge 2.4. devam

Çalışılan polifenolik bileşikler	Örnek	Ekstraksiyon yöntemi	Yöntem	Kolon	Doruğsal aralık	LOD/LO Q	Kaynak
EA	Fermente nar atıkları	Metanol ekstraksiyonu	HPLC-UV, LC-MS ESI-TOF ve 1 H NMR	Phenomenex Sphereclone (250 × 4,60 mm, 5 µm)	5–100 µg/mL	-/-	Verotta vd., 2018
Gallik asit, RUT ve EA	Nar ekşisi ve nar pekmezi	Matris katı faz dispersiyonu yöntemi	HPLC-PDA	RP-C18 (25×4,6 mm, 5 µm)	Gallik asit için (10-100 µg/mL) ve RUT ve EA için (1-500 µg/mL)	(4,50, 0,45 ve 0,40 µg/mL)/(9,50, 0,85 ve 9,5 µg/mL)	Kamal vd., 2018
EA	Nar özü	Etanol çözeltisi ile 48 saat ultrasonik ekstraksiyon 10 dk santrifüj	HPLC-DAD/MS/MS	YMC-Pack ODS-AM C18 (250×4,6 mm, 5 µm)	-	-/-	Wang, Chou ve Su., 2017
gallik asit, punikalajin, kateşin, klorojenik asit, kafeik asit, epikateşin, RUT ve EA	Nar kabuğu	20 ml %60 etanol çözeltisi ile ultrasonik ekstraksiyon	HPLC-UV	Agilent Zorbax SB-C18 (250×4,6 mm, 5 µm)	0,04-275 mg/L	(0,013-0,045 mg/L)/-	Li vd., 2015
Hesperidin, narirutin, eriocitrin, nobiletin, RUT ve mandaletin	portakal suları	Sulu metanol çözeltisi (% 90, (h/h) SPE (C18 Bond Elut, ve SPE (polimerik Strata X)	HPLC-DAD/MS	BEH X-Bridge C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm) ve guard kolon (20×4,6 mm, 5 µm)	0,01–223,4 µg/g	(1–22 ng/g)/(0,7–7,4 µg)	Mesquita ve Monteiro., 2018
31 Fenolik bileşik tespit edilmiştir. 27 tanımlanmış fenolik bileşiklerin yedisi tanen veya monomeri, 15'i flavonol türevi (mirisetin, kersetin ve isorhamnetin gibi) ve 5'i antosiyanin (malvidin 3-O-glikoz gibi)	Luma (meyve ve yaprakları) ve L. apiculata	RP-SPE, Bond Elut C-18, 500 mg/6 mL	HPLC-DAD ve HPLC-ESI/MS	Purospher star-C18 (250×4,6 mm, 5 µm)	0,1-65,0 µg/mL (flavanoidler için)	-/-	Simirgiotis, Bórquez ve Hirschmann., 2013

Çizelge 2.4. devam

Çalışılan polifenolik bileşikler	Örnek	Ekstraksiyon yöntemi	Yöntem	Kolon	Doruğsal aralık	LOD/LO Q	Kaynak
Hidrokinonlar: floretin-2-OB-glukozit Hidroksibenzoik asitler: gallik asit ve EA Flavan-3 ol: (+) – kateşin ve (-) - epikateşin Hidroksisinamik asitler: Kafeik asit, P-kumarik asit ve klorojenik asit Flavonol: Kaempferol glikozit , İzoramnetin-3-O-rutinosit, kersetin ve kersetin-3-O-rutinosit (RUT) Flavanonlar: naringin , Hesperetin-7-O-rutinosit ve naringenin-7-O-rutinosit	Çeşitli taze çilek, elma ve mandalina meyve suları	Dondurularak kurutulmuş numunelerin çözücü ekstraksiyonu (metanol kullanılmış) % 1 asetik asit ve askorbik asit %0.2 k/h) içeren metanol-su-asetik asit, h/h/h karışımları	RP-HPLC-DAD	RP-Luna (Phenomenex C18 (150x4,6 mm, 3 µm) ve Nova-Pak C18 (10x3,9 mm id, 4 µm) guard kolon	0,02-100 µg/mL	(0,005-0,03) µg/mL/(0,02-0,1) µg/mL	Abad-Garcia vd., 2007
EA	40 çeşit taze meyve (çilek, dut, fueijoa, ananas ve nar gibi ve 11 çeşit işlenmiş meyve (ahududu reçeli, yaban mersini reçeli ve çilek reçeli)	Metanol ile homojenizasyon 0,1 M HCl çözeltisinden 100 µl ilave edildikten sonra Sep-Pak Plus SPE C18 (900 mg)	HPLC/DAD	Shimadzu L-ODS C18 (250x4,6 mm , 5 µm)	0,1–100 mg/mL	(0,015 mg/g)/0,05 mg/g	Amakura vd., 2000

3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Örnekler

EA ve RUT tayinlerinde kullanılan çeşitli sambucol veya sambutus (kara mürver) özütü gıda takviye örnekleri (Çizelge 3.1) Eskişehir’deki çeşitli eczane ve marketlerden satın alınmış ve temin edilmiştir. Deneylerde kullanılan kızılılık pekmezi, karadut pekmezi, yaban mersini pekmezi Ayvalık’ta üretilmiş ve nar ise Eskişehir’deki bir marketten satın alınmıştır. Deneylerde, EA ve RUT belirlenmeyen yaban mersini pekmezi boş matriks olarak kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. *Sambucol (kara mürver) örnekleri*

Şuruplar	Efervesan tabletler	Çiğnebilir tabletler
1- Sambucol® (plus)	4- Sambucol® efervesan tablet	6- Kara mürver özlü çiğnenebilir bitkisel şeker®
2- Sambucol kids® (4-10 yaş)	5- Sambucus nigra® (zinc+vit C) (Boos+)	7- Sambucol® kara mürver çiğnenebilir form (takviye edici gıda)
3- Sambutus®		

3.2. Kimyasallar

Çalışmalarda standart madde olarak kullanılan EA ve RUT Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, A.B.D.) firmasından satın alınmıştır. Deneylerde kullanılan metil alkol (MeOH) ($\geq 99,9\%$; gradiyent saflıkta), hidroklorik asit (HCl), formik asit ($\geq 99,9\%$; gradiyent saflıkta), MP (IS1) ve EP (IS2) IS maddeleri Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, A.B.D.) firmasından temin edilmiştir. Tez çalışmasında kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıktadır.

3.3. Araç, Gereç ve Cihazlar

Kromatografik çalışmalarda HPLC (Agilent 1100 serisi, Waldbronn, Almanya) cihazı ile DAD dedektörü kullanılmıştır. Ayrımlar, ACE fenil (4,6 mm×100 mm×3 µm) (Scotland) kolonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deneyler sırasında kullanılan diğer cihazlar ve gereçler; ultrasonik banyo Bandelin Sonorex (Almanya), su banyosu Clifton (İngiltere), vortex daigger Scientific Industries (A.B.D.) ve ultra saf su için Arium

comfort (Hollanda) su saflaştırma cihazıdır. Örnekler ve çözeltiler 0,45 µm gözenek çapına sahip minisart NML hidrofilik (Sartorius, Almanya) şırınga filtrelerinden süzölmüştür. Ayrıca, SPE için C18 (3 mL, 500 mg, Supelco, A.B.D.) kolonu kullanılmıştır.

3.4. İstatistiksel Analizler

Deneylerdeki tüm istatistiki hesaplamalar Microsoft excel ve GraphPad Prism v.6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) programları kullanılarak yapılmıştır.

3.5. EA ve RUT Deneyleri

3.5.1. Standart çözeltilerin hazırlanması

EA katısından 1,3 mg tartılarak 10 mL MeOH ile ana stok çözeltisi hazırlanmıştır. RUT stok çözeltisi ise 10,7 mg tartılarak 10 mL MeOH çözeltisinde hazırlanmıştır. EA ana stok çözeltisinin derişimi $4,30 \times 10^{-4}$ M ve ikinci stok çözeltisinin derişimi ise $1,00 \times 10^{-4}$ M'dir. RUT stok çözeltisinin derişimi $1,75 \times 10^{-3}$ M olarak hesaplanmıştır. EA ve RUT çözeltilerinin hazırlanmasında yapılan tüm seyreltmeler için %50 MeOH kullanılmıştır. Stok çözeltiler 0,45 µm gözenek çaplı şırınga filtrelerinden süzölerek deneylerde kullanılabilece kadar -20°C'de saklanmıştır.

3.5.2. İç standart (IS) çözeltilerinin hazırlanması

Deneylerde IS1 olarak MP ve IS2 olarak EP kullanılmıştır. 10 mg MP ve 11,2 mg EP tartılarak 10'ar mL MeOH eklenmiş ve derişimleri $6,57 \times 10^{-3}$ M ve $6,74 \times 10^{-3}$ M olan iç standart çözeltileri hazırlanmıştır. Daha sonra bu çözeltiler son derişimleri $3,42 \times 10^{-5}$ M ve $3,5 \times 10^{-5}$ M olacak şekilde %50 MeOH ile seyreltilmiştir.

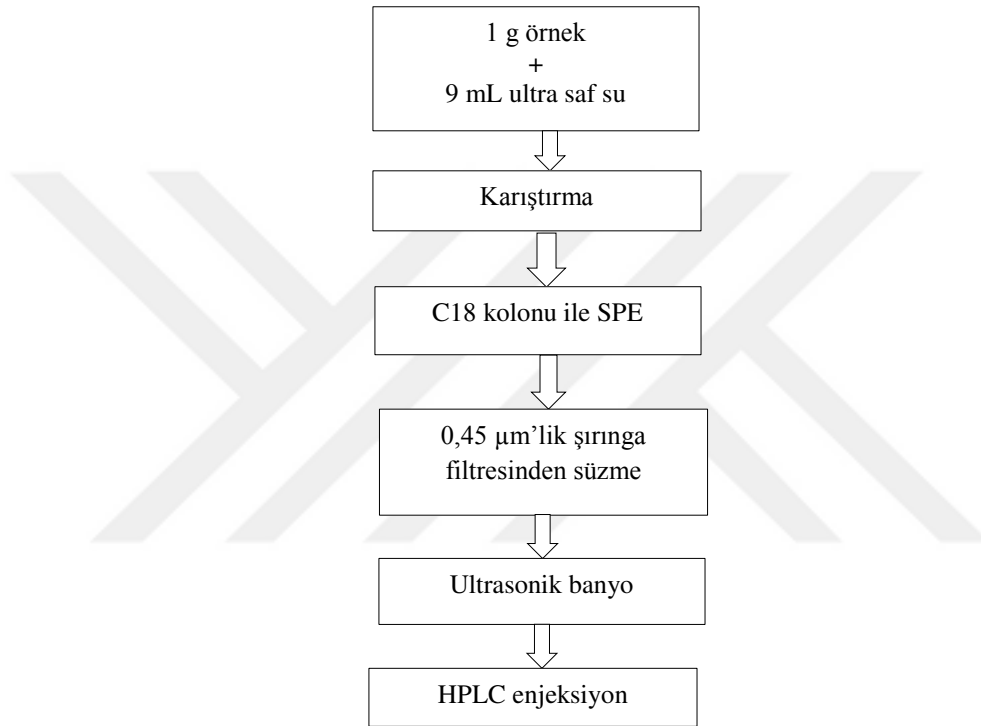
3.6. Örnek Hazırlama

3.6.1. Sambucol örneklerinin hazırlanması

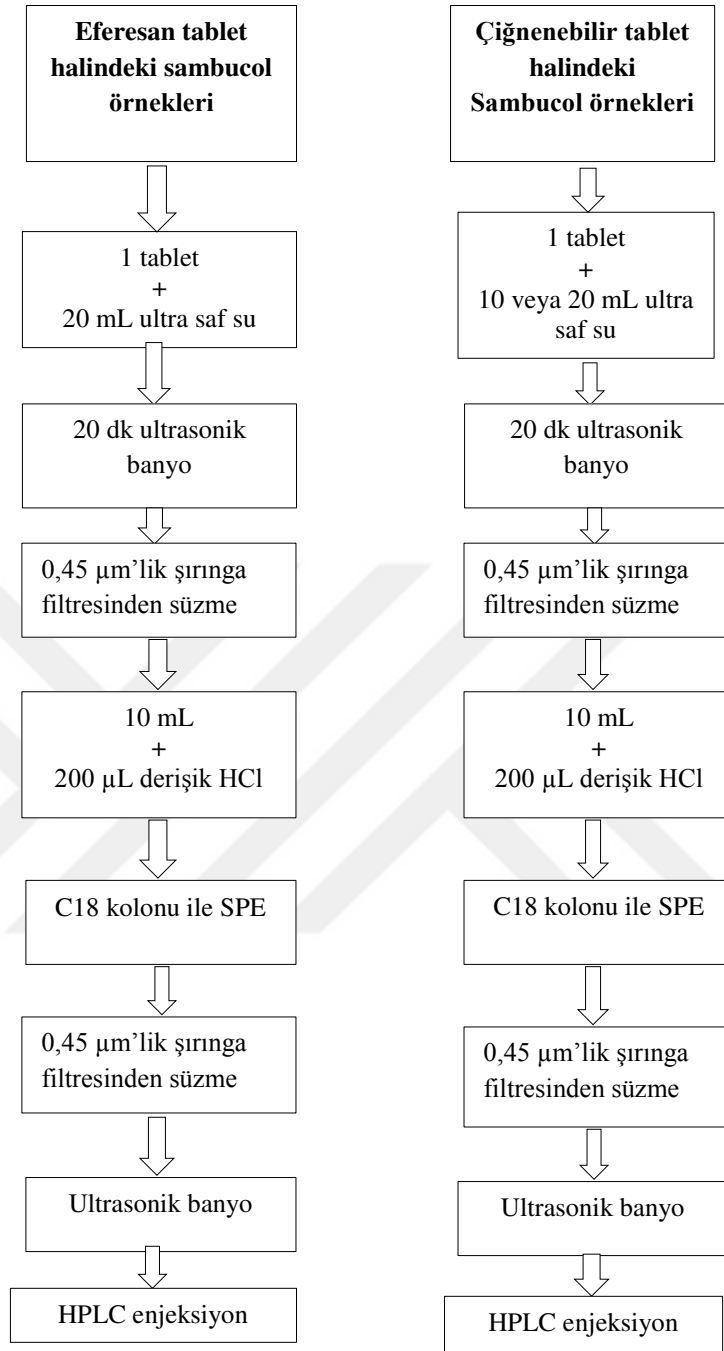
Deneylerde kullanılan sambucol şurup örnekleri yaklaşık 1 g tartılıp üzerine 9 mL ultra saf su ve 200 µL derişik HCl eklendikten sonra 10 dakika ultrasonik banyoda karıştırılmıştır. Sambucol tabletleri ise tartıldıktan sonra 20 mL ultra saf su içinde çözölerek 20 dakika gazların uzaklaştırılması için ultrasonik banyoda tutulmuştur. Daha sonra 0,45 µm'lik şırınga filtresinden süzölerek 10 mL alınmış ve SPE yapılmadan önce

200 µL derişik HCl eklenmiştir. Çiğnenebilir tabletler tartıldıktan sonra 30 mL ultra saf su eklenerek ultrasonik su banyosunda çözünmüştür. Daha sonra bu örneklerden 10 mL alınmış ve SPE yapılmadan önce üzerine 200 µl derişik HCl eklenmiştir.

Şekil 3.1 (sambucol® şurup örnekleri) ve Şekil 3.2’de (sambucol® efervesan tablet ve sambucol® çiğnenebilir tablet örnekleri) gösterildiğı gibi sambucol örneklerinin ön hazırlama işlemlerinden sonra SPE yapılmıştır.



Şekil 3.1. *Sambucol şurup örneklerinin analize hazırlanışı*



Şekil 3.2. Sambucol efervesan ve çiğnenebilir tablet örneklerinin analize hazırlanışı

3.6.2. Nar suyu örneğinin hazırlanması

Marketten alınan taze nar meyvesinin suyu sıkılıp 10 dakika 3500 rpm'de santrifüjlenerek 0,45 µm'lik şırınga filtresinden süzöldökten sonra 10 mL alınmış ve özerine 200 µL derişik HCl eklenmiştir. Daha sonra vortex cihazıyla 5 dakika karıştırıldıktan sonra örneğın saflaştırılması ve temizlenmesi için C18-SPE yöntemi uygulanmıştır.

3.6.3. Pekmez örneklerinin hazırlanması

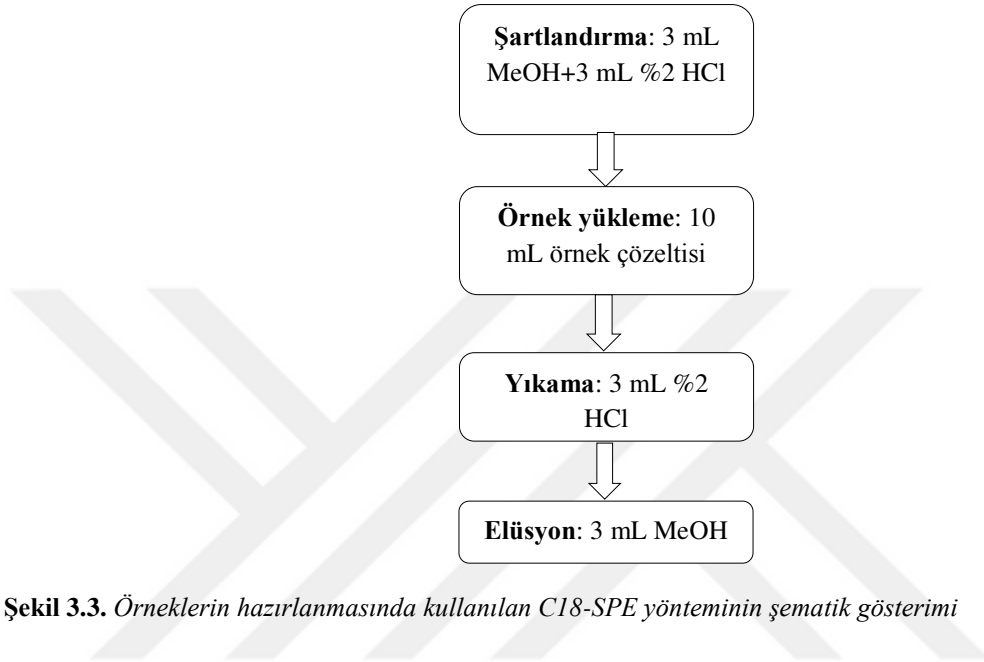
Deneylerde kullanılan kızılıık pekmezi, yaban mersini pekmezi ve karadut pekmezi 1'er g tartılıp özerlerine 9 mL ultra saf su eklendikten sonra vortex cihazıyla 5 dakika karıştırılmıştır. Örnekler 0,45 µm'lik şırınga filtresinden süzölüp 200 µL HCl ilave edildikten sonra SPE yöntemi uygulanmıştır. Daha sonra 0,45 µm'lik şırınga filtresinden süzölmüştür.

3.6.4. SPE yöntemi

Tez çalışmasında sambucol örnekleri, taze nar suyu, kızılıık pekmezi ve karadut pekmezi örneklerinin temizlenmesi ve saflaştırılmasında SPE yöntemi kullanılmıştır. Ekstraksiyonda kullanılan C18-SPE kolonu 3 mL MeOH ve 3 mL hacimce %2'lik HCl ile şartlandırılmıştır. Daha sonra C18-SPE kolonuna 10 mL örnek yüklenmiş ve 3 mL hacimce %2'lik HCl ile yıkanmıştır. Son olarak örnek 3 mL MeOH ile temiz bir cam tüpe elüe edilmiştir. Elüat, 0,45 µm'lik şırınga filtresinden süzölmüştür. Bu işlemler sonrasında sambucol örneklerini için elüattan uygun hacimler (100-500) µL alınarak özerlerine 280 µL ultra saf su, 20 µL formik asit, 100 µL IS1 (MP), 100 µL IS2 (EP) ve hacim 1 mL'ye tamamlanana kadar MeOH eklenerek karıştırılmıştır. Daha sonra tüm çözeltilerin ultrasonik banyoda gazı giderildikten sonra HPLC cihazına enjeksiyonları yapılmıştır. SPE çözeltilisinden alınan hacim örnek çözeltilerinin derişimlerine bağılı olarak belirlenmiştir. Örneklerin her birine 2'şer kez SPE uygulanarak HPLC'ye enjeksiyonları yapılmıştır. Örneklerle uygulanan SPE yöntemi Şekil 3.4'de şematik olarak gösterilmiştir.

Nar için elüattan 10 µL alınıp özerine 490 µL MeOH, 280 µL ultra saf su, 20 µL formik asit, 100 µL IS1 metil paraben (MP) ve 100 µL IS2 etil paraben (EP) eklenerek karıştırılmıştır.

Pekmez örneklerinin elüatlarından 500 µL alınıp üzerine 280 µL ultra saf su, 20 µL formik asit, 100 µL IS1 metil paraben (MP) ve 100 µL IS2 etil paraben (EP) eklenerek karıştırılmıştır.



Şekil 3.3. Örneklerin hazırlanmasında kullanılan C18-SPE yönteminin şematik gösterimi

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. HPLC-DAD Yöntem Optimizasyonu

HPLC-DAD yöntemi optimizasyonu çalışmalarında, aletsel ve deneysel parametrelerin değiştirilmesi ile polifenolik bileşiklerden EA ve RUT'un aynı anda ayrılması ve tayinleri için en iyi sonuç veren ve en uygun olan koşullar belirlenmiştir. Bu amaçla çeşitli akış hızları, kolon sıcaklığı, farklı hareketli faz bileşimleri ile farklı özellikteki HPLC kolonları ve DAD dalga boyu değeri gibi parametreler araştırılmıştır. Aynı zamanda deneylerde en uygun IS'ı belirlemek için farklı maddeler kullanılmıştır. Bunlar metil paraben, etil paraben, propil paraben, bütül paraben ve parasetamol maddeleridir. Sonuç olarak bu tez kapsamında kullanılan örnek matrisleri için metil paraben (IS1) ve etil paraben (IS2) en uygun IS'lar olarak belirlenmiştir.

Kolon seçimi: Deneylerde C18 kolonu (4,6 mm×150 mm×5 µm) ve C8 kolonu (4,6 mm×150 mm×5 µm) gibi farklı kolonlar denenmiştir. Ancak bu kolonlarda EA ve RUT aynı yerde pik vermiştir. Yapılan deneyler sonucunda EA, RUT ve IS'lar için en iyi ayırım fenil kolonunda (4,6 mm×100 mm×3 µm) gerçekleştirilmiştir.

Hareketli faz seçimi: EA ve RUT tayini için en uygun hareketli fazı bulmak amacıyla deneylerde su ve metil alkol karışımlarının farklı oranları ile formik asit ve asetik asit gibi farklı asitler kullanılarak çeşitli denemeler yapılmıştır. Sonuç olarak 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).

Akış hızı ve kolon sıcaklığı optimizasyonu: Yapılan çalışmalarda EA ve RUT en iyi ayırım elde edilebilmesi için farklı akış hızları (0,7; 0,8; 0,9; 1,0; 1,1 ve 1,2 mL/dk) ve farklı kolon sıcaklıkları (25°C, 30°C ve 35°C) denenmiştir. En uygun akış hızı 1,0 mL/dk ve kolon sıcaklığı 30°C olarak belirlenmiştir.

Dedektör dalga boyu optimizasyonu: Deneylerde EA ve RUT'un maksimum absorbanst yaptığı dalga boyunu belirlemek için DAD dedektöründe 245 nm, 280 nm, 250 nm ve 260 nm gibi farklı dalga boyu değerleri denenmiştir. En iyi sonuçlar 254 nm dalga boyu değerinde elde edilmiştir.

Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucu belirlenen en uygun kromatografik koşullar Çizelge 4.1’de verilmiştir. Ayrıca, HPLC deneylerinde EA ve RUT’un ayırımında uygulanan gradiyent programı Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Optimum HPLC koşulları

Kolon	Fenil kolon (4,6 mm×100 mm×3 µm)
Hareketli faz	A (su:metil alkol:formik asit; 88:10:2; h/h/h) B (su:metil alkol:formik asit; 8:90:2; h/h/h)
Kolon sıcaklığı	30°C
Akış hızı	1,0 mL/dk
Enjeksiyon hacmi	20 µL
DAD dedektör dalga boyu	254 nm

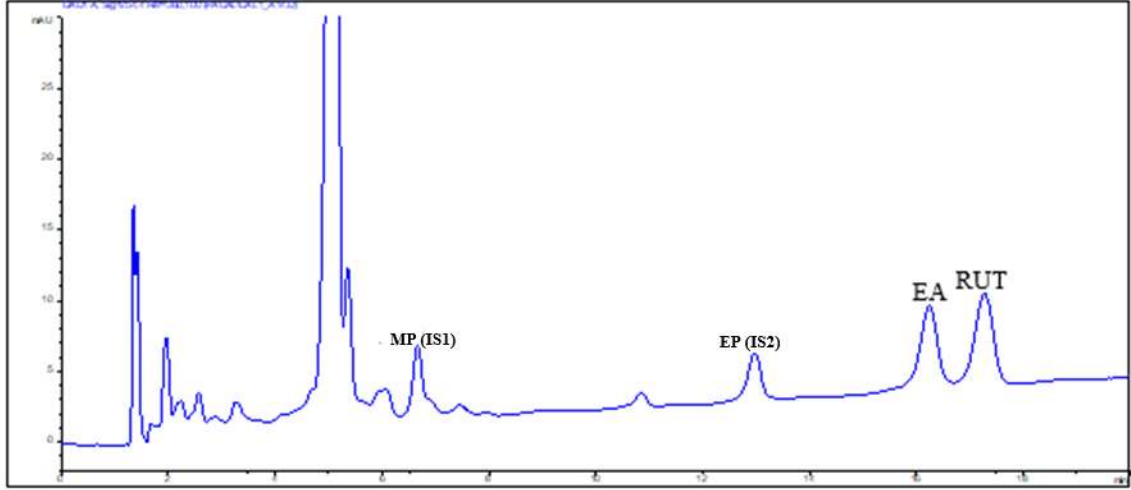
Çizelge 4.2. EA ve RUT tayininde kullanılan gradiyent program

Zaman (dk)	B (%)
0	0
1	0
20	10
22	10
24	45
25	45
27	90
28	0
31	0

Ayrıca, çalışılan örneklerden EA ve RUT’un en iyi şekilde ekstrakte edilmesi için farklı çözücüler ve SPE kolonları (C18 ve C18-OH) gibi da denenmiştir. Sonuç olarak, bitkisel ürün matriksleri için en uygun olarak bulunan C18-SPE kolonu ile yapılan örnek hazırlama ve saflaştırma yöntemi tezin “3.6.4. SPE yöntemi” bölümünde açıklanmıştır.

Şekil 4.1’de optimum HPLC koşullarında elde edilen $3,42 \times 10^{-5}$ M IS1 ve $3,5 \times 10^{-5}$ M IS2 içeren $5,00 \times 10^{-6}$ M EA ve $2,29 \times 10^{-5}$ M RUT standartlarına ait kromatogram görülmektedir. Geliştirilen HPLC yöntemi ile EA, RUT, IS1 ve IS2 aynı anda 18 dakika

içerisinde ayrılmıştır. Belirlenen optimum HPLC koşullarında EA yaklaşık 16,3 dakika ve RUT 17,3 dakikada ayrılmıştır.



Şekil 4.1. Optimum HPLC-DAD koşullarında elde edilen $5,00 \times 10^{-6}$ M EA ve $2,19 \times 10^{-5}$ M RUT standart çözeltileri ile IS1 ve IS2'ye ait kromatogram

EA ve RUT için optimize edilen HPLC-DAD yönteminin validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

4.2. HPLC-DAD Yöntem Validasyon Çalışmaları

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

4.2.1. Doğrusallık ve duyarlılık

Deneylerde matriks uyumlu kalibrasyon eğrisi yöntemi kullanılmıştır. HPLC-DAD yönteminin doğrusallık çalışmalarında boş örnek matriksi olarak seçilen yaban mersini pekmezi üzerine standartlar eklenerek sonrasında SPE yapılmıştır. EA için ($3,33 \times 10^{-7}$, $1,67 \times 10^{-6}$, $3,33 \times 10^{-6}$, $5,0 \times 10^{-6}$ ve $6,67 \times 10^{-6}$ M) ve RUT için ($2,92 \times 10^{-7}$, $7,29 \times 10^{-6}$, $1,46 \times 10^{-6}$, $2,19 \times 10^{-5}$ ve $2,92 \times 10^{-5}$ M) derişim aralığındaki standart çözeltileri kullanılarak kalibrasyon eğrileri çizilmiştir. Bu çözeltilerin 3 günde ve 5'şer kez ($n=5$)

enjeksiyonları yapılmıştır. Boş örnek matriksi olan yaban mersini pekmezinden 1 g tartılıp üzerine EA ve RUT standartlarının her derişim için uygun hacmi eklendikten sonra 10 mL tamamlanana kadar ultra saf su ilave edilmiştir. Daha sonra 200 µl HCl eklenip ultrasonik su banyosunda 2-3 dakika karıştırılıp C18-SPE yöntemi (Şekil 3.4) ile ekstraksiyon yapılmıştır. SPE yapıldıktan sonra 0,45 µm'lik şırınga filtresi ile süzölmüş çözeltiden 500 µL alınarak üzerine 280 µL ultra saf su, 20 µL formik asit, 100'er µL IS'lardan (MP ve EP) eklenmiştir. Böylece tüm farklı derişimdeki EA ve RUT standart çözeltileri aynı şekilde hazırlanmıştır. Çalışmalarda standartların ve iç standartların 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. LOD Ve LOQ değerleri aşağıda verilen eşitlikler yardımı ile hesaplanmıştır.

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

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

Eşitliklerdeki, SS= düşük derişimdeki standart madde çözeltisinin standart sapma değeri ve m= kalibrasyon eğrisinin eğim değeridir.

EA ve RUT'un her bir iç standart (IS1 ve IS2) için regresyon analiz sonuçları Çizelge 4.3'de gösterilmiştir. Ayrıca sambucol örnekleri için geliştirilen HPLC-DAD yöntemi ile belirlenen LOD ve LOQ değerleri de bulunmaktadır. Bitkisel kaynaklı matrikslerde EA ve RUT tayini için bu tez çalışmasında geliştirilen yöntemde yüksek korelasyon katsayıları ($r^2 = 0,9916-0,9985$) ile doğrusal grafikler elde edilmiştir.

Çizelge 4.3. EA ve RUT'un regresyon analiz sonuçları

	Gün içi (n=5)			Günler arası (n=15)
	1. Gün	2. Gün	3. Gün	
EA (IS1)				
Eğim±SS	251334 ± 3325	163496 ± 2278	112347 ± 1555	161294 ± 1388
Kesim±SS	-0,09901 ± 0,01298	-0,02105 ± 0,009211	0,03347 ± 0,006400	-0,01508 ± 0,005066
r ²	0,9963	0,9957	0,9958	0,996
LOD				3,36×10 ⁻⁸ M
LOQ				1,02×10 ⁻⁷ M
EA (IS2)				
Eğim±SS	532376 ± 5055	340660 ± 6469	237613 ± 2756	338558 ± 4175
Kesim±SS	-0,1576 ± 0,02084	-0,01331 ± 0,02552	0,09912 ± 0,01145	-0,007469 ± 0,01446
r ²	0,9985	0,9928	0,997	0,9943
LOD				3,43×10 ⁻⁸ M
LOQ				1,04×10 ⁻⁷ M
RUT (IS1)				
Eğim±SS	60243 ± 804,8	101461 ± 2082	86981 ± 1247	58851 ± 491,4
Kesim±SS	-0,02451 ± 0,01452	-0,04624 ± 0,03460	0,09918 ± 0,02230	0,004566 ± 0,008406
r ²	0,9954	0,9916	0,9953	0,9966
LOD				6,35×10 ⁻⁸ M
LOQ				1,92×10 ⁻⁷ M
RUT (IS2)				
Eğim±SS	124522 ± 1190	140529 ± 2100	117750 ± 1944	124224 ± 897,4
Kesim±SS	0,02118 ± 0,02135	0,07293 ± 0,03741	0,1447 ± 0,02987	0,05418 ± 0,01543
r ²	0,998	0,9953	0,9948	0,997
LOD				6,99×10 ⁻⁸ M
LOQ				2,12×10 ⁻⁷ M

r²: regresyon katsayısı, SS: standart sapma

4.2.2. Kesinlik

Gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlik ile HPLC yönteminin kesinliği değerlendirilmiştir. Bu amaçla yaban mersini pekmesine 3 farklı derişimde EA ($3,33 \times 10^{-7}$ M, $3,33 \times 10^{-6}$ M ve $6,67 \times 10^{-6}$ M) ve RUT ($2,92 \times 10^{-7}$ M, $1,46 \times 10^{-5}$ M ve $2,92 \times 10^{-5}$ M) çözeltileri eklenerek C18-SPE ile ekstraksiyon yapılmıştır. Deneyler 3'er gün ve 5'şer kez (n=5) olacak şekilde tekrar edilmiştir. Yöntemin kesinliği ile ilgili sonuçlar Çizelge 4.4'de verilmiştir. EA ve RUT için hem IS1 hem de IS2 ile ilgili veriler değerlendirildiğinde gün içi ve günler arası kesinlik sonuçlarına göre %BSS değerlerinin

%7,38'den küçük olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak bu yöntem için yüksek tekrarlanabilirlikte sonuçlar elde edilmiştir.

Çizelge 4.4. Kesinlik sonuçları

EA Derişimi (M) (IS1)		Gün içi (n=5)			Günler arası (n=15)
		1. Gün	2. Gün	3. Gün	
$3,33 \times 10^{-7}$	$\bar{X}$	0,055	0,051	0,059	0,055
	SS	0,001	0,001	0,001	0,004
	%BSS	1,72	2,87	1,84	7,38
$3,33 \times 10^{-6}$	$\bar{X}$	0,490	0,511	0,527	0,508
	SS	0,007	0,007	0,006	0,017
	%BSS	1,47	1,40	1,16	3,42
$6,67 \times 10^{-6}$	$\bar{X}$	1,005	1,066	1,064	1,045
	SS	0,030	0,008	0,019	0,035
	%BSS	3,02	0,73	1,77	3,36

EA Derişimi (M) (IS2)		Gün içi (n=5)			Günler arası (n=15)
		1. Gün	2. Gün	3. Gün	
$3,33 \times 10^{-7}$	$\bar{X}$	0,153	0,140	0,132	0,142
	SS	0,003	0,002	0,005	0,009
	%BSS	1,92	1,56	3,61	6,45
$3,33 \times 10^{-6}$	$\bar{X}$	0,898	1,028	0,997	0,986
	SS	0,004	0,012	0,007	0,053
	%BSS	0,46	1,16	0,70	5,36
$6,67 \times 10^{-6}$	$\bar{X}$	1,93	2,264	2,240	2,170
	SS	0,006	0,014	0,006	0,146
	%BSS	0,31	0,62	0,25	6,72

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

Çizelge 4.4. devam Kesinlik sonuçları

RUT Derişimi (M) (IS1)		Gün içi (n=5)			Günler arası (n=15)
		1. Gün	2. Gün	3. Gün	
2,92×10 ⁻⁷	$\bar{X}$	0,044	0,048	0,048	0,046
	SS	0,001	0,002	0,002	0,002
	%BSS	3,52	3,72	3,44	5,47
1,46×10 ⁻⁵	$\bar{X}$	0,915	0,957	0,974	0,950
	SS	0,034	0,005	0,012	0,033
	%BSS	3,70	0,55	1,20	3,48
2,92×10 ⁻⁵	$\bar{X}$	1,933	1,680	1,795	1,801
	SS	0,042	0,022	0,038	0,103
	%BSS	2,17	1,33	2,14	5,73

RUT Derişimi (M) (IS2)		Gün içi (n=5)			Günler arası (n=15)
		1. Gün	2. Gün	3. Gün	
2,92×10 ⁻⁷	$\bar{X}$	0,119	0,105	0,113	0,110
	SS	0,004	0,003	0,003	0,007
	%BSS	3,00	2,68	2,52	5,90
1,46×10 ⁻⁵	$\bar{X}$	1,946	1,987	1,871	1,927
	SS	0,010	0,016	0,036	0,055
	%BSS	0,54	0,83	1,95	2,86
2,92×10 ⁻⁵	$\bar{X}$	3,766	3,780	3,789	3,779
	SS	0,048	0,043	0,016	0,037
	%BSS	1,28	1,14	0,42	0,97

4.2.3. Doğruluk

HPLC-DAD yönteminin doğruluk çalışmaları, boş örnek matrisi olarak seçilen yaban mersini pekmezi üzerine ekstraksiyon işlemi öncesinde derişimi bilinen EA ve RUT standart çözeltileri eklenerek %GK değerlerinin hesaplanması ile gerçekleştirilmiştir. %GK değerlerinin hesaplanması için yaban mersin pekmezinin 3 farklı derişimde standart EA ve RUT çözeltisi eklenerek SPE yöntemi uygulanmıştır. Geri kazanım deneylerinde her bir derişimdeki çözeltilerin 6'şar kez enjeksiyonu yapılmıştır.

Doğruluk verilerinin hesaplanmasında kalibrasyon eğrilerinin denklemleri kullanılmıştır. Çizelge 4.5'de EA ve RUT için %GK, SS ve %BSS değerleri verilmiştir.

Sonuç olarak, %90,46–103,38 aralığında yüksek geri kazanım değerleri ile yüksek doğrulukta sonuçlar elde edilmiştir.

Çizelge 4.5. Doğruluk sonuçları

	Matrikse eklenen derişim (M)	%Geri Kazanım (n=6)	SS	%BSS
EA (IS1)	$3,33 \times 10^{-7}$	97,13	5,58	5,75
	$3,33 \times 10^{-6}$	97,34	3,24	3,32
	$6,67 \times 10^{-6}$	99,03	2,71	2,74
EA (IS2)	$3,33 \times 10^{-7}$	91,88	3,63	3,95
	$3,33 \times 10^{-6}$	90,46	1,64	1,81
	$6,67 \times 10^{-6}$	100,00	0,69	0,69
RUT (IS1)	$2,92 \times 10^{-7}$	96,92	3,48	3,59
	$1,46 \times 10^{-5}$	102,15	3,30	3,23
	$2,92 \times 10^{-5}$	103,38	4,05	3,92
RUT (IS2)	$2,92 \times 10^{-7}$	98,18	4,81	4,90
	$1,46 \times 10^{-5}$	102,65	2,79	2,71
	$2,92 \times 10^{-5}$	102,68	1,02	0,99

4.2.4. Kararlılık (Stabilite)

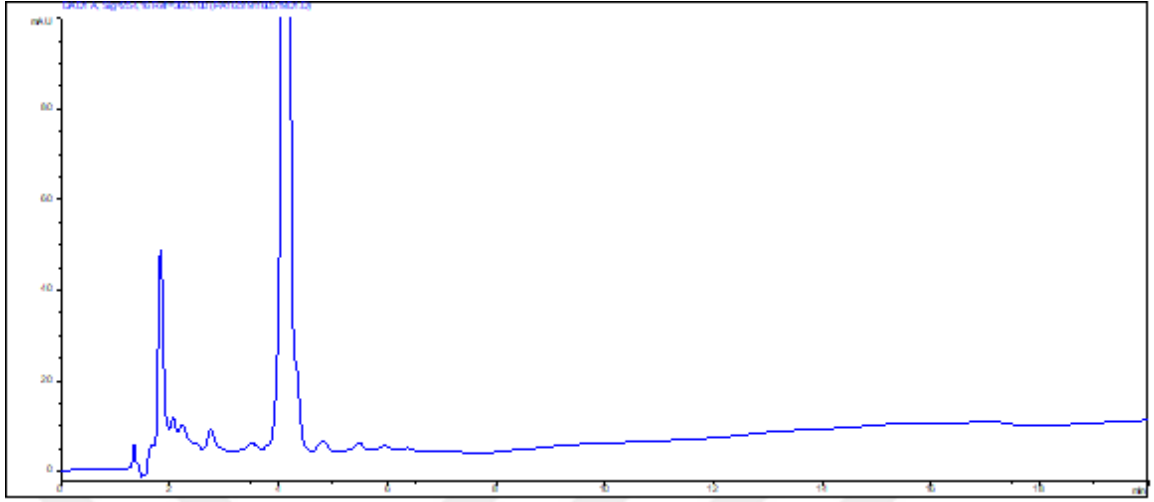
Kararlılık çalışmalarında 2’şer farklı derişimde EA ($1,67 \times 10^{-6}$ M ve $5,0 \times 10^{-6}$ M) ve RUT ($7,29 \times 10^{-6}$ M ve $2,19 \times 10^{-5}$ M) çözeltilerinin her biri için kısa dönem, uzun dönem ve dondurma-çözdürme kararlılıkları 4’er kez (n=4) enjeksiyonları yapılarak EA ve RUT bileşiklerin kararlı olup olmadığını incelenmiştir. Çözeltilerin herbiri %50 MeOH ile hazırlanmıştır. Kısa dönem kararlılığı için hazırlanan standart çözeltileri 24 saat karanlıkta ve oda sıcaklığında bekletilmiştir. Uzun dönem kararlılık çalışmalarında 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 deneyler yapılmıştır. EA ve RUT’un farklı saklama koşullarındaki kararlılıkları için %GKve %BSS değerleri hesaplanmış ve Çizelge 4.6’da verilmiştir. Çizelge 4.6’deki %GK verileri incelendiğinde RUT’un belirtilen koşullarda kararlı olduğu gösterilmiştir ancak EA’nın kısa dönem ve dondurma-çözdürme kararlılıklarının kötü olduğu görülmüştür. Bu yüzden deneyler boyunca EA çözeltileri, -20°C’de tutulan stok çözeltilisinden günlük olarak hazırlanmıştır.

Çizelge 4.6. Kararlılık sonuçları

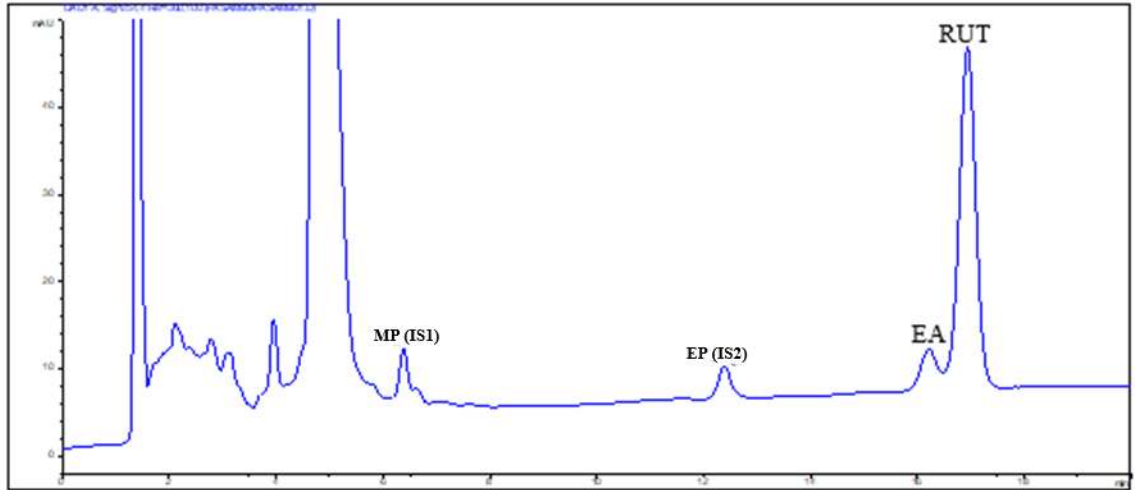
Derişim (M)	Kısa Dönem Kararlılık (24 saat, oda sıcaklığında)		Uzun Dönem Kararlılık (15 gün, -20°C)		Dondurma-Çözdürme Kararlılığı (3 döngü)	
	%Geri Kazanım (ortalama±SS)	%BSS	%Geri Kazanım (ortalama±SS)	%BSS	%Geri Kazanım (ortalama±SS)	%BSS
EA	1,67×10 ⁻⁶	55,17±0,94	1,70	64,17±0,51	0,79	Bozulma —
	5,0×10 ⁻⁶	52,77±0,72	1,37	97,41±1,55	1,59	Bozulma —
RUT	7,29×10 ⁻⁶	99,15±2,52	2,54	103,71±4,48	4,32	108,30±2,83 2,61
	2,19×10 ⁻⁵	98,24±0,55	0,56	105,48±1,02	0,97	114,67±1,46 1,28

4.3. Geliştirilen HPLC-DAD Yönteminin Örneklerle Uygulanması

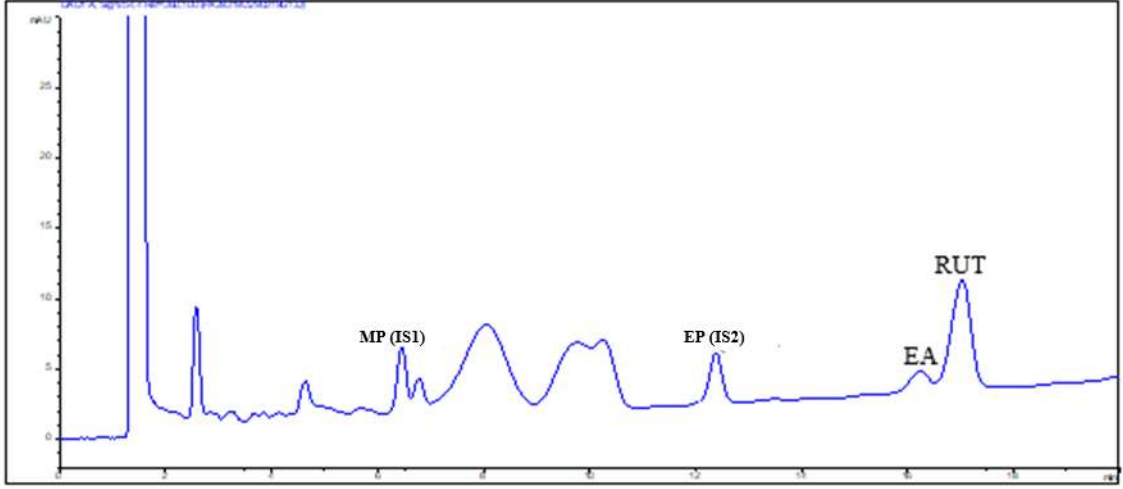
EA ve RUT'un aynı anda tayinleri için geliştirilen ve validasyonu yapılan HPLC-DAD yöntemi farklı sambucol örnekleri, taze nar suyu, kızılıcık pekmezi ve karadut pekmezi gibi çeşitli örneklerle uygulanmıştır. Optimum HPLC-DAD koşullarında boş yaban mersini pekmezi, bazı sambucol örnekleri, taze nar suyu ve kızılıcık pekmezinde EA ve RUT tayinine ait kromatogramlar Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6, Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de verilmiştir. Çizelge 4.7'de EA ve RUT'un analiz edilen bitkisel örneklerdeki miktarları ile ilgili sonuçlar verilmiştir. Sonuçlar her iki iç standarda (IS1 ve IS2) göre de hesaplanmıştır. Deneyler 2 paralel olarak yürütülmüş ve örneklerin 4'er kez enjeksiyonları yapılmıştır. Sambucol® örneklerinde EA miktarları IS1 için 0,178–3,17 mg/kg, IS2 için 0,162–3,51 mg/kg arasında; RUT miktarları IS1 için 1,13–444,0 mg/kg ve IS2 için 1,43–375,0 mg/kg arasında bulunmuştur. Sambucol® çiğnenebilir tablette EA tespit edilmemiştir. Sambucol® çiğnenebilir şekerde RUT tespit edilmemiştir. *Sambucus nigra* efervesan tablet (Boos+) ve karadut pekmezi örneklerinde IS1 (MP) ortamda başka piklerle karıştığı için IS1'li olan EA ve RUT miktarları hesaplanmamıştır ve “*” ile gösterilmiştir. Taze nar suyunda EA miktarı IS1 için 40,8 mg/kg ve IS2 için ise 41,7 mg/kg olarak bulunmuş ancak RUT belirlenmemiştir. Kızılıcık pekmezinde EA miktarı 1,018 mg/kg (IS1) ve 0,821 mg/kg (IS2) olarak ve RUT miktarı ise 55,5 mg/kg (IS1) ve 49,56 mg/kg (IS2) olarak bulunmuştur.



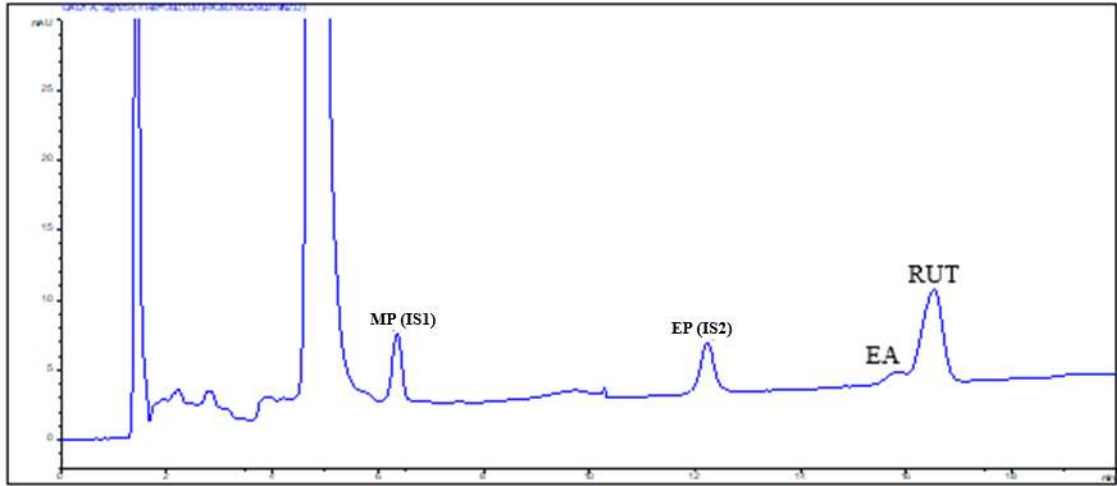
Şekil 4.2. Optimum HPLC-DAD koşullarında elde edilen boş yaban mersini pekmezi için kromatogram



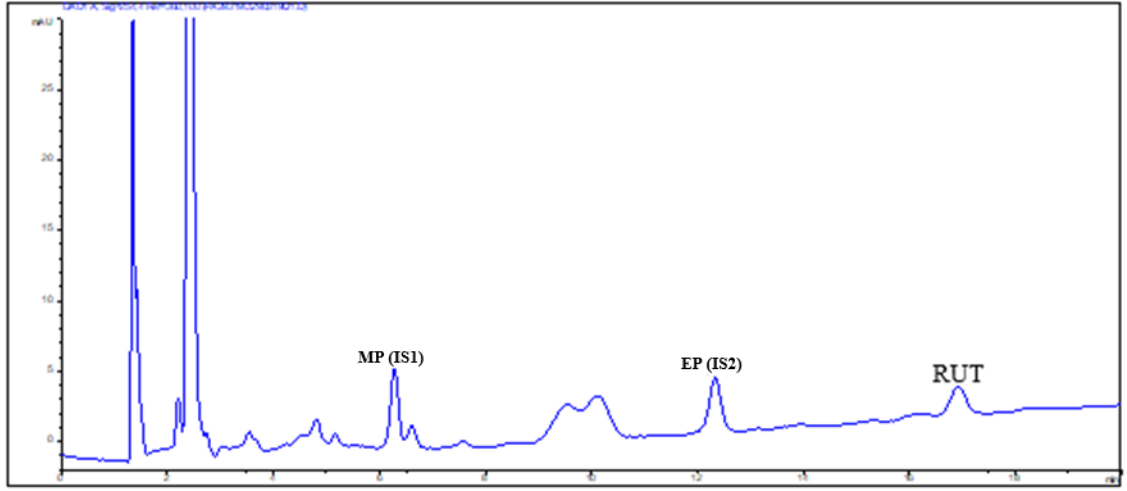
Şekil 4.3. Optimum HPLC-DAD koşullarında elde edilen sambucol® plus şurup örneği için kromatogram



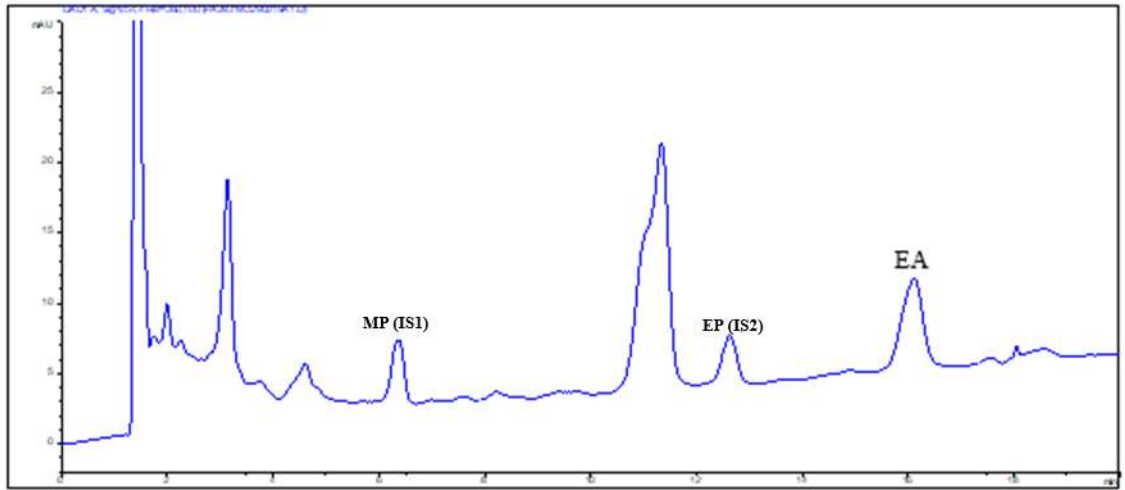
Şekil 4.4. Optimum HPLC-DAD koşullarında elde edilen sambucus® nigra (zinc+vitC) efervesan tablet örneğine ait kromatogram



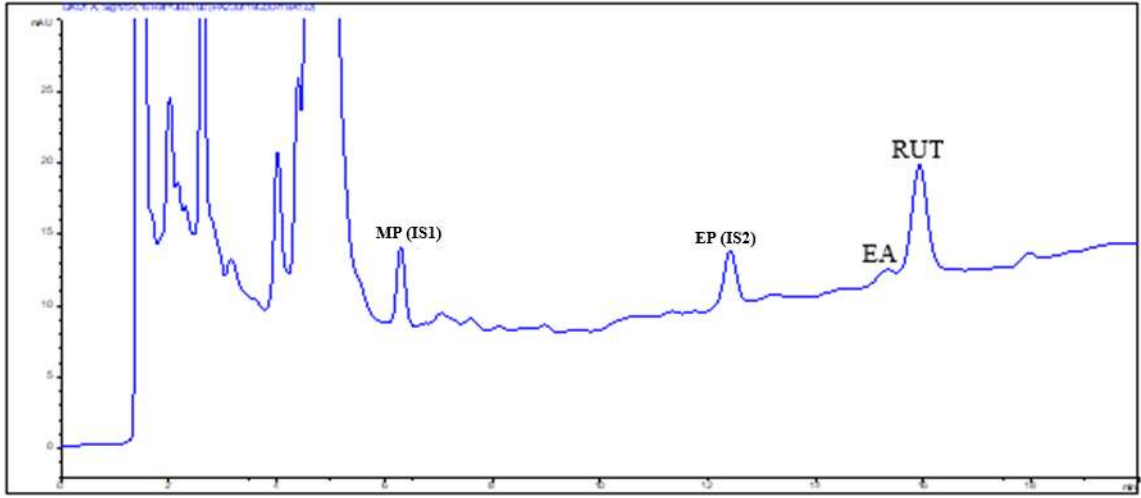
Şekil 4.5. Optimum HPLC-DAD koşullarında elde edilen sambucol® kids şurup örneğine ait kromatogram



Şekil 4.6. Optimum HPLC-DAD koşullarında elde edilen sambucol® efervesan tablet örneğine ait kromatogram



Şekil 4.7. Optimum HPLC-DAD koşullarında elde edilen nar suyu örneğine ait kromatogram



Şekil 4.8. Optimum HPLC-DAD koşullarında elde edilen kıvılcık pekmezi örneğine ait kromatogram

Çizelge 4.7. Bitkisel ürün örneklerinde EA ve RUT miktarları (mg/kg)

Örnekler		IS1		IS2	
		EA	RUT	EA	RUT
Sambucol plus şurup	$\bar{X}$	3,17	238,0	3,51	236,0
	SS	0,208	8,97	0,207	12,2
	%BSS	6,55	3,78	5,89	5,17
Sambucol kids şurup	$\bar{X}$	1,24	109,0	0,919	101,0
	SS	0,111	6,16	0,013	7,56
	%BSS	8,98	5,65	1,41	7,50
Sambutus şurup	$\bar{X}$	0,195	1,13	0,162	1,43
	SS	0,006	0,049	0,001	0,085
	%BSS	3,12	4,32	0,06	5,92
Sambucol efervesan tablet	$\bar{X}$	0,178	8,57	0,214	5,96
	SS	0,013	0,501	0,004	0,339
	%BSS	7,46	5,85	2,01	5,69
Sambucus nigra efervesan tablet	$\bar{X}$	*	*	1,40	69,4
	SS			0,083	0,68
	%BSS			5,94	0,97
Sambucol çiğnenebilir tablet	$\bar{X}$	<LOD	444,0	<LOD	375,0
	SS	—	6,10	—	11,2
	%BSS	—	1,37	—	3,00
Sambucol çiğnenebilir şeker	$\bar{X}$	0,274	<LOD	0,247	<LOD
	SS	0,018	—	0,009	—
	%BSS	6,55	—	3,82	—
Taze nar suyu	$\bar{X}$	40,8	<LOD	41,7	<LOD
	SS	2,60	—	2,52	—
	%BSS	6,36	—	6,04	—
Kıvılcık pekmezi	$\bar{X}$	1,018	55,5	0,821	49,56
	SS	0,038	3,51	0,057	0,96
	%BSS	3,70	6,33	6,92	1,95
Karadut pekmezi	$\bar{X}$	*	*	0,245	0,454
	SS			0,013	0,033
	%BSS			5,49	7,38

*= IS ortamda başka piklerle karıştığı için miktar hesaplanmamıştır, <LOD= gözlenebilirlik sınırının altındadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, insan sağlığı açısından çok önemli olan oksitleyici ajanlara ve serbest radikallere karşı savunma sağlayabilen, vücuttaki hücrelere ve dokulara zarar gelmesini önleyebilen antioksidan özellikteki polifenolik bileşiklerden EA ve RUT'un kara mürverden elde edilen gıda katkı maddelerinde, bazı pekmez ve bazı meyve sularında HPLC ile tayinleri yapılmıştır. Kara mürver özütü (*Sambucus Nigra*, sambucol® veya mürver) bitkisel kaynaklı polifenolik bileşikler araştırılırken en sık rastlanılan meyve ekstresidir ve sağlığa faydaları nedeniyle de son zamanlarda kara mürverler ile ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde en sık fenolik asitler ve flavonollerin çalışıldığı görülmektedir. Sambucus® dışında diğer bitki kaynaklı polifenol bileşiklerince zengin olan sebze ve meyveler özellikle de nar meyvesidir çünkü nar kalp, böbrek, cilt ile ilgili çeşitli hastalıkların riskini azaltır ve ayrıca genel fiziksel ve zihinsel sağlığı da desteklemektedir. Narın antioksidan aktivitesinin yeşil çay gibi diğer diyet polifenol kaynağından üç kat daha güçlü olduğu bilinmektedir. Pekmezler de dut, karadut, andız, üzüm, pancar, hurma, yaban mersini ve kıızılcık gibi pek çok meyveden elde edilebilen ve özellikle de anemi gibi hastalıklarda beslenmemizde önemli bir yeri olan gıdalardır.

Polifenolik bileşiklerin insan sağlığı açısından son derece önemli olmaları, endüstride gıdalarda koruyucu ve renklendirici vb. olarak pekçok kullanım alanı göz önüne alındığında, bu bileşikleri analiz etmek için her zaman yeni ve güvenilir analitik yöntemlere gerek duyulmaktadır. Genellikle, polifenolik bileşiklerin tayinlerinde HPLC-DAD yöntemi yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında da çeşitli bitkisel ürün matris örneklerinde EA ve RUT'un aynı anda tayinleri için basit ve seçici olan bir HPLC-DAD yöntemi geliştirilerek ICH (1996)'a göre validasyonu yapılmıştır. Bu tez çalışmasında EA ve RUT'un, 18 dakikalık bir sürede ve literatürden farklı olarak fenil kolonu (4,6 mm×100 mm×3 µm) kullanılarak ayırımları gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen yöntem, kesinlik, doğruluk, gözlenebilme sınırı (LOD), tayin alt sınırı (LOQ) ve kararlılık validasyon parametreleri ile valide edilmiştir.

Bu tez kapsamında çalışılan kara mürverde EA ve RUT'un HPLC-DAD yöntemi ile tayinine yönelik az sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Özellikle EA ve RUT ile ilgili literatürdeki çalışmaları incelendiğinde fenil kolonu kullanılarak yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ayrıca bilginiz dahilinde literatürde eczanelerde veya bazen marketlerde efervesan tabletleri şeklinde satılan sambucol® gıda takviye edici

numunelerinde HPLC-DAD yöntemi ile fenil kolon kullanılarak EA ve RUT'un ayrıldığı bir çalışmaya da rastlanmamıştır.

Sonuç olarak, geliştirilmiş ve valide edilmiş olan HPLC-DAD yöntemi bitkisel ürün örneklerine başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Geliştirilen bu yöntem, polifenolik bileşiklerin tayinleri, gıda ve ilaç analiz laboratuvarlarında kullanılmaları için önerilebilir. Kara mürver örnekleri ile çalışacak araştırmacılar için bu tez çalışmasının faydalı olacağı söylenebilir.



KAYNAKÇA

- Abad-Garcia, B., Berrueta, L.A., Lopez-Marquez, D.M., Crespo-Ferrer, I., Gallo, B. and Vicente, F. (2007). Optimization and validation of a methodology based on solvent extraction and liquid chromatography for the simultaneous determination of several polyphenolic families in fruit juices. *J. Chromatogr. A*, **1154**, 87–96.
- Amakura, Y., Okada, M., Tsuji, S. and Tonogai, Y. (2000). High-performance liquid chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits., *J. Chromatogr. A*, **896**, 87–93.
- Attia, T.Z. (2016). Simultaneous determination of rutin and ascorbic acid mixture in their pure forms and combined dosage form. *Spectrochim Acta A*, **169**, 82–86.
- Bayne, S. and Carlin, M. (2010). Forensic applications of high performance liquid chromatography. (2. baskı). İngiltere: Cambridge.
- Carocho, M., Morales, P. and Ferreira, I.C.F.R. (2015). Natural food additives: Quo vadis?. *Trends Food Sci. Technol.*, **45(2)** 284-295.
- Christian, G.D., Dasgupta, P.K.S. and Schug, K.A. (2014). Analytical Chemistry. ABD: John Wiley&Sons Inc.
- Cong, X.C., Bing, W., Qiong, P.Y., Sheng, T.J. and Tong, Z. (2017). Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. *Chin. J. Nat. Med.*, **15(10)**, 0721-0731.
- Davalos, J.Z., Lima, C.F.R.A.C., Santos, L.M.N.B.F., Romero, V.L. and Liebman, J.F. (2019). Thermochemical and structural studies of gallic and ellagic acids. *J. Chem. Thermodynamics*, **129**, 108–113.
- Domínguez-Rodríguez, G., Marina, M.L. and Plaza, M. (2017). Strategies for the extraction and analysis of non-extractable polyphenols from plants. *J. Chromatogr. A*, **1514**, 1-15.
- Esteban-Fernandez, A., Zorraquín-Pena, I., de -Llano, D.G., Bartolom, B. and Moreno-Arribas, M.V. (2017). Review The role of wine and food polyphenols in oral health. *Trends Food Sci. Technol.*, **69**, 118-130.
- Fazio, A., Plastina, P., Meijerink, J., Witkamp, R.F. and Gabriele, B. (2013). Comparative analyses of seeds of wild fruits of Rubus and Sambucus species from Southern

- Italy: Fatty acid composition of the oil, total phenolic content, antioxidant and anti-inflammatory properties of the methanolic extracts. *Food Chem.*, **140**, 817-824.
- Fontanals, N., Pocurull, E., Borrull, F. and Marcé, R.M. (2019). Role of solid-phase extraction in wastewater-based epidemiology. *Curr. Opin. Environ. Sci. & Health*, **9**, 26–33.
- Gini, T.G. and Jothi, G.J. (2018). Column chromatography and HPLC analysis of phenolic compounds in the fractions of *Salvinia molesta* mitchell. *EJBAS*, **5**, 197–203.
- Giri, N.C. (2019). *Introduction to probability and statistics*. (2. baskı). Taylor and Francis Group, New York: Taylor and Francis Group.
- Glavac, N.K., Stojilkovski, K., Kreft, S., Park, C.H. and Kreft, I. (2017). Determination of fagopyrins, rutin, and quercetin in Tartary buckwheat products. *Food Sci. Technol.*, **79**, 423-427.
- Gleichenhagen, M. and Schieber, A. (2016). Current challenges in polyphenol analytical chemistry. *Curr. Opin. Food Sci.*, **7**, 43–49.
- Gullon, B., Lú-Chau, T.A., Moreira, M.T., Lema, J.M. and Eibes, G. (2017). Rutin: A review on extraction, identification and purification methods biological activities and approaches to enhance its bioavailability. *Trends Food Sci. Tech.*, **67**, 220-235.
- Hoge, A., Guillaume, M., Albert, A., Tabart, J., Dardenne, N., Donneau, A.F., Kevers, C., Defraigne, J.O. and Pincemail, J. (2019). Validation of a food frequency questionnaire assessing dietary polyphenol exposure using the method of triads. *Free Radic. Biol. Med.*, **130**, 189-195.
- http-1:** <http://www.hplc.eu> (Erişim Tarihi: 25.06.2019).
- ICH (International Conference on Harmonization) topic Q2B. (1996). Validation of analytical procedures: Methodology. ICH Harmonized Tripartite Guidelines. ICH, Geneva, Switzerland, CPMP/ICH/281/95.
- Jakobek, L., Seruga, M., Novak, V. and Medvidovic-Kosanovic, M. (2007). Flavonols, phenolic acids and antioxidant activity of some red fruits. *Dtsch. Lebensm. Rundsch.*, **103**, 122-135.
- Kalili, K.M., de-Villiers, A., Malan, M. and Roodman, J. (2010). Improving HPLC separation of polyphenols. *LCGC Europe*, **9**, 466–478.

- Kamal, Y.T., Alam, P., Alqasoumi, S.I., Foudah, A.I., Alqarni, M.H. and Yusufoglu, H.S. (2018). Investigation of antioxidant compounds in commercial pomegranate molasses products using matrix-solid phase dispersion extraction coupled with HPLC. *Saudi Pharm. J.*, **26**, 839-844.
- Karabiberoğlu, Ş.U. and Dursun, Z. (2018). Fabrication of nickel coated graphene oxide composite electrode for sensitive determination of Rutin. *J. Electroanal. Chem.*, **815**, 76–85.
- Karimi, E., Oskoueian, E., Hendra, R. and Jaafar, H.Z.E. (2010). Evaluation of crocus sativus l. Stigma phenolic and flavonoid compounds and its antioxidant activity. *Molecules*, **15**, 6244-6256.
- Kicel, A., Owczarek, A., Michel, P., Wozniak, K.S., Kiss, A.K. and Olszewska, M.A. (2015). Application of HPLC, UHPLC-PDA-ESI-MS and HPLC-PDA methods for rapid, one-step preparative separation and quantification of rutin in Forsythia flowers. *Ind. Crop Prod.*, **76**, 86–94.
- Lamuela-Raventós, R.M., Vallverdú-Queralt, A., Jáuregui, O., Martínez-Huélamo, M. and Quifer-Rada, P. (2014). (Polyphenols in plants) Chapter 14-Improved characterization of polyphenols using liquid chromatography. *Academic Press*, 261-292.
- Li, J., He, X., Li, M., Zhao, W., Liu, L. and Kong, X. (2015). Chemical fingerprint and quantitative analysis for quality control of polyphenols extracted from pomegranate peel by HPLC. *Food Chem.*, **176**, 7-11.
- Lin, D., Xiao, M., Zhao, J., Li, Z., Xing, M., Li, X., Kong, M., Li, L., Zhang, Q., Liu, Y., Chen, H., Qin, W., Wu, H. and Chen, S. (2016). Review An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. *Molecules*, **21**, 1374.
- Lorrain, B., Ky, I., Pechamat, L. and Teissedre, P.L. (2013). Evolution of analysis of polyphenols from grapes, wines, and extracts. *Molecules*, **18**(1), 1076-1100.
- Marvin, C. and McMaster. (2007). HPLC A Practical User's Guide. (2. baskı). New Jersey: John Wiley&Sons, Inc.
- Mesquita, E. and Monteiro, M. (2018). Simultaneous HPLC determination of flavonoids and phenolic acids profile in Pêra-Rio orange juice. *Food Res. Int.*, **106**, 54-63.

- Młynarczyk, K., Tomczak, D.W. and Łysiak, G.P. (2018). Bioactive properties of *Sambucus nigra* L. as a functional ingredient for food and pharmaceutical industry. *J. Func. Foods.*, **40**, 377-390.
- Motilva, M.J., Serra, A. and Macià, A. (2013). Review Analysis of food polyphenols by ultra high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry: An overview. *J. Chromatogr. A.*, **1292**, 66–82.
- Nour, V., Trandafir, I. and Cosmulescu, S. (2013). HPLC determination of phenolic acids, flavonoids and juglone in walnut leaves. HPLC determination of phenolic acids, flavonoids and juglone in walnut leaves. *J. Chromatogr. Sci.*, **51(9)**, 883–890.
- Olejnik, A., Olkiewicz, M., Kowalska, K., Rychlik, J., ski, R.D., Myszka, K., Juzwa, W., Białas, W. and Moyer, M.P. (2016). Gastrointestinal digested *Sambucus nigra* L. fruit extract protects in vitro cultured human colon cells against oxidative stress. *Food Chem.*, **197**, 648-657.
- Öztürk, N., Tunçel, M. ve Tunçel, N.B. (2007). Determination of phenolic acids by a modified HPLC: Its application to various plant materials. *J Liq. Chrom. Relat. Tech.*, **30**, 587-596
- Pandey, K.B. and Rizvi, S.I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2(5)**, 270-278.
- Pereira, D.M.,Valentão, P., Pereira, J.A. and Andrade, P.B. (2009). Phenolics from chemistry to biology. *Molecules.*, **14**, 2202-2211.
- Plaza, M., Domínguez-Rodríguez, G., Castro-Puyana, M. and Marina, M.L. (2018). Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications. *PP.*, 177-232.
- Ranade, A.N., Ranpise, N.S. and Ramesh, C. (2015). To investigate the pharmacokinetic profile of ellagic acid in presence of Aloe vera gel powder in rabbits using validated HPLC method. *Synergy.*, **2**, 25–30.
- Ratnam, D.V., Bhardwaj, V. and Kumar, M.N.V.R. (2006). Simultaneous analysis of ellagic acid and coenzyme Q10 by derivative spectroscopy and HPLC. *Talanta.*, **70**, 387–391.
- Rebecca J. and Robbins. (2009). Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 2866–2887.

- Ribeiro, A.M., Estevinho, B.N. and Rocha, F. (2019). Microencapsulation of polyphenols - the specific case of the microencapsulation of *Sambucus Nigra* L. extracts - A review. *Trends Food Sci. Technol.*, 18, 2244-30139.
- Robbins, R.J. (2003). Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *J. Agric. Food Chem.*, **51**(10), 2866-2887.
- Rodríguez, G.D., Marina, M.L. and Plaza, M. (2017). Review article; Strategies for the extraction and analysis of non-extractable polyphenols from plants. *J. Chromatogr. A.*, **1514**(8), 1-15.
- Romani, A., Minunni, M., Mulinacci, N., Pinelli, P. and Vincieri, F.F. (2000). Comparison among differential pulse voltammetry, amperometric biosensor, and HPLC/DAD analysis for polyphenol determination. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 1197–1203.
- Safdar, M.N., Kausar, T., Jabbar, S., Mumtaz, A., Ahad, K. and Saddozai, A.A. (2017). Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulata* L.) peel using ultrasound and maceration techniques. *J Food Drug Anal.*, **25**, 488-500.
- Sandoval-Riofrio, M.A. (2017). Extraction of phorbol esters (PEs) from pinion cake using computationally-designed polymers as adsorbents for solid phase extraction. University of Leicester, Birleşik Krallık.
- Settle, F. (1997). Handbook of instrumental techniques for Analytical Chemistry. New Jersey: Prentice Hall PTR.
- Sghaiera, M.B., Pagano, A., Mousslim, M., Ammaria, Y., Kovacic, H. and Luis, J. (2016). Rutin inhibits proliferation, attenuates superoxide production and decreases adhesion and migration of human cancerous cells. *Biomed. Pharmacother.*, **84**, 1972–1978.
- Simirgiotis, M.J., Bórquez, J. and Hirschmann, G.S. (2013). Antioxidant capacity, polyphenolic content and tandem HPLC–DAD–ESI/MS profiling of phenolic compounds from the South American berries *Luma apiculata* and *L. Chequén*. *Food Chem.*, **139**, 289–299.
- Skoog, D.A., Holler, F.J. and Nieman. (1998). *T.A. Principles of Instrumental Analysis*. (5. baskı). ABD.

- Spínola, V., Pinto, J., Martínez, E.L. and Castilho, P. (2019). Changes in the phenolic compositions of *Elaeagnus umbellata* and *Sambucus lanceolata* after in vitro gastrointestinal digestion and evaluation of their potential anti-diabetic properties. *Food Res. Int.*, **122**, 283–294.
- Szmagara, A., Krzyszczyk, A., Sadok, I., Karczmarz, K., Staniszevska, M.M. and Stefaniak, E.A. (2019). Determination of ellagic acid in rose matrix by spectrofluorimetry. *J. Food Compos. Anal.*, **78**, 91–100.
- Thomas, G.P. (2019). High performance liquid chromatography (HPLC)—methods, benefits and applications. *Azom.*, 8468.
- Tsao, R. (2010). Review chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, **2**, 1231-1246.
- Uwe, D.N. (1997). *HPLC Columns theory*, technology and practice: New York: ABD.
- Verotta, L., Panzella, L., Antenucci, S., Calvenzani, V., Tomay, F., Petroni, K., Caneva, E. and Napolitano, A. (2018). Fermented pomegranate wastes as sustainable source of ellagic acid: Antioxidant properties, anti-inflammatory action, and controlled release under simulated digestion conditions. *Food Chem.*, **246**, 129-136.
- Villalba, R.G., Espín, J.C. and Barberán, T. (2016). Chromatographic and spectroscopic characterization of urolithins for their determination in biological samples after the intake of foods containing ellagitannins and ellagic acid. *J. Chromatogr. A*, **1428**, 162–175.
- Vu, H.T.H., Hook, S.M., Siqueira, S.D., Müllertz, A., Rades, T. and McDowell, A. (2018). Are phytosomes a superior nanodelivery system or the antioxidant rutin?. *Inter. J. Pharm.*, **548**(1), 82-91.
- Wang, S.T., Chou, C.T. and Su, W.N. (2017). A food-grade self-nanoemulsifying delivery system for enhancing oral bioavailability of ellagic acid. *J. Funct. Foods.*, **34**, 207–215.
- Weston, A. and Brown, P.R. (1997). *HPLC and CE principles and practice*. San Diego: W.B. Saunders Company.
- Yıldırım, S., Kadioğlu, A., Sağlam, A. and Yaşar, A. (2017). Determination of phenolic acids and rutin in *Heliotropium thermophilum* by high-performance liquid

chromatography with photodiode array detection. *Instrum. Sci. Technol.*, **45(1)**, 35–48.

Zahmanov, G., Alipieva, K., Denev, P., Todorovc, D., Hinkov, A., Shishkov, S., Simova, S. and Georgiev, M.I. (2015). Flavonoid glycosides profiling in dwarf elder fruits (*Sambucus ebulus* L.) and evaluation of their antioxidant and anti-herpes simplex activities. *Ind. Crop. Prod.*, **63**, 58–64.

Zhao, Y., Wang, Y., Jiang, Zi-Tao. and Li, R. (2017). Screening and evaluation of active compounds in polyphenol mixtures by HPLC coupled with chemical methodology and its application. *Food Chem.*, **227**, 187–193.

Żwir-Ferenc, A. and Biziuk, M. (2006). Solid phase extraction technique–trends, opportunities and applications. *Polish J. Environ. Stud.*, **15(5)** 677-690.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hafsah QABA
Yabancı Dil : İngilizce
Doğum Yeri ve Yılı : Hodaidah/Yemen, 1991
E-Posta : hafsah.qaba@gmail.com

Eğitim ve Mesleki Geçmişi:

- 2019, Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Fen Bilimleri enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı
- 2014, Sana Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü