

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ * FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜRKİYE'DE BULUNAN BAZI ÇAM AĞAÇLARININ KABUKLARINDA PİKNOGENOL
TAYİNİ**

DOKTORA TEZİ

Mehmet Emin ŞEKER

Anabilim Dalı : Kimya Bölümü

Programı : Analitik Kimya

MANİSA 2014

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ * FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜRKİYE'DE BULUNAN BAZI ÇAM AĞAÇLARININ KABUKLARINDA PİKNOGENOL
TAYİNİ**

DOKTORA TEZİ

Mehmet Emin ŞEKER

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 01-4-2014

Tezin Savunulduğu Tarih : 17-4-2014

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ali ÇELİK
Diğer Jüri Üyeleri : Prof.Dr. Emür HENDEN (E.Ü.)
: Prof.Dr. Kenan DOST (C.B.Ü.)
: Doç. Dr. Nur Erdem AKSUNER (E.Ü.)
: Yrd. Doç. Pelin Günc ERGÖNÜL (C.B.Ü.)

MANİSA 2014

İÇİNDEKİLER

KISALTMA LİSTESİ	v
ŞEKİL LİSTESİ	vi
TABLO LİSTESİ	xii
TEŞEKKÜR	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Piknogenolün Kısa Tarihi	1
1.2. Fenolik Bileşikler, Proantosiyanidinler ve Prosiyanidinler	4
1.2.1. Fenolik Asitler	5
1.2.2. Flavonoidler	6
1.3. Çam Kabuğu Ekstraktı ve Piknogenol	11
1.4. Piknogenol Tayininde Kullanılan Yöntemler	13
2. KROMATOĞRAFİK METOTLARA GİRİŞ.....	19
2.1. Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması	19
2.2. Kromatografinin Uygulamaları	21
2.2.1. Nitel Analiz	21
2.2.2. Nicel Analiz	22
2.3. Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC)	23
2.3.1. HPLC Kullanırken Alınması Gereken Önlemler	24
2.3.1.1. Hareketli Faz Çözücüleri İçin Önlemler.....	24
2.3.1.2. Kolon Kullanımı İçin Önlemler.....	25
2.3.1.3. Örnek Hazırlanması	25
2.3.1.4. Dedeksiyon Sisteminin Korunması	26
3. MATERYAL VE METOT	27
3.1. Amaç	27

3.2. Yöntem	27
3.3. Kullanılan Cihazlar	27
3.4. Materyal	28
3.5. Kullanılan Kimyasallar	29
3.6. Prosedür	29
3.6.1. Materyalin Hazırlanması	29
3.6.2. Standartların Hazırlanması	29
3.6.3. Örneklerin Ekstraksiyonu	30
3.6.4. Örneklerin Analizi	32
4. SONUÇLAR	32
4.1. Piknogenol Tayini	32
4.1.1. Optimizasyon Çalışmaları	33
4.2. Kalibrasyon Grafikleri	53
4.3. Kara çam kabuğu ekstraktının analizi ve miktarları	56
4.4. Fıstık çam kabuğu ekstraktının analizi ve miktarları	60
4.5. Sarı çam kabuğunda bulunan piknogenol bileşenleri ve miktarları	62
4.6. Kızıl çam kabuğu ekstraktında bulunan piknogenol bileşenleri ve miktarları	66
4.7. Halep çam kabuğu ekstraktında bulunan piknogenol bileşenleri ve miktarları	72
4.8. LC-MS Analizleri	75
5. TARTIŞMA	89
KAYNAKLAR	93

KISALTMA LİSTESİ

dak	: Dakika
LC–MS	: Sıvı kromatografisi – kütle spektrometrisi
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
LC	: Sıvı (liquid) kromatografisi
mL	: Mililitre
RDS	: Bağıl standart sapma
SD	: Standart sapma
UV-VIS	: Ultraviyole görünür bölge moleküler absorpsiyon spektroskopisi
µL	: Mikrolitre
Mg	: miligram
mL	: mililitre
µg	: mikrogram
C	: Kateşin
EC	: Epikateşin
EGC	: Epigallokateşin
ECG	: Epikateşingallat
GC	:Gallik asit
GCG	: Gallokateşingallat
EGCG	: Epigallokateşingallat
nm	: nanometre
PBE	: Pine Bark Ekstract (Çam kabuğu ekstraktı)
OFA	: Orto Fosforik Asit
m/z	: kütle/yük
PPO	: polifenoloksidaz enzimleri
h	: hacim

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1 Fransız deniz çam ormanlarına ait bir fotoğraf	3
Şekil 1.2 Bazı proantosiyanidinlerin yapıları	4
Şekil 1.3 Bazı fenolik asitlerin yapıları	5
Şekil 1.4 Flavonoidlerin çeşitleri	7
Şekil 1.5 Flavanollerin genel yapısı	7
Şekil 1.6 Proantosiyanidinlerde bulunan monomerlerin sistematik numaralandırılması	8
Şekil 1.7 Kateşinlerin genel yapısı	8
Şekil 1.8 Prosiyanidinlerin monomer yapıları	9
Şekil 1.9 Bazı Prosiyaninlerin yapısı	11
Şekil 1.10 Toz haline getirilmiş piknogenolün görüntüsü	12
Şekil 1.11 Ticari çam kabuğu ekstraktına ait normal faz HPLC kromatogramı	14
Şekil 1.12 Piknogenolü oluşturan ana maddeler olan Kateşin, kafeik asit, Ferrulik asit ve Taksifolinin (1) Su/Metanol, (2) Su/Asetonitril içeren mobil faz ile alınmış kromatogramları	16
Şeki 1.13 Çam kabuğu (1) Ekstraktı Standardı ve (2) örneğe ait kromatogramlar.	16
Şekil 3.1 Çam kabukları	28
Şekil 3.2 Toz haline getirilmiş çam kabukları ve kaynar suyla ekstraksiyon	30
Şekil 3.3 Ekstrakte edilen çam kabuklarının süzülmesi	30
Şekil 3.4 Etil asetat ekstraksiyonu	31
Şekil 3.5 Etil asetat fazın argon gazı ile ve vakum altında uçurulması	31
Şekil 4.1 Solgar firmasından alınan PBE'nin su/metanol/OFA (79.9/20/0.1) mobil faz şartlarına ait kromatogramı.	33
Şekil 4.2 Solgar PBE analizi için 20.05/79.9/0.05 -- su/metanol/OFA şartlarına ait kromatogram	34
Şekil 4.3 Solgar PBE analizi için 20.08/79.9/0.02 -- su/metanol/OFA şartlarına ait kromatogram	34

Şekil 4.4 Solgar PBE ekstraksiyonunun saf metanolde çözülmesi sonucu elde edilen kromatogram.	35
Şekil 4.5 Saf metanolde çözülmüş GNC firmasından temin edilen çam kabuğu ekstraktına ait kromatogram.....	36
Şekil 4.6 Karaçam kabuğu ekstraktı, 10/89.9/0.1 -- su/metanol/OFA-- şartlarına ait kromatogram.	37
Şekil 4.7 210 nm'de kateşin standardı için ard arda 2 kez enjeksiyon yapılmıştır. Kateşinine (10/89.9/0.1 --- su/metanol/OFA) ait kromatogram.	37
Şekil 4.8 Kateşin, epikateşin, epikateşingallat, ferrulik asit ve taksifolin için UV'de yapılan maksimum dalga boyu taraması.....	38
Şekil 4.9 Piknogenol bileşenlerinin standart çözeltisinin 280 nm'de kromatogramı. Mobil faz olarak 250 mL içinde 0.1 mL OFA içeren %32'lik metanol-su karışımında; (1-Gallik Asit, 2-Kateşin,3-EpiGalloKateşin Gallat, 4-Vanilik Asit, 5-Kafeik Asit).	39
Şekil 4.10 280 nm'de, mobil faz olarak 250 mL içinde 0.1 mL OFA içeren %30'lik metanol-su karışımında; (1-Gallic Acid, 2-Catechin, 3-EpiGalloCatechinGallate, 4-Vanilic A., 5-Caffeic A., 6-Ferulic A.)	40
Şekil 4.11 %0.1 OFA içeren %68 su- %32 metanol fazı ile başlanan gradient elüsyonda, Piknogenol standart çözeltilerinin karışımına ait kromatogram; 1-Gallic Acid, 2-Catechin, 3-EpiGalloCatechinGallate, 4-Vanilic A., 5-Caffeic A., 6-Ferulic A.	41
Şekil 4.12 Piknogenol standart çözeltilerinin karışımına ait kromatogram. 1-Gallic Acid, 2-Catechin, 3-EpiGalloCatechinGallate, 4-Vanilic A., 5-Caffeic A., 6-Ferulic A.	41
Şekil 4.13 Piknogenol standart çözeltilerinin karışımına ait kromatogram. 1-Gallik. A., 2- Kateşin, 3- Epikateşin, 4- E.P.C.G., 5- Vanilik A., 6- Kafeik A., 7- Ferulik A., 8- Taxifolin, 9- Epi.Cat. Gal	42
Şekil 4.14 Karaçam kabuğu ekstraktına ait kromatogram.....	43
Şekil 4.15 Karaçam Kabuğu Ekstraktına ait kromatogram.....	44
Şekil 4. 16 Karaçam kabuğu ekstraktına ait kromatogram.....	45
Şekil 4.17 Karaçam Kabuğu Ekstraktına ait kromatogram.....	46
Şekil 4.18 Kızılçam Kabuğu Ekstraktına ait kromatogram.	47

Şekil 4.19 Ekstraksiyon sonrası saf metanolde çözülmüş Karaçam kabuğu ekstraktına ait kromatogram.	48
Şekil 4.20 Karaçam kabuğu ekstraktına ait kromatogram.....	49
Şekil 4.21 Argon gazı altında etil asetat fazın uçurulmasına ve piknogenol bileşenlerinin toplanmasına ilişkin düzenek.	50
Şekil 4.22 Evaporatör kullanılmadan havasız ortamda, etil asetat uçurularak kurutulan karaçam kabuğu ekstraktına ait kromatogram.....	50
Şekil 4.23 Piknogenol bileşenlerine ait standartlar. 2-Catechin, 5-Epicatechin, 6-Ferulic Acid, 7-Taxifolin.....	51
Şekil 4.24 %25 metanol -su içinde çözülen ve su-metanol-asetonitril hareketli faz sistemi kullanıldığında; 1 kateşin, 2-epikateşin, 3-ferulik asit, 4-taksifolin karışımına ait kromatogram.	52
Şekil 4.25 Hareketli faz bileşimi ve gradient elüsyon çalışma şartları.....	53
Şekil 4.26 Kateşine ait kalibrasyon grafiği.....	54
Şekil 4.27 Epikateşine ait kalibrasyon grafiği	54
Şekil 4.28 Epikateşingallata ait kalibrasyon grafiği.....	55
Şekil 4.29 Ferrulik asite ait kalibrasyon grafiği	55
Şekil 4.30 Taksifoline ait kalibrasyon grafiği.....	56
Şekil 4.31 Kara çam kabuğu ekstraktına ilişkin kromatogram.....	56
Şekil 4.32 Kara çam kabuğu ekstraktına kateşin, epikateşin ve ferrulik asit standartlarının eklenmesiyle elde edilen kromatogram.....	57
Şekil 4.33 Karaçam kabuğu ekstraktına kateşin, epikateşin, ferrulik asit ve taksifolin eklenmesiyle elde edilen kromatogram.....	58
Şekil 4.34 Kara çam kabuğu ekstraktında bulunan piknogenol bileşenleri.	59
Şekil 4.35 Fıstık çam kabuğu ekstraktına ait kromatogram.....	60
Şekil 4.36 Fıstık çam kabuğuna kateşin, epikateşin ve taksifolin eklenmesine ilişkin kromatogram. 1-kateşin, 2- epikateşin, 3- taksifolin.....	61
Şekil 4.37 Fıstık çam kabuğunda bulunan piknogenol bileşenlerine ait kromatogram.	61
Şekil 4.38 Sarı çam kabuğu ekstraktına ait kromatogram.....	62

Şekil 4.39 Sarı çam kabuğu ekstraktına kateşin, epikateşin ve kefein eklenmesiyle elde edilen kromatogram.....	63
Şekil 4. 40 Sarı çam kabuğu ekstraktına epigallokateşin ve kafeik asit eklenerek elde edilen kromatogram.....	64
Şekil 4. 41 Sarı çam kabuğu ekstraktına taksifolin eklenmesiyle elde edilen kromatogram.	64
Şekil 4.42 Sarı çam kabuğunda bulunan piknogenol bileşenleri	65
Şekil 4.43 Kızıl çam kabuğu ekstraktına ait kromatogram.	66
Şekil 4.44 Kızıl çam kabuğu ekstraktına epikateşin katılmasına ilişkin kromatogram.	67
Şekil 4.45 Kızıl çam kabuğuna kateşin katılmasıyla elde edilen kromatogram.	68
Şekil 4.46 Yaklaşık yüz kat seyreltilmiş kızıl çam kabuğu ekstraktı	69
Şekil 4.47 Seyreltilmiş kızıl çam kabuğu ekstraktına ferrulik asit standardı eklenerek elde kromatogram.	69
Şekil 4.48 Seyreltik kızıl çam kabuğu ekstraktına ferrulik asit ve taksifolin eklenmesiyle elde edilen kromatogram.....	70
Şekil 4.49 Seyreltilmiş kızıl çam kabuğu ekstraksiyonuna ait kromatogram.....	71
Şekil 4.50 Halep çam kabuğu ekstraksiyonuna ilişkin kromatogram.	72
Şekil 4.51 Halep çam kabuğu ekstraktına kateşin, epikateşin ve taksifolin standartları katılarak elde edilen kromatogram.....	73
Şekil 4.52 Halep çam kabuğuna ait kromatogram.....	74
Şekil 4.53 Kateşinin LC-MS analizi.....	76
Şekil 4.54 Epikateşinin LC-MS analizi	77
Şekil 4.55 Epikateşin Gallatın LC-MS analizi	78
Şekil 4.56 Ferrulik asidin LC-MS analizi	79
Şekil 4.57 Taksifolinin LC-MS analizi	80
Şekil 4.58 Yukarıdan aşağıya sırasıyla; kateşin ve epikateşin, taksifolin, ferrulik asit ve epikateşin gallatın açık yapıları verilmiştir.....	81
Şekil 4.59 Kateşin, epikateşin, epikateşingallat, ferrulik asit ve taksifolin karışımının LC-MS ile analizine ilişkin sonuçlar.....	82
Şekil 4.60 Kara çam kabuğu ekstraktının LC-MS ile analizine ilişkin sonuçlar.	83

Şekil 4.61 Kızıl çam kabuğu ekstraktının LC-MS ile analizine ilişkin sonuçlar.....	84
Şekil 4.62 Halep çam kabuğu ekstraktının LC-MS ile analizine ilişkin sonuçlar.	85
Şekil 4.63 Fıstık çam kabuğu ekstraktının LC-MS ile analizine ilişkin sonuçlar.	86
Şekil 4.64 Sarı çam kabuğu ekstraktının LC-MS ile analizine ilişkin sonuçlar.	87
Şekil 4.65 LC-MS analizine ait kromatogram.	88

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1 En yaygın proantosiyandinlerin içerdği fonksiyonel gruplara göre adlandırılması.....	9
Tablo 1.2 Prosiyanidinlerin adlandırılması.....	10
Tablo 1.3 Ticari çam kabuğu ekstraktlarındaki polifenollerin normal faz kullanılarak elde edilen miktarlar	15
Tablo 1.4 Çeşitli çay örneklerinde bulunan kateşin, kafein ve gallik asit miktarları.....	17
Tablo 1.5 Piknogenol Ekstraktında Bulunan Madde Miktarları	18
Tablo 1. 6 Farklı tür çam ağaçları kabuklarında bulunan Madde Miktarları	18
Tablo 2. 1 Düzlemsel kromatografinin sınıflandırılması	20
Tablo 2. 2 Kolon kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması	21
Tablo 4.1 Karaçam kabuğunda bulunan piknogenol bileşenlerinin miktarları	59
Tablo 4.2 Fıstık çam kabuğunda bulunan piknogenol bileşenleri.	62
Tablo 4.3 Sarıçam kabuğunda bulunan piknogenol bileşenleri ve miktarları.....	66
Tablo 4.4 Kızılçam kabuğunda bulunan piknogenol bileşenleri.	71
Tablo 4.5 Halep çam kabuğunda bulunan piknogenol bileşenleri.....	74
Tablo 4.6 Standartlara ilişkin geri kazanım sonuçları.....	75
Tablo 4.7 LC-MS'de kullanılan gradient elüsyon yöntemi	75
Tablo 5.1 Farklı tür çam ağaçları kabuklarında bulunan piknogenol bileşenleri ve miktarları.....	89
Tablo 5.2 Türkiye ve Almanya'dan toplanan bazı çam ağacı kabuklarındaki piknogenol bileşenlerine ait miktarlar	90

TEŞEKKÜR

Tüm eğitim öğretim hayatım boyunca her zaman yanımda olan, daha da önemlisi beni bu günlere getiren, maddi ve manevi her türlü desteğini eksik etmeyen annem Mukadder ŞEKER'e, babam Kadir ŞEKER'e, meslektaşım olan ve her konuda yardımını aldığım, kardeşim Dr. Ayşegül ERDOĞAN'a en içten teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım. Üniversite eğitimim için benden hiçbir desteği esirgemeyen ve buralara gelmemde çok büyük katkıları olan rahmetli dedem Latif Fuat ÖZTÜRK ve sevgili anneannem Kevser ÖZTÜRK'e de sonsuz teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmam boyunca bana her konuda destek veren, karşılaşılan bütün problemlerle tek tek ilgilenen, değerli bilgi ve yorumları ile bana yol gösteren çok sevgili ve saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Ali ÇELİK'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam sırasında bana bilgilerini sunarak yol gösteren sayın hocam Prof. Dr. Kenan DOST'a ve tez izleme komitesinde bulunarak çalışmamıza katkıda bulunan sayın hocam Prof. Dr. Emür HENDEN'e katkılarından dolayı teşekkürü bir borç bilirim.

Deneyler için bize gerekli kimyasal ve laboratuvar materyalini temin eden BAP (Bilimsel Araştırma Projeleri) komisyonu üyelerine FBE 2010 / 080 numaralı projemizi desteklerikleri için teşekkürü borç biliriz.

Çalışmalarımız için bize gerekli numune materyali sağlayan Bursa Bölge Orman Müdürlüğünden sayın Öztürk Alacan, sayın İhsan Aydemir ve Sayın Serdar Akçaman'a katkılarından dolayı teşekkürü borç bilirim.

Benden hiçbir zaman yardımını esirgemeyen, her konuda destek olan sevgili arkadaşım Dr. Emriye Ay'a, anorganik laboratuvarında yaptığımız çalışmalarda bize destek veren sayın hocam Doç. Dr. Funda Demirhan, bu çalışmalarda bana zamanlarını ayırarak yardımcı olan değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Pelin Sözen Aktaş, Arş. Gör. Hülya Avcı Özbek, Arş. Gör. Gözde Murat Saltan, Arş. Gör. Mustafa Cittan ve Arş. Gör. Mertcan Öksüz'e teşekkürlerimi sunarım.

Bu zamana kadar bana katkıları olan, bilgilerini ve yorumlarını sunan tüm hocalarıma da teşekkür ederim.

ÖZET

Çam ağaçlarının kabukları çok eski zamanlardan beri ilaç, şurup, ödem giderici ve benzer birçok nedenle kaynatılıp içilmekte ya da yaralara sürülmektedir. Eski insanlardan kalma tecrübeye dayanan bu bilgiler çağımızda bilimin gelişmesiyle incelenmeye ve doğrulanmaya başlanmıştır. Bilim insanları çam kabuklarının ekstraksiyonuyla elde edilen bu karışımı piknogenol olarak adlandırmışlardır. Piknogenol birçok bileşenden oluşan (proantosiyanidinler, flavanoidler vb.) bir karışımdır. E vitaminine göre 50 kat, C vitaminine göre 30 kat daha kuvvetli antioksidan özelliği gösterdiği bilinmektedir. Piknogenol, Frana'da deniz kenarında yetişen kara çam türüne ait ağaçların kabuklarından elde edilmekte ve ticari olarak satılmaktadır. Bu çalışmada Türkiye'de bulunan bazı çam ağacı kabuklarında bir kısım piknogenol bileşenlerinin nitel ve nicel tayini 280 nm dalga boyunda UV dedektör içeren HPLC ile yapılmış ve bileşenlerin elüsyonunda gradient pompa kullanılmıştır. Önce yöntemi optimize etmek amacıyla ticari olarak satın alınan çam kabuğu ekstraktları kullanılmıştır. Daha sonra standartlar ve toplanan örnekler kullanılarak örneklerin nicel ve nitel analizleri yapılmıştır.

Çalışmada Manisa, Bilecik ve Adana bölgelerinden toplanan beş farklı tür çam kabuğu kullanılmıştır. Ekstraksiyon işlemi başlangıçta literatürde önerildiği şekilde yapılmıştır. Ancak etilasetat fazın uzaklaştırılması sırasında piknogenol bileşenlerinde oksitlenme gözlemlenmiştir. Bu nedenle etilasetat giderme adımı argon gazı altında vakumda yapılmıştır. Ekstraksiyon amacıyla toz haline getirilen çam kabuklarından 20 g tartılır, üzerine 150 mL kaynar su ilave edilerek ekstrakte edilir. Oda sıcaklığına kadar soğumaya bırakılan ekstrakt süzülerek kabuklardan ayrıldıktan sonra doygunluğa kadar üzerine tuz eklenir ve tekrar süzülür. Süzüntü alınarak etil asetat ile ekstrakte edilir ve ekstrakt etil asetat fazda toplanır. Kalan suyu uzaklaştırmak amacıyla etil asetat faza sodyum sülfat eklenir. Sodyum sülfat süzülerek uzaklaştırıldıktan sonra kalan etil asetat havasız ortamda argon gazı ile vakum altında uçurulur. Elde edilen bej renkli katı kısım 25 mL %25 (h/h) metanol içeren suda çözüldükten sonra cihaza enjekte edilmiştir.

Analizi yapılan piknogenol bileşenlerine ait standartlar için hareketli faz bileşimi ve akış hızı optimize edildikten sonra örnekler analizlenmiştir. Hareketli faz olarak % 0.1 orto fosforik asit içeren su, % 0.1 orto fosforik asit içeren metanol ve % 0.1 orto fosforik asit içeren asetonitril üçlü elüsyon sistemi kullanılmıştır. Akış hızı 1 mL/dak. olarak ayarlanmış ve gradient elüsyon sistemi kullanılmıştır. Analizlenen çam kabuklarında (karaçam, kızılçam, sarıçam, fıstıkçamı, halepçamı) piknogenol bileşenlerinden kateşin, epikateşin, epikateşingallat, ferrulik asit ve taksifolinin nitel ve nicel tayinleri yapılmıştır. Çam ağaçlarının türlerine göre bulunan piknogenol bileşenleri; karaçamda 0.209 mg/g taksifolin, 0.086 mg/g kateşin, 0.076 mg/g epikateşin, 0.022 mg/g ferrulik asit; kızılçamda 23.16 mg/g taksifolin, 1.454 mg/g kateşin, 0.027 mg/g epikateşin; fıstık çamında 1.923 mg/g kateşin, 1.801 taksifolin; sarı çamda 0.066 mg/g epikateşin, 0.065 mg/g kateşin, 0.025 epikateşingallat, 0.015 taksifolin, 0.010 ferrulik asit; halepçamda 0.219mg/g taksifolin, 0.093 kateşin, 0.046 epikateşin olarak bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: HPLC, piknogenol, proantosiyanidin, çam kabuğu, kateşinler.

ABSTRACT

Pine barks have been used since ancient times as medicine, syrup, edema reliever and etc. and due to these reasons they are drunk after boiling or applied for wounds. Old people knew this based on their experiences and this information was known and verified by the development of science in our era. Finally, scientists have named this mixture extracted from pine barks as pycnogenol. Pycnogenol is a mixture composed of many constituents like proanthocyanidins, flavonoids and etc. It has been known to have antioxidant properties of 50 times more potent than Vitamin C and 30 times more potent than Vitamin E when compared. Pycnogenol is obtained from *Pinus nigra* in France near the seaside and is commercially available.

In this study, pycnogenol components of different types of pine barks collected from Manisa, Bilecik and Adana regions were analyzed qualitatively and quantitatively after the optimization of gradient HPLC method. At first, the extraction procedure was performed according to the studies in literature. However, oxidation of pycnogenol components were observed during the removal of ethyl acetate phase. For this reason, removal of ethyl acetate step was realized under vacuum using argon gas. The collected pine bark samples were thoroughly grounded, 20 g of pine bark was weighed and then it was extracted in 150 mL of hot water. The sample was filtrated to remove the barks after cooling to room temperature. After, salt was added until saturation and it was re-filtrated. Then, the filtrate was extracted with ethyl acetate and this phase was collected. Sodium sulfate was added to this ethyl acetate phase in order to remove the remaining water. Later, sodium sulphate was also filtered and the ethyl acetate was removed by argon with vacuum. The solid residue which was off-white was dissolved in 25 mL of 25% methanol-water (v/v) mixture. Afterwards, the solution was injected to the instrument.

The samples were analyzed only after the optimization of mobile phase composition. As the mobile phase composition, water, methanol and acetonitrile were used each containing 0.1% ortho-phosphoric acid. The flow rate was adjusted to 1 mL/min. and gradient elution was used. The qualitative and quantitative analyses of pine barks (karaçam, kızılçam, sarıçam, fıstıkçamı, halepçamı) that contain catechin, epicatechin, epicatechingallate, ferulic acid and taxifolin have been performed. According to the types of pine barks analyzed, the pycnogenol components were found to be as: 0.209 mg/g taxifolin, 0.086 mg/g catechin, 0.076 mg/g epicatechin, 0.022 mg/g ferulic acid in karaçam; 23.16 mg/g taxifolin, 1.454 mg/g catechin, 0.027 mg/g epicatechin in kızılçam; 1.923 mg/g catechin, 1.801 mg/g taxifolin in fıstıkçamı; 0.066 mg/g epicatechin, 0.065 mg/g catechin, 0.025 mg/g epicatechingallate, 0.015 mg/g taxifolin, 0.010 ferulic acid in sarıçam; 0.219 mg/g taxifolin, 0.093 mg/g catechin, 0.046 mg/g epicatechin in halepçam.

Keywords: HPLC, pycnogenol, proanthocyanidin, pine bark, catechins.

1. GİRİŞ

1.1. Pknogenolün Kısa Tarihi

İnsanlar çok eski çağlardan beri doğanın kendilerine sunduğu olanaklarla ayakta kalmayı başarmışlardır. Bunlar içerisinde en önemlilerinden birisi bitkilerdir (Maimoona et al, 2011). Bitkiler dört bin yıldır hastalıkları önlemek ve tedavi etmek için kullanılmaktadır (Maimoona et al, 2011). Günümüzde de birçok doğal ürün bitkilerden, ağaçlardan ve çam kabuklarından elde edilmektedir (Tulp et-al. 2004). Çok sayıda fitokimyasal kaynağı olan ağaç kabukları insanlar için son derece önemli biyolojik ve fizyolojik ihtiyaçları karşılamaktadır (Maimoona et al, 2011).

Kabukların tedavi ve sağlık amaçlı kullanımı çok eski zamanlara dayanmaktadır (Chandler et al. 1979). İnsanlar böylece eski alışkanlıklarını devam ettirmiş ve günümüze kadar taşımıştır. İlk sentetik ilaçlardan biri olan aspirin doğal kaynaklı salisilik asit kadar etkili olmuştur (Forlines et al. 1992; Tulp et al, 2004). Söğüt ağacının kabuğu doğal bir askorbik asit ve polifenolik bileşik kaynağıdır (Tulp et al, 2004). Çam kabukları antik çağlarda Mısır ve Hindistan'da kullanılmıştır (Drehse,1999). Bunun kaynağı ise onların dinleriydi (Drehse, 1999). Çam kabuklarının iltihap tedavisindeki kullanımı "Tıbbın Babası" sayılan Hipokrat'a kadar dayanmaktadır (Packer et al. 1999; Kollesch et al. 1994; D. Drehse). Bunun dışında, çam kabuklarının antik çağlarda Amerika ve Avrupa'da da yaygın olarak kullanıldığı bildirilmektedir. Yemek takviyesi olarak (Eiditiz et al 1969; Lindgren, 1918, Scientific Consultative Committee of Natural Defence, 1979), çay ve şurup olarak (Fielder, 1975; Speck 1951; Wallis et al, 1955) ve tedavi amaçlı (Hoppe, 1969; Lescarbot 1911; Schmitz 1974) olmak üzere üç farklı kullanımı kaydedilmiştir. Örneğin, Amerika'da beyaz çam ağacının iç kabukları ezilip yaraların ve iltahapların üzerine lapa olarak konulmuş ve tedavi amaçlı kullanılmıştır (Chandler et al. 1979; Fielder 1975). Ayrıca, öksürük şurubunun kökeni beyaz çam ağacının kabuklarına dayanmaktadır (The Dispensatory of The United States of America 1955). Diğer taraftan, Avrupalılar çam kabuklarını ılık sirkeye emdirip diş ağrılarını geçirmek amacıyla emmişlerdir (Minner 1479; Schmitz, 1974). Fransız deniz (maritime) çam kabukları kanamaları önlemede, mesane ve böbrek semptomlarında kullanılmıştır (Dragendorff, 1898). Çam kabuklarının Hieronymus Bock tarafından; İdrar söktürücü, ishal, öksürük ve cilt tedavileri amacıyla kullanımı önerilmiştir (Hoppe, 1969).

Avrupa'da çam kabuğu çayını ilk kullanan kişi olarak kaşif Jacques Cartier ve tayfaları olarak tanıtılmaktadır (Rohdewald, 2001; Maimoona, 2011). Cartier ve tayfaları 1534 kışı boyunca çam kabuğu çayı içerek bu çayın C vitamini eksikliğinden kaynaklanan kötü bir

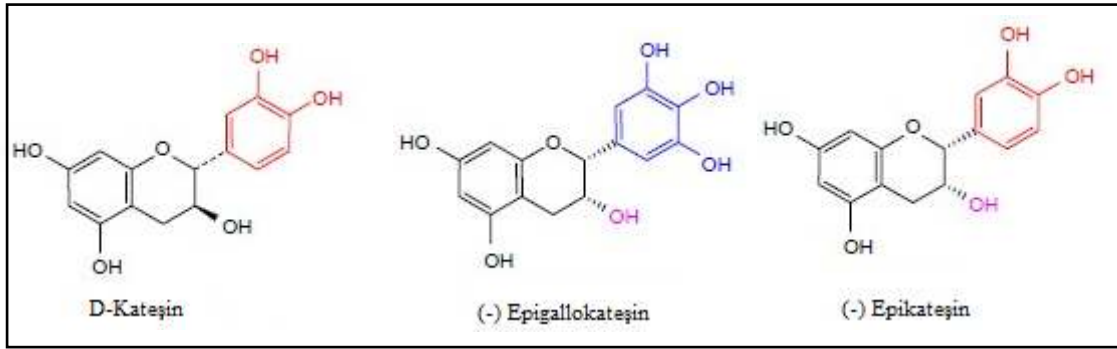
hastalığı önlemede mükemmel bir kaynak olduğunu göstermişlerdir (Rohdewald, Maimoona et al., 2011). Bu durum biyoflavonoidler üzerine çalışan Profesör Jack Masqueiler tarafından doğrulanmıştır (Maimoona et al., 2011). Masqueiler daha sonra çam kabuğu ekstraktının biyoflavonoidler ve organik asitlerce zengin bir kaynak olduğunu tespit etmiştir (Msquelier et al, 1979). 1979 yılında yayınladığı bir makalede çam kabuğu çayından oluşan karışımı 'pycnogenol' olarak adlandırmıştır. (Msquelier et al, 1979; Harborne et al. 1982.Advances in Research. Chapman and Hall, New York.) Bu kimsayallar en iyi serbest-radikal önleyicilerdir (Maimoona et al, 2004). E vitamininden 50 kat, C vitamininden 20 kat daha fazla antioksidan özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir (Passwater et al., 1994). Ultra viole ışığı absorbladığı gösterilmiştir (Guochang, 1993; Noda et al, 1997; Rong et al, 1995). İltihap önleyici özelliği farklı çalışmalarla kanıtlanmıştır (Blazso et al, 1994; Blazso et al. 1995; Blazso et al. 1997). Bu özelliğinin mekanizması hücre kültürü örnekleri ile yapılan çalışmalar sonucunda aydınlatılmıştır (Rohdewald 2002; Packer et al 1999). Doğal çam kabuğu ekstraktı; polifenoller, prosiyanidinleri, kateşin ve taksifolin gibi monomerleri, fenolik asitleri ve vanilini içermektedir (Drehse, 1999; Rohdewald, 1998, Chen et al. 2009).



Şekil 1.1 Fransız deniz çam ormanlarına ait bir fotoğraf (Drehzen G., 1999)

1.2. Fenolik Bileşikler, Proantosiyanidinler ve Prosiyanidinler

Proantosiyanidinler biyoflavonoid sınıfına ait güçlü antioksidanlardır (Rohr et al. 2000). Bunlar, piknogenol veya oligo-proantosiyanidinlere refere edilirler (Rohr et al. 2000). Bu proantosiyanidinler monomer, dimer, trimer ve oligomerlerden meydana gelebilmektedirler (Matthews et al.1997). En önemlileri kateşin, epikateşin, epigallokateşin ve epigallokateşin gallat gibi maddelerden oluşurlar (Dumon, 1990; Hemingway, et al. 1992). Yapıları, Şekil 1.2'de verilmiştir.



Şekil 1.2 Bazı proantosiyanidinlerin yapıları (Hardborne, J.B. et al. 1982)

Prosiyanidinler de polifenolik bileşikler olarak bilinen proantosiyanidinlerin bir sınıfıdır. Proantosiyanidinler renksiz bileşikler olup bitkilerde ya da odunsu yapılarda bulunurlar (Rohr et al. 2000). İsimlerini hidrolizasyon reaksiyonlarından alırlar. Asidik renkli antosiyanidinlere dönüşürler. Proantosiyanidinler karbon-karbon bağı yapmış öncül flavanoidlerden oluşurlar (Bagchi et al. 2003). Proantosiyanidinlerin zincir uzunluğu kısadır ve bunlar renksizdirler (Yanagida, 2003). Zincir uzunluğu arttıkça sarıdan kahverengiye doğru değişen bir renk alırlar (Rohr et al. 2000).

Bütün bitkiler metabolizmalarında sekonder metabolit olarak çok sayıda fenolik madde oluşturmaktadır. Bu nedenle, bitkisel kökenli bütün gıdalarda daima farklı nitelikte ve miktarda çeşitli fenolik bileşikler bulunmaktadır (G. D'Andrea, 2010).

Fenolik bileşikler meyve ve sebzelerin kendilerine özgü buruk tadını ve renklerini verirler. Bazı fenolik bileşikler ise acı tadın oluşmasında da rol almaktadırlar. Gıda bileşeni olarak fenolik bileşikler; insan sağlığı açısından işlevleri, tat ve koku oluşumundaki etkileri, renk oluşumu ve değişimine katılmaları, antimikrobiyal ve antioksidatif etki göstermeleri, enzim inhibisyonuna neden olmaları, değişik gıdalarda saflık kontrol kriteri olmaları gibi birçok açıdan önem taşımaktadırlar (Weber et al. 2007). Fenolik bileşikler, 80 monomerli bileşiklere kadar kondanse olabilirler ve proteinlerle kompleks oluşturarak tortu yaparlar (Williams et al. 1983; Ferreira, et al. 1992). Fenolik bileşiklerin bu özelliklerinden meyve suyu endüstrisinde meyve

suyunun durultulması sırasında yararlanılmaktadır (Mc Murrough et al. 1992; Mc Murrough et al. 1994).

Fenolik bileşikler gıdalarda istenilmeyen renk değişimlerine neden olurlar (Lee, 1992; Ho. C.T. 1992). Bunlar arasında en önemlisi enzimatik esmerleşme reaksiyonudur (Nozzolillo, 1984).

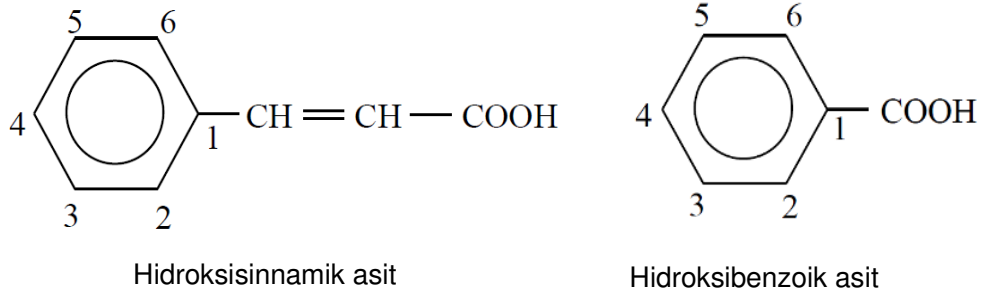
Fenolik bileşiklerin oksidasyonuna neden olan bu reaksiyonları katalize eden enzimlere genel olarak polifenoloksidaz enzimleri (PPO) adı verilmektedir (Rohr Et al. 2000).

Gıdalarda enzimatik esmerleşme, genellikle kalite kaybı olarak değerlendirilmekte ve bu nedenle meyve ve sebzelerin işlenmeleri sırasında fenolik maddelerin oksidasyonları çeşitli yöntemlerle önlenmeye çalışılmaktadır (Mc Murrough et al. 1992; Mc Murrough et al. 1994).

Son yıllarda bitkisel kökenli gıdalarda bulunan fenolik bileşiklerin yoğun bir şekilde incelenmesi, bunların insan sağlığı ile yakından ilişkisi olduğunun saptanmasından ve özellikle de kanser riskini azalttığı yönündeki epidemiyolojik bilgilerden kaynaklanmaktadır (Shahat, et al. 1996; Baldi, et al. 1997). Buna karşın, bazı çalışmalar flavonoidlerin karsinogen olduğunu savunsa da, diğer birçok çalışmada elde edilen bulgular, flavonoidlerin antitumör ve antikarsinogen olduğunu desteklemektedir. Bitkilerdeki fenolik bileşikler, fenolik asitler ve flavonoidler olmak üzere iki ana başlıkta incelenmektedir. Bunlar, küçük moleküllü ve çoğunlukla uçucu olan bileşiklerdir. Bunlardan, gıdaların yapılarında yer alan fenolik asitler ve flavonoidler önem taşımaktadır.

1.2.1. Fenolik Asitler

Fenolik asitler; hidroksisübenzoik asitler ve hidroksisübenzoik asitler olmak üzere iki grupta incelenmektedirler. Şekil 1.3'de görülen bu bileşiklere -OH ve -OCH₃ grupları bağlanarak önemli türevleri olan fenolik asitler oluşabilmektedir (Robbins, 2003). Fenolik asitler genel olarak serbest halde bulunmazlar (Croteau, et al. 2000). Karboksil grupları karbohidratlar, glikozidler, aminoasitler veya proteinlerle reaksiyona girebilirler ve alkollerle fenol esterler, amino bileşikleri ile de amidleri oluştururlar (Clifford, 1999). Fenolik asitlerin, fenol halkasına bağlı hidroksil grupları da çok aktif olup, şekerlerle birleşerek glikozitleri oluştururlar (Klick, 1988; Winter, M.; 1986).

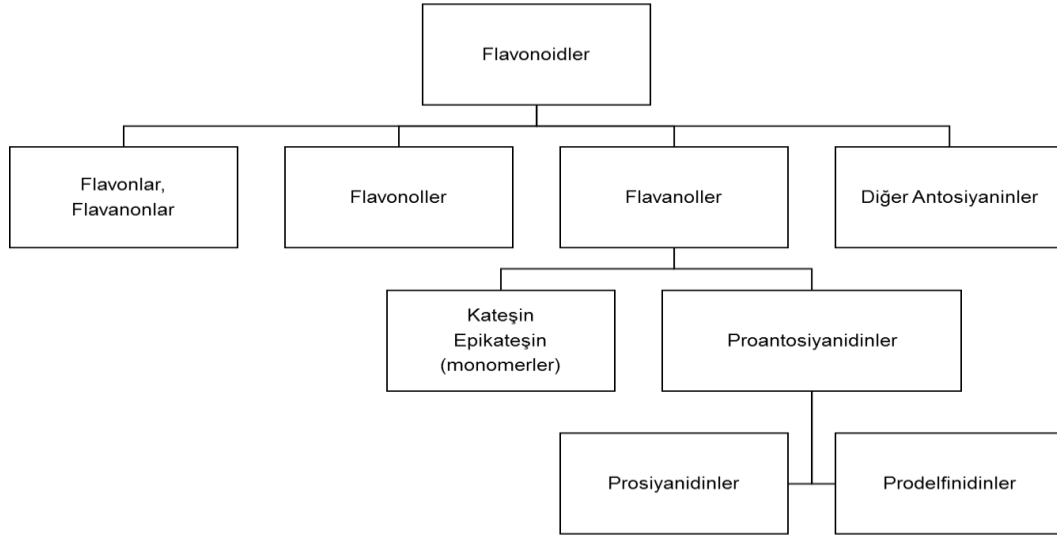


Şekil 1.3 Bazı fenolik asitlerin yapıları

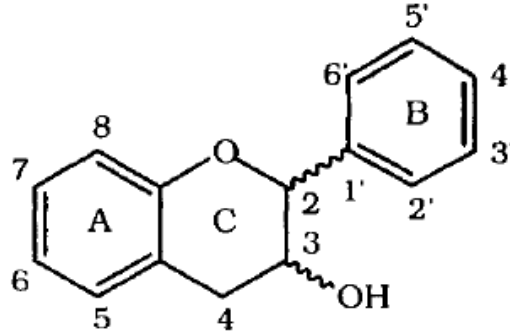
1.2.2. Flavonoidler (Flavan türevleri)

Flavonoidler C₆–C₃–C₆ difenilpropan yapısında olup fenil grupları arasındaki üçlü karbon köprüsü, oksijenle halka (flavan halkası) oluşturmaktadırlar. (Borges, et al. 2001). Değişik flavonoidler arasındaki farklar; bağlanan hidroksil gruplarının sayısından, doymamışlık derecesinden ve üçlü karbon segmentinin oksidasyon düzeyinden kaynaklanmaktadır (Borges, et al. 2001).

Flavonoidler, fenolik bileşikler içinde en önemli grubu oluşturan flavan (2-Fenol-benzo-dihidropiran) türevleridir (Spencer, et al. 2009). Şekil 1.4'te görüldüğü gibi yapısal olarak altı gruba ayrılırlar ve Şekil 1.5 bunların genel yapısını göstermektedir.

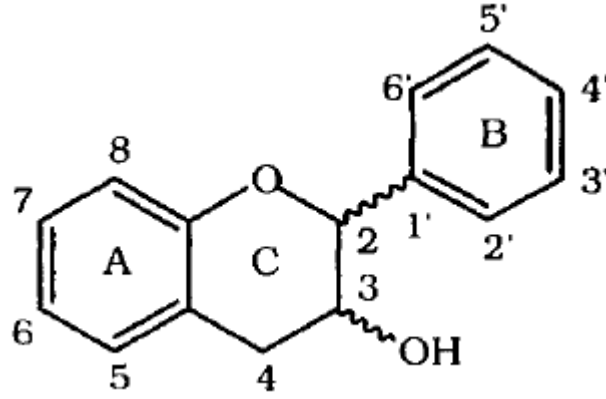


Şekil 1.4 Flavonoidlerin çeşitleri (Rohr. G.E. et al. 2000)



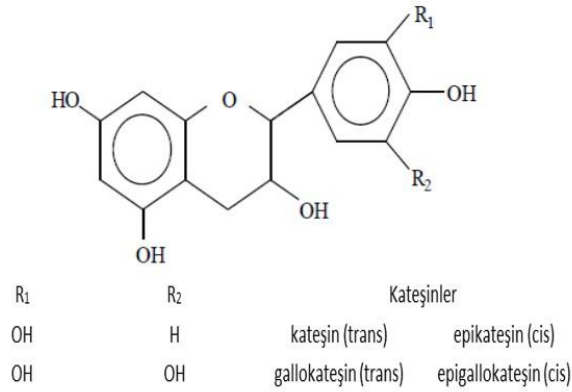
Şekil 1.5 Flavanollerin genel yapısı (Rohr. G.E. et al. 2000)

Prosiyanidinler, diastereoisomerler olan (-)-epikateşin ve (+)-kateşin'lerin birleşmesinden oluşurlar (Haslam, 1989; Rohdewald 2002;). Proantosiyandinlerde bulunan monomerlerin sistematik numaralandırılması Şekil1.6'da görülmektedir. Düşük moleküler kütleye sahip olanları "**Piknogenol**" olarak adlandırılmaktadırlar (Porter, 1988; Dumon, M.-C. 1990; Atta-ur-Rahman 2000).



Şekil 1.6 Proantosiyanidinlerde bulunan monomerlerin sistematik numaralandırılması (Rohr. G.E. et al. 2000)

Kateşinler, renksiz bileşiklerdir (Rohr et al 2000). Hemen her meyvede bulunan kateşinler, flavonoid biyosentezinde ara ürün olarak yer alırlar (Butler, et al. 1992). Gıdalarda en yaygın olarak bulunan flavonoid grubunu oluştururlar (Rohr et al 2000). Ayrıca, 3.C atomunda bir OH grubu içerdiğinden sistematik olarak flavan-3-ol olarak adlandırılırlar (Rohr et al 2000). Kateşinlerin yapılarında iki asimetrik karbon atomu bulunduğu için dört izomerleri bulunmaktadır (Rohr et al 2000). Bunların yapısı Şekil 1.7’de verilmiştir.



Şekil 1.7 Kateşinlerin genel yapısı (Rohr. G.E. et al. 2000)

Kateşinler, hem kimyasal hem de enzimatik olarak havadaki oksijen ile kolaylıkla reaksiyona girerler (Amiot et al. 1992). Reaksiyon sonunda kondanse olarak proantosiyanidinleri oluştururlar (Piretti, 1991). Proantosiyanidinler, kateşinlerin flavan-3-ol yapısının kimyasal veya enzimatik olarak dimer, oligomer ve polimerlere kondensasyonu ile oluşan bileşiklerdir (Tarnai et al. 1994). Molekül ağırlıkları 7000 Dalton’a (yaklaşık 20 flavan-3-ol

ünitesi) kadar ulaşabilmektedir (Swain, 1979). Bu bileşiklerin buruk veya acı tadı molekül ağırlıklarına bağlıdır. Kısa zincir uzunluğundaki moleküller renksiz olduğu halde polimerizasyon dereceleri yükseldikçe renkleri sarıdan kahverengine dönüşmektedir (Nozzolillo et al. 1984). Ancak asit ortamda ısıtıldıklarında antosiyanidinlere dönüşerek tipik, kırmızı-mor bir renk alırlar (Nozzolillo et al. 1984).

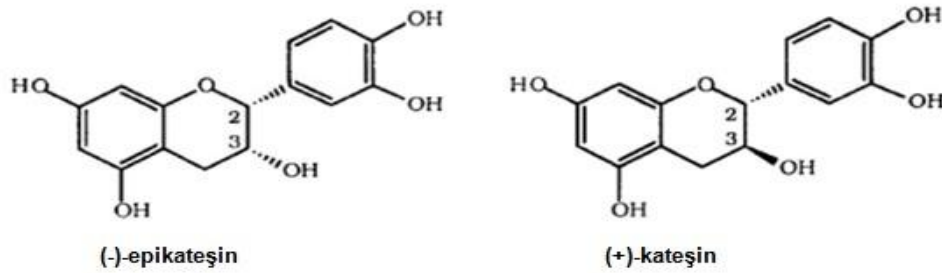
Bu nedenle, proantosiyandinin adı verilmektedir (Ferreira et al. 1996). Tablo 1.1, bazı proantosiyandinlerin içerdiği fonksiyonel gruplara göre nasıl adlandırıldığını göstermektedir.

Tablo 1. 1 En yaygın proantosiyandinlerin içerdiği fonksiyonel gruplara göre adlandırması (Rohr. G.E.et al, 2000)

Sınıf	Monomer (2R,3S Stereokimya)	Fonksiyonel gruplar				
		5	7	3'	4'	5'
Prosiyanidin	Kateşin	OH	OH	OH	OH	H
Prodelfinidin	Gallokateşin	OH	OH	OH	OH	OH
Properalgonidin	Afzeleşin	OH	OH	H	OH	H
Profisetinidin	Fisetinidol	H	OH	OH	OH	H

Proantosiyandinlerin oluşumunda kateşin ünitelerinin birbirleriyle bağlanmaları genellikle C4–C8 kondensasyonu şeklindedir (Haslam 1989; Ferreira 1996). Böylece çoğunlukla doğrusal (lineer) proantosiyandinler oluşur. Saf kateşin/epikateşin ünitelerinin kondensasyonu ile oluşan bileşiğe prosiyanidin adı verilmektedir (Haslam 1989; Porter 1988).

Bitkisel kökenli gıdalarda yaygın olarak bulunan proantosiyandinler; (-)-epikateşin ve (+)-kateşin kombinasyonlarından oluşan dimerlerle iki (-)-epikateşin ünitesinden oluşan prosiyanidin B2'dir (Rohr et al. 2000). Ayrıca proantosiyandin (B1, B2, B3 ve B4) ve diaizomerleri ise proantosiyandin B5, B6, B7 ve B8 bulunmaktadır (Rohr et al. 2000). 68 monomerli proantosiyandinler meyve ve sebzelerin buruk tadına neden olduğu halde, 35



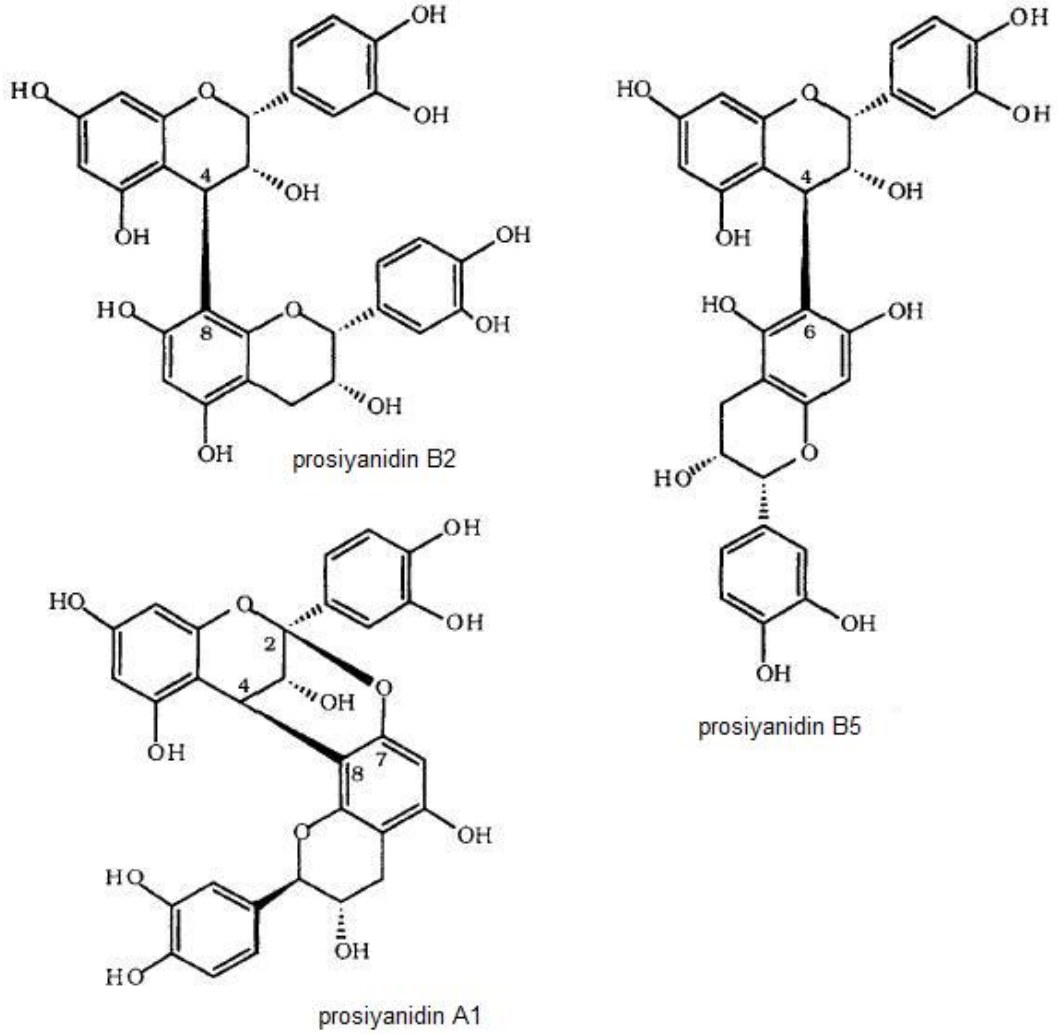
Şekil 1.8: Prosiyanidinlerin monomer yapıları (Rohr. G.E.et al, 2000)

monomerli olanların acı bir tat verdikleri bildirilmektedir (Rohr et al. 2000). Şekil 1.8'de ve Tablo 1.2'de prosiyanidinlere ait adlandırılmalar ve kullanılan kısaltma isimler yer almaktadır.

Tablo 1. 2 Prosiyanidinlerin adlandırılması (Rohr. G.E. et al. 2000)

Kısaltma isimler	Adlandırmalar
B1	epikateşin-(4 β →8)-kateşin
B2	epikateşin-(4 β →8)-epikateşin
B3	kateşin-(4 α →8)-kateşin
B4	kateşin-(4 α →8)-epikateşin
B5	epikateşin-(4 β →6)-epikateşin
B6	kateşin-(4 α →6)-kateşin
B7	epikateşin-(4 β →6)-kateşin
B8	kateşin-(4 α →6)-epikateşin
C1	epikateşin-(4 β →8)-epikateşin-(4 β →8)-epikateşin
C2	kateşin-(4 α →8)-kateşin-(4 α →8)-kateşin
A1	epikateşin-(4 β →8), (2 β →O→7)-kateşin
A2	epikateşin-(4 β →8), (2 β →O→7)-epikateşin

Diğer taraftan kondanse olmuş ve analitik olarak Folin-Denis ayırıcı ile belirlenen fenolik madde grubuna tanen adı verilmektedir (Tempel et al. 1982; Singleton 1988). Bu bileşiklerin molekül büyüklükleri 500-3000 Dalton arasında değişmekte ve proteinleri çöktürme ve deriyi sepileme özellikleri vardır (Ka"ıhko"nen, et al. 1999; Rohr et al. 2000). Fenolik bileşiklerin deriyi sepileme özelliği, fenolik -OH grupları yanında molekül büyüklükleri ile de ilgilidir (Rohr. et al. 2000)). Tanenlerin ön bileşikleri fenolik monomerler olup, bu grup esas olarak prosiyanidinlerden oluşmaktadır. Bu monomer yapıların birleşmesiyle oluşabilecek dimer yapılar da Şekil 1.9'da gösterilmiştir.



Şekil 1.9 Bazı Prosiyaninlerin yapısı (Rohr. G.E. et al. 2000)

1.3. Çam Kabuğu Ekstraktı ve Piknogenol

Piknogenol Fransız deniz çam kabuklarından (*Pinus pinaster* de denir) elde edilen ekstrakta verilen addır (Chen et al. 2009). Doğal çam kabuğu ekstraktı 65%-75 oranında kateşin ve epikateşinin çeşitli varyasyonlarından oluşan prosiyanidinlerdir (Rohdewald 2002). Geri kalan kısım feno fenolik asitler, fenolik monomerler, sinamik asitler ve onların glikozitlerinden oluşan bir karışımdır (Rohdewald 2002). Piknogenol 2-12 arası monomerik yapı içerebilmektedir (Rohdewald, 2001). Piknogenol'ün tanımında kullanılan ve analizi için asıl kabul edilen monomerler: kafeik asit, kateşin, ferulik asit ve taksifolindir (U.S. Pharmacopeia (2005). Piknogenolün içeriğinde bulunan maddeler bulundukları türe göre değişkenlik göstermekle beraber çam ağacı kabuklarında, üzüm çekirdeğinde, söğüt ağacı yapraklarında,

yer fıstığında, yaban elmasında, limon ağacı kabuklarında, çaylarda, kırmızı şarapta ve fındık ağacı yapraklarında bulunmaktadır (D'Andrea, 2010).

Çam Kabuğu Ekstraktı kuru ve karanlıkta muhafaza edildiğinde, Şekil 1.10'da gösterildiği gibi kahverengi kararlı bir karışımdır. Özelliklerini şöyle sıralayabiliriz (Rohdewald, 2001):

- toz halledir
- kırmızımsı-kahve rengidir
- aromatik kokuludur
- nemsiz ortamda oldukça kararlıdır
- ışıktan ve nemden korunmalıdır; karanlık şişelerde saklanmalıdır
- cilt / göz ile temasında alerjik etki göstermez
- suda, etanolde ve asetonda kolaylıkla çözünebilir
- ısıya karşı dayanıklıdır



Şekil 1.10 Toz haline getirilmiş pinnogenolün görüntüsü

Pinnogenol'ün günümüzde kullanımı çok geniştir. Yapılan çalışmalar her geçen gün daha çok yararı olduğunu göstermektedir. Yapılan klinik çalışmalar sonucunda pinnogenolün aşağıda belirtilen rahatsızlıklara iyi geldiği bildirilmiştir:

- Kalp ve damar sağlığını koruduğu, damar sertliğini ve tıkanmasını önlediği (Zibadi et al. 2007; Belcaro, G. Et al. 2006; Cesarone et al. 2006)
- Kolesterolü düşürdüğü (Devaraj .et al. 2002; Durackova et al. 2003)
- Göz sağlığına iyi geldiği (Schönlau et al. 2002; Chida et al. 1999)
- Diyabetik rahatsızlıklarda kullanıldığı (Schäfer 2007; Cesarone et al. 2006)

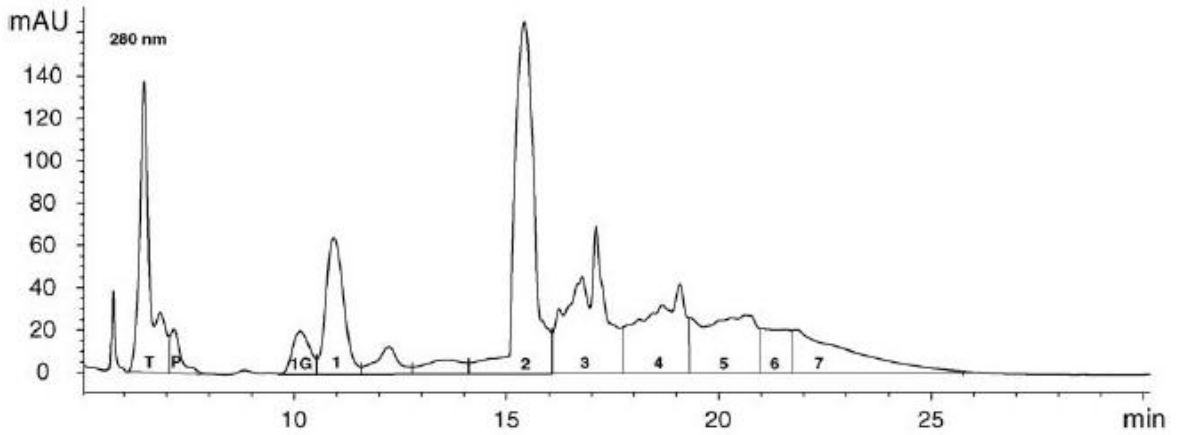
- Antioksidan özellik nedeniyle yaşlanmayı geciktirdiği ve vücudu serbest radikallerden temizlediği (Veurink et al. 2003; Liu et al. 1998)
- Cilt sağlığını koruduğu (Schönlau 2002; Saliou et al. 2001)
- İltihapları, yaraları iyileştirici özellik gösterdiği (Grimm et al. 2006; Schäfer et al. 2005)
- Ağız sağlığını korucuyu etki gösterdiği (Torras et al. 2005; Blazso et al. 2004)
- Bağışıklık sistemini güçlendirdiği (Liu et al 1998; Sime et al. 2004)
- Alerji ve astımı önlediği (Hosseini Et al. 2001; Lau et al. 2004)
- Adet düzensizliklerini önlediği ve ağrıları azalttığı (Kohama et al. 2007; Kohama et al. 2006)
- Spor faaliyetlerinde dayanıklılığı arttırdığı (Nishioka et al. 2007; Vinciguerra et al. 2006)
- Üreme sisteminin daha sağlıklı olmasını sağladığı (Roseff 2002; Roseff et al. 1999)
- Dikkat dağınıklığı ve hiperaktivite rahatsızlıklarının tedavilerinde kullanıldığı (Liu et al. 1999; Dvorakova et al. 2006).
- Anti-mikrobiyal ve anti-viral olarak kullanıldığı (Virgili et al. 1998; Torras et al.2005)
- Metabolizmaya daha birçok katkı sağladığı (Rohdewald, 1999; Sarikaki, et al. 2004)
- E ve C vitamininden, lipoik asitlerden bile daha kuvvetli bir antioksidan olduğu (Chovanova et al. 2006; Cossins et al. 1998)
- Kanseri önlediği (Nelson et al. 1998)
- Ülsere iyi geldiği
- Parkinson ve hipertansiyon hastalığı tedavisinde kullanıldığı
- Proteinleri enzimatik bozunmadan koruduğu (Voss et al. 2006; Devaraj et al. 2002)
- Antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu (Torras et al. 2005; Matsumori et al. 2007)
- Eklem yerleri sağlığına katkısı (Farid et al. 2007) olduğu ilgili kaynaklarda belirtilmektedir.

1.4. Piknogenol Tayininde Kullanılan Yöntemler

Literatür çalışmalarına bakıldığında Piknogenol tayini için genel olarak HPLC-UV, HPLC-MS cihazları ile ters faz ve normal faz analizler yapılmıştır. Literatürde çam kabuklarında piknogenol tayinine yönelik yapılmış fazla çalışma bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalar genellikle Fransız çam ağacı kabuklarından elde edilen Çam Kabuğu Ekstraktı Standardının analizine ve yöntem geliştirmeye dayanmaktadır. Fransız çamları dışında diğer tür çamlarda çok az çalışma mevcuttur. Bunlardan en önemlisi de ülkemizde yapılmış bazı çalışmalardır (I. Ince et al. 2009).

Bunların dışında piknogenol içeriğinde bulunan flavonoidlerin; çay yaprakları, üzüm çekirdekleri gibi farklı örneklerde tayinlerine yönelik çalışmalar olduğu literatürde görülmektedir. Çalışmalar içerisinde çaylarda kateşinlerin tayinine yönelik yapılmış olan rastladığımız sadece bir tane isokratik elüsyon HPLC yöntemi bulunmaktadır (Huafu Wang et al. 2000). Diğer tüm yöntemler gradient elüsyon kullanılarak yapılmıştır. Çalışmalarda ekstraksiyon çözücüsü olarak su, metanol ya da etanol en çok kullanılan çözücülerdir. Yine örnek hazırlanırken sıklıkla bu çözümler kullanılmıştır. Mobil faz olarak da yine su, metanol, asetonitril gibi çözümler farklı yüzdelerde karıştırılarak kullanılmıştır. Mobil faz içerisinde modifiye edici olarak formik asit, asetik asit veya orto-fosforik asit gibi asitler tercih edilmiştir. Çalışmalarda C-18 kolon tercih edilmiştir. Dalga boyu olarak 210 nm'yi kullanan çalışmalar olmuşsa da en çok kullanılan dalga boyu 280 nm'dir (Huafu Wang et al. 2000).

Çam kabuğu ekstraktı standardı kullanılan bir çalışmada Prosiyanidinlerin polimerizasyon dereceleri verilmiştir. Bu analizlere göre birinci bölgede monomerik yapıdaki kateşin türlerinin çoğunlukta olduğu ve ikinci, üçüncü bölgelere ilerledikçe dimerik, trimerik ve oligomerik yapıların sıralandığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar çam kabuğu ekstraktının içeriğinin genel olarak belirlenmesi açısından önemlidir. Çalışmaya ilişkin kromatogram ve değerler Şekil 1.11'de ve tablo 1.3'de verilmiştir (A. Romani et al. 2006).



Şekil 1.11 Ticari çam kabuğu ekstraktına ait normal faz HPLC kromatogramı (280 nm) 1-10: Polimerleşme derecesini ifade eder. (T) Taksifolin (P) Protocateşuik asit (1G) gallik asit, (1)(+) kateşin, (-) epikateşin ve eser miktarda gallokateşin, (2) dimerler ve eser miktarda gallokateşin dimerleri, (3) trimerler ve eser miktarda gallokateşin trimerleri, (4) tetramerler, (5) pentamerler, (6) hexamerler, ve (7) heptamerler.

Tablo 1. 3 Ticari çam kabuğu ekstraktlarındaki polifenollerin normal faz kullanılarak elde edilen miktarlar (A. Romani et al. 2006).

Bileşikler	mg/g
Taksifolin	33.1
Protokateşik asit	9.1
Gallik asit	24.4
Kateşin, epikateşin ve gallokateşinler	74.2
Prosiyanidin ve gallokateşin dimerleri	285.3
Prosiyanidin ve gallokateşin trimerleri	177.7
Prosiyanidin tetramerleri	124.0
Prosiyanidin pentamerleri	90.9
Prosiyanidin hekzamerleri	8.8
Prosiyanidin heptamerleri	15.7
Toplam	843.0

Parmak izi analizi olarak adlandırılan bir çalışmada piknogenol standardının ayrıştırılması için metot geliştirme çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmada piknogenol olarak analizlenen dört temel proycanidin şunlardır: Kateşin, kafeik asit, ferulik asit taksifolindir. Çalışmada metanol su gradient elüsyon sisteminin Ferulik asit ve taxifolin ikilisini ayırmada yeterli olmadığı görülmektedir. Bu yüzden çalışma su-asetonitril gradient elüsyon sistemiyle tamamlanmıştır (Pei Chen et al. 2009).

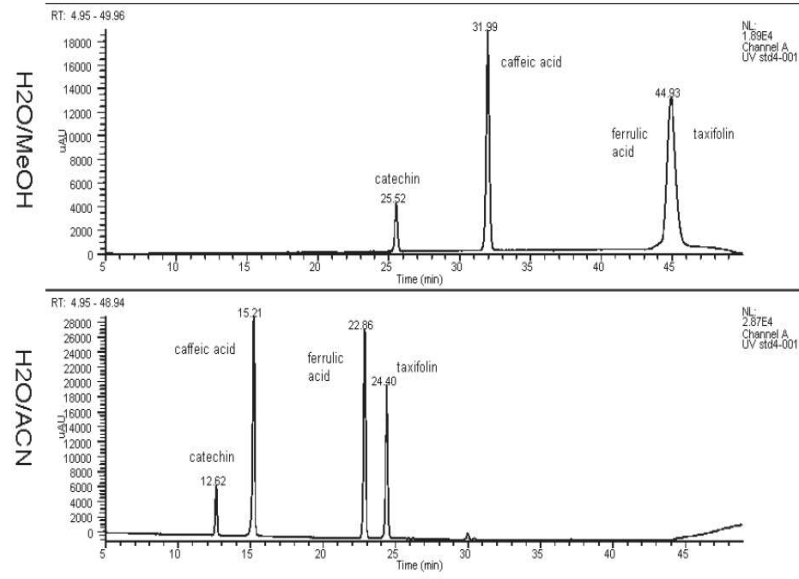


Figure 2. Chromatograms of the four key components with H₂O and MeOH as mobile phase (top) and H₂O and acetonitrile (bottom) as mobile phases.

Şekil 1.12 Piknogenolu oluşturan ana maddeler olan Kateşin, kafeik asit, Ferrulik asit ve Taksifolinin (1) Su/Metanol, (2) Su/Asetonitril içeren mobil faz ile alınmış kromatogramları (Pei Chen et al. 2009).

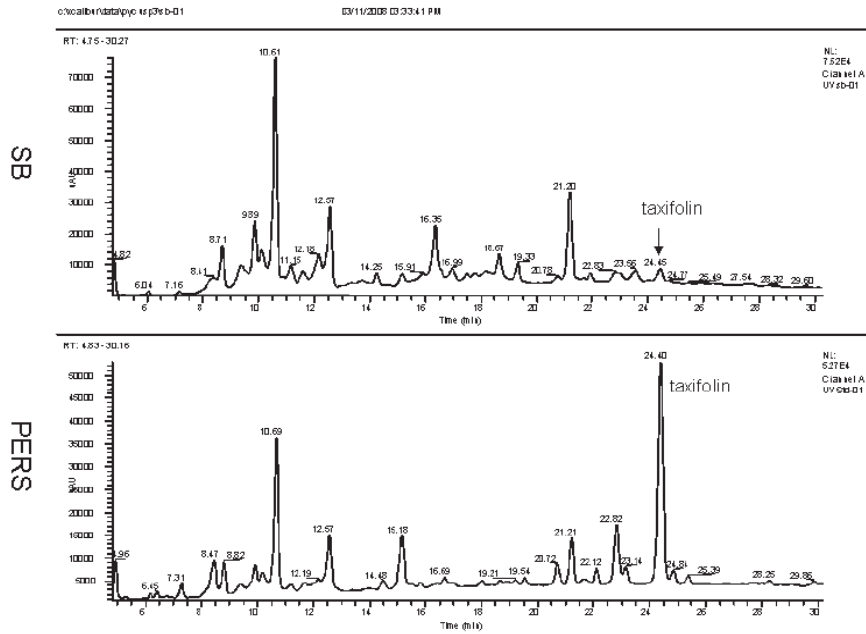


Figure 6. Chromatograms of Sample B (top) and PERS (bottom).

Şeki 1.13 Çam kabuğu (1) Ekstraktı Standardı ve (2) örneğe ait kromatogramlar.

Literatürde Prosiyanidinlerin farklı örneklerde tayinine yönelik birçok çalışmaya rastlamak mümkündür. Yapılan çalışmalarda 3 mg madde miktarından 100 gram miktarlarına kadar örnek kullanılmaktadır. En çok kullanılan örnekler içinde çay, üzüm çekirdeği, çam kabuğu ekstraktı standardı ve çam kabukları vardır. Dört çeşit üzüm çekirdeği ve iki çeşit çam kabuğu örneğinin kullanıldığı bir çalışmada elde edilen sonuçlar karşılaştırmalı olarak verilmiştir. C-18 kolonun kullanıldığı çalışmada mobil faz olarak 0.3% fosforik asit içeren su ve asetonitril kullanılmıştır. Standartlar ve örnekler metanol-su karışımında hazırlanmışlardır. Analiz 80 dakika sürmüştür. Çeşitli çay örneklerinden 3 g alınarak 150 mL kaynayan suda 5 dakikalık ekstraksiyon işleminden sonra 210 nm dalga boyunda elde edilen sonuçlar tablo 1.4'de verilmiştir (Huafu Wang et al, 1999).

Tablo 1. 4 Çeşitli çay örneklerinde bulunan kateşin, kafein ve gallik asit miktarları (mg/100 mL)
(Mobil faz: metanol:su:ortofosforik asit=20:79.9:0.1, Akış hızı: 1mL/dak)

Aranan Mad.	Gunpowder	RGT	Sencha	Keemun	Sri Lanka
Gallik Asit	0.78	1.65	0.74	3.33	2.79
(+)-GC	2.57	3.05	2.81	0.40	1.57
(-)-EGC	2.97	30.1	36.2	0.90	1.84
(+)-C	0.69	1.22	1.41	nd	0.50
Kafein	23.9	30.3	28.9	38.2	22.9
(-)-EGCG	32.6	31.4	28.8	0.95	1.16
(-)-EC	5.58	6.48	9.54	nd	1.45
(-)-GCG	0.51	0.91	1.02	nd	nd
(-)-ECG	4.26	5.03	4.92	1.19	2.92
ΣKateşinler	76.0	78.2	84.6	3.44	9.43

Bu çalışmanın dışında Prosiyanidinlerin ve piknogenolün tayini için isokratik elüsyon yöntemine rastlanmamıştır. Çam kabuklarında ise standart PBE dışında çok az çalışma yapılmıştır. Çam kabuklarının analizine yönelik yapılan çalışmalarda aynı çam ağaçlarından toplanan kabuklardaki miktarların bölgeden bölgeye değişiklik gösterdiği görülmektedir. Bazı Prosiyanidinler bazı bölgedeki ağaç kabuklarında bulunmazken başka bölgelerdeki aynı türe ait çam ağaçlarının kabuklarında bulunabilmektedir. Ülkemizde yapılan karşılaştırmalı bir çalışmada farklı ülkelerden alınan çam kabukları analizlenmiştir. Piknogenol referans standardına ait sonuçlar aşağıdaki gibidir (I. Ince et al. 2009):

Tablo 1. 5 Piknogenol Ekstraktında Bulunan Madde Miktarları (mg/g)

Ekstrakt	Kateşin	Epikateşin	Kateşin gallat	Taksifolin	Toplam kateşin
Piknogenol	7.92±0.09	4.81±0.05	0.85±0.01	17.04±0.01	13.58

Çalışmada her bir örnek için 100 gram çam kabuğu 600 mL kaynayan suda ekstrakte edilmiştir. Daha sonra oda sıcaklığına kadar soğumaya bırakılan ekstrakt süzölmüş ve üzerine doygunluğa erişinceye kadar sodyum klorür eklenmiştir. Çökelen kısım yine ayrılmış ve kalan su fazlı ekstrakt etil asetat ile yeniden ekstraksiyona sokulmuştur. Etil asetat faz alınarak evaporatörde deriştirilmiştir. Deriştirilen kısım üzerine kloroform eklenerek çöktürme yapılmıştır. Çökelen bej renkli kısım alınarak -20°C'de saklanmış ve analizleneceği zaman metanolde çözöndürölmüştür. Örneklere ait sonuçlar Tablo 1.6'daki gibidir (O. Yesil-Celiktas et al. 2009):

Tablo 1. 6 Farklı tür çam ağaçları kabuklarında bulunan Madde Miktarları (mg/g)

Türler	Kateşin	Epikateşin	Kateşin gallat	Taksifolin
<i>P.pinea (fıstık çamı)</i>	7.70 3 ± 0.02	0.684 ± 0.08	1.529 ± 0.05	0.138 ± 0.00
<i>P.sylvestris (sarı çam)</i>	3.207 ± 0.46	0.466 ± 0.04	0.332 ± 0.05	0.041 ± 0.01
<i>P.nigra (kara çam)</i>	1.817 ± 0.02	0.563 ± 0.01	0.025 ± 0.00	0.266 ± 0.00
<i>P. parviflora</i>	0.095 ± 0.00	0.061 ± 0.00	0.002 ± 0.00	0.016 ± 0.00
<i>P.ponderosa</i>	0.256 ± 0.01	0.131 ± 0.00	0.015 ± 0.00	0.128 ± 0.00
<i>P.sylvestris*</i>	0.299 ± 0.01	0.215 ± 0.01	0.231 ± 0.03	0.018 ± 0.00
<i>P.nigra (kara çam)*</i>	0.161 ± 0.01	0.068 ± 0.01	0.002 ± 0.00	0.10 ± 0.00

*P.sylvestris** ve *P.nigra** Almanya'dan hasat edilmiştir.

2. KROMATOĞRAFİK METOTLARA GİRİŞ

Kromatografi iki veya daha fazla maddenin birbiri ile karışmayan iki faz arasında farklı oranlarda dağılma özelliğinden yararlanılarak ayrılması esasına dayanır. Daha açık bir tanım getirilirse, kromatografi; kompleks karışımlardaki çeşitli maddeleri birbirinden ayırmaya ve tanımlamaya olanak veren bir seri ayırma tekniğidir.

Kromatografik ayırmalar, biri sabit öteki hareketli olan iki faz arasında gerçekleştirilir. Sabit faz bir kolon içerisine doldurulmuş veya düz bir zemin üzerine yayılmış herhangi bir katı veya katı üzerine emdirilmiş bir sıvı, hareketli faz ise sıvı, gaz veya süperkritik bir akışkan olabilir. Hareketli faz bir kolon içinde, ya normal gravitasyon (yer çekimi) kuvvetiyle veya basınçla kolondaki sabit faz üzerinden geçirilir. Bu geçiş esnasında hareketli fazda çözünmüş halde bulunan maddelerle sabit faz arasında fiziksel ve kimyasal bazı çekim kuvvetleri meydana gelir. Bu çekim kuvvetleri her madde için ayrıdır. Bundan dolayı hareketli faz, sabit faz üzerinden geçerken, hareketli faz içerisinde bulunan maddelerin kolon içindeki hızları farklı olur. Sabit fazla arasındaki çekim kuvveti en az olan kolon içinde hızlı yol alırken (kolonda en önce çıkarken), sabit fazla arasındaki çekim kuvveti en çok olan, yavaş yol alır.

2.1 Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması

Kromatografik yöntemler farklı kriterlere göre sınıflandırılabilir. Bunlardan birinde, hareketli ve sabit fazların fiziksel olarak nasıl temas ettikleri esas alınır. Bu esasa göre kromatografi, kolon kromatografi ve düzlemsel kromatografi olarak ikiye ayrılır. Kolon kromatografide, sabit faz ince bir kolon içerisine doldurulur ve hareketli faz basınç altında bu sabit faz üzerinden geçmeye zorlanır. Düzlemsel kromatografide, sabit faz düz bir plaka üzerine veya bir kağıdın gözenekleri arasına tutturulur ve bu durumda hareketli faz sabit faz arasından kapiler etkisiyle veya yer çekimi etkisiyle hareket eder. Düzlemsel kromatografi yöntemleri, TLC, PC ve elektroforez ile elektrokromatografiyi içermektedir. (Tablo 2.1.) (Skoog D.A., 1998;; Skoog D.A.,1999).

Tablo 2. 1 Düzlemsel kromatografinin sınıflandırılması

Adı	Hareketli faz	Sabit faz	Sabit faz tutma yöntemi
İnce-tabaka	Sıvı	Sıvı-katı	Bir cam levhadaki ince toz halindeki katı üzerinde
Kağıt	Sıvı	Sıvı	Kalın bir kağıdın gözenekleri içinde
Elektroforez ve Elektrokromatografi	Sıvı	Sıvı-katı	Elektrik alanda molekül ağırlığı ve elektrik yüklerine göre bir katı üzerinde

Kromatografik yöntemlerin bir başka sınıflandırması ayırma mekanizmasına göre yapılabilir. Bunlar ise (1) adsorpsiyon, (2) dağılma, (3) iyon değiştirici, (4) jel kromatografisidir (Skoog D.A., 1998,; Skoog D.A.,1999). Kromatografinin daha temel bir sınıflandırması kullanılan durgun ve hareketli fazların tipleri ve fazlar arasında madde aktarımını sağlayan dengelerin cinslerine göre yapılır. Tablo 2.2 kromatografinin üç genel tipini göstermektedir: Sıvı kromatografisi, gaz kromatografisi ve süperkritik akışkanlı kromatografi. Bu isimlerde de geçtiği gibi, bu üç teknikte hareketli faz sırasıyla sıvı, gaz ve süperkritik akışkandır. Sadece sıvı kromatografisi hem kolonlarla hem de düz yüzeyler üzerinde gerçekleştirilebilir. Gaz kromatografisi ve süperkritik sıvı kromatografisi yalnızca kolonlarda gerçekleştirilir (Gündüz T. 2002; Skoog D.A., 1998).

Tablo 2. 2 Kolon kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması

Genel Sınıf	Özel Yöntem	Sabit faz	Denge Tipi
Sıvı kromatografi (LC) (hareketli faz: sıvı)	Sıvı-sıvı veya Dağılma	Katı üzerine adsorplanmış sıvı	Karışmayan sıvılar arasında dağılma
	Sıvı-bağlı faz	Katı yüzeyine bağlanmış organik türler	Sıvı ve bağlı yüzey arasında dağılma
	Sıvı-katı veya adsorpsiyon	Katı	Adsorpsiyon
	İyon değişimi	İyon değiştirici reçine	İyon değişimi
	Boyut eleme	Polimer bir katının gözeneklerindeki sıvı	Dağılma/eleme
Gaz kromatografi (GC) (hareketli faz : gaz)	Gaz-sıvı	Katı yüzeyine adsorplanmış sıvı	Gaz ve sıvı arasında dağılma
	Gaz-bağlı faz	Katı yüzeyine bağlanmış organik türler	Sıvı ve bağlı faz arasında dağılma
	Gaz-katı	Katı	Adsorpsiyon
Süperkritik-akışkanlı kromatografi (SFC) (hareketli faz : sıvı)		Katı yüzeyine bağlanmış organik türler	Süperkritik akışkan ve bağlı yüzey arasında dağılma

2.2 Kromatografinin Uygulamaları

2.2.1 Nitel Analiz

Kolon kromatografisinde t_R , düzlemsel kromatografide RF değerleri kalitatif analiz yapmamızı sağlar. Bu analiz yapılırken iyi bir standart karışım hazırlanıp bu standartlarla örneklerin karşılaştırılması yapılır. Karşılaştırma esnasında tüm koşulların (kolon, dedektör, akış hızı vb.) aynı tutulması önemlidir. Ancak bu durumda kromatografik olarak kalitatif tayin

gerçekleştirilmiş olur. Bu sonuçlar diğer spektroskopik yöntemlerle desteklenebilir. Günümüzde kromatografik yöntemler spektroskopik yöntemlerle birleştirilerek (GC-IR, GC-MS gibi) uygulanmakta ve böylece kalitatif analizde daha güvenilir sonuçlar elde edilebilmektedir (Gündüz T. 2002; Skoog D.A., 1998).

2.2.2 Nicel Analiz

Kantitatif analiz yapılan maddenin pik yüksekliğinin veya pik alanının bir veya birkaç standardın yükseklikleri veya pik alanlarıyla kıyaslanmasına dayanır. Düzlem kromatografisindeyse, kantitatif analiz ayrılmış olan türün kapladığı alana bağlıdır. Şartlar iyi ayarlanabilirse, bu şekilde bulunan alanlar konsantrasyonla doğru orantılıdır [(Gündüz T. 2002; Skoog D.A., 1998).

Pik Yüksekliğine Dayalı Analizler; Bir kromatografi pikinin yüksekliği, pikin her iki tarafındaki taban çizgilerinin düz bir çizgi ile birleştirilmesi ve bu çizgiden pik tepesine dikey mesafesinin ölçülmesi ile elde edilir. Bu ölçüm genellikle yüksek kesinlikle yapılabilmektedir. Bununla birlikte pik yüksekliklerinin pik genişlikleriyle ters orantılı olduğuna dikkat etmek gerekir. Bu nedenle pik yüksekliklerini kullanarak doğru sonuçlar ancak kolon koşullarındaki değişikliklerin numunenin ve standartların kromatogramlarını elde etmek için gerekli olan sürede pik genişliklerini değiştirmede olduğu durumda elde edilir. Yakından kontrol edilmesi gereken değişkenler kolon sıcaklığı, eluent akış hızı ve numune enjeksiyon hızıdır. Ayrıca kolonun aşırı yüklenmemesine de dikkat edilmelidir. Numune enjeksiyon hızı özellikle kromatogramın ilk pikleri için önemlidir. Bu sebepten dolayı şırınga ile yapılan enjeksiyonlarda % 5-10 bağlı hata normaldir (Gündüz T. 2002; Skoog D.A., 1998).

Pik Alanına Dayalı Analizlerde; Pik alanları, pik yüksekliğine dayalı analizlerde söz konusu olan değişkenlere bağlı olan bant genişlemesi etkilerinden bağımsızdır. Bu bakış açısına göre, alanlar pik yüksekliklerine göre daha iyi bir analitik değişkendir. Diğer yünden pik yükseklikleri daha kolay ölçülür ve dar pikler için daha doğru bir şekilde tayin edilebilir (Gündüz T. 2002; Skoog D.A., 1998).

Kalibrasyon ve Standartlar; Kromatografik yöntemlerde, kantitatif analizler için en dolaysız yöntem, bilinmeyen bileşimine benzeyen bir seri standart çözelti hazırlanmasını içerir. Bundan sonra standartların kromatogramları alınır ve pik yükseklikleri veya alanları derişimin bir fonksiyonu olarak grafiğe geçirilir. Kantitatif analiz yapılabilmesi için çalışılan konsantrasyon aralığında elde edilen grafik doğrusal olmalıdır. En yüksek doğruluk için sık sık yeniden kalibrasyon yapılması gereklidir. Bu yöntemde en yüksek hata kaynağı, genellikle

numune hacmindeki belirsizlik ve bazen de enjeksiyon hızıdır (Gündüz T. 2002; Skoog D.A., 1998).

İç Standart Yöntemi; En kesin kromatografik kantitatif değerler, iç standart kullanılmak suretiyle elde edilir. Bu metotta kullanılan çözücülerde çokça çözünen ve analitin kimyasal yapısına benzerlik gösteren bir madde iç standart olarak seçilir ve bilinen bir miktarı numune içerisine ilave edilir. Analitin pik alanı veya yüksekliğinin, iç standardın pik yüksekliğine veya alanına oranı bir analitik parametre olarak kullanılır ve konsantrasyon bu oran üzerinden hesaplanır. Bu metottan iyi sonuç alabilmek için iç standardın pikinin, numunede bulunan diğer maddelerin piklerinden iyi ayrılmış ($R_s > 1,25$) ve analitin pikine çok yakın olması gerekir. Uygun bir iç standart kullanılarak kesinliği %1 den daha düşük bağıl hatayla tayinler yapmak mümkündür (Gündüz T. 2002; Skoog D.A., 1998).

2.3 Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Sıvı kromatografisi yönteminin özel bir uygulaması olan yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yönteminde, sabit faz olarak kullanılan parçacık boyutlarının önemli ölçüde küçültülmesi sonucu hareketli faz ile etkileşen sabit faz yüzey alanı büyür ve böylece kolonun etkinliği artırılmış olur. Çok sıkı olarak doldurulmuş kolondan hareketli fazın belirli bir hızla geçebilmesi için bir basınç uygulanması gerekir. Bu yüksek verimdeki kolonların ve oldukça yüksek basınçların kullanıldığı HPLC, element türlendirilmesinde en yaygın biçimde uygulanan kromatografi türüdür.

HPLC günümüzde kimya, biyokimya, biyoteknoloji, farmakoloji, tıp kimyası, bitki kimyası, tarım ve kimya mühendisliğini içeren alanlarda ayırma ve analiz için vazgeçilmez bir araç olarak kabul edilmektedir. Bilhassa diğer kromatografik tekniklere uygun olmayan bileşiklerin ayrılması ve analizi için uygundur. Çevre sıcaklığında termal olarak kararsız bileşikler ve yüksek polarlıktaki bileşikler herhangi bir türevlendirme olmaksızın ayırabilir ve analiz edebilir (Gündüz T. 2002; Skoog D.A., 1998; Skoog D.A. 1999).

HPLC sıvı kromatografisinin diğer türlerinden üstünlükleri şunlardır:

1. HPLC kolonu, rejenerasyon olmaksızın pek çok kez kullanılabilir.
2. Böyle kolonlarda gerçekleştirilen ayırma, eski yöntemlerle elde edilenden çok daha çeşitlidir.
3. Bu teknik kullanıcının becerisine daha az bağımlıdır ve tekrarlanabilirlik daha yüksektir.

4. Nicel analiz amaçları için de kullanılabilir.
5. Analiz süresi çok kısadır.
6. Duyarlık çok yüksektir, 10 µg lık bir örnek bile, floresans veya elektron yakalama dedektörleri kullanılarak tayin edilebilir.

2.3.1 HPLC Kullanırken Alınması Gereken Önlemler

2.3.1.1 Hareketli Faz Çözücüleri İçin Önlemler

Farklı dolgulu kolonlar için çözücü sınırlaması: Silika dolgulu bir kolon kullanıldığında, kullanılan hareketli fazın pH'ına dikkat edilmelidir. Uygun pH aralığı 2- 7.5 arasındadır. Gözenekli polimere sahip bir kolonun çözücüsünü değiştirirken, kolon maddesinde şişme veya büzülme olup olmadığına dikkat edilmelidir. Dolgu maddesinin şişmesi, su yüzdesiyle artar. Asit, baz, tuz veya iyon çifti reaktif kullanıldıktan sonra kolon, metanol/su karışımı ile temizlenmelidir.

Çözücünün saflığı: HPLC'de kullanım için mümkün olan en yüksek saflıkta bir çözücü önerilir.

Çözücünün degaze edilmesi: HPLC'de, eğer hava, hareketli fazda yüksek basınç altında çözünürse, pompa başında veya dedektör hücresinde doğru analize imkan vermeyen hava kabarcıkları oluşur. Bu yüzden mobil faz olarak kullanılan çözücü tamamen degaze edilmelidir. Degaze işlemi özellikle, gazların kolayca çözündüğü su, alkol ve asetonitril veya bunların karışımı için gereklidir.

Çözücünün süzülmesi: HPLC çözeltileri, kullanılmadan önce daima süzülmalıdır. Eğer süzülmeden kullanılırlarsa, kolon filtresi ve kolon başı tıkanabilir. Bunun sonucunda duyarlılığın azalması, basıncın artması ve kolon ömrünün azalması gibi değişik problemler ortaya çıkabilir. Sulu ortamda süzme genellikle selüloz ester karışımı 0.22 µm gözenek büyüklüğüne sahip filtrelerle, organik ortamda süzme ise 0.2 µm gözenek büyüklüğündeki politetrafloroetilen filtrelerle yapılır veya HPLC çözücüsü için özel süzme aleti kullanılabilir.

Çözücülerin değişimi: Eğer çözücü değiştirilecek olursa, diğer çözelti ilkiyle iyi karışabilir olmalıdır. Bu durum yalnızca pompanın düzensiz çalışmasına yol açmaz, aynı zamanda kolon ve dedektörü de kararsız hale getirir. Bir tampon kullanıldıktan hemen sonra organik bir çözücü kullanılırsa, HPLC sistemi tuzların çökmesi yüzünden çalışamaz hale gelir. Bu kolonun ömrünü de etkileyebildiğinden, organik çözücü kullanılmadan önce sistem su veya ara polaritede bir çözücü ile temizlenmelidir.

2.3.1.2 Kolon Kullanımı İçin Önlemler

1-Kolon seçimi: Örneğin molekül kütlesi, solvent sisteminin çözünürlüğü, ayırma modu gibi bilgiler performanslı bir ayırmadan önce kolon seçimine yardım eder. Üreticiler kolon dolgu maddelerini, ayırdıkları bileşikler, örnek kapasiteleri vb. şekilde sınıflandıran bir literatür sağlamışlardır.

2- Ön-kolon kullanımı: Hareketli faz, pompa çıkışından sonra, ayırmayı sağlayan kolon ile aynı sabit fazı içeren bir ön-kolondan geçirilir. Bu uygulamanın amacı, hareketli fazdaki safsızlıkları toplamak ve hareketli fazı sabit faz ile doyunluğa getirmektir. Ön-kolon kullanmanın bir diğer avantajı ise fiyatları bir hayli yüksek olan ayırıcı kolonların ömrünü uzatmasıdır.

3- Kolon tabakasının bozulması: HPLC sistemi çalıştırılmaya başlanınca akış hızı yavaş yavaş arttırılmalıdır. Aynı uygulama sistem kapatılırken de izlenmelidir. Böylece kolon tabakasının bozulmaksızın kolon basıncının artması sağlanır.

4- Kolonun korunması: Kolonlar rutubetli ve çok yüksek veya çok düşük sıcaklıkların olduğu yerlerde saklanmamalıdır. Kolonların özel bir çözücü ile saklanması, kirlenmeyi azaltır ve kolon ömrünü artırır. Bazı tamponlar (özellikle halojen tuzlarını içeren tamponlar) kolonun paslanmaz çelik duvarını aşındırır. Bu nedenle kolon saklanmadan önce uygun bir çözücüyle temizlenmelidir.

5- Kolonun rejenerasyonu (yenilenmesi): Kolon performansı azaldığında en iyisi kolonu rejenere etmektir. Normal faz kolonları kullanıldığında, kolon önce çok az polarlıkta bir çözücü geçirilerek yenilenebilir ve sonra tekrar hareketli fazla dengeye getirilir. Ters faz kolonları metanol, THF, CH_2Cl_2 gibi çözücülerle yenilenebilir (Gündüz T. 2002; Skoog D.A., 1998; Skoog D.A. 1999)

.

2.3.1.3 Örnek Hazırlanması

1-Katı örnekler: Bir örneği HPLC sistemine vermek için, bu örneğin, hareketli faz olarak kullanılan çözücüde çözünmesi gerekir. Örneğin, metanol/su karışımı bir hareketli fazla ile analiz yapılacaksa, örnek metanolde, suda veya metanol/su karışımında çözülmelidir. Eğer örnek böyle bir çözücüde çözünmüyorsa, diğer bir çözücüde çözünmeli, fakat bu durumda kullanılan çözücü kesinlikle hareketli fazla karışabilir olmalıdır. Örnek bileşenlerinin, mobil faz

çözücüsünde çökmemesine de dikkat edilmelidir.

2- Sıvı örnekler: Sıvı örneklerde çözücü, sistem ile uyumluysa, doğrudan enjekte edilebilir. Eğer örnekler istenen çözücüde değillerse veya enjekte edilecek kadar derişik değillerse, kurutulmalıdır veya deriştirilmelidir. Daha sonra hareketli fazda tekrar çözünmelidir.

3- Örneklerin süzülmesi: Hareketli faz akışında azalmaya, geri basıncında artmaya, kolon veriminde azalmaya ve istenmeyen piklere neden olabilecek çözünmeyen maddelerin kolona girmesini önlemek için, örneğin enjeksiyondan önce süzülmesi tavsiye edilir (Gündüz T. 2002; Skoog D.A., 1998; Skoog D.A. 1999).

2.3.1.4 Dedeksiyon Sisteminin Korunması

Dedeksiyon hücresinde gaz kabarcıkları oluşursa, tayinde problemler ortaya çıkar. Gaz kabarcığının oluşumunu önlemek için şu önlemler alınmalıdır (Gündüz T. 2002; Skoog D.A., 1998; Skoog D.A. 1999):

1. Sistemde sızıntı olmamalıdır.
2. Solvent HPLC sisteminde kullanılmadan önce degaze edilmelidir.
3. Eter, pentan gibi uçucu solventler sistemde buharlaşacağından, bunları kullanmaktan kaçınılmalıdır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Amaç

Piknogenol olarak bilinen (Kateşin, Epikateşin, Gallik Asit, Ferrulik Asit, Taksifolin vb.) bazı flavonoidler antioksidan olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Literatürde genel olarak bu flavonoidleri ağırlıklı olarak içerdiği bilinen Fransız çam ağacı kabuklarından piknogenolün ticari olarak üretildiği bilinmektedir. Ağaç kabuklarının belli bir kullanımı olmadığı dikkate alındığında bu çalışmada; ülkemizde bulunan bazı çam kabuklarındaki söz konusu flavonoidleri nitel ve nicel olarak belirlenmesi amaçlanmıştır (Şekil 3.2, 3.3, 3.4, 3.5).

3.2. Yöntem

Toplanan farklı tür çam kabukları ilk önce öğütülmüş sonra kaynar su ile ekstrakte edilmiştir. Süzüntü sıvı sıvı ekstraksiyonuna tabi tutulduktan sonra ekstrakt argon gazı altında uçurulmuştur. Kalıntı metanol- su karışımında çözüldükten sonra HPLC cihazında analizlenmiştir. Ayrıca ekstraktın nitel analizi LC-MS-MS cihazı ile yapılmıştır.

3.3. Kullanılan Cihazlar

Deneylerde, Perkin Elmer Series 200 Marka HPLC cihazı kullanılmıştır. Cihaz Perkin Elmer Series 200 ve Perkin Elmer Series 200 UV-VIS dedektör, Perkin Elmer Series 200 izo-kritik ve gradient akış pompası,

7725-i Rheodyne enjektör sistemi ve 50 µl'lik loop içermektedir. Kolon olarak ise C18 (oktadesil silan 4.6 mm x 250 mm-ODS3) kolon kullanılmıştır. LC-MS analizleri Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi FABAL laboratuvarlarında yapılmıştır. Analizler için Thermo SCIENTIFIC/TSQ Quantum Access Max model cihaz kullanılmıştır.

3.4. Materyal

Analizi yapılan am kabukları Türkiye’de bulunan beş tür am ağacından toplanmıştır. Bu amaçla kullanılan am ağacı türleri aşağıda verilmiş olup, bunlardan üç tanesi tanesi Bilecik Bozyk’ten (kızılçam, sarıçam, fıstıkam), karaçam Manisa bölgesinden, Halepamı ise Adana’dan temin edilmiştir. Bu alışmada;

- Pinus brutia (Kızılçam)
- Pinus halapensis (Halep amı)
- Pinus nigra (Karaçam)
- Pinus pinea (Fıstık amı)
- Pinus sylvestris (Sarıçam)

olmak üzere beş farklı am ağacı kabuğunda bulunan pknogenol bileşenlerinin tayinleri yapılmıştır. şekil 3.1 deneylerde kullanılan am kabuklarına ait bir resmi göstermektedir.



şekil 3.1 am kabukları

3.5. Kullanılan Kimyasallar

Epikateşin, taksifolin, gallik asit, vanilik asit, ferrulik asit, kafeik asit, epigallokateşin gallat standartları sigma'dan; analitik saflıkta çözücü metanol, asetonitril Carlo Erba'dan; analitik saflıkta etil asetat ve kloroform Merck'ten temin edilmiştir. Denemelerde kullanılan tuz (NaCl) ve kurutmada kullanılan Sodyum Sülfat (Na_2SO_4) Merck firmasından satın alınmıştır. Çalışmalarda kullanılan Çam Kabuğu Ekstraktı (Piknogenol) örnekleri Solgar ve GNC firmalarından satın alınmıştır.

Denemelerde kullanılan ultra saf su Celal Bayar Üniversitesi Kimya Bölümü Analitik Kimya Araştırma Laboratuvarındaki Elix Synergy 185 Millipore çift arıtmalı su cihazından elde edilmiştir.

3.6. Prosedür

3.6.1. Materyalin Hazırlanması

Temin edilen çam kabukları mikserle toz haline gelene kadar öğütülür. Toz haline gelen örnekten 20.000 ± 0.020 g tartılarak ekstraksiyon edilmek üzere kullanılır.

3.6.2. Standartların Hazırlanması

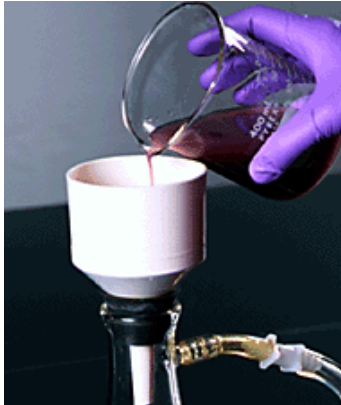
Katı olan kateşin ve ferrulik asit türlerinden hesaplanan miktarda ayrı ayrı (kateşin 390 mg/L, ferrulik asit 356 mg/L), sıvı epikateşin, taksifolin ve epikateşin gallat türlerinden yine hesaplanan miktarda ayrı ayrı (epikateşin 200 mg/L, taksifolin 100 mg/L, EGCG 200 mg/L) çözeltileri hazırlanarak koyu renkli şişelerde ve buz dolabında saklanmıştır. Bu stok çözeltilerden çıkılarak bütün türler için 1 mg/L derişimde olacak şekilde deney standartları hazırlanmıştır. Sıvı örnekler 5 mg ve 10 mg'lık ambalajlarda geldiği için bunlara ait çözeltiler 50 mL'lik balon jojelerde 100 mg/L olacak şekilde ya da 25 mL balon jojelerde 200 mg/L olacak şekilde hazırlanmıştır. Daha sonra hazırlanan bu stok çözeltilerden farklı konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlanmıştır.

3.6.3. Örneklerin Ekstraksiyonu

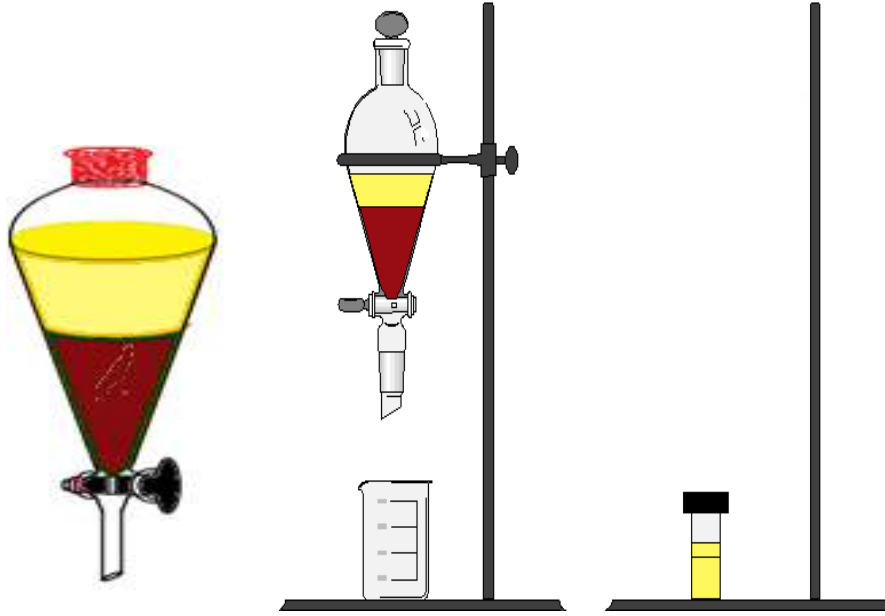
Toz haline getirilmiş çam kabuğu örneklerinden her bir tür için $20,000 \pm 0.020$ g'lık 3 paralel örnek tartılmıştır. Tartılan örnekler 150 mL kaynayan su içerisine alınmıştır (Şekil 3.2). Kaynayan suda 10 dakika ekstrakte edildikten sonra oda sıcaklığına kadar soğumaya bırakılmıştır. Oda sıcaklığına kadar soğumuş olan ekstrakt önce santrifüjlenip daha sonra kalan süspansiyon süzülerek ayrılmıştır. Süzülerek ayrılan kıvılcımlı çözelti üzerine doygunluğa kadar tuz eklenerek yüksek molekül ağırlıklı protein vb. yapılar çöktürülmüştür. Çöken kısımlar tekrar santrifüjlendikten sonra kalan süspansiyon tanecikler süzülerek ayrılmıştır (Şekil 3.3). Elde edilen açık kıvılcımlı çözelti 25 mL etil asetat ile 3 kez ekstrakte edildikten sonra etil asetat fazları toplanmış ve etil asetat içinde kalabilecek su, sodyum sülfat ile kurutulmuştur (Şekil 3.4, 3.5, 3.6). Kalan etil asetat fazı ise vakumda argon gazı altında tamamen uçurulmuştur. Elde edilen bej kıvılcımlı katı kısım %25 (h/h)'lik metanol/su çözücüsünde çözülmüş ve buz dolabında saklanmıştır. Toplanan ekstraktlar aynı gün analiz edilmiştir.



Şekil 3.2: Toz haline getirilmiş çam kabukları ve kaynar suyla ekstraksiyon



Şekil 3.3: Ekstrakte edilen çam kabuklarının süzülmesi.



Şekil 3.4: Etil asetat ekstraksiyonu



Şekil 3.5: Etil asetat fazın argon gazı ile ve vakum altında uçurulması

3.6.4. Örneklerin Analizi

Her bir çam kabuğu örneğinden elde edilen ekstraktan 2 mL alınarak 10 mL'lik cam tüpler içerisine konulmuş ve buradan 80 µL'lik kısım alınarak cihazın 50 µL'lik loopuna enjekte edilmiştir. Ölçümler 280 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Elimizde bulunan piknogenol bileşenleri standartları için elde edilen kromatogramlar kullanılarak çam kabuğu türlerinin ekstraktlarındaki söz konusu bileşenlerin varlığı ve miktarları analiz edilmiştir. Her bir standart ve örnek için üç ölçüm alınmıştır.

4. SONUÇLAR

4.1. Pknogenol Tayini

Çam kabuklarında bulunan pycnogenol tayinini HPLC yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla cihazda ODS3 kolon kullanılmıştır. Farklı oranlarda organik çözücü içeren mobil fazlar denenmiş ve farklı akış hızlarında çeşitli kromatogramlar elde edilmiştir.

Başlangıçta pycnogenol tayini için isokratik pompa içeren HPLC ile bu tayin yapılmaya çalışılmış olumlu sonuç alabilmek için mobil faz bileşiminde optimizasyona gidilmiştir.

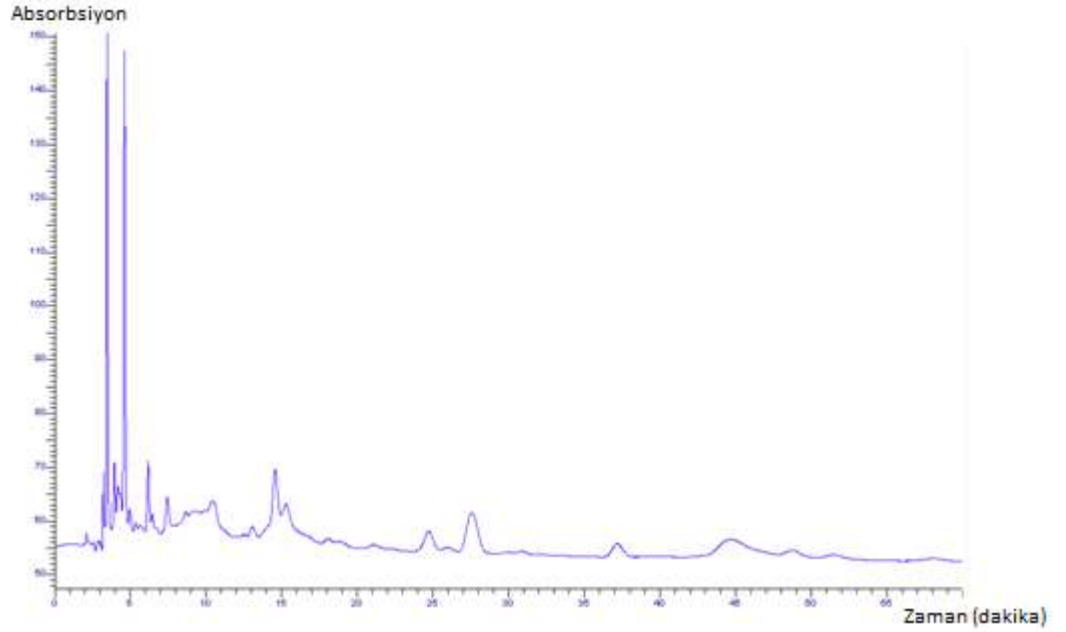
Ayrıca çam kabuğu ekstraksiyonunda ideal ürün eldesi için optimizasyon yapılmış olup bu amaçla farklı miktarlarda (3g, 5g, 10g, 20g) çam kabuğu mikserle 1 dakika öğütülmüş 150 mL kaynar su içinde ekstrakte edilmiş ve oda sıcaklığına kadar soğutulmuştur. Filtrasyondan sonra ekstrakt doyurulana kadar sodyum klorür eklenmiş çökelen kısım ayrılmıştır. Süzülen kısım üç kez etil asetat ile ekstrakte edilmiştir (10 mL ekstrakta 1 mL etil asetat olacak şekilde).

Etil asetat faz susuz sodyum sülfat ile kurutulmuş ve vakumlu evaporatörde 1/5 oranında deriştirilmiştir. Ekstrakt karıştırılarak 3 hacim kloroform içine aktarılmıştır. Proanthocyanidinler çöktürülmüş ve süzülerek ayrılmış bej renkli toz %25 (h/h) metanol içinde çözülmüştür.

ODS3 çalışma ve quard kolonu birlikte kullanılarak 210 nm dalga boyunda UV-ViS dedektör kullanılarak ölçümler alınmıştır. Mobil faz akış hızı 1 mL/dak olacak şekilde kromatogramlar alınmıştır.

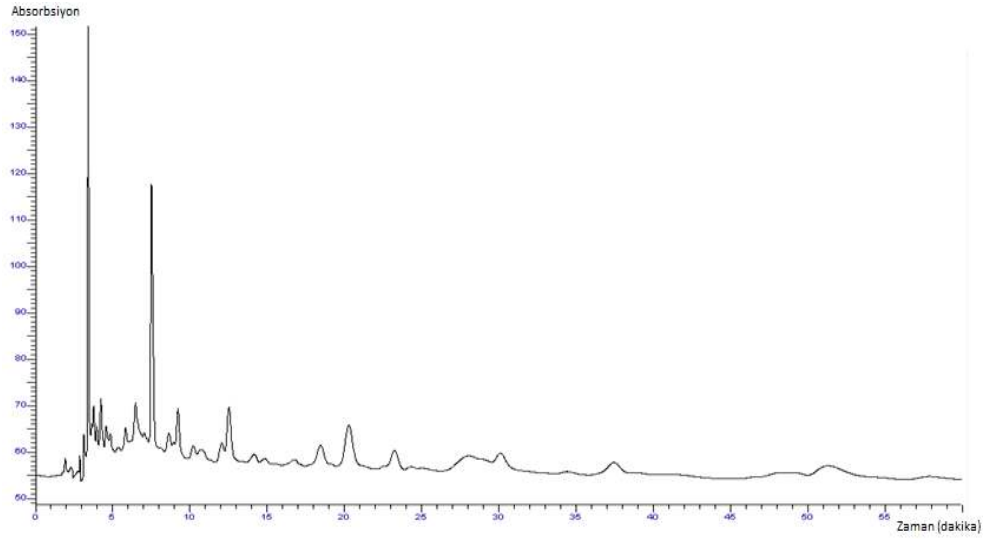
4.1.1. Optimizasyon Çalışmaları

En iyi ayırmayı sağlayacak şekilde mobil faz bileşimiyle ilgili optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Başlangıçta mobil faz bileşimi su/metanol/OFA (79.9/20/0.1) olacak şekilde kullanılmıştır. Optimizasyon çalışmalarında önce Solgar firmasından ticari olarak satın alınan çam kabuğu ekstraktı (PBE) örnek olarak kullanılmıştır. Bu şartlarda elde edilen kromatogram şekil 4.1.'de görülmektedir.



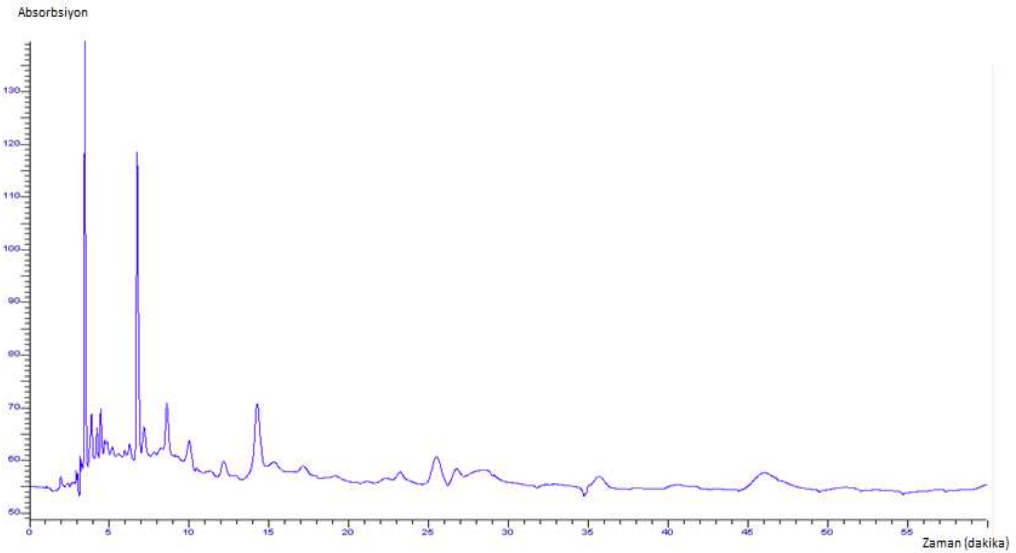
Şekil 4.1 Solgar firmasından alınan PBE'nin su/metanol/OFA (79.9/20/0.1) mobil faz şartlarına ait kromatogramı.

Su/metanol/OFA (79.9/20/0.1) hareketli faz bileşimiyle yapılan ayırma yeterince iyi olmadığı için orto fosforik asit yüzdesi 0.05 olacak şekilde deney tekrarlanmıştır. Bu şartlarda elde edilen kromatogram şekil 4.2'de görülmektedir.



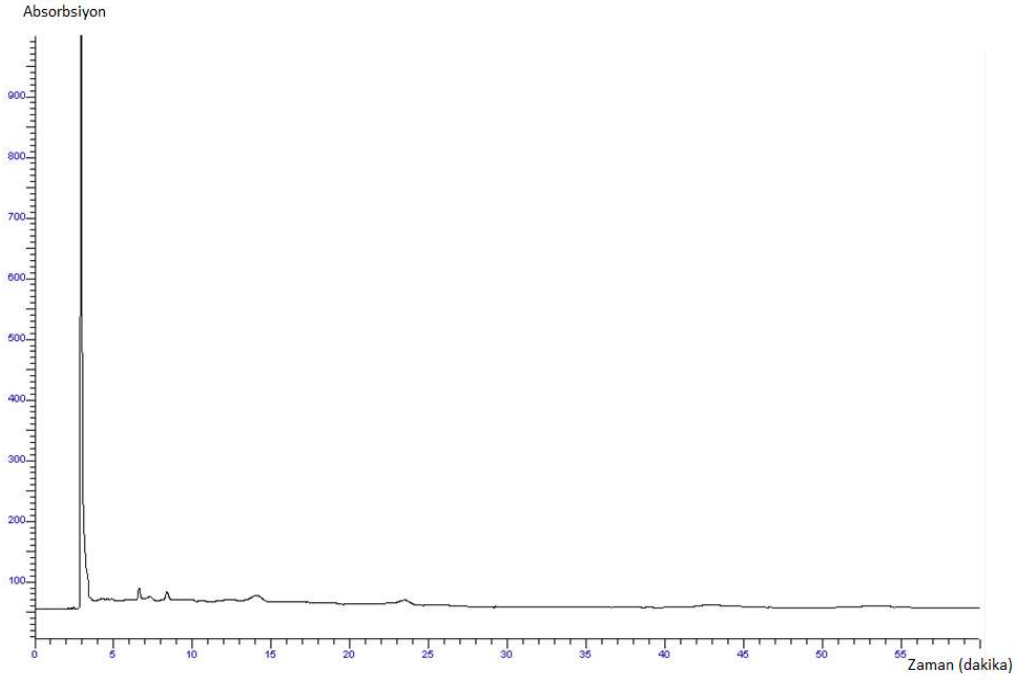
Şekil 4.2 Solgar PBE analizi için 20.05/79.9/0.05 -- su/metanol/OFA şartlarına ait kromatogram

Bu çözücü bileşiminde de kromatogramda piknogenol bileşenlerine ait beklenen ayırmanın gerçekleşmediği görülmektedir. Bu ayırmayı istenen seviyeye dönüştürmek amacıyla çözücü bileşiminde optimizasyona devam edilmiştir. Buna göre ilk önce OFA miktarı %0.02 ye indirilerek (değişim su ile OFA arasında yapılmış metanol miktarına dokunulmamıştır) analiz yapılmıştır. Bu şekilde yapılan analiz sonucunda Şekil 4.3.'de görülen kromatogram elde edilmiştir.



Şekil 4.3 Solgar PBE analizi için 20.08/79.9/0.02 -- su/metanol/OFA şartlarına ait kromatogram

Kromatogramda OFA miktarının pik dağılımını etkilediği ancak istenen ayırmayı sağlamadığı görülmektedir. Hareketli faz bileşenlerinden OFA oranında yapılan değişikliklerin ayırmada önemli bir performans sağlamadığı tespit edilmiştir. Bunun üzerine çözücü etkisini denemek amacıyla Solgar çam kabuğu ekstraktına uygulanan genel ekstraksiyon işlemlerinin sonunda elde edilen katı kısım %25 metanol çözeltisi yerine saf metanolde çözülmüştür. Aynı taşıyıcı faz kullanılarak (20.08/79.9/0.02 -- su/metanol/OFA) saf metanolde çözülmüş numune enjekte edilmiş ve Şekil 4.4.'deki kromatogram elde edilmiştir.

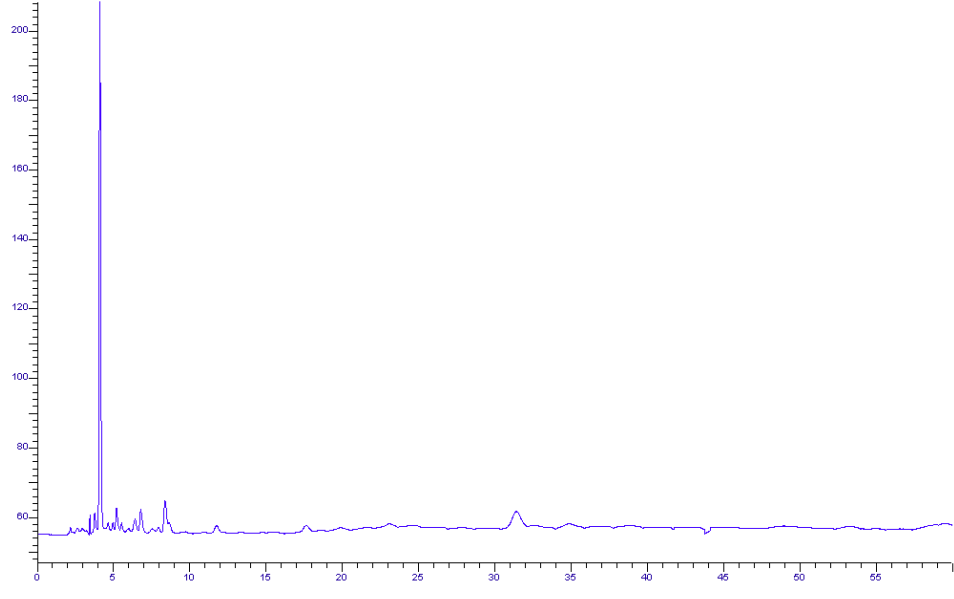


Şekil 4.4 Solgar PBE ekstraksiyonunun saf metanolde çözülmesi sonucu elde edilen kromatogram.

Alınan kromatogramda bileşenlere ait piklerin tek bir büyük pik olarak toplandığı ve bileşenlerin ayrılmadığı görülmüştür.

Solgar firmasından alınan çam kabuğu ekstraktı örneği yerine GNC firmasından satın alınan çam kabuğu ekstraktı yukarıda verdiğimiz şekilde ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuş elde edilen bej renkli katı kalıntı saf metanolde çözülmüştür. Hazırlanan örnek, aynı taşıyıcı faz kullanılarak (20.08/79.9/0.02 -- su/metanol/OFA) analizlenmiştir. Burada da piklerin büyük kısmının tek bir pik verecek şekilde toplandığı görülmüştür.

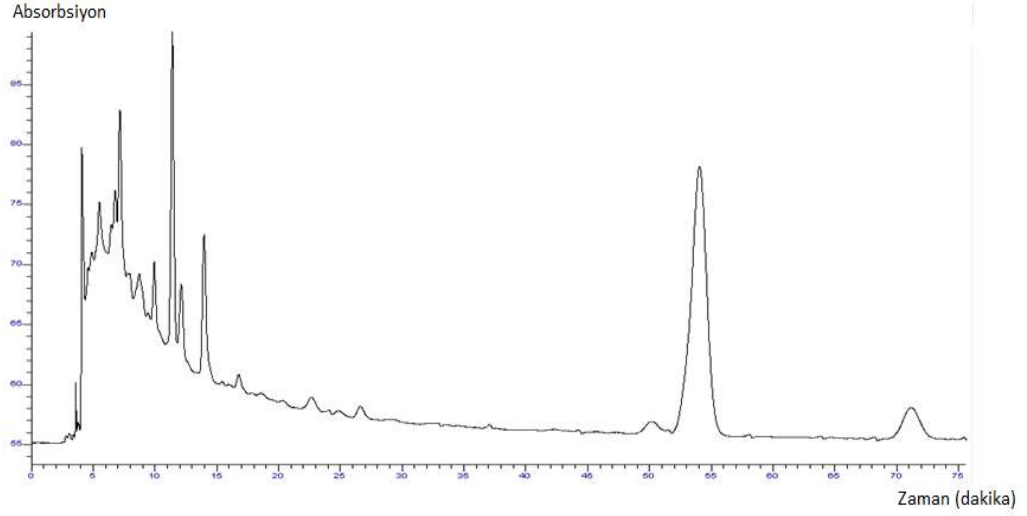
Bunun üzerine GNC firmasından satın alınan PBE kapsülü içerisindeki çam kabuğu ekstraktı hiçbir ekstraksiyon işlemi uygulanmadan doğrudan saf metanolde çözülmüş ve cihaza enjekte edilmiştir. Elde edilen kromatogram Şekil 4.5.'de verilmiştir.



Şekil 4.5 Saf metanolde çözülmüş GNC firmasından temin edilen çam kabuğu ekstraktına ait kromatogram.

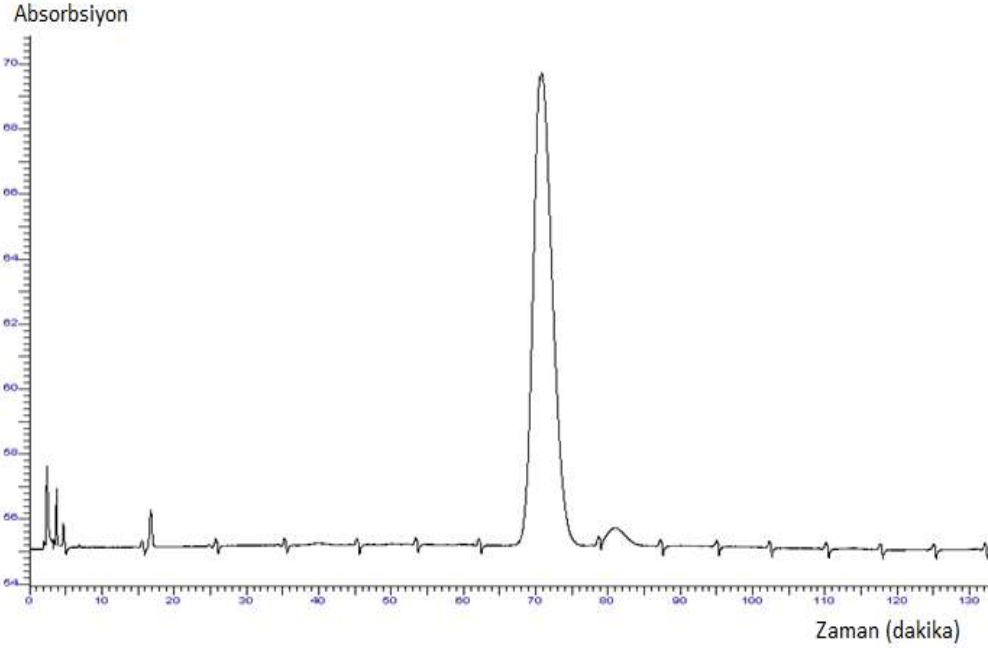
Burada da türlerin tek bir yerde çıktığı ve ayrılmadığı tespit edilmiştir. Bu durum çözgen olarak metanolün kullanılması halinde ayırmanın olmadığını göstermiştir. Bu sonuçlar, çalışmanın çözücü olarak su-metanol karışımı ile yapılmasının daha doğru olacağını göstermektedir. Bu nedenle standart karışımları ve bu çalışmada kullanılan çam kabuklarının ekstraksiyonundan elde edilen ekstraktların (%25 metanol'de çözülmesiyle elde edilen örnekler) hareketli faz sisteminde kullanılan su ve metanol yüzdesi değiştirilerek en iyi ayırma elde edilene kadar denemeler yapılmış ve çeşitli kromatogramları alınmıştır. Bu optimizasyonlara ilişkin kromatogramlar Şekil 4.6, 4.7, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12 ve 4.13.'de görülmektedir.

Manisa bölgesinden toplanan karaçam kabuğu örneklerinin ekstraksiyonundan elde edilen ekstraktın %25 metanol'de çözülmüş örneğin 10/89.9/0.1 --su/metanol/OFA hareketli faz şartlarına ait kromatogramı Şekil 4.6.'de verilmiştir.



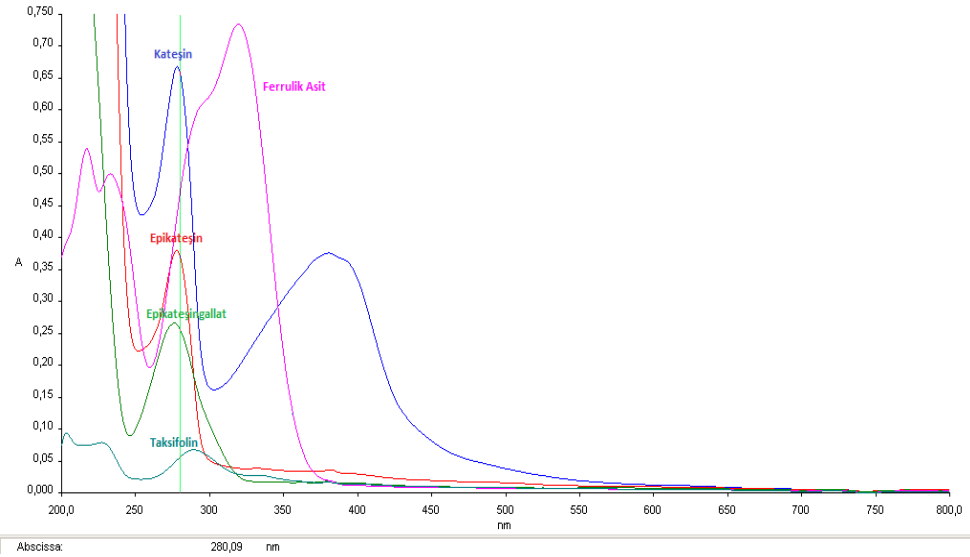
Şekil 4.6 Karaçam kabuğu ekstraktı, 10/89.9/0.1 -- su/metanol/OFA-- şartlarına ait kromatogram.

Bu deneyler çok sayıda tekrarlanmış olup buna göre hareketli fazdaki su yüzdesi arttıkça piklerin geciktiği, metanol yüzdesi arttıkça ise piklerin çakıştığı tespit edilmiştir. Hareketli faz bileşimi olarak 10/89.9/0.1 -- su/metanol/OFA karışımı mobil faz olarak kullanıldığında Şekil 4.6.'daki kromatogram elde edilmiştir. Kromatogramın sol tarafındaki çakışmalardan kurtulabilmek amacıyla su yüzdesini arttırılmış bunun sonucu hem standartların hem de örnek içindeki maddelerin alıkonma zamanlarının çok fazla arttığı gözlenmiştir (şekil 4.7.).



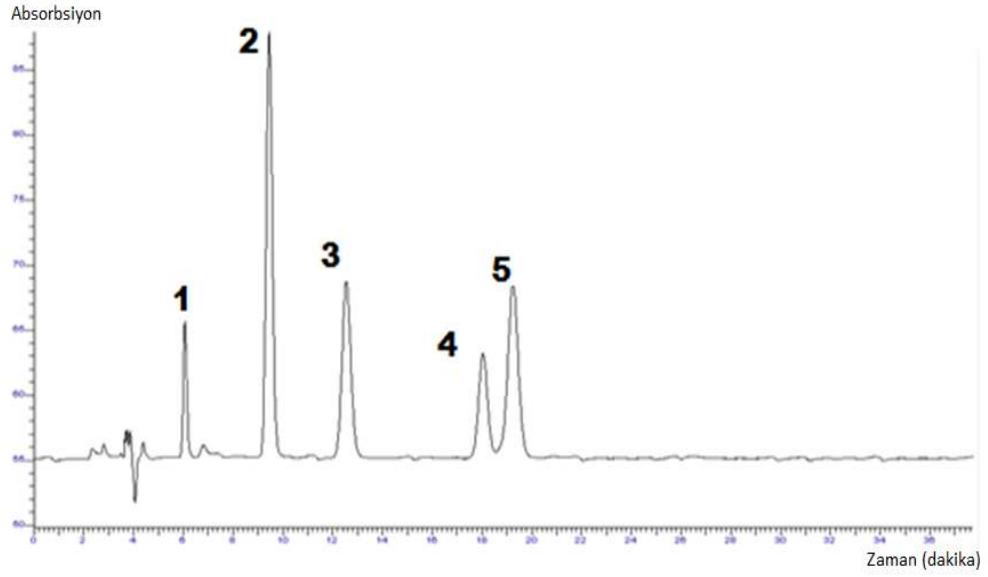
Şekil 4.7 210 nm'de kateşin standardı için ard arda 2 kez enjeksiyon yapılmıştır. Kateşinine (10/89.9/0.1 --- su/metanol/OFA) ait kromatogram.

Hareketli fazdaki su yüzdesi artırılarak yapılan çalışmalarda kateşin standardının çıkma süresi 70 dakikayı bulmuştur (Şekil 4.7). Ayrıca çalışmalarda 210 nm dalga boyu kullanıldığı zaman piklerde düzensizlik olduğu ve baseline'da bozulma ve tekrarlanabilirlikte sorunlar çıktığı görülmüştür. Ayrıca dedektörün dengeye zor gelmesi nedeniyle UV'de piknogenol bileşenleri ile daha farklı bir dalga boyunda çalışabilmek amacıyla maksimum dalga boyu taraması yapılmıştır. Kateşin ve epikateşin için 280 nm, epikateşingallat için 278 nm, ferrulik asit için 296 nm ve 324 nm (maksimum dalga boyu) ve taksifolin için 288 nm dalga boyu değerleri bulunmuştur. Tüm bileşenler için ortak olarak uygun olan 280 nm çalışma dalga boyu seçilmiş ve bundan sonraki çalışmalarda 210 nm yerine 280 nm kullanılmıştır. (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8: Kateşin, epikateşin, epikateşingallat, ferrulik asit ve taksifolin için UV'de yapılan maksimum dalga boyu taraması.

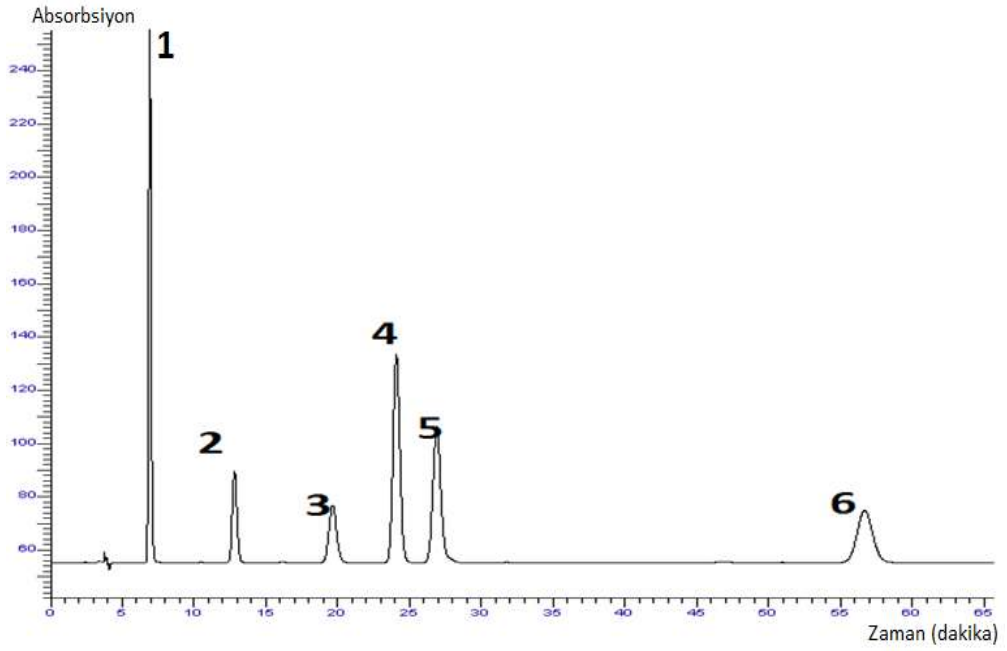
250 mL %32 (h/h)'lik metanol su ve 0,1 mL OFA içeren hareketli fazın kullanıldığı ve 10 ppm olacak şekilde %25 (h/h) metanol su içerisinde çözülmüş gallik asit, kateşin, epigallokateşin gallat, vanilik asit ve kafeik asit standartlarının karışımına ait 280 nm'de alınan kromatogram Şekil 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.9 Piknogenol bileşenlerinin standart çözeltisinin 280 nm'de kromatogramı. Mobil faz olarak 250 mL içinde 0.1 mL OFA içeren %32'lik metanol-su karışımında; (1-Gallik Asit, 2-Kateşin,3-EpiGalloKateşin Gallat, 4-Vanilik Asit, 5-Kafeik Asit).

Şekil 4.9.'de görüldüğü gibi mobil faz olarak 250 mL içinde 0.1 mL OFA içeren %32'lik metanol-su karışımı kullanılarak standartların analizine yönelik yapılan isokratik çalışmalarda, 5 standart için başarılı sonuçlar elde edilmiş ve alıkonma zamanları 20 dakikanın altına çekilebilmiştir.

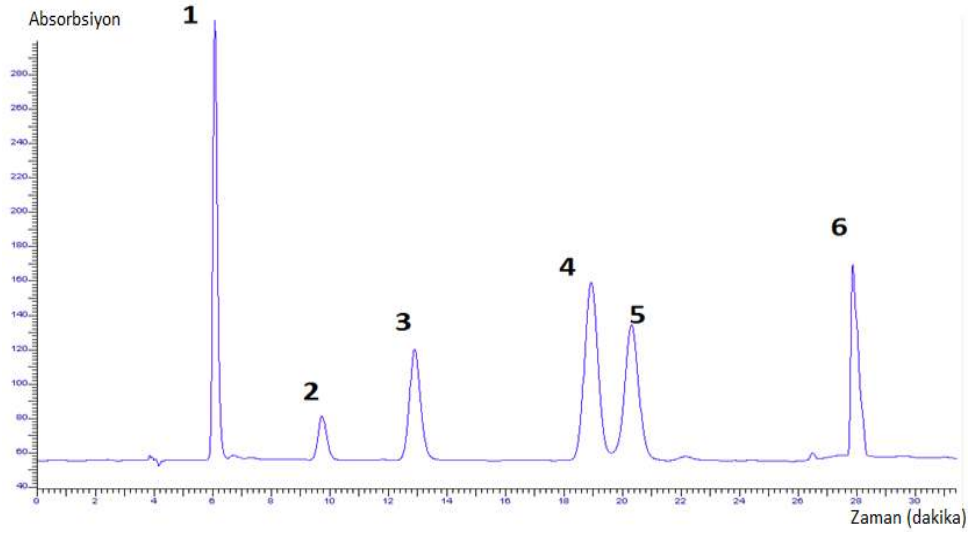
Vanilik asit ve kafeik asitin daha iyi ayrılabilmesi için metanol %30'a düşürüldüğünde (Mobil fazlı olarak %30 MeOH-%0.04OFA-Su karışımı) ve çalışmaya ferulik asit eklendiğinde toplam süre bir anda 55 dakikanın üzerine çıkmıştır (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 280 nm’de, mobil faz olarak 250 mL içinde 0.1 mL OFA içeren %30’lik metanol-su karışımında; (1-Gallic Acid, 2-Catechin, 3-EpiGalloCatechinGallate, 4-Vanilic A., 5-Caffeic A., 6-Ferulic A.)

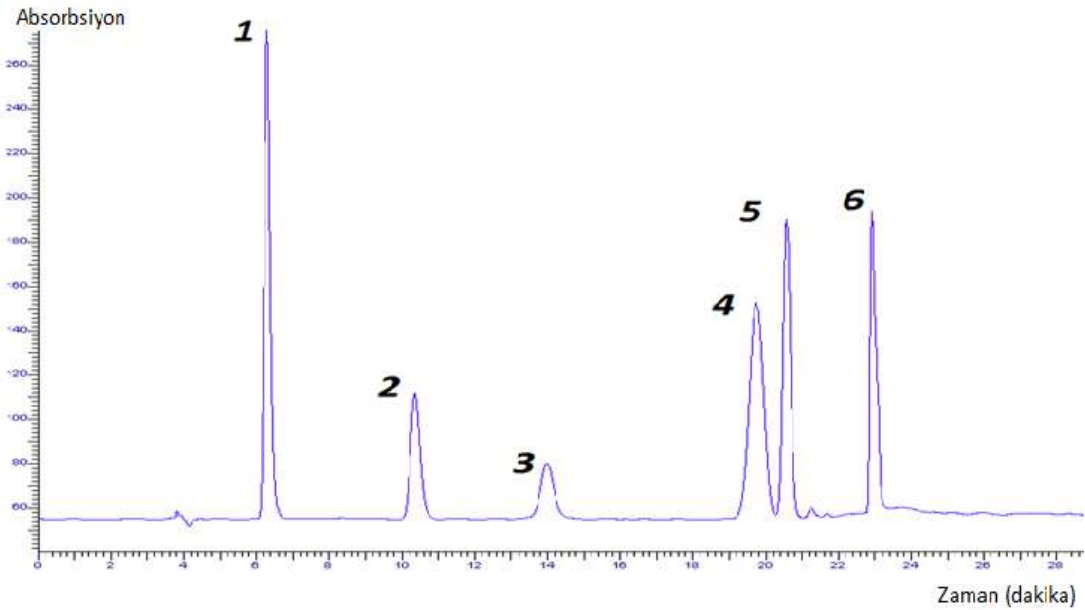
Şekil 4.10.’da görüldüğü gibi ferrulik asite ait (6 numaralı pik) çok geç geldiği için isokratik sistemle bu tayinin çok uzun süre alacağı görülmüştür. Bu sorunu gidermenin yolu gradient pompa kullanılarak hareketli faz programlamasının gerekli olduğu ortaya çıkmış olup bundan sonra çalışmalar gradient sistem kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Aynı çalışma gradient sistem kullanılarak gerçekleştirilmiş ve 1 mL/dak. akış hızında 21 dakika %0.1 OFA içeren %68 su- %32 metanol fazı geçirildikten sonra %0.1 OFA içeren saf metanol fazı geçirilmiş ve bu şartlarda çok daha hızlı sonuç alındığı görülmüştür. Böylece son pik daha öne çekilebilmiştir. Elde edilen kromatogram Şekil 4.11.’da görülmektedir. Ayırmanın başarılı olduğu ve son standardın (ferrulik asit) 28 dakikada çıktığı tespit edilmiştir.



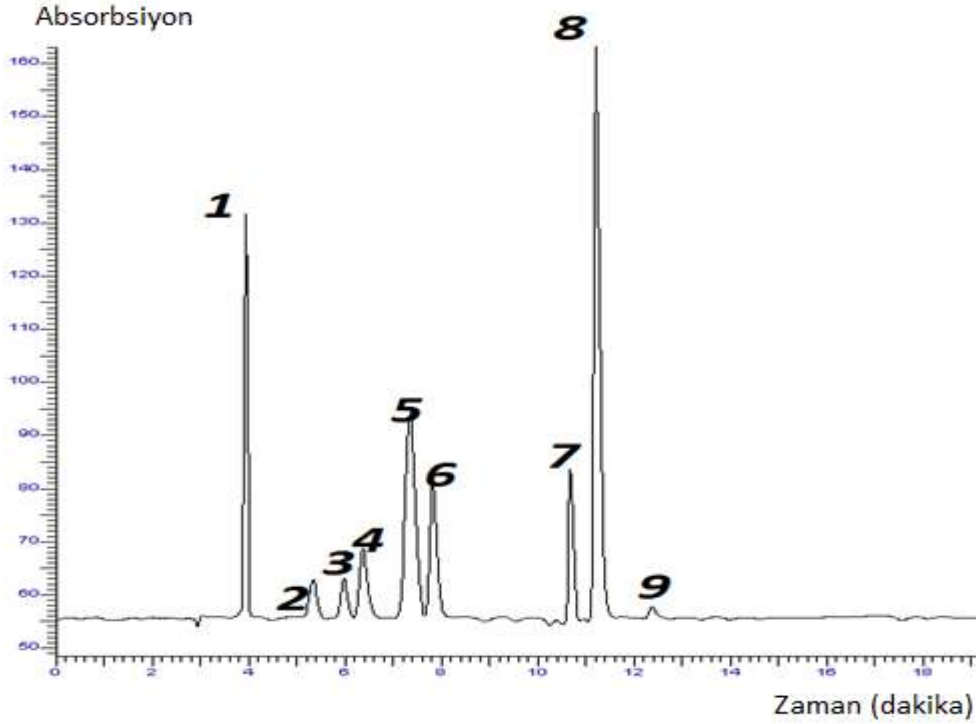
Şekil 4.11 %0.1 OFA içeren %68 su- %32 metanol fazı ile başlanan gradient elüsyonda, Piknogenol standart çözeltilerinin karışımına ait kromatogram;
1-Gallic Acid, 2-Catechin, 3-EpiGalloCatechinGallate, 4-Vanilic A., 5-Caffeic A., 6-Ferulic A.

Daha sonra gradient sistem üzerinde yapılan çeşitli optimizasyonlar sonucunda standartlara ait en son pik 23.20 dakikaya çekilebilmiştir. % 0.1 OFA içeren Su (A) ve Metanolden (B) oluşan hareketli faz sistemi için 13 dakika %68 A-%32 B fazı geçirilmiş daha sonra 5 dakika içinde %10 A-%90 B olacak şekilde hareketli faz ayarlanmış ve 8 dakika daha %10 A-%90 B fazı geçirilerek sistem kapatılmıştır. Bu çalışma sonucu elde edilen kromatogram Şekil 4.12.'de görülmektedir.



Şekil 4.12 Piknogenol standart çözeltilerinin karışımına ait kromatogram. 1-Gallic Acid, 2-Catechin, 3-EpiGalloCatechinGallate, 4-Vanilic A., 5-Caffeic A., 6-Ferulic A.

3. ve 4. piklerin arasındaki süreyi azaltmak yani toplam analiz zamanını kısaltmak için yüksek metanol yüzdesiyle başladığımızda tüm piklerin 15 dakikaya sıkıştığı ve yeterince ayırma olmadığı gözlenmiştir. 13. dakikadan sonra metanol yüzdesini %100 yaptığımızda bile sonucun değişmediği görülmüştür. Bu durum ilk dakikalarda kullanılan hareketli fazın tüm piklerin alıkonma zamanları üzerine çok büyük etkisi olduğunu göstermektedir. Buradan yola çıkılarak çalışmada kullanılan 6 standarda ilave olarak 3 standart daha (epikateşin, taksifolin,epikateşin gallate) eklenerek yapılan yoğun çalışmalar sonucunda standartlara ait tüm piklerin 13 dakika içinde çıktığı tespit edilmiştir (Şekil 4.13).

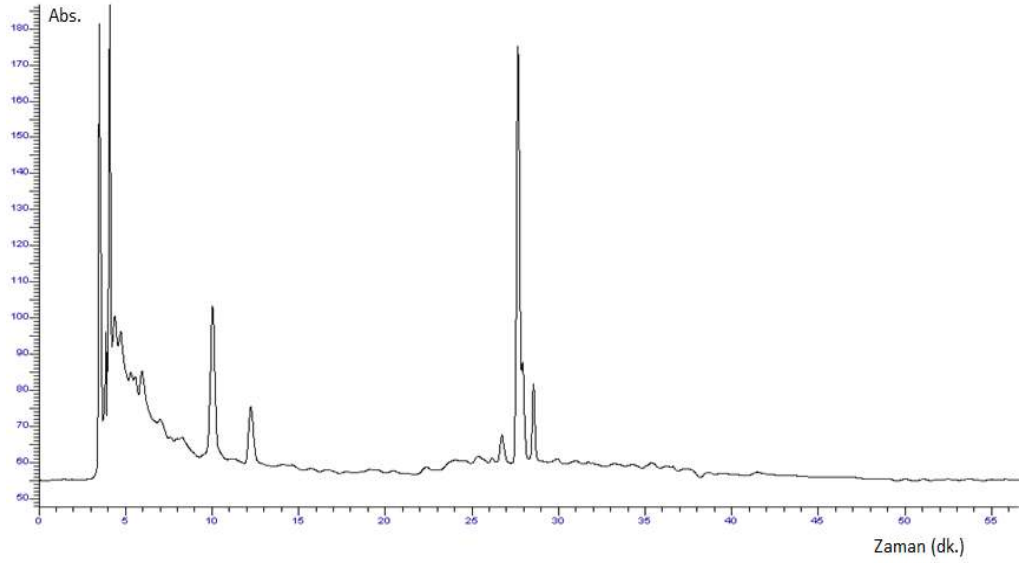


Şekil 4.13 Piknogenol standart çözeltilerinin karışımına ait kromatogram. 1-Gallik. A., 2-Kateşin, 3- Epikateşin, 4- E.P.C.G., 5- Vanilik A., 6- Kafeik A., 7- Ferulik A., 8- Taxifolin, 9- Epi.Cat. Gal

Buna göre 9 farklı standart karışımının ayrılması için hareketli faz bileşimi ve gradient elüsyon programı; %0.1 OFA içeren saf su (A) ve %0.1 OFA içeren metanol (B) den yola çıkılarak ilk 4 dakika %80(A)-%20(B) fazı geçirilmiş daha sonra 4.4 dakika içinde %81.8(A)-19.2(B) olacak şekilde ayarlanmış, 8.8.dakikadan sonra 4 dakika içinde %60(A)-

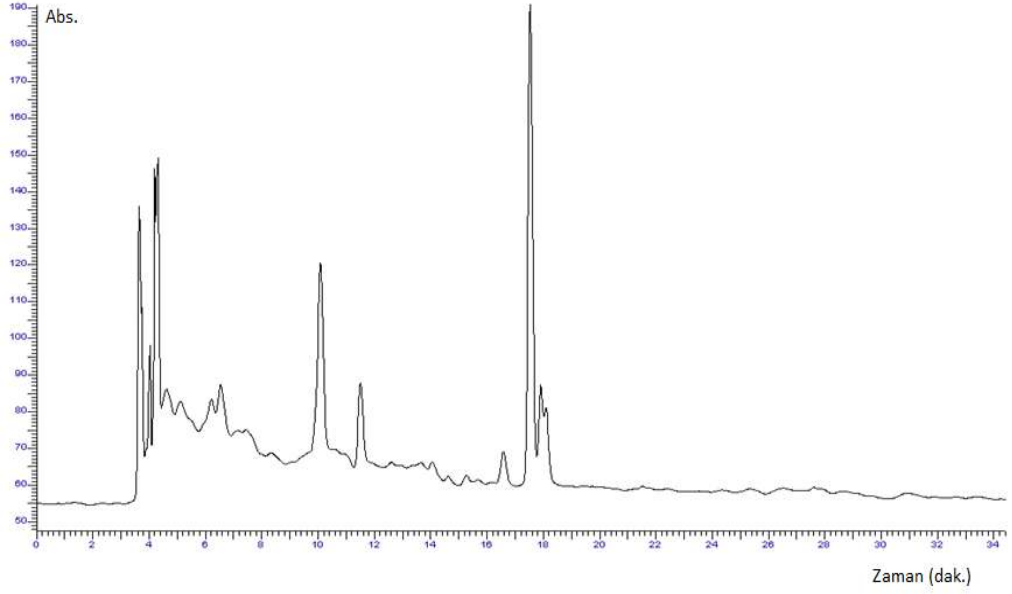
40(B) olarak ayarlanmış ve 12.8 dakikadan sonra 2 dakika daha sabit olacak şekilde hareketli faz geçirilerek tamamlanmıştır.

Standartların ayrılmasından sonra örnek analizinin optimizasyonu için Karaçam kabuğu ekstraktı analizlenmiştir. Bu amaçla hareketli faz; A fazı için %0.1 OFA içeren su, B fazı için %0.1 OFA içeren metanol kullanılmıştır. İlk 15 dakika (A)%68-(B)%32 karışımı geçirilmiştir.. Daha sonra 15 dakika süreyle (A)%90-(B)%10 olacak şekilde hareketli faz geçirilmeye devam edilmiştir. 30 dakika sonunda 10 dakika boyunca (A)%50-(B)%50 oranında faz geçirilerek kolon temizlenmiştir. Bu şartlarda karaçam kabuğunun ekstraksiyonunun analizinde beklenen ayrımlar elde edilememiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14 Karaçam kabuğu ekstraktına ait kromatogram.

Bunun üzerine gradient elüsyon programında değişikliğe gidilmiştir. Bu amaçla hareketli faz; A fazı için %0.1 OFA içeren su, B fazı için %0.1 OFA içeren metanol kullanılmıştır. İlk 2 dakika (A)%68-(B)%32 karışımı geçirilmiş, daha sonra 10 dakika süreyle (A)%90-(B)%10 olacak şekilde hareketli faz geçirilmeye devam edilmiştir. 12 dakika sonunda 10 dakika boyunca (A)%50-(B)%50 oranında faz geçirilerek kolon temizlenmiştir. Bu şartlarda da kromatogramda görüldüğü gibi (Şekil 4.15) beklenen ayırma gerçekleşmemiştir.

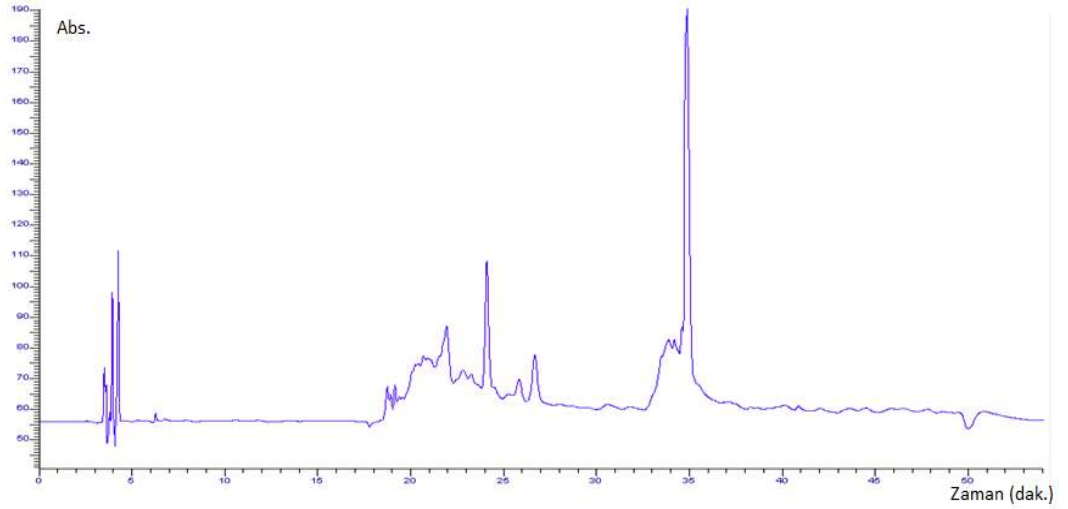


Şekil 4.15 Karaçam Kabuğu Ekstraktına ait kromatogram.

Bu şartlarda piklerin toplam geliş süresi 30 dakikadan 18 dakikaya indirilmiş ancak bazı piklerde çakışmalar gözlenmiştir (Şekil 4.15.).

Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda standartlara uygulanan hareketli faz bileşiminin örnek için uygun olmadığı tespit edilmiştir. Kromatogramda yer alan piklerin çalıştığımız şartlarda çok sıkıştığı görülmüş daha iyi bir ayırma için alıkonma zamanlarının uzatılması amaçlanmış ve hareketli faz bileşimi ve gradient elüsyon programında optimizasyona devam edilmiştir.

Karaçam kabuğu örneği için literatürde uygulanan hareketli faz bileşimi dikkate alınarak farklı elüsyon programları denenmiştir. Bu amaçla A fazı %0.1 OFA içeren su, B fazı %0.1 OFA içeren metanol olmak üzere; ilk 10 dakika (A)%95-(B)%05 karışımı geçirilmiş daha sonra 3 dakika içinde oran (A)%68-(B)%32 değişecek şekilde fazlar ayarlanmış ve bundan sonra 13 dakika boyunca (A)%68-(B)%32 fazı geçirilmeye devam edilmiştir. 26. dakikadan sonra metanol (B) fazı oranı daha da arttırılarak oranlar 3 dakika içinde (A)%10-(B)%90 olacak şekilde ayarlanmıştır. 15 dakika daha bu faz geçirilerek kolon temizlenmiştir (Şekil 4.16).

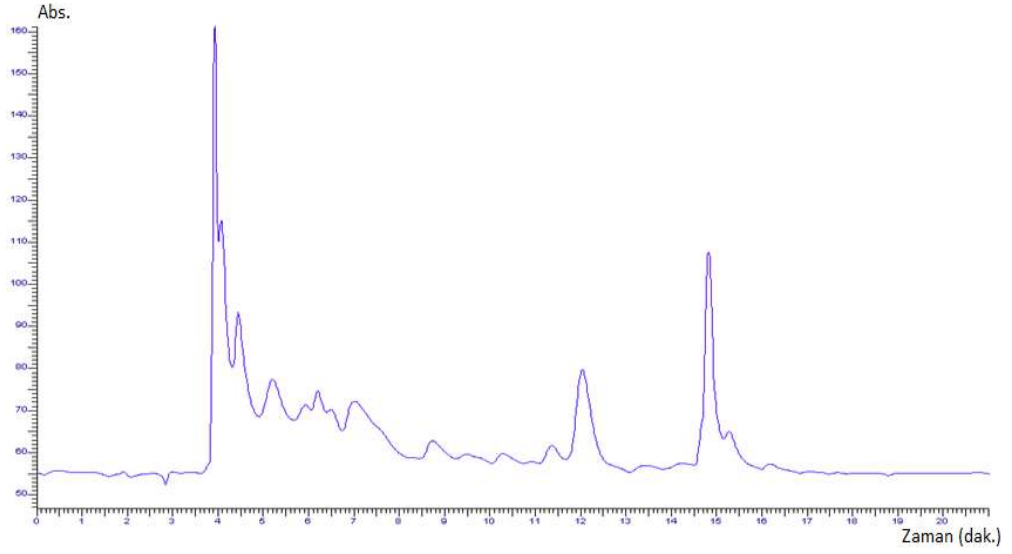


Şekil 4. 16: Karaçam kabuğu ekstraktına ait kromatogram.

Söz konusu çalışma şartlarında alıkonma zamanları uzamasına karşın ayırmanın hiç sağlanamadığı görülmüştür (Şekil 4.16).

Mobil faz olarak su ile birlikte metanol yerine literatürde sıklıkla kullanılan asetonnitrilin etkisini görmek amacıyla su-asetonitril hareketli faz sisteminin denenmesine karar verilmiştir.

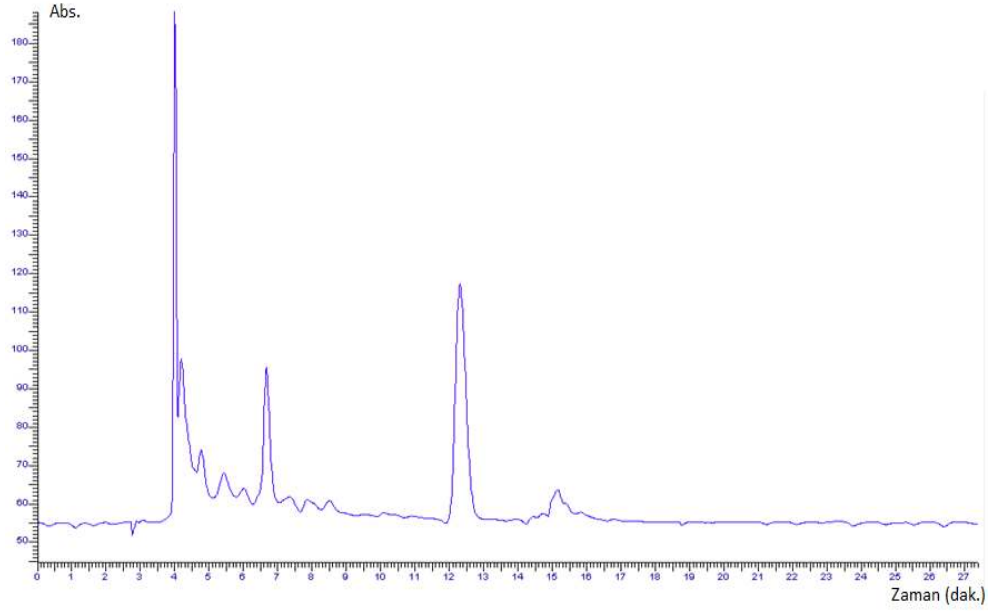
Bu amaçla hareketli faz; A fazı için %0.1 OFA içeren su, B fazı için %0.1 OFA içeren asetonnitril kullanılmıştır. İlk 4 dakika (A)%77-(B)%23 karışımı geçirilmiştir. Daha sonra 4.4 dakika süreyle (A)%77.8-(B)%21.2 olacak şekilde hareketli faz geçirilmeye devam edilmiştir. 8.8 dakikının sonunda 2 dakika içinde (A)%60-(B)%40 hareketli faza dönüşecek şekilde ayarlanmış ve 4 dakika daha bu faz geçirilmiştir. Elde edilen kromatogram Şekil 4.17’da verilmiştir.



Şekil 4.17: Karaçam Kabuğu Ekstraktına ait kromatogram.

Söz konusu şartlarda da istenilen ayırma sağlanamamıştır (Şekil 4.17).

Üstte yer alan hareketli faz bileşimi ve elüsyon programı kızılçam kabuğu ekstraktına da uygulanmıştır. Bu amaçla hareketli faz; A fazı için %0.1 OFA içeren su, B fazı için %0.1 OFA içeren asetonitril kullanılmıştır. İlk 4 dakika (A)%77-(B)%23 karışımı geçirilmiştir. Daha sonra 4.4 dakika süreyle (A)%77.8-(B)%21.2 olacak şekilde hareketli faz geçirilmeye devam edilmiştir. 8.8 dakikanın sonunda 2 dakika içinde (A)%60-(B)%40 hareketli faza dönüşecek şekilde ayarlanmış ve 4 dakika daha bu faz geçirilmiş ve elde edilen kromatogram Şekil 4.18.'de verilmiştir.

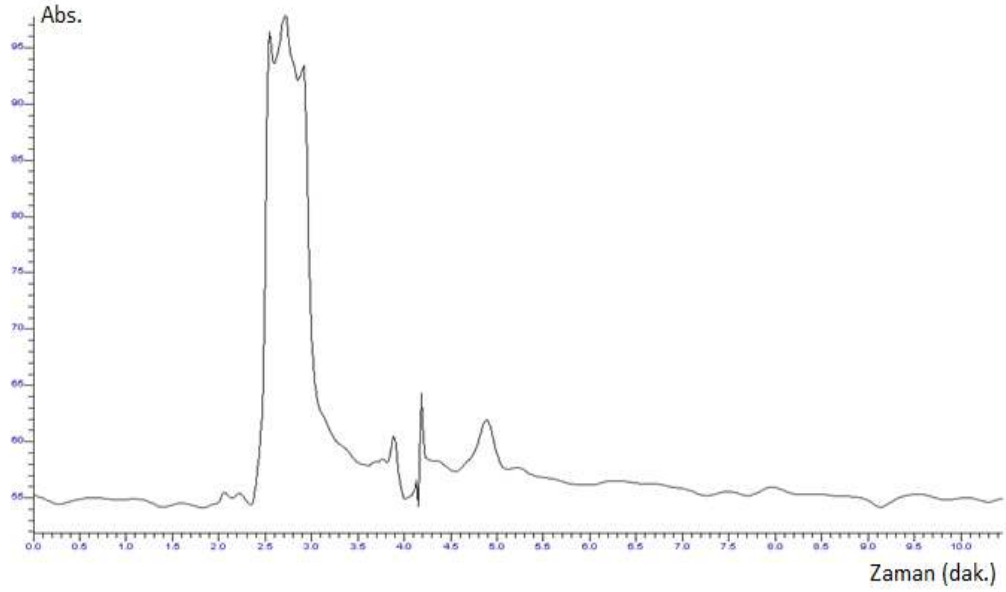


Şekil 4.18 Kızılçam Kabuğu Ekstraktına ait kromatogram.

Kızılçam kabuğu ekstraktına ait kromatogramda da ilk 10 dakika içerisinde kolondan çıkan bileşenler için sağlıklı ayırmanın olmadığı görülmektedir (Şekil 4.17). Asetonitrilin ayırmada önemli bir fark oluşturmaması nedeniyle hareketli faz bileşiminin yeniden (A) %0.1 OFA içeren su ve (B) %0.1 OFA içeren metanol olmasına karar verilmiştir..

Solgar ve GNC ekstraktlarının çözeltiye alınması amacıyla kullanılan metanol, çam kabuğu ekstraktlarının çözeltiye alınması amacıyla da kullanılarak üstte yer alan hareketli faz bileşimi ve elüsyon programı kullanılarak örnekler (karaçam, kızılçam) analizlenmiştir.

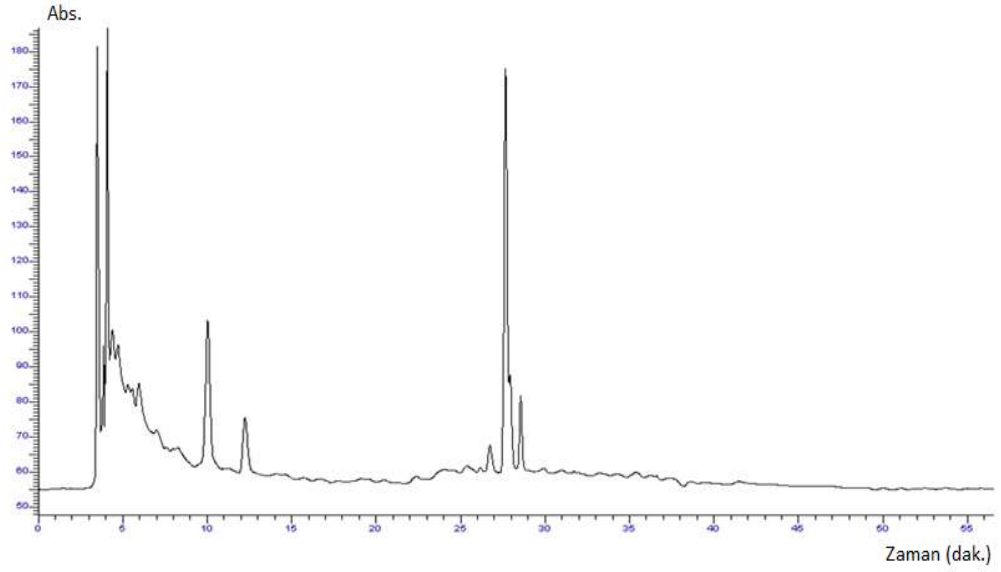
Bu amaçla hareketli faz; A fazı için %0.1 OFA içeren su, B fazı için %0.1 OFA içeren metanol kullanılmıştır. İlk 4 dakika (A)%77-(B)%23 karışımı geçirilmiştir.. Daha sonra 4.4 dakika süreyle (A)%77.8-(B)%21.2 olacak şekilde hareketli faz geçirilmeye devam edilmiştir. 8.8 dakikanın sonunda 2 dakika içinde (A)%60-(B)%40 hareketli faza dönüşecek şekilde ayarlanmış ve 4 dakika daha bu faz geçirilmiştir. Elde edilen kromatogram Şekil 4.19.'de verilmiştir.



Şekil 4.19 Ekstraksiyon sonrası saf metanolde çözülmüş Karaçam kabuğu ekstraktına ait kromatogram.

Kromatogramda görüldüğü gibi ekstraktın saf metanolde çözülmesi de ayırmayı yeterince sağlamadığı gibi bileşenlerin ilk anda bir arada gelmesine yol açmıştır. Bu durumu gidermek amacıyla çözme aşaması için çeşitli metanol-su karışımları denenmiş ve en iyi ayırmanın gradient elüsyonun başlangıcında kullanılan hareketli faza en yakın bileşimde (%25 metanol-%75 su) çözücü kullanıldığında sağlanmıştır. Bundan sonraki çalışmalarda ekstrakt %25 metanol-%75 su karışımında çözülerek cihaza enjekte edilmiş, hareketli faz bileşimi ve gradient elüsyon programı optimizasyonuna devam edilmiştir. Bu çalışmalardan birinde:

A: %0.1 OFA içeren su, B: %0.1 OFA içeren metanol olarak hazırlanmış, 15 dakika boyunca %68(A)-%32(B) fazları geçirilmiş daha sonra 15 dakika içinde gradient elüsyon %10(A)-%90(B) olacak şekilde programlanmıştır. Kolonu temizlemek amacıyla son 10 dakika hareketli faz %50(A)-%50(B) bileşiminde olacak şekilde geçirilmiştir.



Şekil 4.20 Karaçam kabuğu ekstraktına ait kromatogram

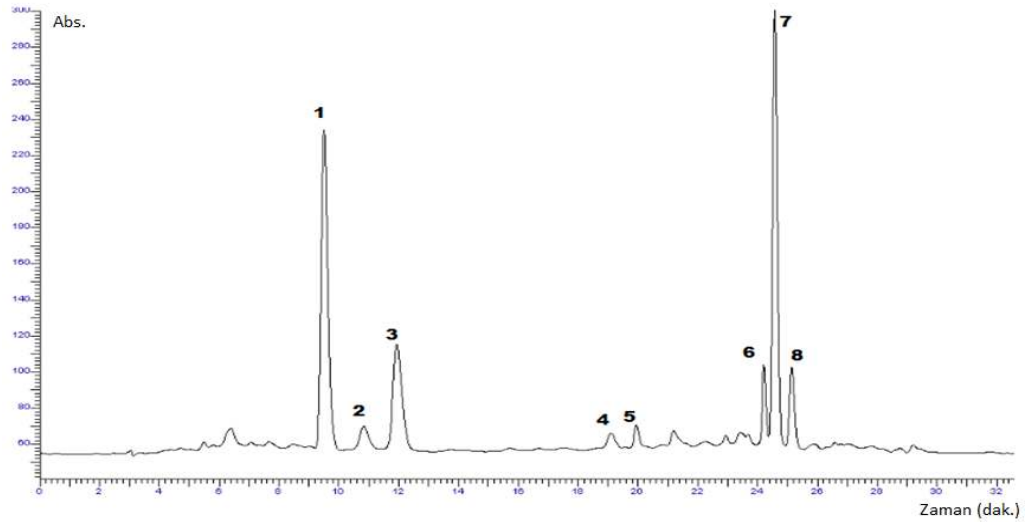
Bu şartlarda elde edilen kromatogram Şekil 4.20.'de verilmiştir. İlk 10 dakikadaki yoğunlaşmanın yine bertaraf edilemediği görülmektedir. Aynı çakışmalar diğer çam kabuğu ekstraktlarında da gözlemlenmiştir. Gradient elüsyon şartlarının değiştirilmesine rağmen problem çözülememiştir. Yaptığımız çalışmalar sonucunda, ekstraksiyonun son aşamasında elde edilen bej renkli katı toz karışımın, vakum sistemiyle yapılan süzme işlemi sırasında çok miktarda havayla teması sonucunda oksitlendiği veya oligomerleştiği gözlemlenmiştir. Süzme işlemi pompa kullanılmadan yapıldığında, ise süzüntünün kuruması için uzun süre geçmesi nedeniyle kurumaya başlayan bej renkli toz karışımın yine havayla etkileşimi sonucu oksitlendiği ve renginin kahverengine döndüğü tespit edilmiştir. Yaptığımız literatür çalışmaları da bizi desteklemekte olup, bu olaya literatürde "browning" (kahverengileşme) denilmektedir.

Çalışmamızın ekstraksiyon prosedüründe bu aşamadan sonra değişikliğe gidilmiştir. Etil asetat su ekstraksiyonundan sonra evaporatöre verilen ve daha sonra kloroform eklenerek çöktürülen karışım evaporatöre verilmemiş, etil asetat faz havasız ortamda argon gazı altında uçurulmuş ve elde edilen bej renkli toz kısım %25 metanol içeren sulu çözeltide çözülmüştür. Bu şekilde elde edilen örnek çözeltisi cihaza enjekte edilmiştir. Bu sayede hem evaporatör aşamasında bileşenlerin ısıtılmasına gerek kalmamış hem de antioksidan özellik taşıyan ekstraktın hava ile temas etmesi önlenmiştir. Böylece örneklerde gözlenen kahverengileşme ya da oksitlenme giderilmiştir. Argon gazı geçirilerek vakum altında etil asetatın uçurulması ve piknogenol bileşenlerinin toplanması için kullanılan düzenek şekil 4.21'dedir..



Şekil 4.21: Argon gazı altında etil asetat fazın uçurulmasına ve piknogenol bileşenlerinin toplanmasına ilişkin düzenek.

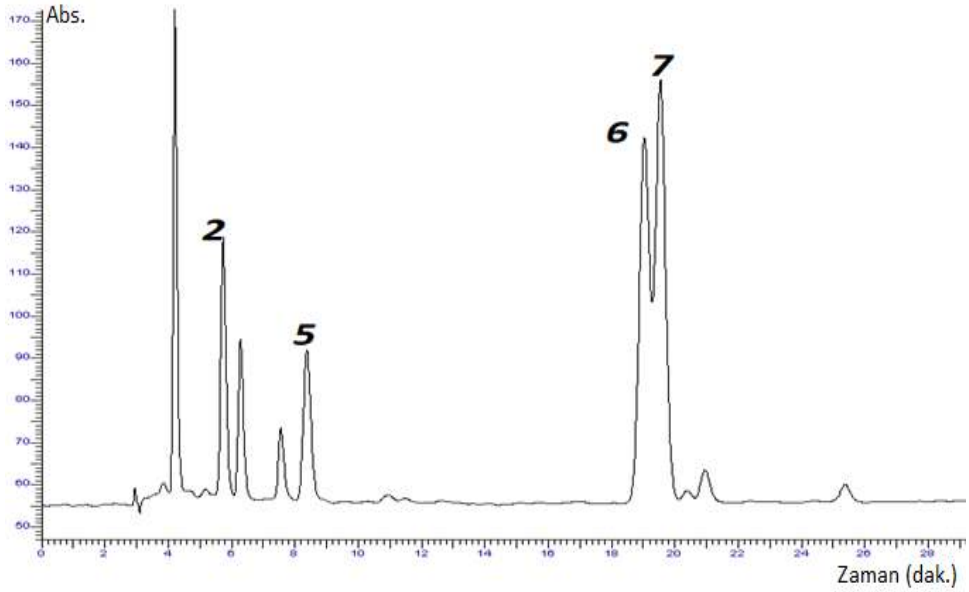
Karaçam ekstraktına ait örneğin analizi için; A: %0.1 OFA içeren Su, B: %0.1 OFA içeren metanol olarak ayarlanmış ilk 4 dakika boyunca %77(A)-%23(B) fazları geçirilmiş sonraki 4.4 dakika içinde gradient elüsyon %79(A)-%21(B) olacak şekilde ayarlanmış ve bu faz 2 dakika daha geçirilmiştir. 10.4. dakikadan sonra ise mobil faz 4.6 dakika içinde %60(A)-%40(B) olacak şekilde ayarlanmıştır. Buna göre 20 g karaçam kabuğu ekstraktı için elde edilen kromatogram Şekil 4.22’de verilmiştir.



Şekil 4.22 Evaporatör kullanılmadan havasız ortamda, etil asetat uçurularak kurutulan karaçam kabuğu ekstraktına ait kromatogram

Esktraksiyon aşamasında değişikliğe gidilmesiyle birlikte ekstraktların bozulmasının önlenildiği ve girişim yapan piklerin çoğunun ortadan kalktığı görülmüştür (Şekil 4.22).

Standartlarla yapılan çalışmalar sonucunda su metanol karışımının ilk 10 dakikalık zaman diliminde asetonitrile göre daha iyi ayırım sağlamasına rağmen literatürde belirtildiği gibi Taksifolin-Ferrulic asit karışımının ayrılmasında sorun çıkarttığı gözlenmiştir. Standartların analizine yönelik yapılan çalışmalarda çakışan iki pik su-metanol ortamında ayrılamamıştır (Şekil 4.23).

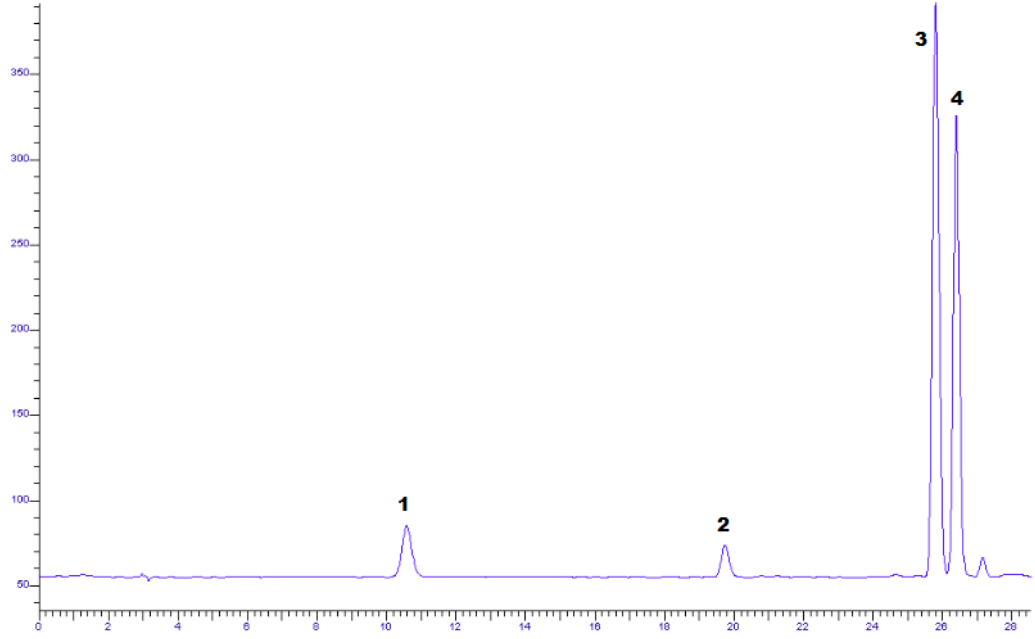


Şekil 4.23 Piknogenol bileşenlerine ait standartlar. 2-Catechin, 5-Epicatechin, 6- Ferulic Acid, 7-Taxifolin

(A) %0.1 OFA içeren su, (B) %0.1 OFA içeren metanol olmak üzere birçok deneme sonucunda varılan en iyi sonuç Şekil 4.21.'deki gibidir. İlk 4 dakika %65(A)-%35(B) karışımı geçirilmiş daha sonra 4 dakika içinde %67(A)-%33(B) olacak şekilde ayarlanmıştır. Sekizinci dakikadan sonra 17 dakika içinde gradient elüsyon %50(A)-%50(B) olacak şekilde ayarlanmış ve sistem kapatılmıştır.

Literatürde de (Huafu Wang et al. 2000) su-metanol hareketli faz kullanımında sıklıkla karşılaşılan ferrulic asit taksifolin çakışması durumundan kurtulabilmek için su-metanol-asetonitril üçlü fazı kullanılmıştır. Yapılan çalışmalardan sonra standartların ve örneğin analizi için optimum HPLC şartları belirlenmiştir. Buna göre; (A) %0.1 OFA içeren su, (B) %0.1 OFA içeren metanol, (C) %0.1 OFA içeren asetonitril olmak üzere 280 nm'de; İlk beş dakika %74(A)-%26(B) fazı geçirilmiş daha sonraki dört dakika içinde bu karışım %76(A)-%24(B) oranına dönüşecek şekilde ayarlanmıştır. Dokuzuncu dakikadan sonra sistem on beş dakika içinde lineer olarak %68(A)-%32(C) oranına dönüşecek şekilde ayarlanmıştır. Bu faz beş

dakika daha geçirilerek sistem kapatılmıştır. Bu şartlarda ferulik asit ve taksifolinin ayrılması sağlanmıştır (Şekil 4.24).

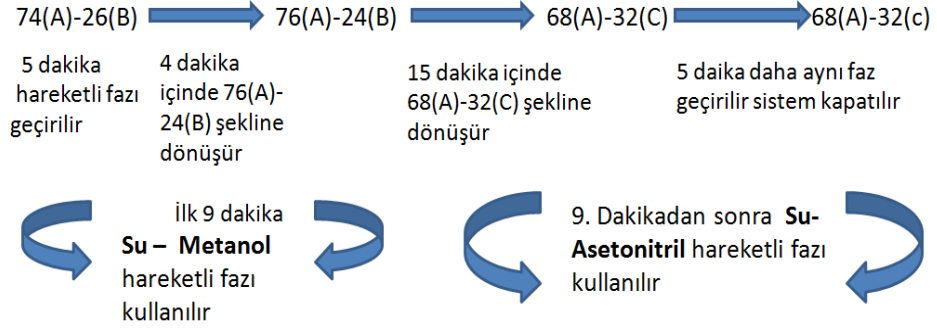


Şekil 4.24 %25 metanol -su içinde çözölen ve su-metanol-asetonitril hareketli faz sistemi kullanıldığında; 1 kateşin, 2-epikateşin, 3-ferulik asit, 4-taksifolin karışımına ait kromatogram.

Ayrımın başarılı olmasından sonra yöntem örneklere de uygulanarak çalışma tamamlanmıştır. Yapılan tüm optimizasyonlar sonucunda elde edilen en iyi çalışma şartları Şekil 4.25'de şematik olarak verilmiş ve bundan sonraki çalışmalarda bu şartlar uygulanmıştır.

HPLC ÇALIŞMA ŞARTLARI

A: % 0.1 OFA içeren su, **B:** % 0.1 OFA içeren metanol, **C:** % 0.1 OFA içeren asetonitril

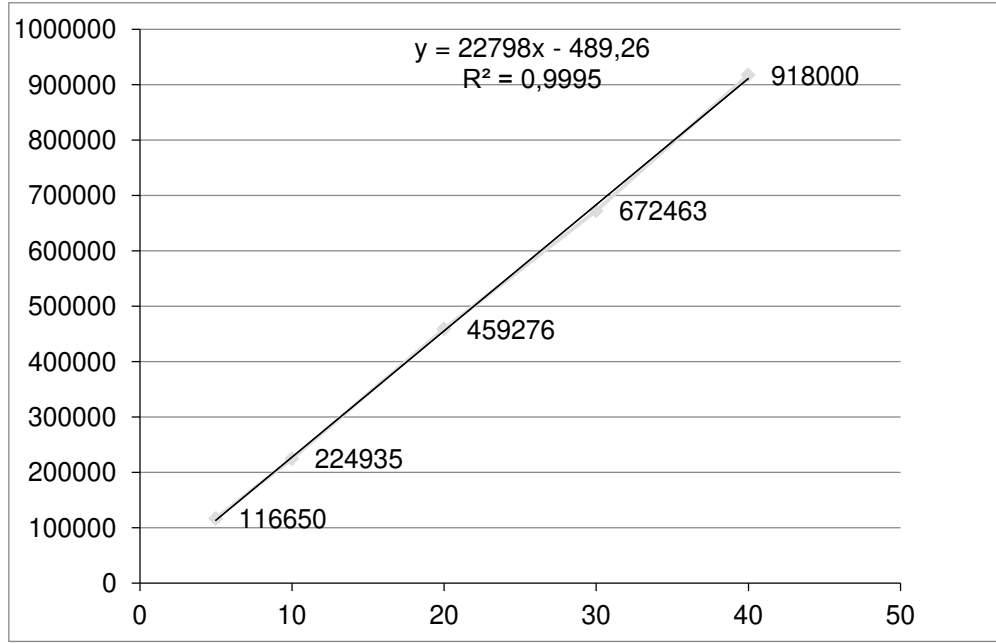


Akış hızı: 1 ml/ dakika, ölçüm dalga boyu 280 nm

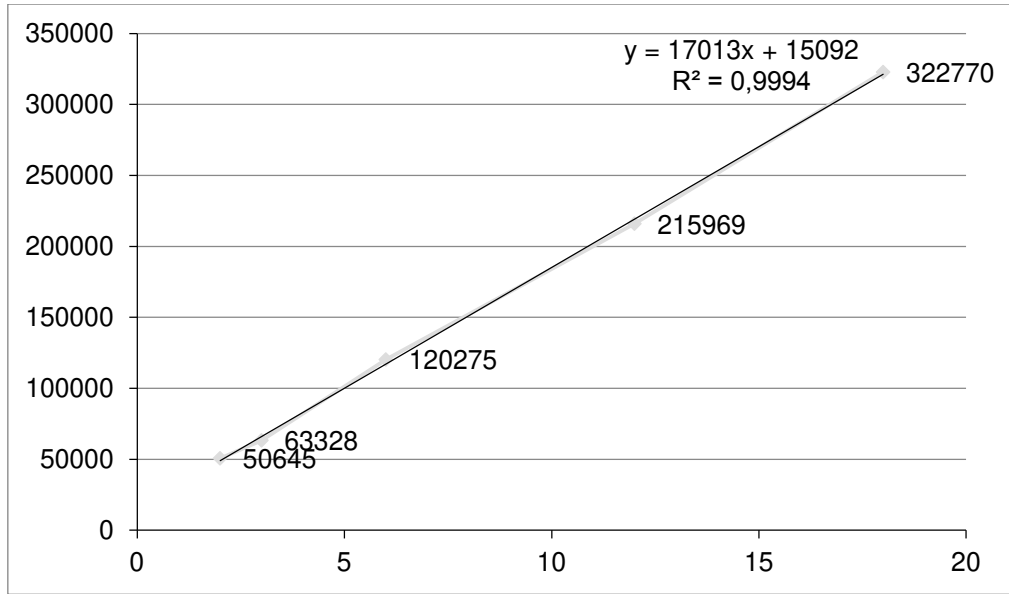
Şekil 4.25 Hareketli faz bileşimi ve gradient elüsyon çalışma şartları.

4.2 Kalibrasyon Grafikleri

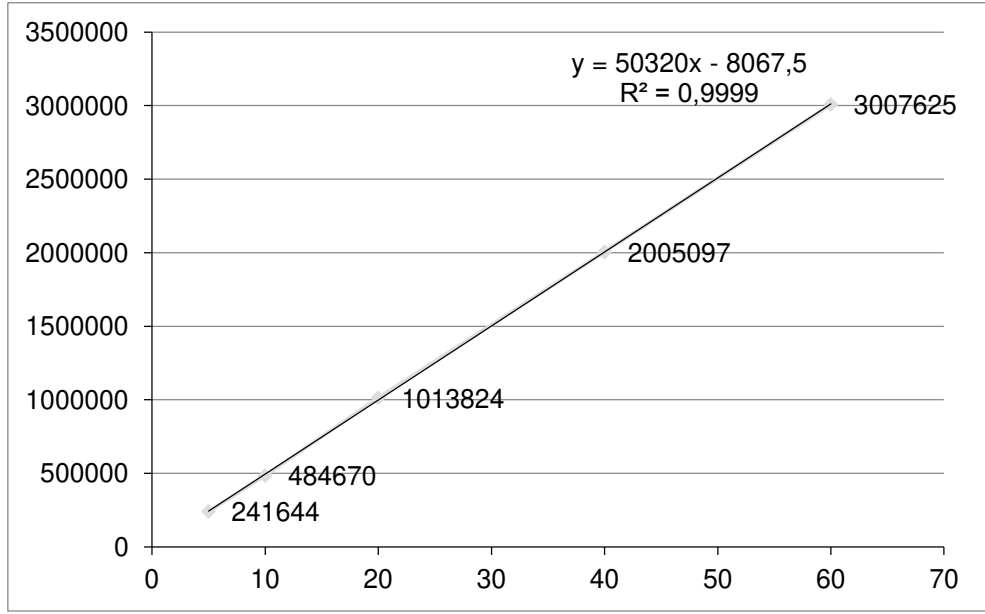
Çam kabukları ekstraktlarındaki piknogenol bileşenlerinin tayini kalibrasyon grafikleri ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla kateşin ve epigallokateşin için 5, 10, 15, 20, 40 mg/L, epikateşin için 2, 3, 6, 12, 18 mg/L; ferrulik asit için 5, 10, 20, 30, 40 mg/L ve taksifolin için 10, 20, 30, 40, 50 mg/L standart çözeltileri kullanılarak kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Kateşin, epikateşin, epikateşingallat, ferrulik asit ve taksifoline ait elde edilen kalibrasyon eğrileri sırasıyla şekil 4.26, 4.27, 4.28, 4.29 ve 4.30'de verilmiştir. Her bir standart için üç kez ölçüm alınmıştır.



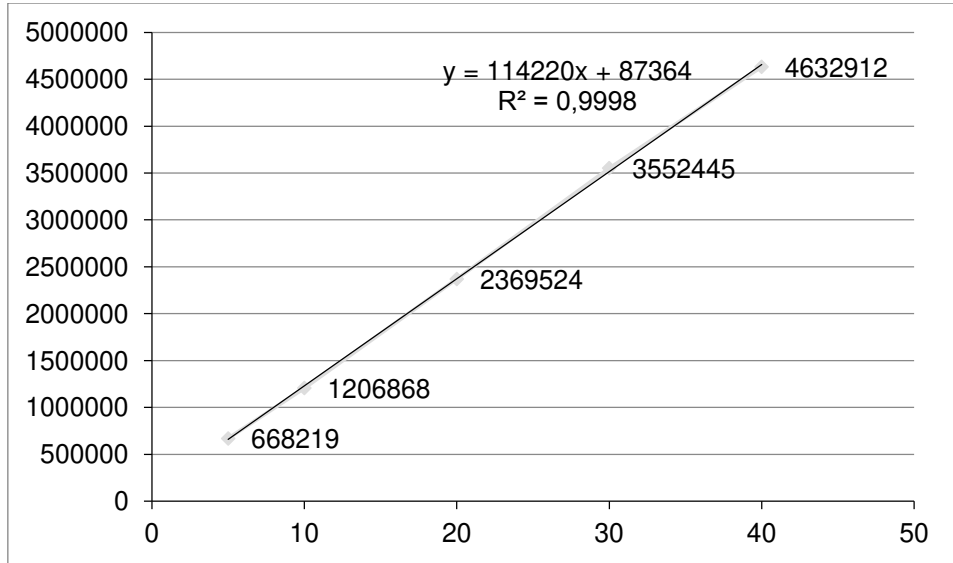
Şekil 4.26 Kateşine ait kalibrasyon grafiği



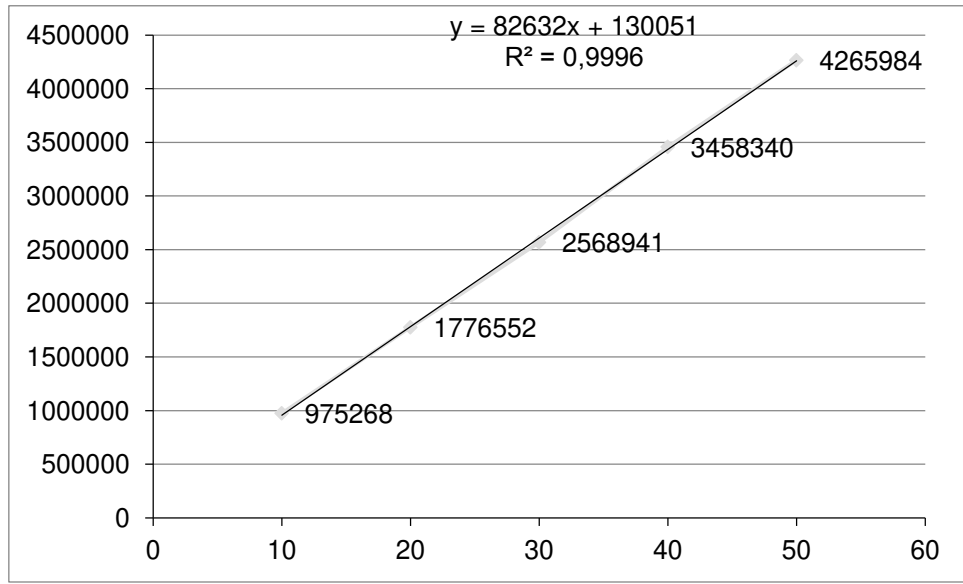
Şekil 4.27 Epikateşine ait kalibrasyon grafiği



Şekil 4.28 Epikateşingallata ait kalibrasyon grafiği



Şekil 4.29 Ferrulik asite ait kalibrasyon grafiği

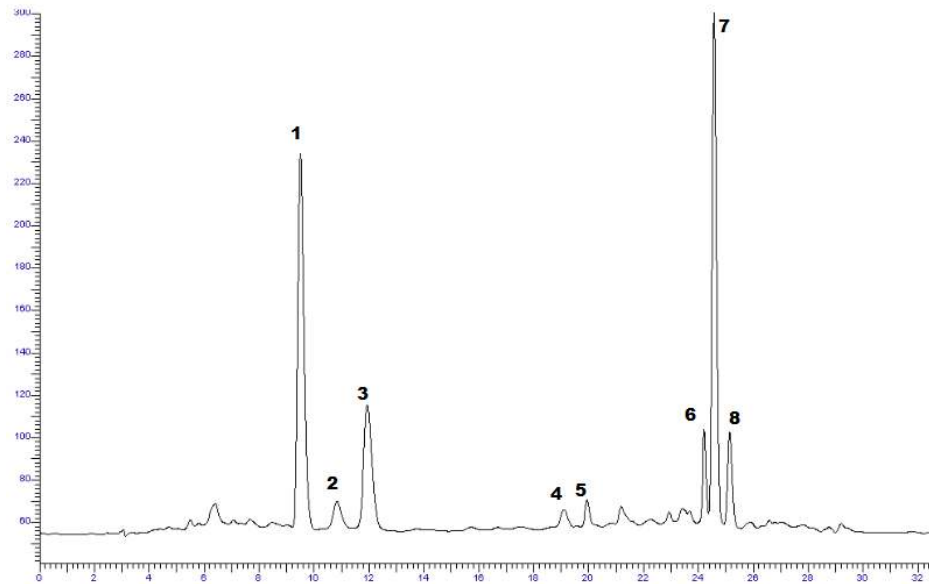


Şekil 4.30 Taksifoline ait kalibrasyon grafiği

4.3.3 Kara çam kabuğu ekstraktının analizi ve miktarları

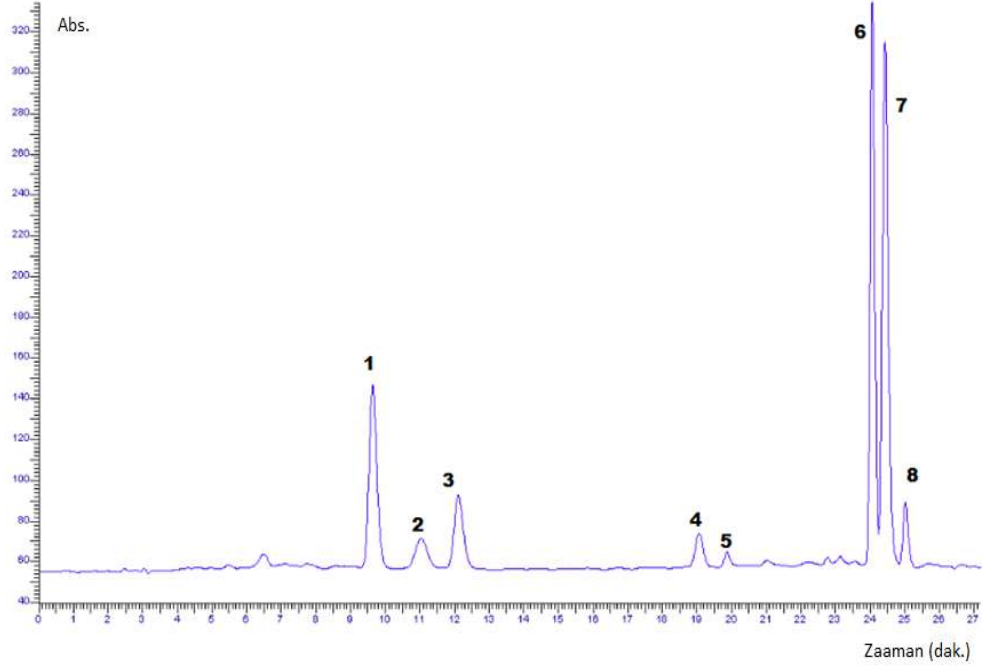
Tüm örneklerde nicel tayini yapılan maddelerin miktarlarını belirlemek amacıyla kalibrasyon yöntemi kullanılmış buna ek olarak nitel doğrulama için standart katma metodu uygulanmıştır.

Şekil 4.31'de kara çam kabuğu ekstraktına ait kromatogram görülmektedir.



Şekil 4.31 Kara çam kabuğu ekstraktına ilişkin kromatogram

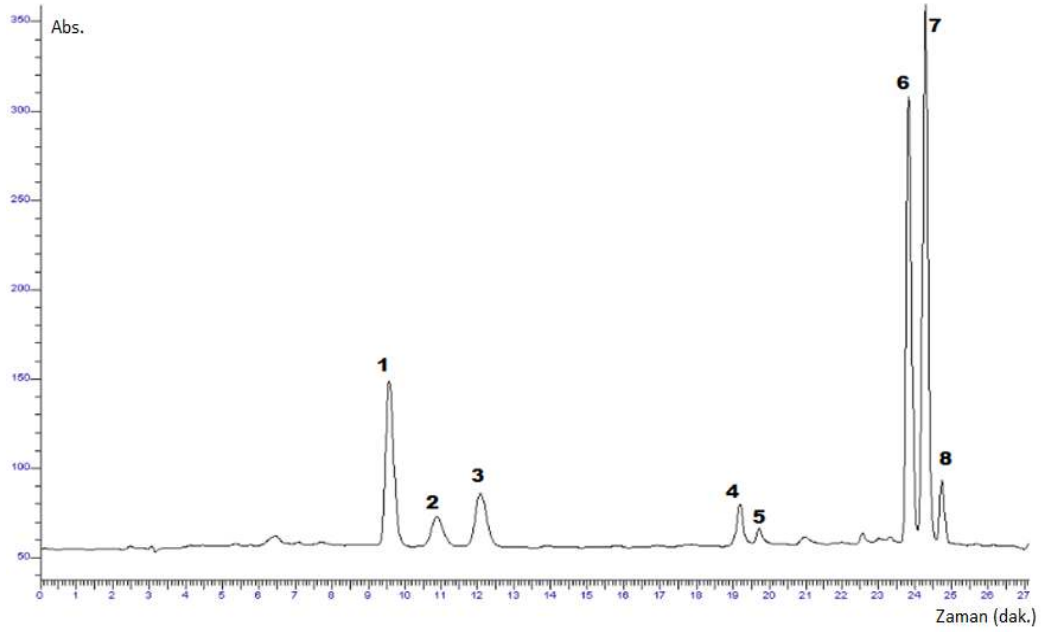
Kromatogramda görüldüğü gibi kara çam kabuğu ekstraktı bileşenlerine ait birbirinden farklı sekiz ayrı pik yer almaktadır. Bunların hangi bileşenler olduğunu belirlemek amacıyla elimizde bulunan kateşin, epikateşin, ferulik asit ve taksifolin standartları katılarak kromatogramlar alınmıştır. Kateşin ve epikateşin için 5 mg/L, ferulik asit için 20 mg/L olacak şekilde standart katmalar yapılmış ve ölçüm alınmıştır. Buna ilişkin kromatogram Şekil 4.32'de görülmektedir.



Şekil 4.32 Kara çam kabuğu ekstraktına kateşin, epikateşin ve ferulik asit standartlarının eklenmesiyle elde edilen kromatogram.

Elde edilen kromatogram Şekil 4.29 ile karşılaştırıldığında 2.(kateşin), 4.(epikateşin) ve 6.(ferulik asit) numaralı piklerde artış görülmektedir. Bunun dışında, standart katma sonucu seyrelme meydana geldiğinden diğer bileşen piklerinde kısmi bir azalma dikkat çekmektedir.

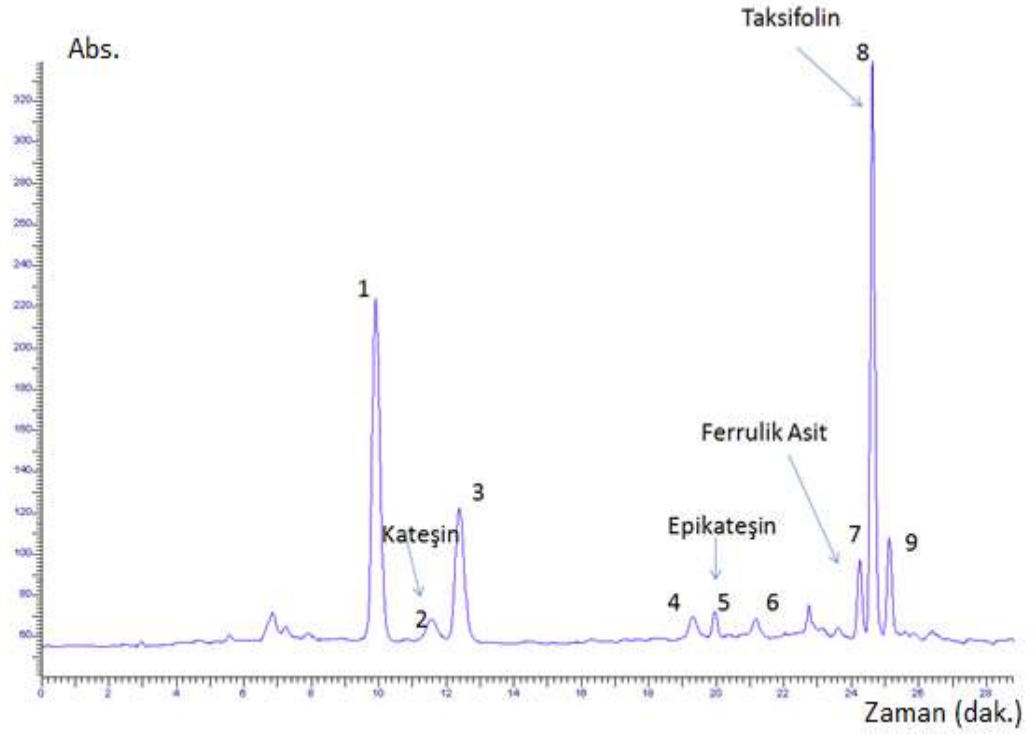
Kromatogramda yer alan 2 numaralı kateşin ve 4 numaralı epikateşine ait pikleri daha da belirginleştirip taksifolin varlığını belirlemek amacıyla kateşin ve epikateşin iki katına çıkartılmış, ferulik asit sabit tutulmuş ve ortama 10 mg/L taksifolin standartları katılarak kromatogram alınmıştır (Şekil 4.33).



Şekil 4.33 Karaçam kabuğu ekstraktına kateşin, epikateşin, ferrulik asit, ve taksifolin eklenmesiyle elde edilen kromatogram.

Bu şartlarda elde edilen kromatogramda beklendiği gibi 2 (kateşin), 4 (epikateşin) ve 7 (taksifolin) numaralı piklerde artış gözlenmiştir. Sonuç olarak karaçam kabuğunda; kateşin, epikateşin, ferrulik asit ve taksifolin bileşenlerinin varlığı saptanmıştır.

Gallik asit, kafeik asit, vanilik asit ve epigallokateşingallat standartları da çam kabuğu ekstraktına katılmış ancak bu bileşenlerin piklerinin çıktığı yerde yalnız başına çam kabuğu ekstraktında herhangi bir pik gözlenmediği için analizi yapılan çam kabuklarında söz konusu bileşenlerin olmadığına kanaat getirilmiştir. Karaçam kabuğu ekstraktında bulunan bileşenler Şekil 4.34'deki şekilde gösterilmiş ve sonuçlar Tablo 4.1'de verilmiştir.



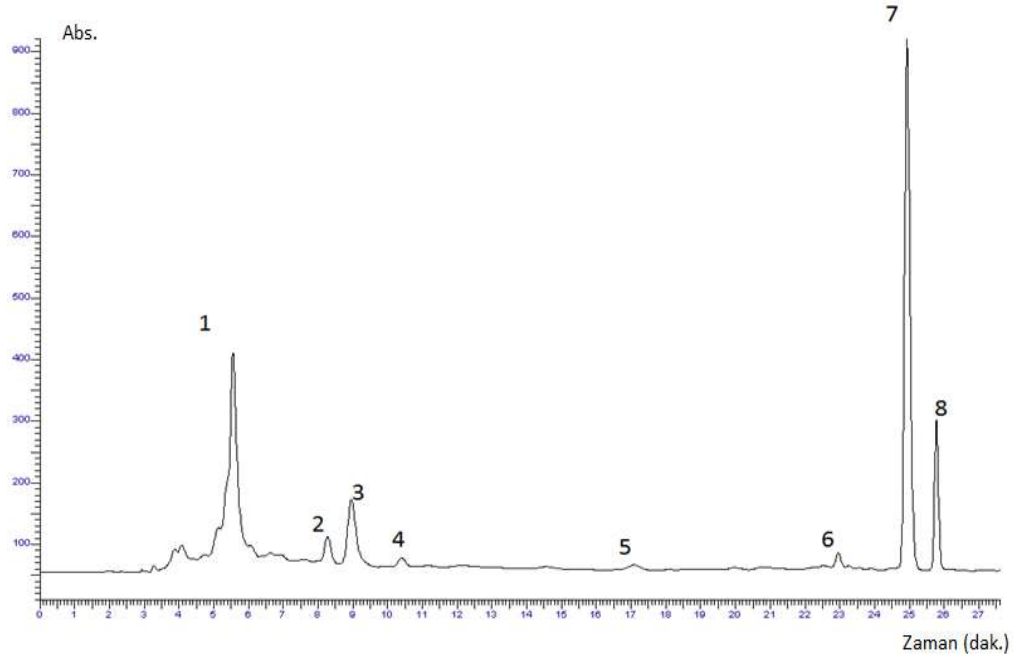
Şekil 4.34 Kara çam kabuğu ekstraktında bulunan piknogenol bileşenleri.

Tablo 4.1 Karaçam kabuğunda bulunan piknogenol bileşenlerinin miktarları

Bulunan bileşenler	Korelasyon Katsayısı ² r	Kalibrasyon Denklemi	Alıkonma Zamanları t_R	Örnekte Bulunan Miktar (mg/g)	RSD
Kateşin	0.9995	$y=22798x-489,26$	10.954(0.07%)	0,086 ± 0,002	2.28%
Epikateşin	0,9994	$y=17013x+15092$	19.818(0.41%)	0,076 ± 0,002	3.19%
Ferulik A.	0,9998	$y=114220x+87364$	25793(0.407%)	0,022 ± 0,001	3.45%
Taksifolin	0,9996	$y=82632x+130051$	26.366(0.364%)	0,209 ± 0,005	2.57%

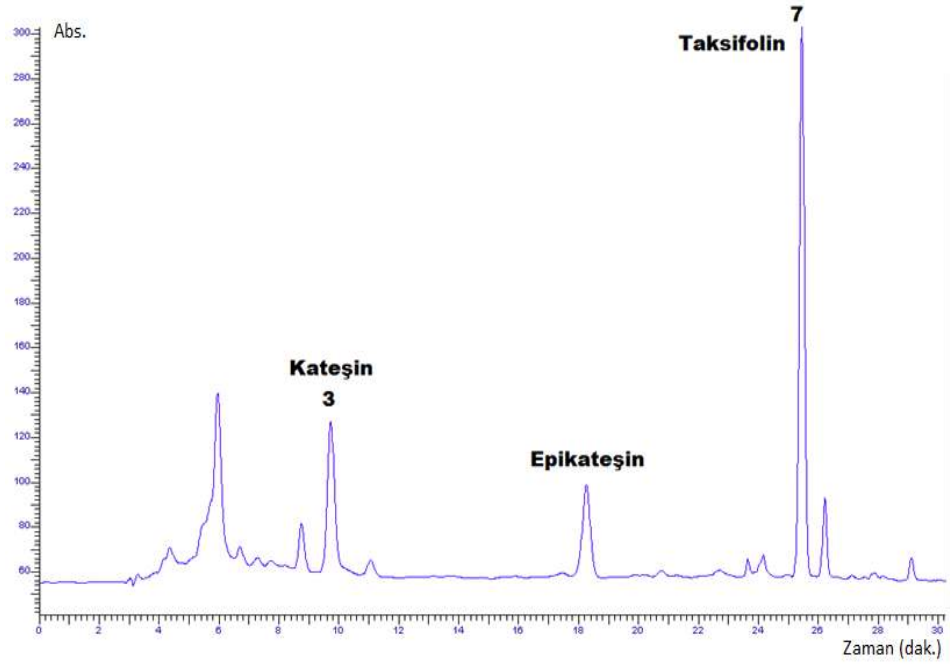
4.4. Fıstık çam kabuğu ekstraktının analizi ve miktarları

Karaçam kabuğu ekstraktı için uygulanan işlemler diğer çam kabuğu ekstraktlarına da uygulanmıştır. Buna göre fıstık çam kabuğu ekstraktının doğrudan enjeksiyonu sonucu elde edilen kromatogram Şekil 4.35.'de görülmektedir.



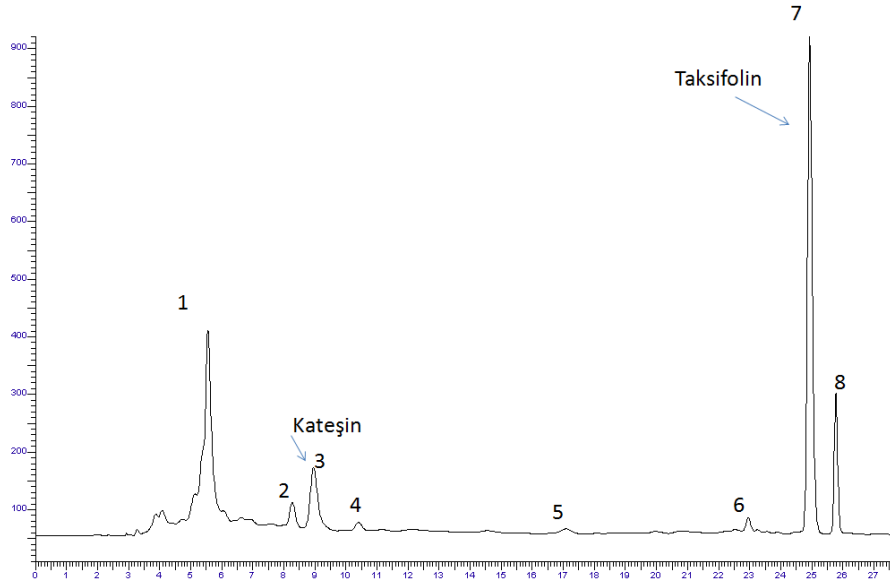
Şekil 4.35 Fıstık çam kabuğu ekstraktına ait kromatogram

Fıstık çam kabuğu ekstraktının kromatogramında sekiz ayrı bileşene ait pikler gözlenmiştir. Bunların analizini yaptığımız piknogenol bileşenlerinden hangisine ait olduğunu belirlemek amacıyla ekstrakta kateşin, epikateşin ve taksifolin standartları eklenerek kromatogram alınmıştır (Şekil 4.36).



Şekil 4.36 Fıstık çam kabuğuna kateşin, epikateşin ve taksifolin eklenmesine ilişkin kromatogram. 1-kateşin, 2- epikateşin, 3- taksifolin

Kromatogramda 3. ve 7. piklerde artış gözlenmiş olup bu piklerin kateşin ve taksifolin olduğuna (alıkonma zamanlarına göre), epikateşinin ise hiçbir pikin artışına neden olmaması ve alıkonma zamanları dikkate alındığında fıstık çamında sadece analizi yapılan piknogenol bileşenlerinden kateşin ve taksifolin olduğu tespit edilmiştir. Fıstık çam kabuğunda tespit edilen piknogenol bileşenleri ait kromatogram Şekil 4.37.'de, sonuçları ise Tablo 4.2'de verilmiştir.



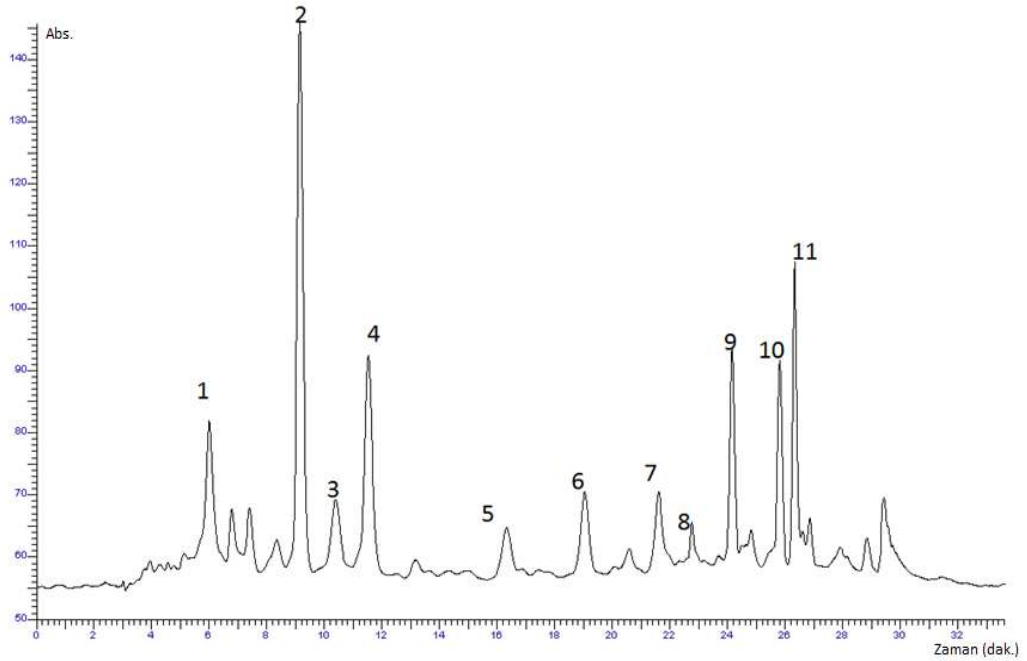
Şekil 4.37 Fıstık çam kabuğunda bulunan piknogenol bileşenlerine ait kromatogram.

Tablo 4.2 Fıstık çam kabuğunda bulunan piknogenol bileşenleri.

Bulunan bileşenler	Korelasyon Katsayısı R^2	Kalibrasyon Denklemi	Alıkonma Zamanları t_R	Örnekte Bulunan Miktar (mg/g)	RSD
Kateşin	0.9995	$y=22798x-489,26$	10.954(0.07%)	1.923 ± 0,021	1.08%
Taksifolin	0,9996	$y=82632x+130051$	26.366(0.364%)	1.801 ± 0,001	0.07%

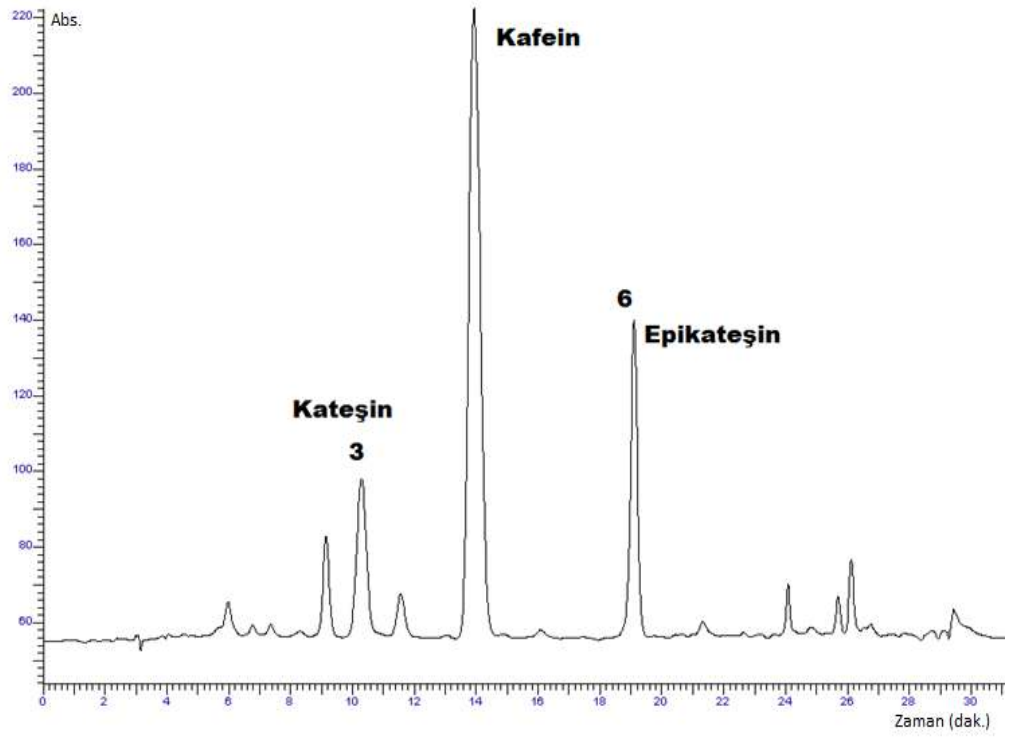
4.5 Sarı çam kabuğunda bulunan piknogenol bileşenleri ve miktarları

Karaçam ve fıstık çamı ekstraktlarının analizi gibi sarıçam kabuğu ekstraktının da analizi yapılmış olup elde edilen kromatogram Şekil 4.38’de verilmiştir.

**Şekil 4.38** Sarı çam kabuğu ekstraktına ait kromatogram

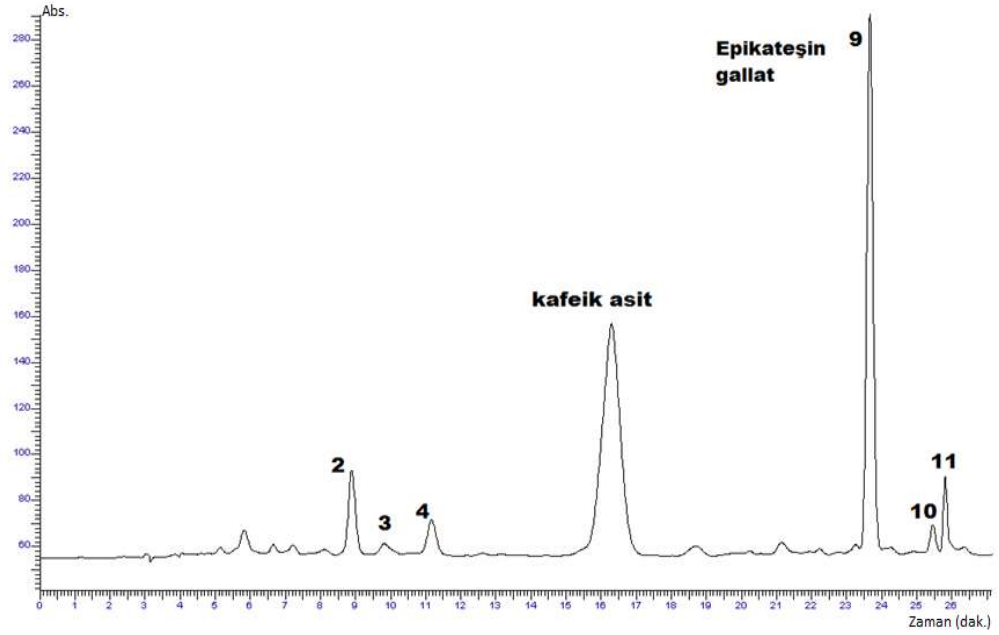
Sarı çam kabuğunda diğer çam kabuğu ekstraktlarına göre çok sayıda bileşen piki gözlenmiştir. Bunların çalışılan piknogenol bileşenlerinden hangilerine ait olduğu ve ne oranda bulunduğunu belirlemek amacıyla standart katma işlemi uygulanmıştır. Buna göre analizi

yapılan türlere ilave olarak epikateşingallat bileşenine de rastlanmıştır. Sarı çam kabuğu ekstraktına ilk önce kateşin, epikateşin ve literatürde bu tür örneklerde rastlanan bileşenlerden kafeinin de olabileceği düşünülerek kafein standardı da eklenmiştir. Bu standart katmalar sonucu elde edilen kromatogram aşağıda verilmiştir (Şekil 4.39).



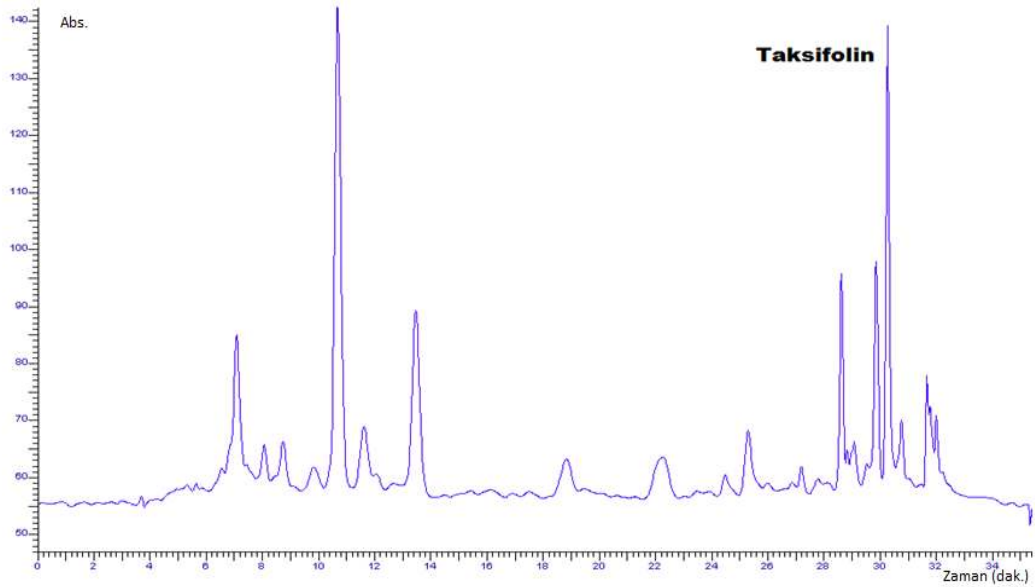
Şekil 4.39 Sarı çam kabuğu ekstraktına kateşin, epikateşin ve kafein eklenmesiyle elde edilen kromatogram

3 ve 6 numaralı piklerdeki artış kateşin ve epikateşinin varlığını gösterirken kafein standardı hiçbir pikle örtüşmeden bağımsız olarak çıkmıştır. İkinci olarak sarıçam kabuğu ekstraktına epikateşingallat ve kafeik asit standartları eklenerek de kromatogram alınmıştır (Şekil 4.40).



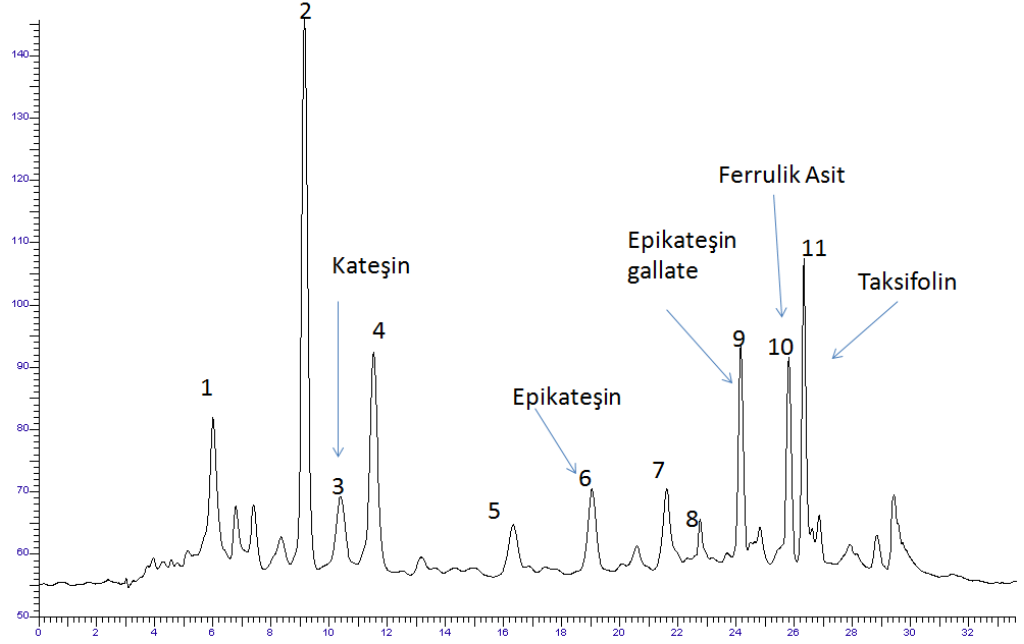
Şekil 4. 40 Sarı çam kabuğu ekstraktına epigallokateşin ve kafeik asit eklenerek elde edilen kromatogram.

Kromatogramda 9 numaralı pikteki artış, bu pikin epigallokateşine ait olduğunu göstermektedir. Kafeik asitin altında kalan pikin alıkonma zamanı 15.6 iken kafeik asitin alıkonma zamanı 16.2 olarak tespit edilmiştir. Bu durum altta kalan pikin kafeik asit olmadığını göstermektedir. Sarı çam kabuğu ekstraktına taksifolin eklenmesiyle elde edilen kromatogram Şekil 4.41'da verilmiştir.



Şekil 4. 41 Sarı çam kabuğu ekstraktına taksifolin eklenmesiyle elde edilen kromatogram.

Şekil 4.41, Şekil 4.38 (sarı çam kabuğu ekstraktına ait kromatogram) ile karşılaştırıldığında aynı alıkonma zamanına sahip 11 numaralı pikte artış görülmüştür. Bu durum sarı çam kabuğunda taksifolin varlığını da göstermektedir. Sarı çam kabuğunda bulunan piknogenol bileşenleri Şekil 4.42'deki kromatogramda gösterilmiş ve sonuçlar Tablo 4.3'de verilmiştir.



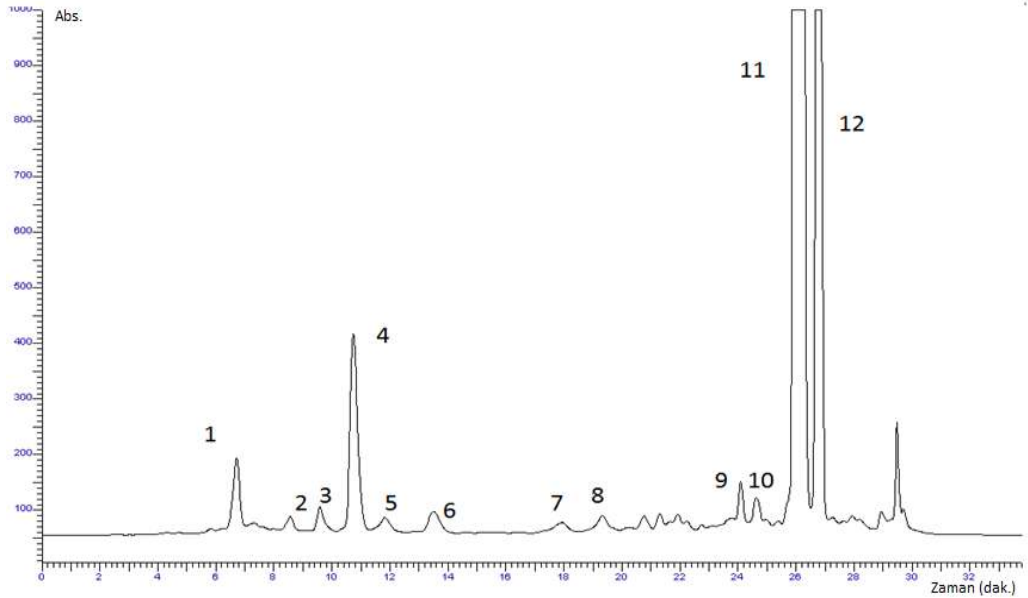
Şekil 4.42 Sarı çam kabuğunda bulunan piknogenol bileşenleri

Tablo 4.3 Sarıçam kabuğunda bulunan piknogenol bileşenleri ve miktarları.

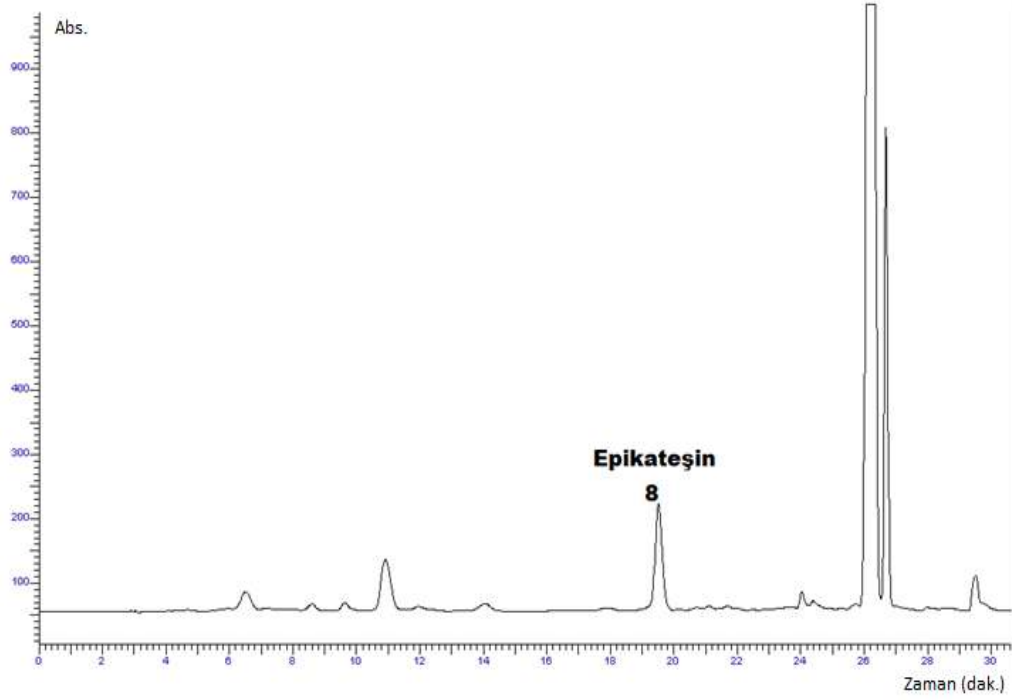
Bulunan bileşenler	Kaorelasyon Katsayısı r^2	Kalibrasyon Denklemi	Alıkonma Zamanları t_R	Örnekte Bulunan Miktar (mg/g)	RSD
Kateşin	0.9995	$y=22798x-489,26$	10.954(0.07 %)	0,065 ± 0,002	3.90%
Epikateşin	0,9994	$y=17013x+15092$	19.818(0.41 %)	0,066 ± 0,002	2.46%
Ferulik A.	0,9998	$y=114220x+87364$	25793(0.407 %)	0,010 ± 0,000	4.04%
Taksifolin	0,9996	$y=82632x+130051$	26.366(0.364 %)	0,015 ± 0,000	0.236 %
EpikateşinGallat	0,9999	$y=50320x-8067,5$	23787(0.33%)	0,025 ± 0,000	2.37%

4.6 Kızıl çam kabuğu ekstraktında bulunan piknogenol bileşenleri ve miktarları

Kızıl çam kabuğu ekstraktına ait kromatogram Şekil 4.43'de verilmiştir.

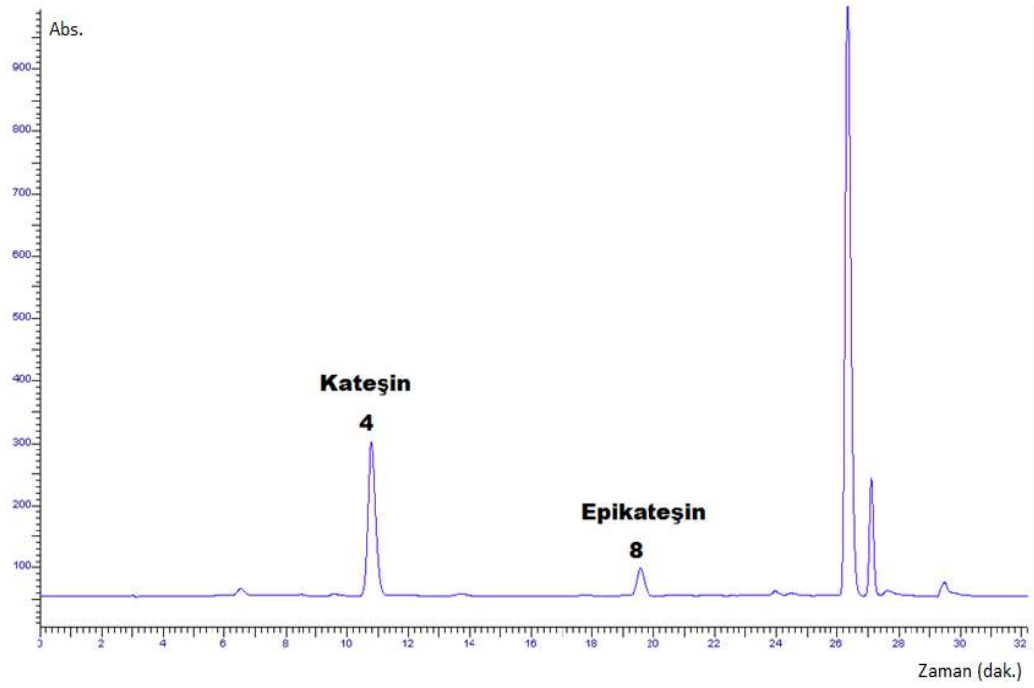
**Şekil 4.43** Kızıl çam kabuğu ekstraktına ait kromatogram.

Kromatogramda görüldüğü gibi kızıl çam kabuğu ekstraktında çok sayıda bileşen bulunmaktadır. Kızıl çam kabuğu ekstraktına bulunabilecek piknogenol bileşenlerini tayin etmek amacıyla piknogenol bileşenlerinden ilk önce epikateşin standardı katılarak kromatogram alınmıştır (Şekil 4.44).



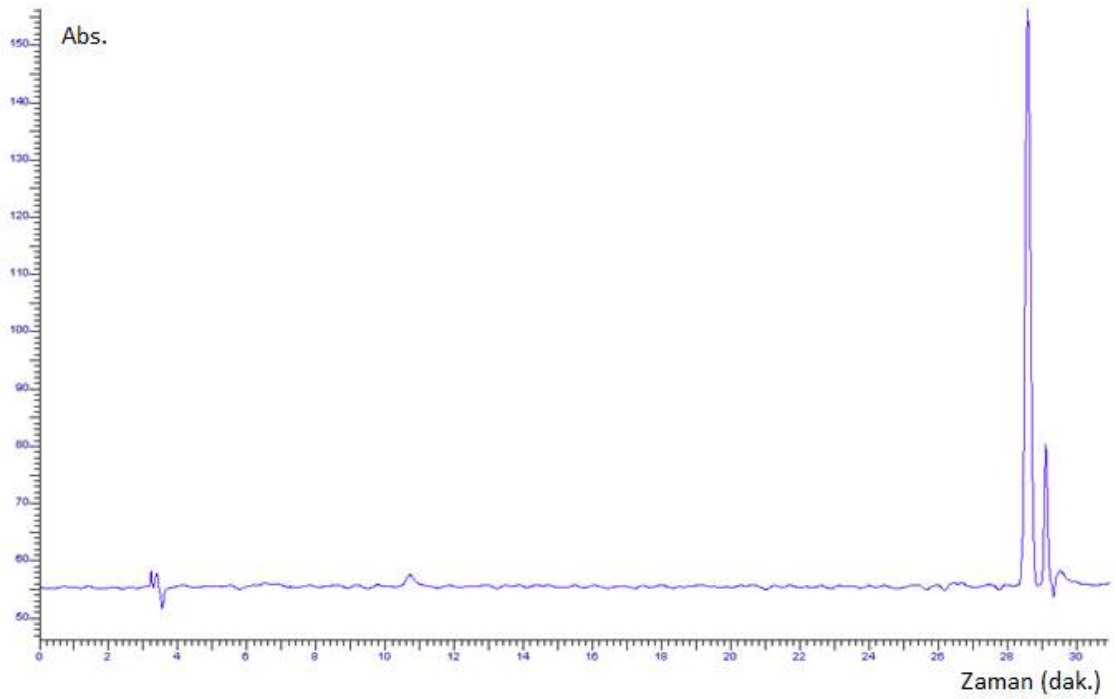
Şekil 4.44 Kızıl çam kabuğu ekstraktına epikateşin katılmasına ilişkin kromatogram.

Kızıl çam kabuğu ekstraktına ait kromatogramda yer alan 8 numaralı pikte gözlenen artış, bu pikin epikateşin olduğunu göstermektedir. Daha sonra epikateşin eklenmiş kızıl çam kabuğu ekstraktına kateşin standardı da katılarak ölçüm alınmış ve elde edilen kromatogram Şekil 4.45’de verilmiştir.



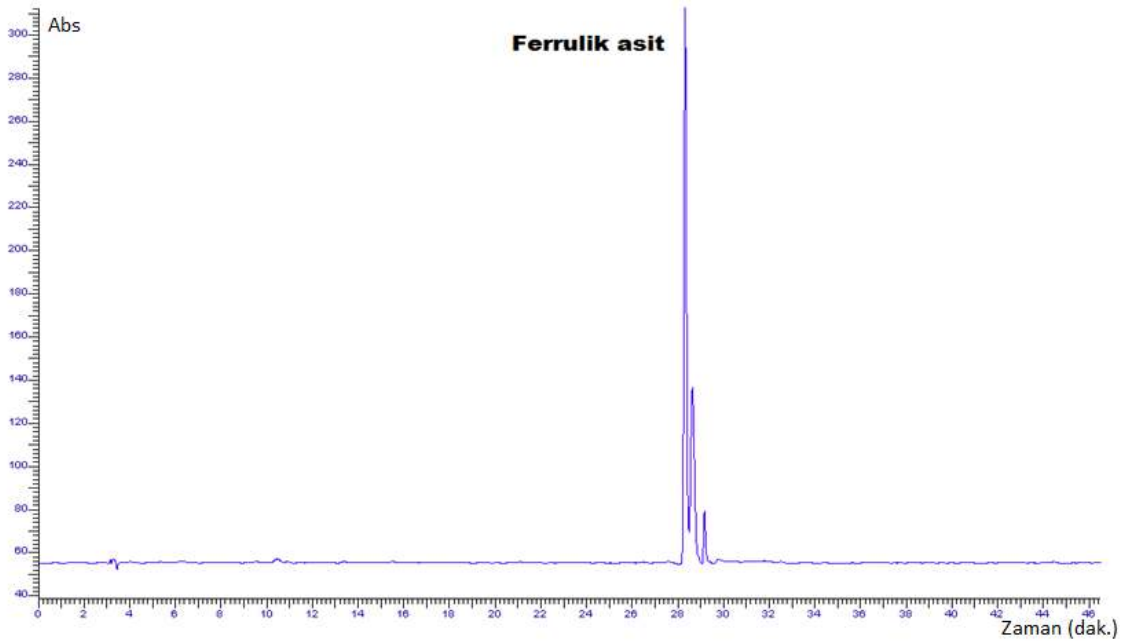
Şekil 4.45 Kızıl çam kabuğuna kateşin katılmasıyla elde edilen kromatogram.

Kromatogramdaki 4 numaralı pikte gözlenen artış bu pikin kateşin olduğunu göstermektedir. Daha sonra kızıl çam kabuğu ekstraktında taksifolin ve ferrulik asit olup olmadığını araştırmak amacıyla bu standartların alıkonma zamanlarının bulunduğu yerdeki piklerin çok büyük olması nedeniyle başlangıçta kızıl çam kabuğu ekstraktı yaklaşık yüz kat seyreltilerek kromatogram alınmıştır (Şekil 4.46).



Şekil 4.46 Yaklaşık yüz kat seyreltilmiş kırmızı çam kabuğu ekstraktı

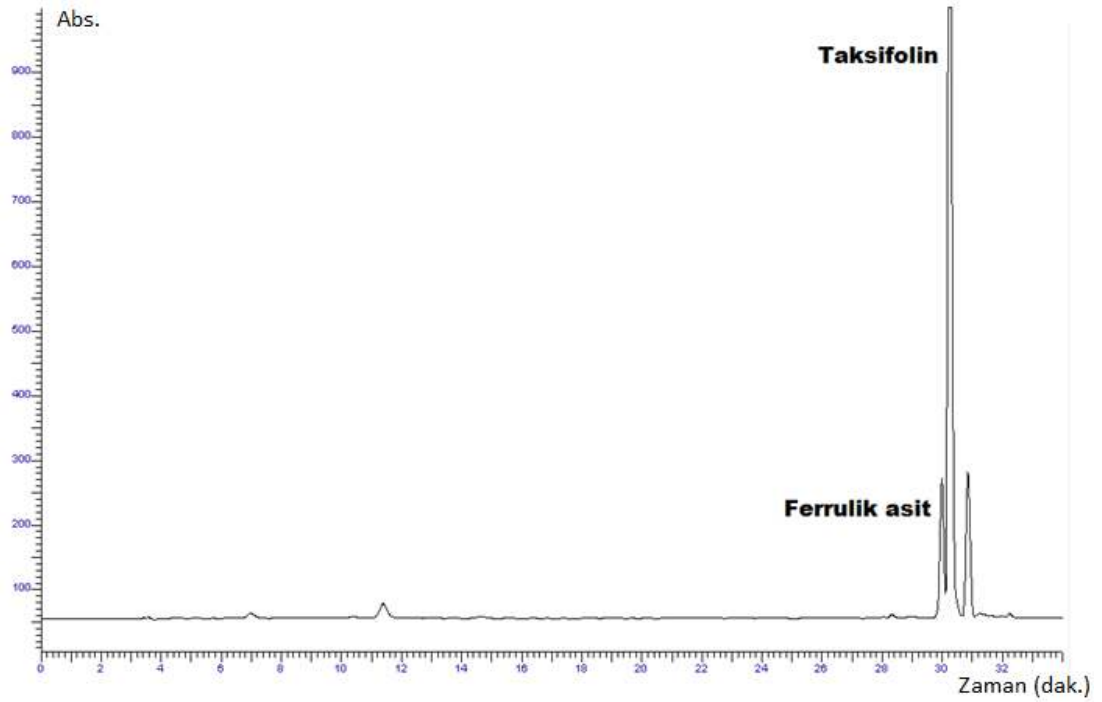
Seyrelme sonucu orijinal örnekte gözlenen piklerin önemli bir kısmı kaybolmuştur. Seyreltilmiş kırmızı çam kabuğu ekstraktına ferrulik asit standardı eklenerek kromatogram alınmıştır (Şekil 4.47).



Şekil 4.47 Seyreltilmiş kırmızı çam kabuğu ekstraktına ferrulik asit standardı eklenerek elde kromatogram.

Ferrulik asite ait pikin, Şekil 4.46'deki kromatogramda (seyreltilmiş kızıl çam kabuğu ekstraktına ait) gözlediğimiz iki pikten önce çıktığı ve hiçbir pikle çakışmadığı görülmüştür. Bu sonuç kızıl çam kabuğu ekstraktında ferrulik asit olmadığını göstermektedir.

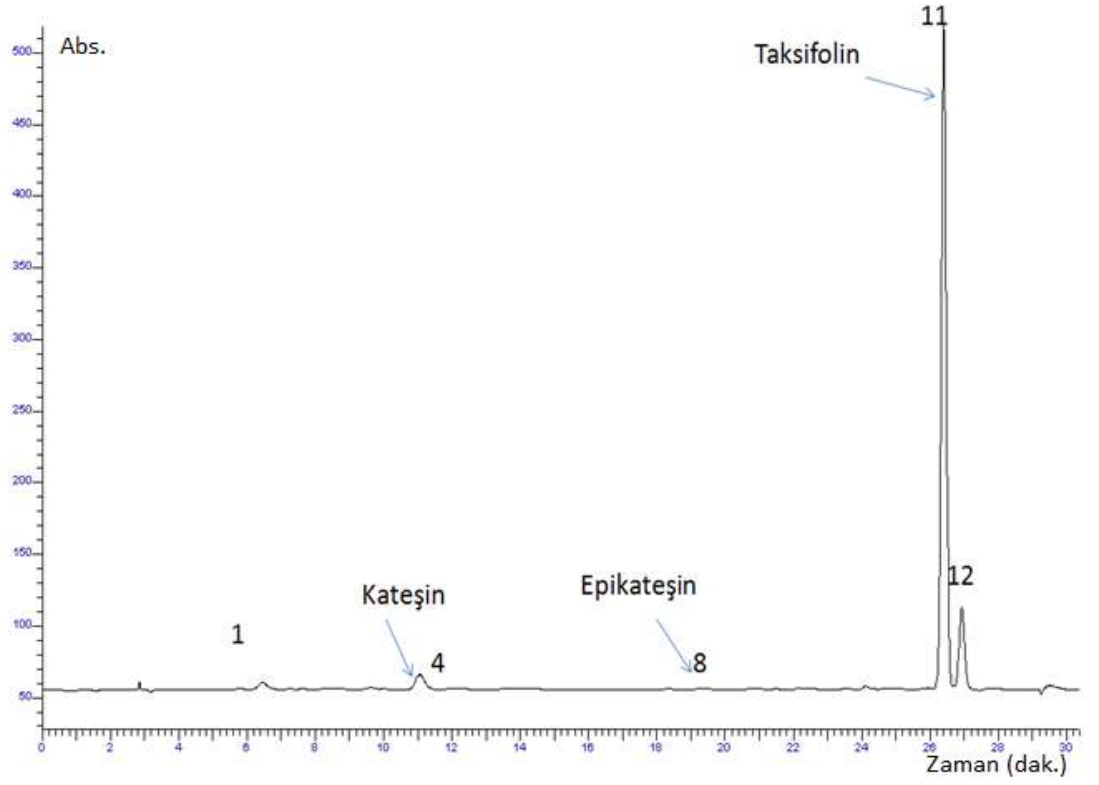
Ferulik asit pikinin hemen sağında yer alan iki pikin tam ayrılmadığı tespit edilmiş ve bu ayırmayı sağlamak ve o bölgede çıkan taksifolin bileşeninin varlığını tespit etmek amacıyla seyreltik kızıl çam kabuğu ekstraktına ferrulik asit ve taksifolin standartları katılarak kromatogram alınmıştır (Şekil 4.48).



Şekil 4.48 Seyreltik kızıl çam kabuğu ekstraktına ferrulik asit ve taksifolin eklenmesiyle elde edilen kromatogram.

Kromatogramdan görüldüğü gibi ferulik asitin sağında yer alan ilk pikte artış gözlenmiş ve bu pikin taksifoline ait olduğu belirlenmiştir.

Kızıl çam kabuğu ekstraktında bulunan piknogenol bileşenleri Şekil 4.49'da, sonuçlar ise Tablo 4.4'de verilmiştir.



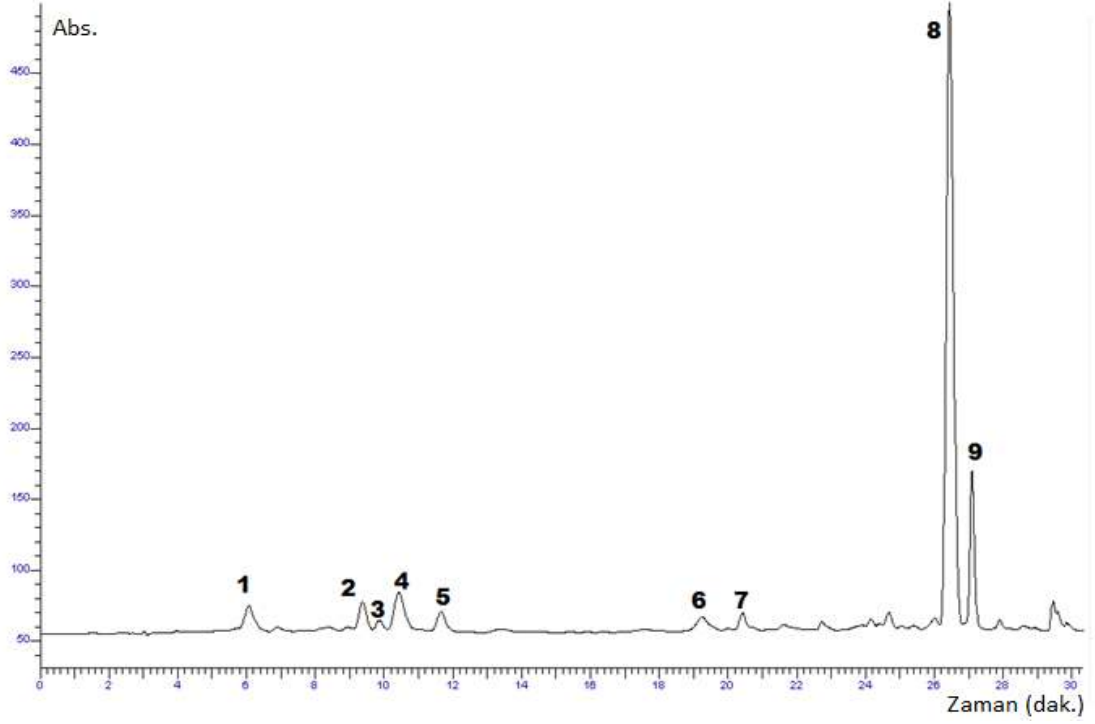
Şekil 4.49 Seyreltilmiş kıvıı çam kabuğu ekstraksiyonuna ait kromatogram.

Tablo 4.4 Kıvııçam kabuğunda bulunan piknogenol bileşenleri.

Bulunan bileşenler	Kaorelasyon Katsayısı ² r	Kalibrasyon Denklemi	Alıkonna Zamanları t_R	Örnekte Bulunan Miktar (mg/g)	RSD
Kateşin	0.9995	$y=22798x-489,26$	10.954(0.07%)	$1.454 \pm 0,004$	3,72%
Epikateşin	0,9994	$y=17013x+15092$	19.818(0.41%)	$0,026 \pm 0,000$	1.69%
Taksifolin	0,9996	$y=82632x+130051$	26.366(0.364%)	$23,164 \pm 0,322$	1,39%

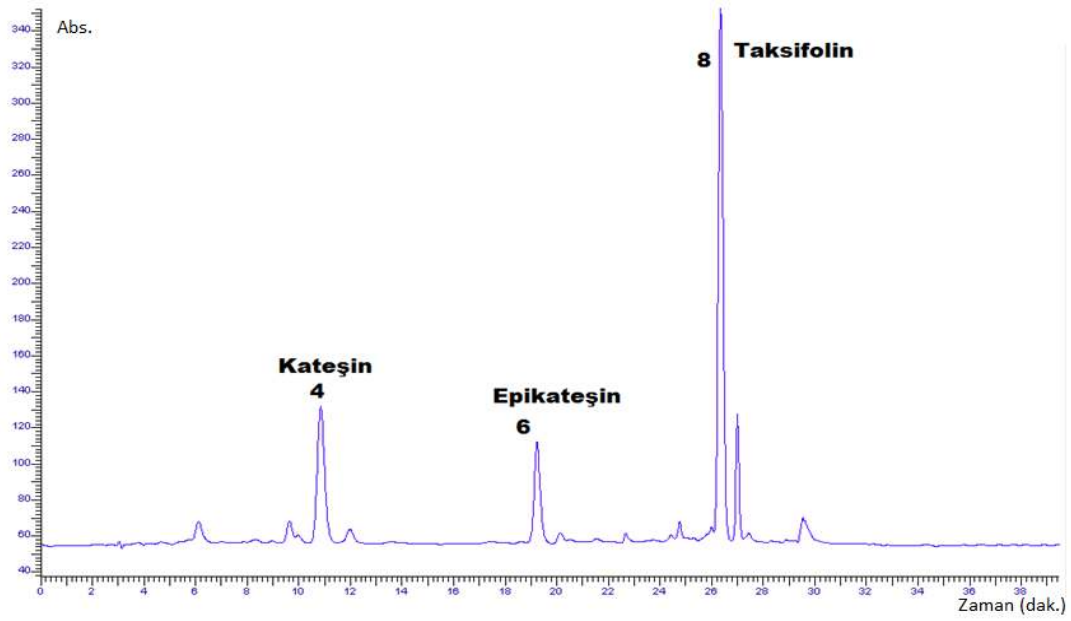
4.7. Halep çam kabuğu ekstraktında bulunan piknogenol bileşenleri ve miktarları

Halep çam kabuğu ekstraktının analizi için de diğer çam kabukları ekstraksiyonuna uygulanan yöntem aynı şekilde kullanılmıştır. Halep çam kabuğu ekstraktının doğrudan analizine ilişkin kromatogram Şekil 4.50'de vermiştir.



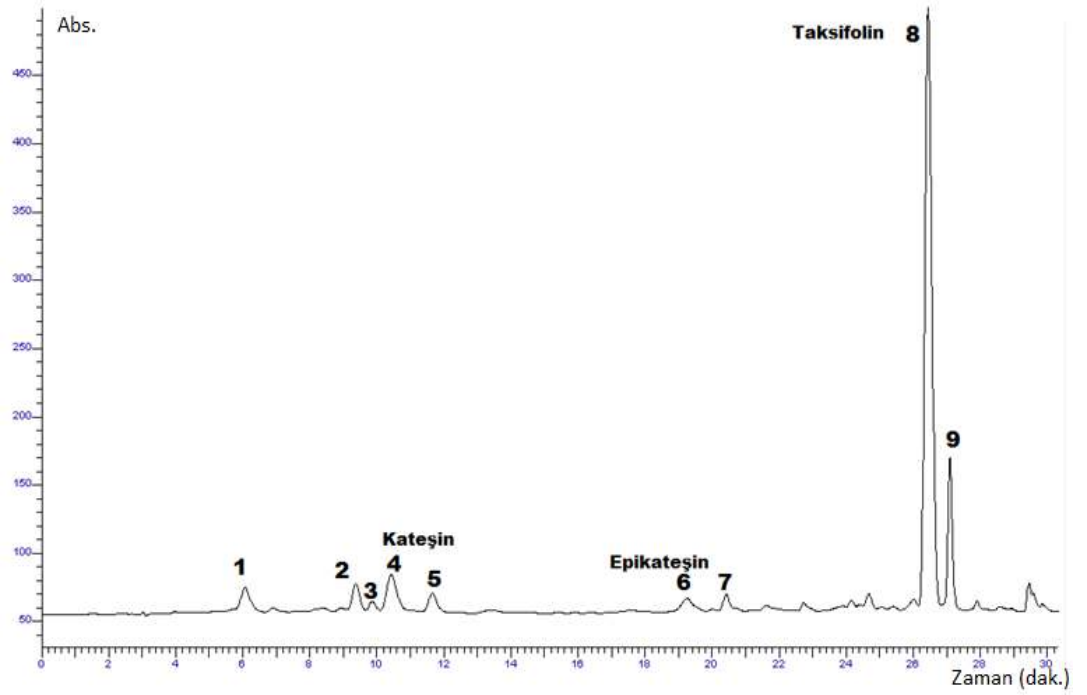
Şekil 4.50 Halep çam kabuğu ekstraksiyonuna ilişkin kromatogram.

Kromatogramda tanımlanabilecek 10'a yakın pik görülmektedir. Bunlardan hangilerinin piknogenol bileşenleri olduğunu belirlemek amacıyla halep çam kabuğu ekstraktına kateşin, epikateşin ve taksifolin standartları katılarak kromatogram alınmıştır (Şekil 4.51).



Şekil 4.51 Halep çam kabuğu ekstraktına kateşin, epikateşin ve taksifolin standartları katılarak elde edilen kromatogram.

Kromatogramda 4. 6. ve 8. pikte artışlar gözlenmiş ve bunların sırasıyla kateşin, epikateşin ve taksifolin olduğu tespit edilmiştir. Örnekte var olabileceğini düşündüğümüz bazı bileşenlere ait standartlar örneğe katılarak enjeksiyon yapılmış ve ölçümler alınmıştır. Ancak bu standartlar hiçbir pikle çakışmadığından bunların varlığına ilişkin veri elde edilememiştir. Bu tespitler sonucu standart katma yapılmamış, Halep çam kabuğu ekstraktında bulunan bu piknogenol bileşenleri kromatogramda işaretlenmiştir (Şekil 4.52). Bulunan bileşenlerin miktarları ise Tablo 4.5’de verilmiştir.



Şekil 4.52 Halep çam kabuğuna ait kromatogram.

Tablo 4.5 Halep çam kabuğunda bulunan pknogenol bileşenleri.

Bulunan bileşenler	Kaorelasyon Katsayısı ² r	Kalibrasyon Denklemi	Alıkonma Zamanları t_R	Örnekte Bulunan Miktar (mg/g)	RSD
Kateşin	0.9995	$y=22798x-489,26$	10.954(0.07%)	$0,093 \pm 0,003$	2,97%
Epikateşin	0,9994	$y=17013x+15092$	19.818(0.41%)	$0,046 \pm 0,000$	1.58%
Taksifolin	0,9996	$y=82632x+130051$	26.366(0.364%)	$0,219 \pm 0,002$	0.99%

Analizi yapılan tüm çam kabuğu ekstraktlarında tespit ettiğimiz pknogenol bileşenlerine ait standartlar için geri kazanım oranları hesaplanmıştır. Bu amaçla her bir pknogenol bileşenine ait standart suda 10 ppm olacak şekilde hazırlanmıştır. Daha sonra çam kabuğu ekstraktlarına uygulanan prosedür bu çözeltilere uygulanarak kromatogramlar alınmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.6 Standartlara ilişkin geri kazanım sonuçları.

Katılan standart miktarı	Geri kazanılan Kateşin miktarı	Geri kazanılan Epikateşin miktarı	Geri kazanılan Ferulik A. miktarı	Geri kazanılan Taksifolin miktarı	Geri kazanılan Epicat.Gallat miktarı
10 mg/g	9.7 mg/g %97	9.1 mg/g %91	9.5 mg/g %95	9.6 mg/g %96	9.2 mg/g %92

4.8. LC-MS ANALİZLERİ

Çalışmada elde edilen sonuçların güvenilirliğini kontrol etmek amacıyla standartların ve örneklerin LC-MS ile nitel analizleri yapılmıştır. Bu amaçla önce kateşin, epikateşin, epikateşingallat, ferrulik asit ve taksifolin standartları tek tek loop enjeksiyonu olarak (kolondan geçirilmeden) cihaza verilmiştir. Böylece MS için optimum analiz koşulları belirlenmiştir. Her standart için yapılan enjeksiyonlar sırasıyla şekillerin üstünde verilmiştir. Şekillerin altında ise açığa çıkan parçalanma ürünleri (m/z oranları) verilmiştir. Üstteki denemeler sonucu seçilen en uygun enjeksiyonun hangisi olduğu alıkonma zamanı ile altta belirtilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.53, 4.54, 4.55, 4.56 ve 4.57’de verilmiştir.

Sprey voltaj pozitif polaritede +2500, negatif polaritede -3000 olarak ayarlanmıştır. Boşaltma akımı pozitif ve negatif polaritelerde +4 ve -4 olarak seçilmiştir. Kapiler sıcaklığı 300°C’ye ayarlanmıştır. Çarpışma enerjileri (CE) Ferrulik Asit için 10 volt, kateşin için 25 volt, epikateşin ve epikateşingallat için 15 volt, ve taksifolin için 20 volt olarak ayarlanmıştır. Ferrulik asit ve epikateşingallat pozitif modda; kateşin, epikateşin ve taksifolin negatif modda analizlenmiştir. Hareketli faz olarak (A) %0,1 formik asit içeren su ve (B) %0,1 formik asit içeren metanol kullanılmıştır. Kullanılan gradient yönteme ilişkin bilgiler tablo 4.7’de verilmiştir.

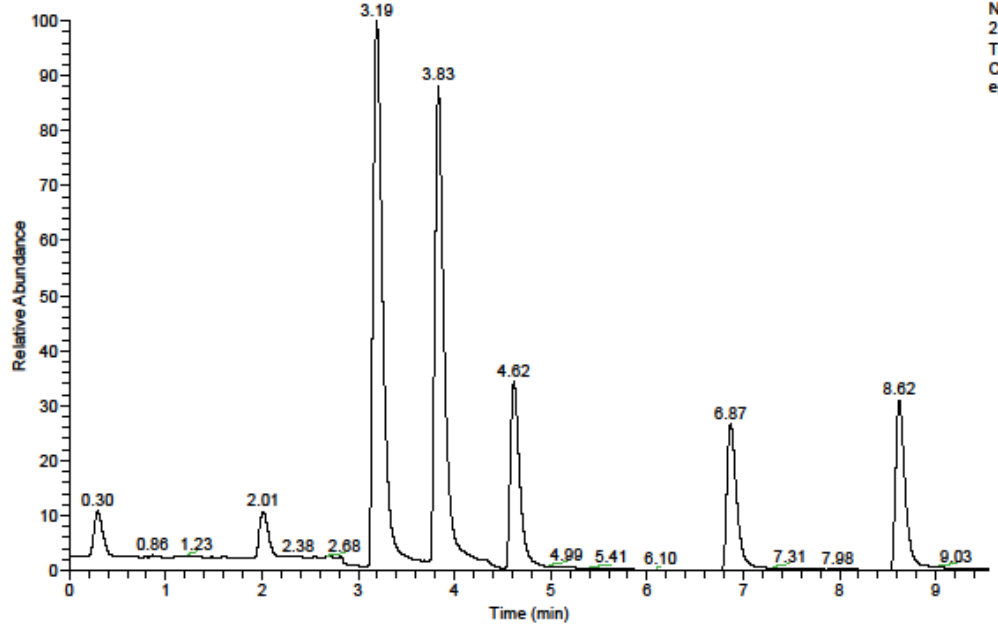
Tablo 4.7: LC-MS’de kullanılan gradient elüsyon yöntemi

Numara	Zaman	%A	%B	µL/dak
0	0.00	80.0	20.0	500.0
1	1.00	80.0	20.0	500.0
2	3.00	20.0	80.0	500.0
3	5.00	20.0	80.0	500.0
4	5.01	80.0	20.0	500.0
5	6.00	80.0	20.0	500.0

Catechin_neg

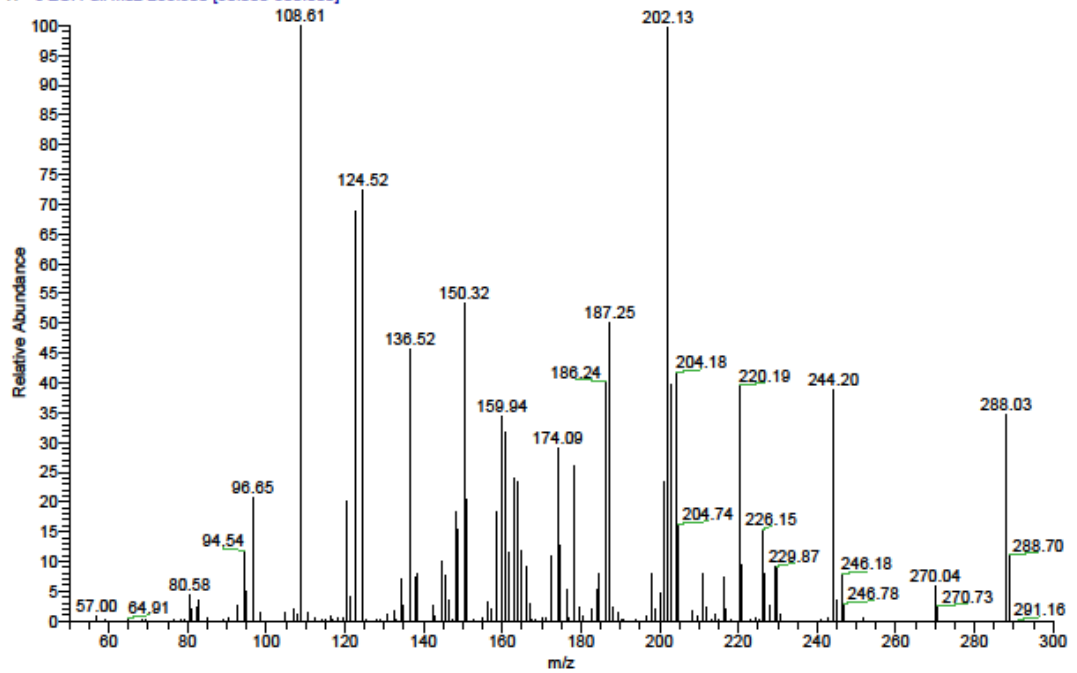
3/28/2014 5:23:22 PM

RT: 0.00 - 9.55 SM: 7G



NL:
2.57E7
TIC MS
Catechin_n
eg

Catechin_neg #1872 RT: 6.87 AV: 1 SB: 114 6.18-6.59 NL: 5.04E5
T: -c ESI Full ms2 288.800 [50.000-300.000]

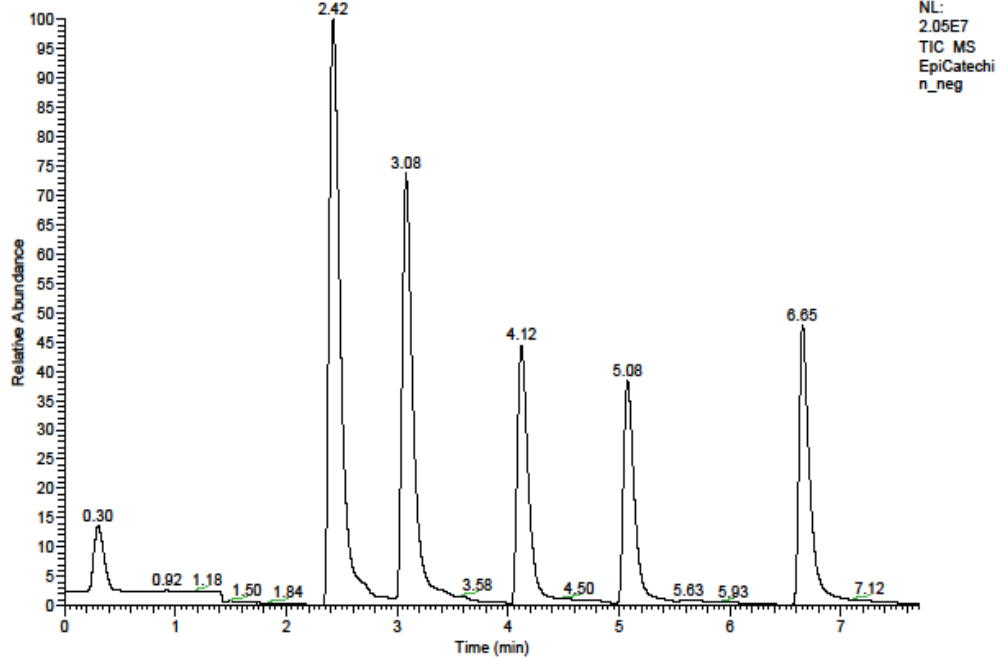
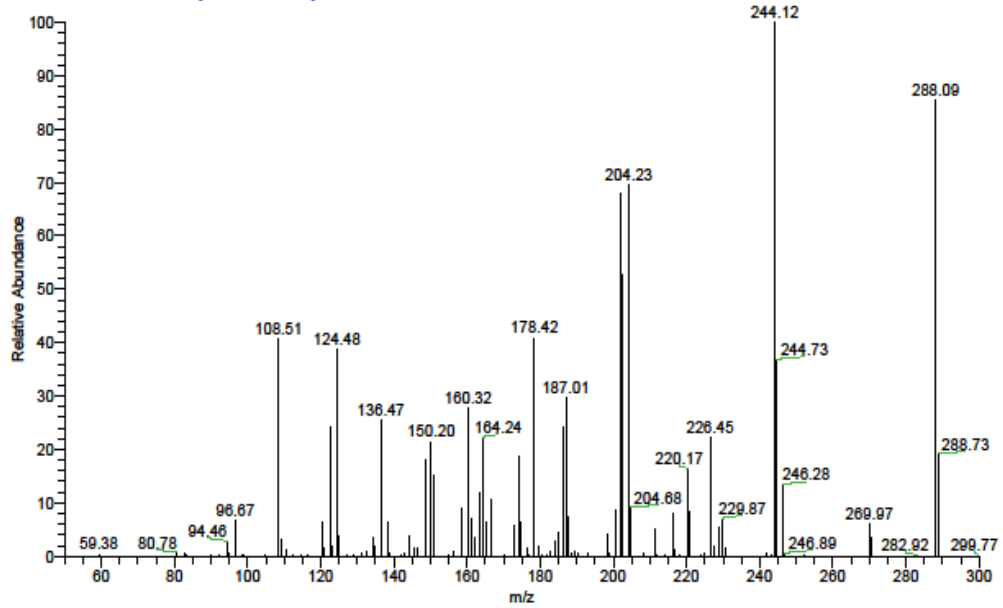


Şekil 4.53 Kateşinin LC-MS analizi.

EpiCatechin_neg

3/28/2014 5:44:17 PM

RT: 0.00 - 7.71 SM: 7G

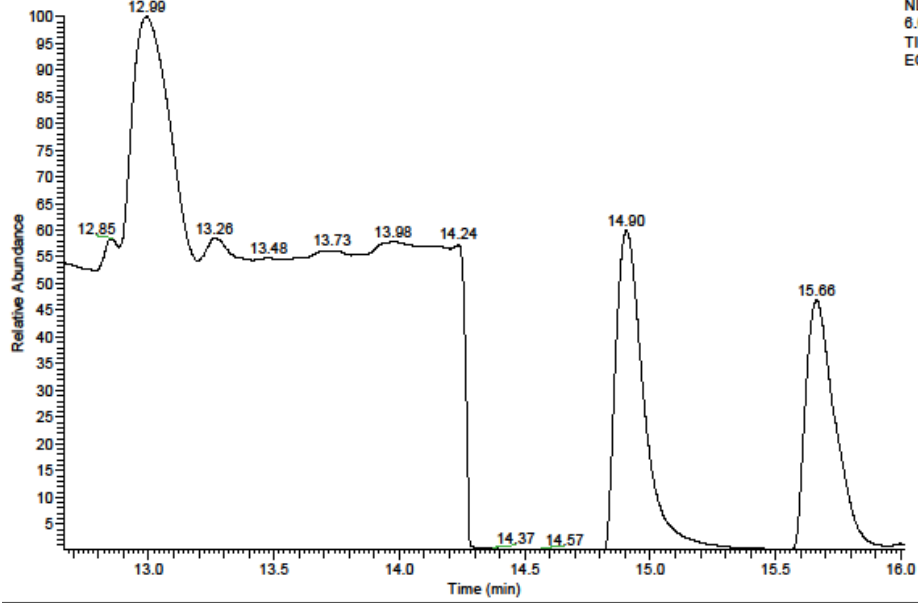
EpiCatechin_neg #1825 RT: 6.78 AV: 1 SB: 217 5.64-6.44 NL: 2.01E5
T: - c ESI Full ms2 288.660 [50.000-300.000]

Şekil 4.54 Epikateşinin LC-MS analizi

C:\Documents and Settings\... \ECD

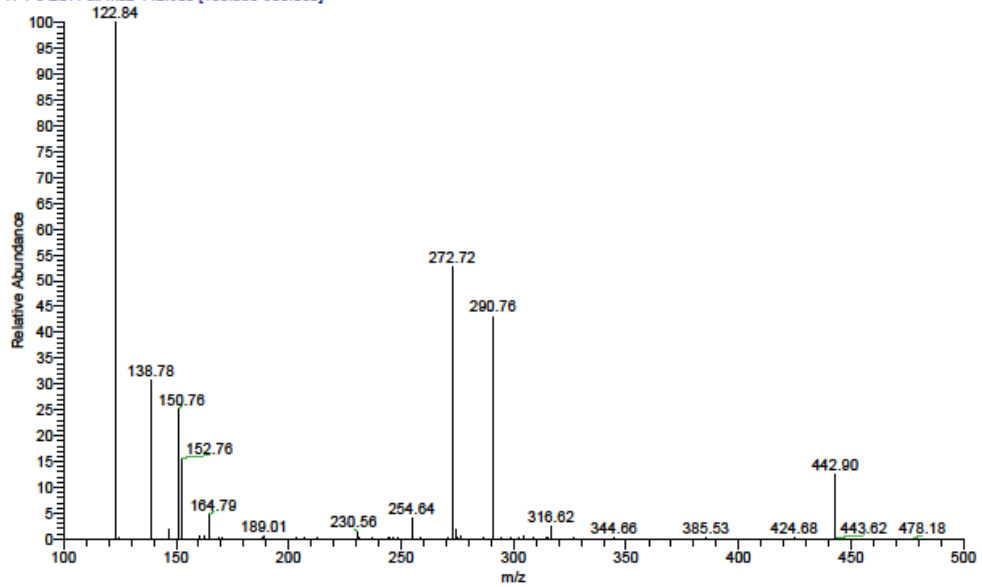
3/19/2014 5:23:54 PM

RT: 12.66 - 16.01 SM: 7G

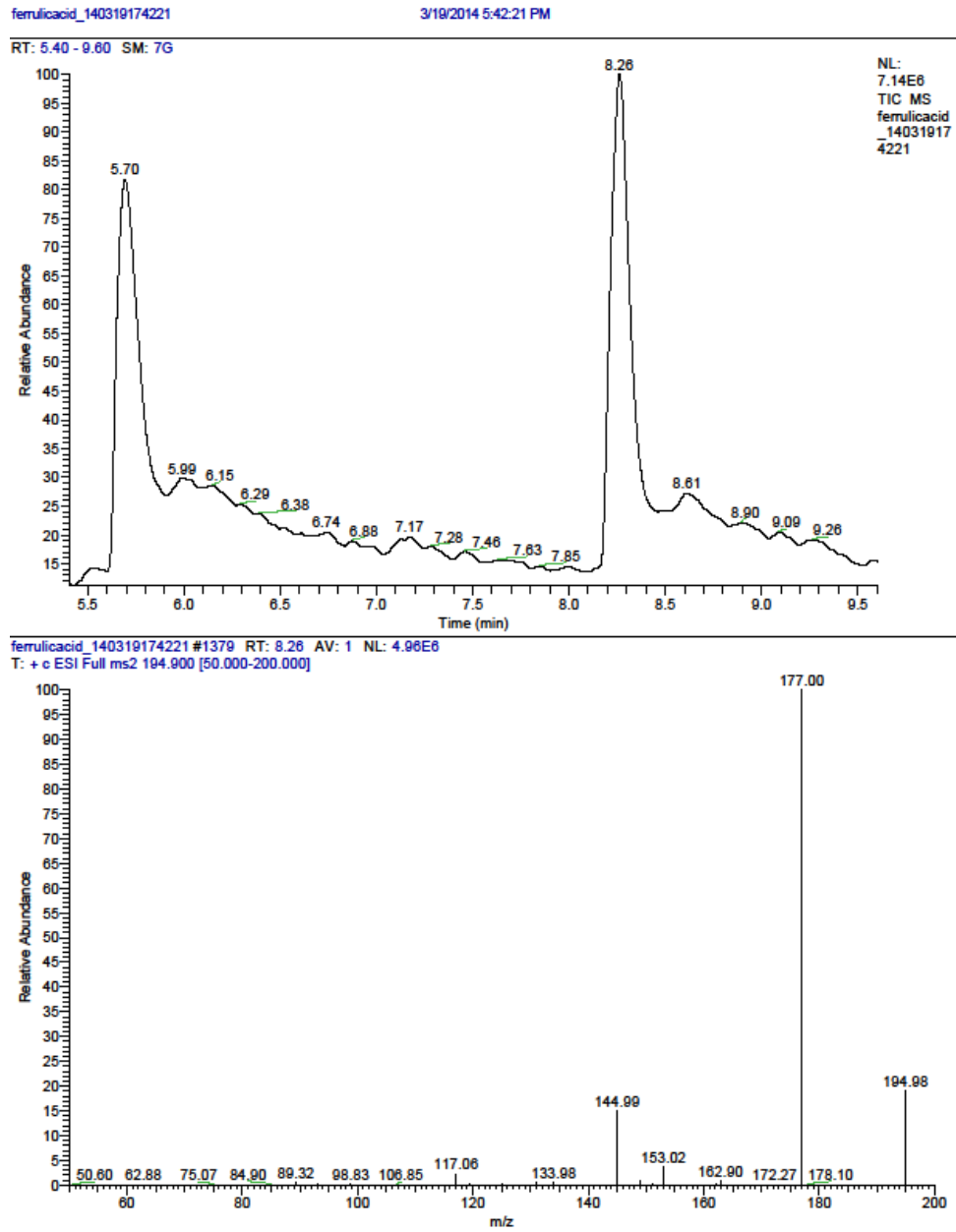
NL:
6.02E7
TIC MS
ECD

ECD #2022 RT: 15.66 AV: 1 NL: 9.31E6

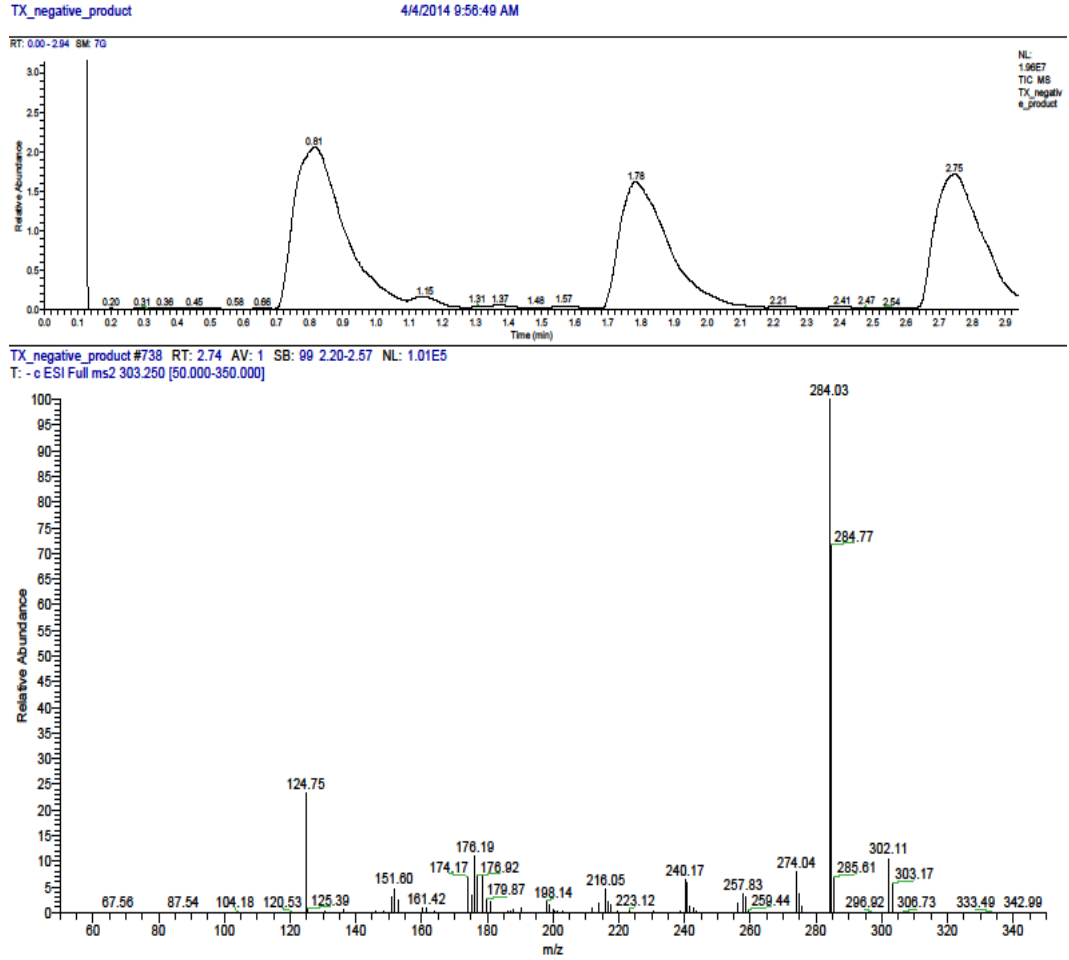
T: + c ESI Full ms2 442.900 [100.000-500.000]



Şekil 4.55 Epikateşin Gallatın LC-MS analizi

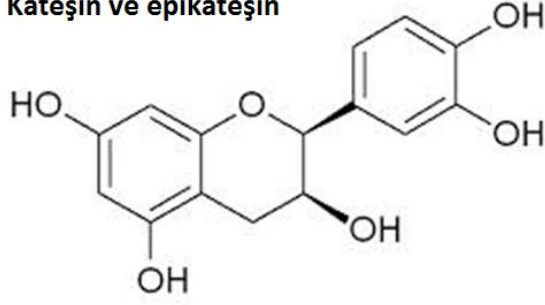
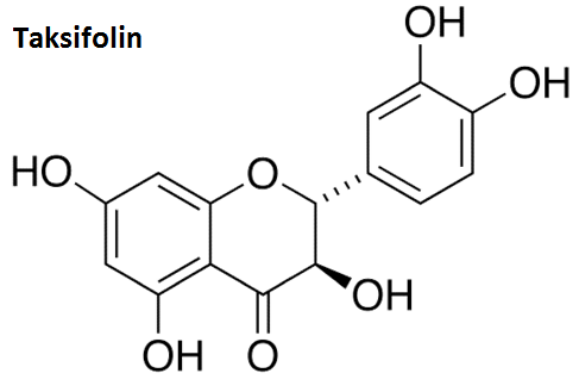
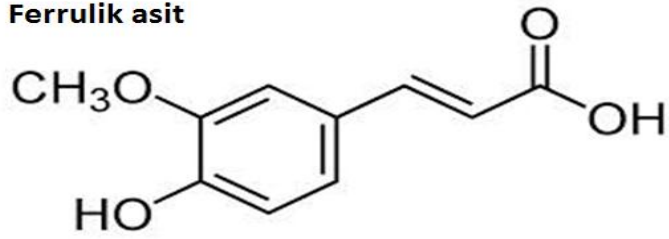
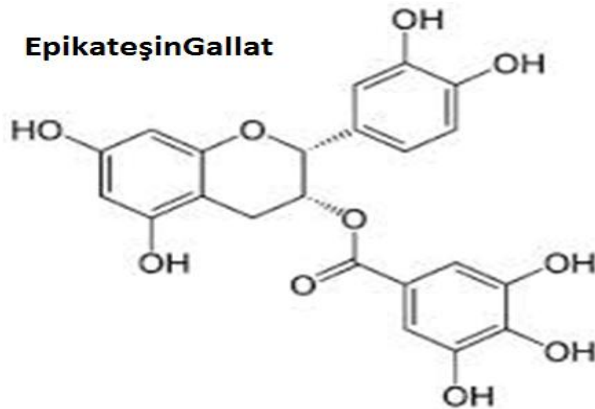


Şekil 4.56 Ferrulik asidin LC-MS analizi



Şekil 4.57 Taksifolinin LC-MS analizi

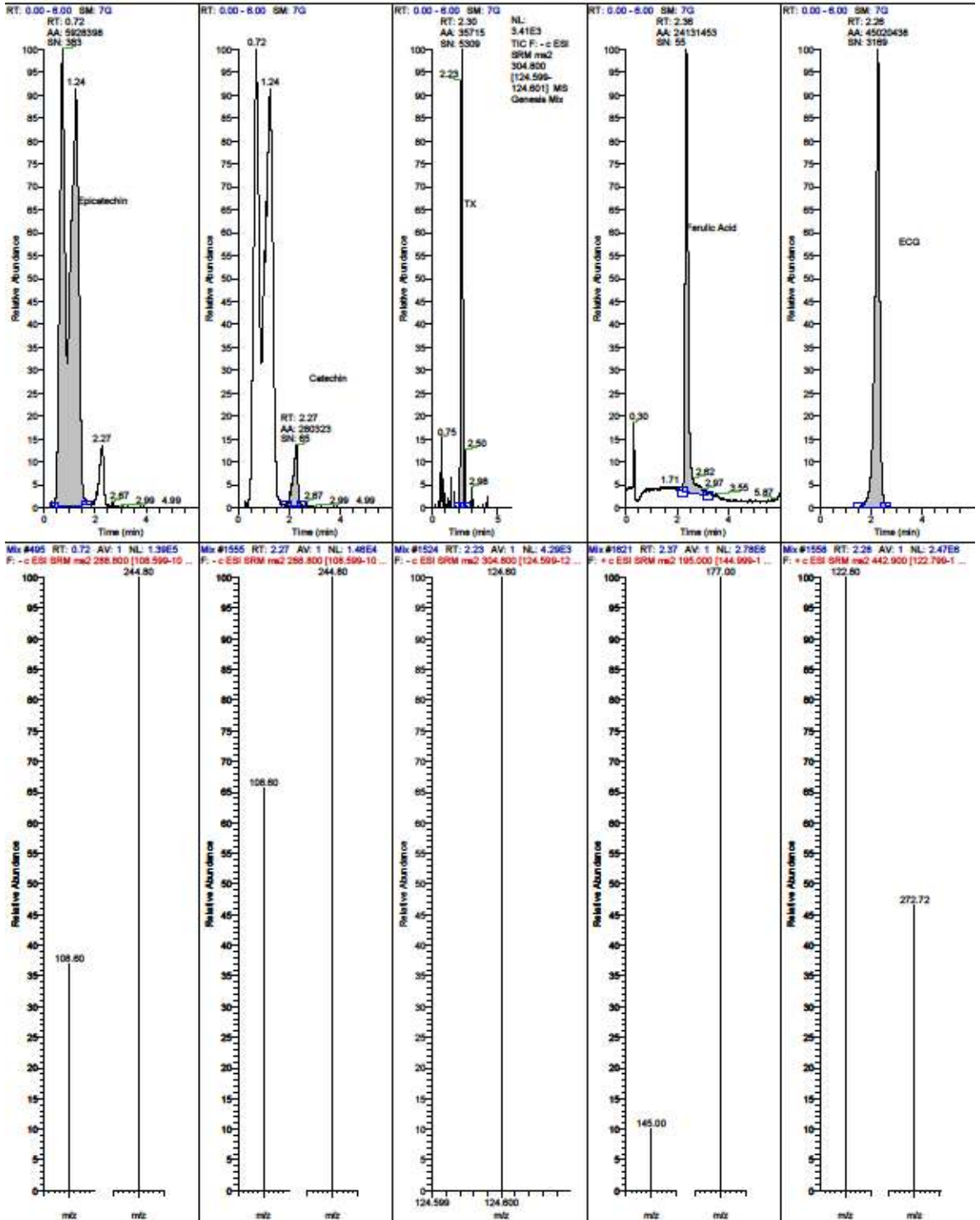
Bileşenlerin tek tek analizi yapıldıktan sonra bunlara ait karışım LC-MS cihazına verilmiştir. Bunlara ait parçalanma (m/z oranları) ürünleri Şekil 4.58'da görülmektedir. Daha sonra kara çam kabuğu, kızıl çam kabuğu, halep çam kabuğu, fıstık çam kabuğu ve sarı çam kabuğu ekstraktları LC-MS cihazına enjekte edilmiş ve bunlara ilişkin sonuçlar sırasıyla Şekil 4.59, 4.60, 4.61, 4.62 ve 4.63'de verilmiştir. Ayrıca bileşenlerin açık yapıları Şekil 4.58'de verilmiştir.

Kateşin ve epikateşin**Taksifolin****Ferrulik asit****EpikateşinGallat**

Şekil 4.58: Yukarıdan aşağıya sırasıyla; kateşin ve epikateşin, taksifolin, ferrulik asit ve epikateşin gallatın açık yapıları verilmiştir.

C:\Xcalibur\data\MES\2014_03_20\Mix

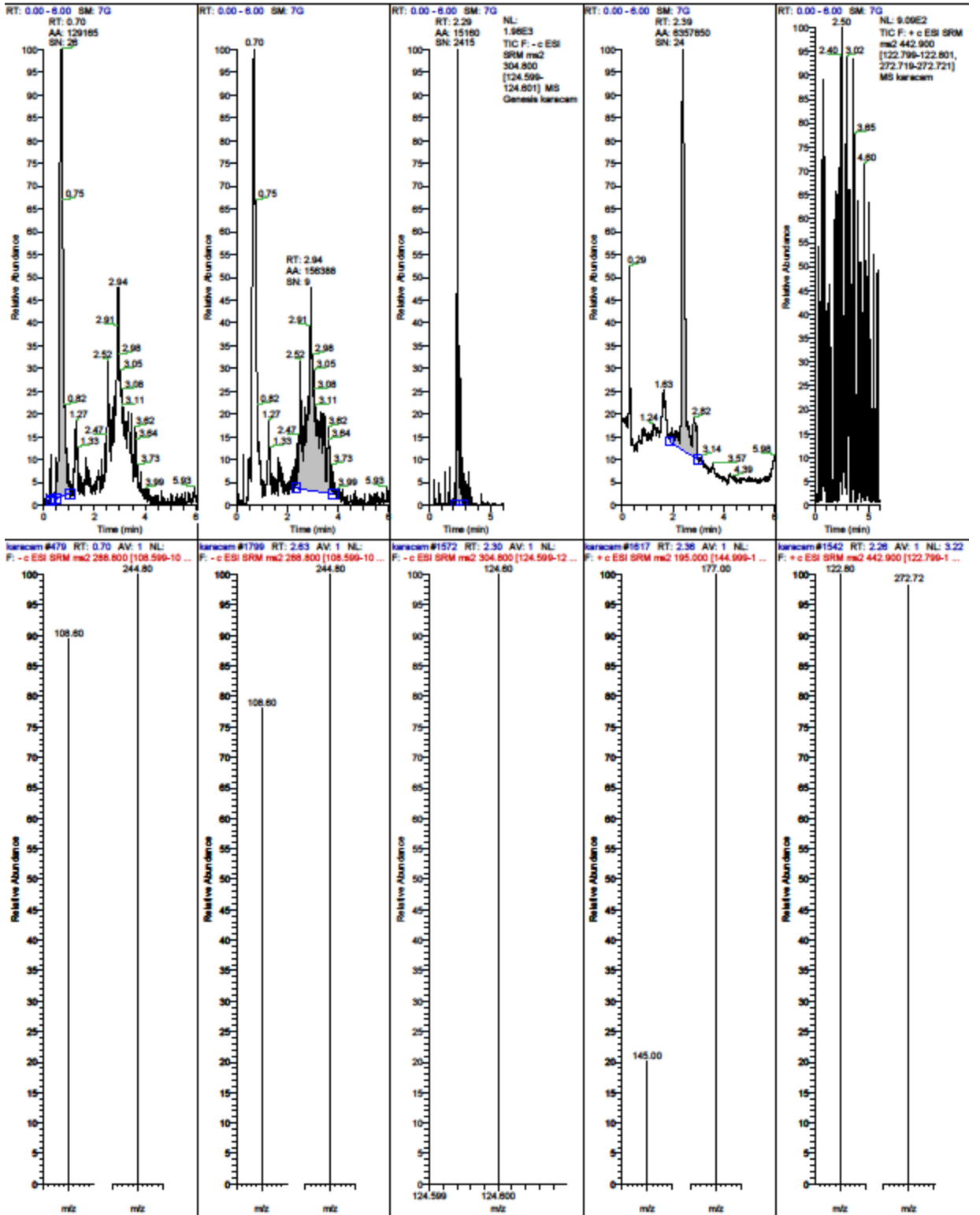
3/20/2014 4:22:07 PM



Şekil 4.59 Kateşin, epikateşin, epikateşingallat, ferrulik asit ve taksifolin karışımının LC-MS ile analizine ilişkin sonuçlar

c:\xcalibur\data\mes\2014 03 20\karacam

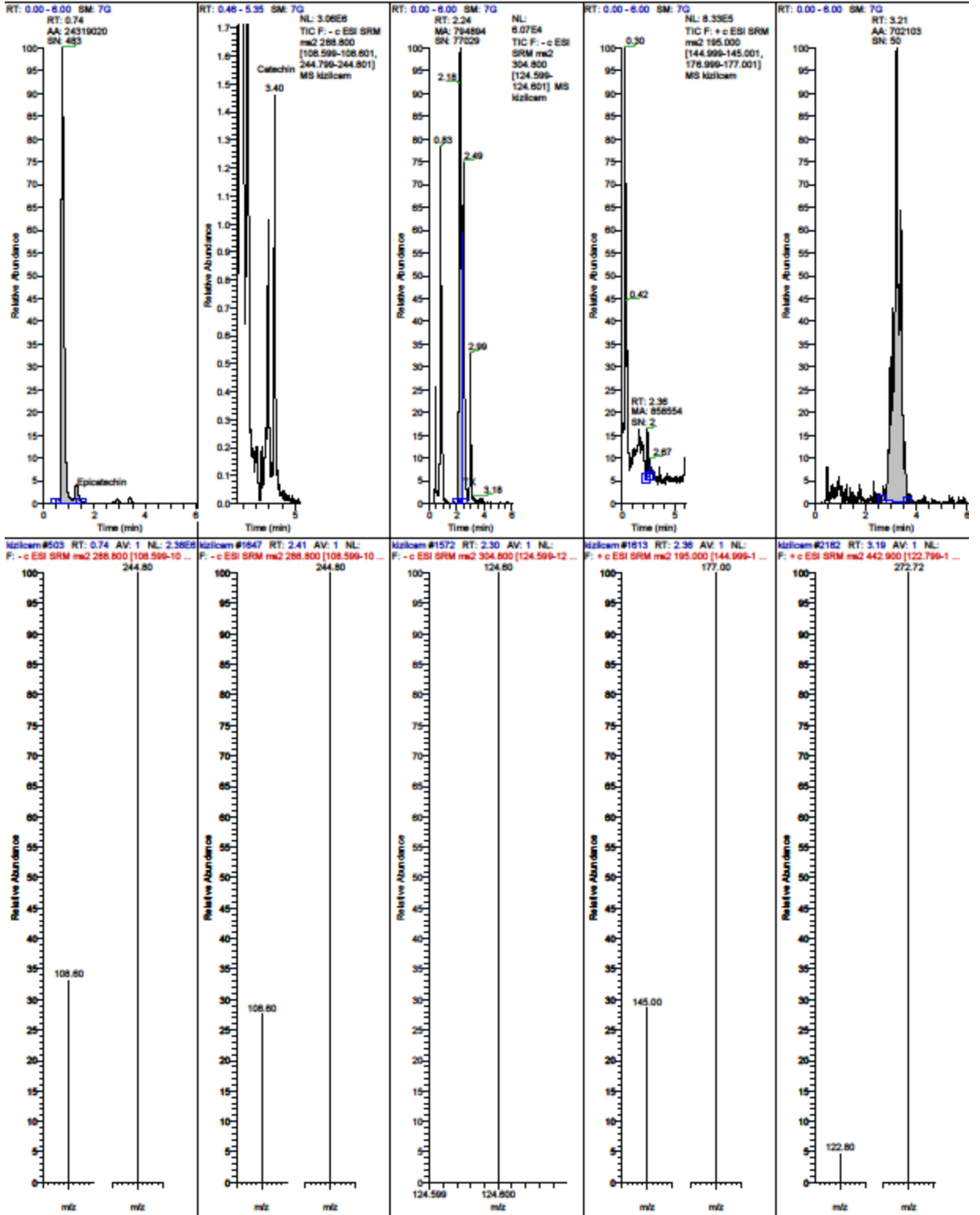
3/20/2014 4:54:32 PM



Şekil 4.60 Kara çam kabuğu ekstraktının LC-MS ile analizine ilişkin sonuçlar.

c:\xcalibur\data\mes\2014 03 20\kizilcam

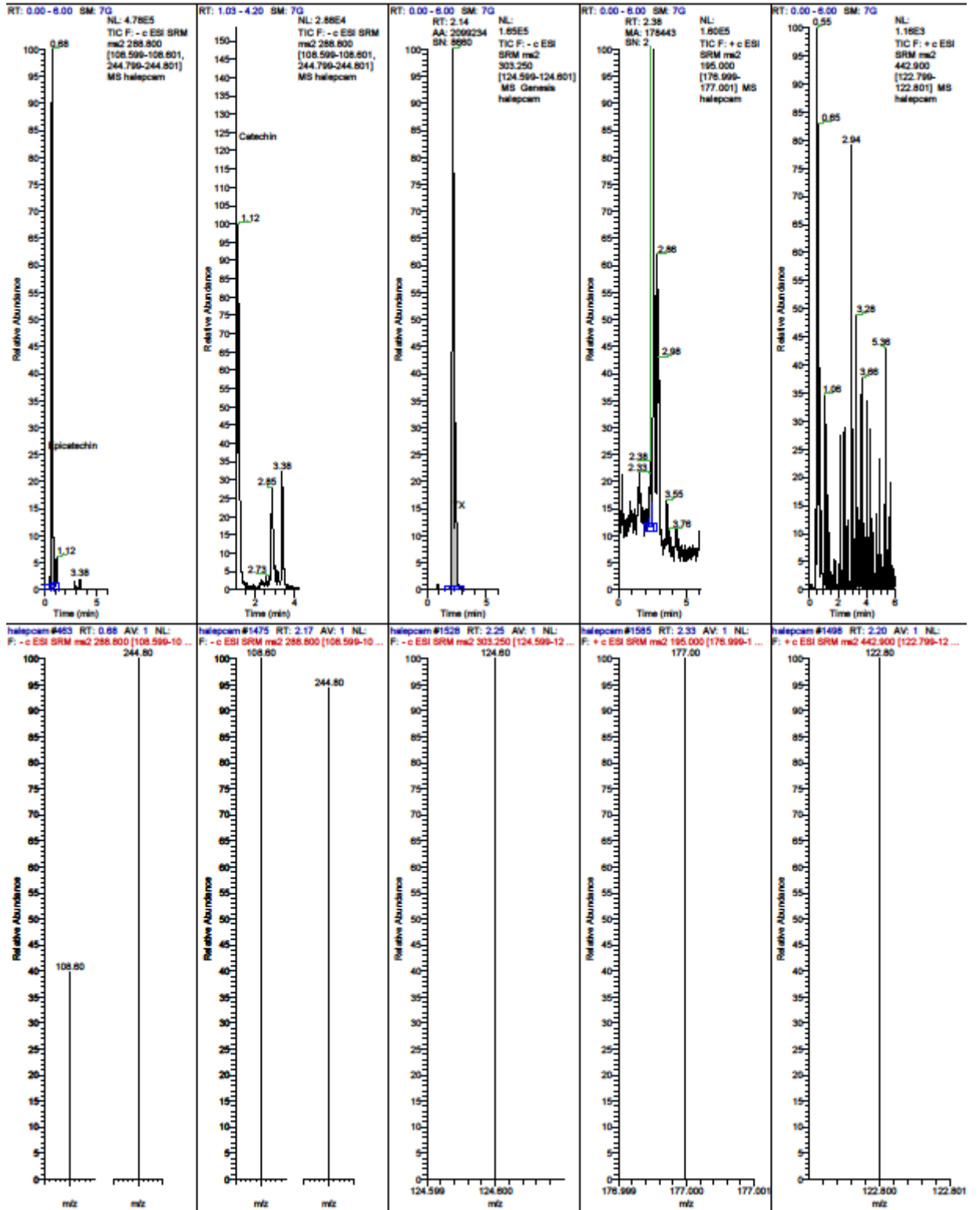
3/20/2014 5:05:14 PM



Şekil 4.61 Kızıl çam kabuğu ekstraktının LC-MS ile analizine ilişkin sonuçlar.

c:\xcalibur\data\mes\2014 04 04\halepcam

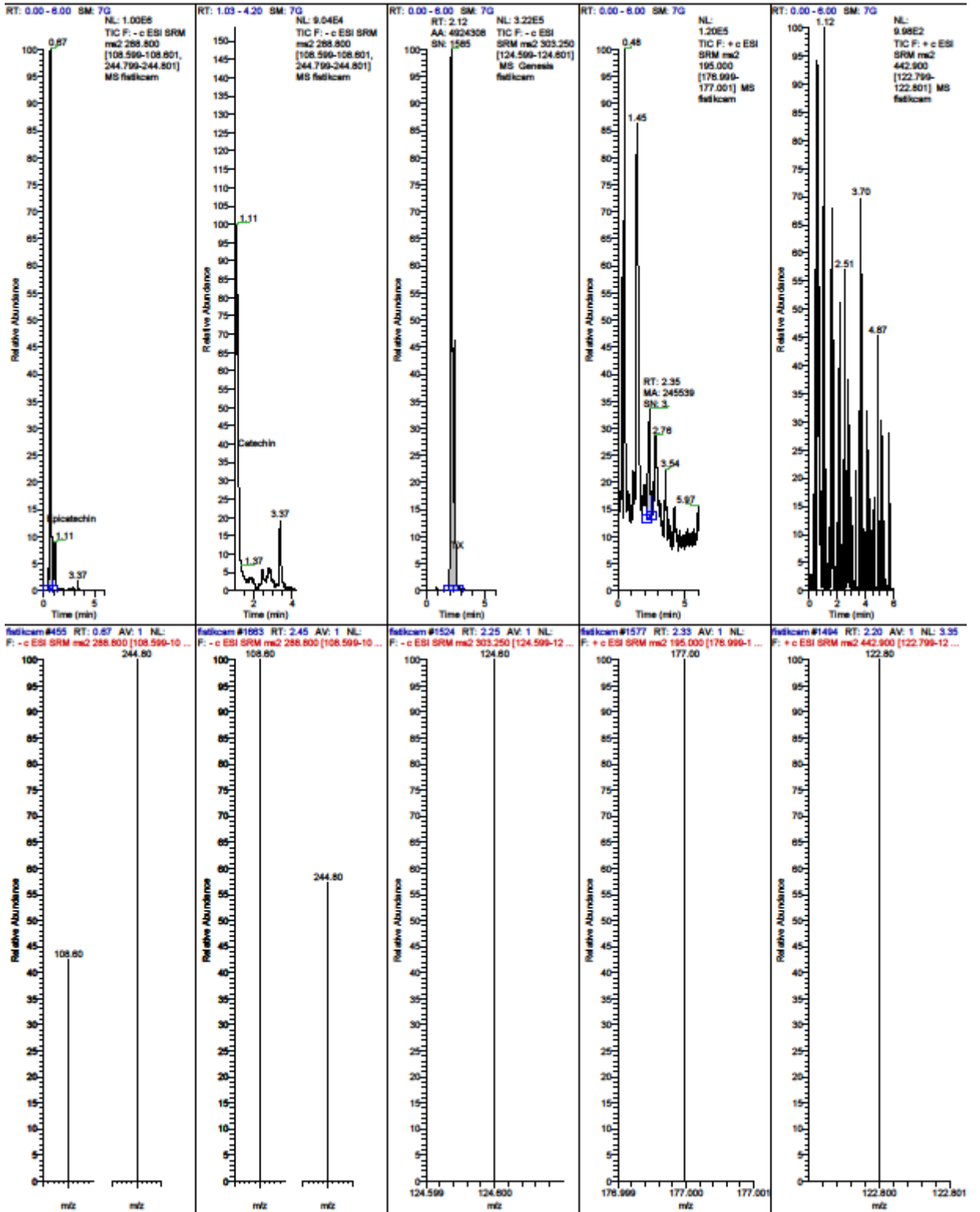
4/4/2014 11:04:48 AM



Şekil 4.62 Halep çam kabuğu ekstraktının LC-MS ile analizine ilişkin sonuçlar.

c:\xcalibur...mes\2014 04 04\fstikcam

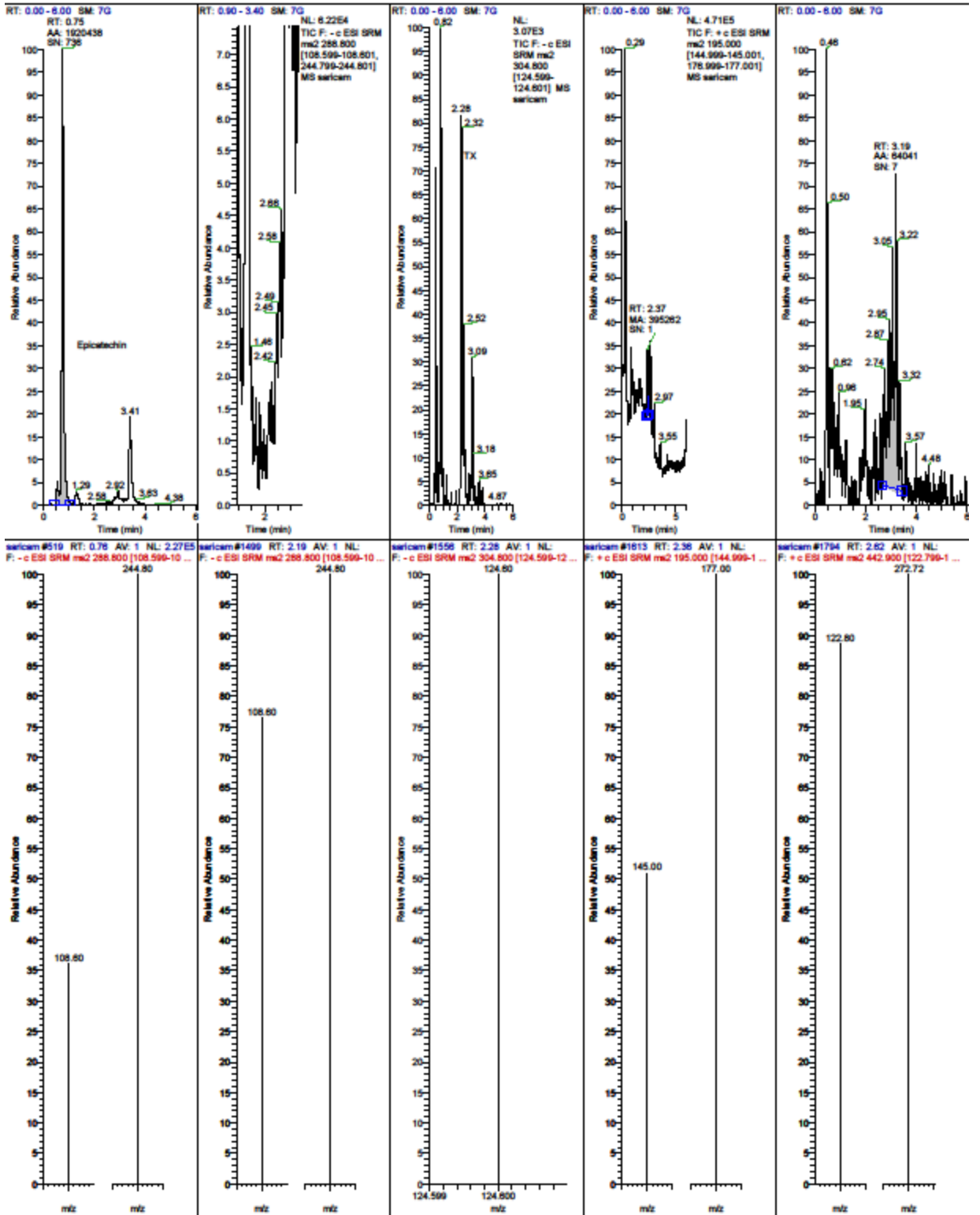
4/4/2014 11:11:32 AM



Şekil 4.63 Fıstık çam kabuğu ekstraktının LC-MS ile analizine ilişkin sonuçlar.

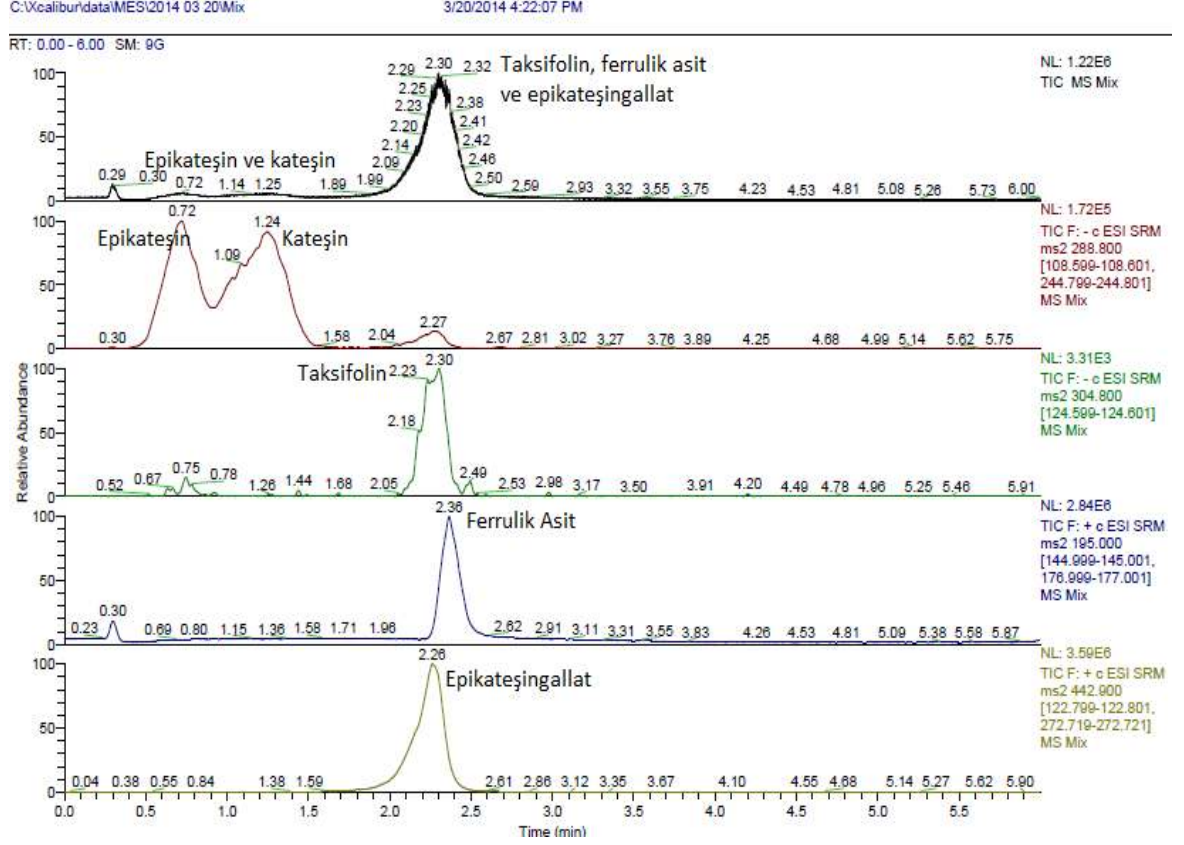
c:\xcalibur\data\mes\2014_03_20\saricam

3/20/2014 4:43:50 PM



Şekil 4.64 Sarı çam kabuğu ekstraktının LC-MS ile analizine ilişkin sonuçlar.

Şekil 4.64'de standartlara ait karışımın kromatogramı görülmektedir. Önceden belirlenen şartların uygulanması ile istenen m/z oranına ait bileşenler kromatogramdan seçilerek, istenen bileşene ait MS değerleri görülebilmektedir.



Şekil 4.65: LC-MS analizine ait kromatogram.

LC-MS ile yapılan analizlerde standartlardan elde edilen parçalanma ürünleri örneklerden elde edilen parçalanma ürünleri ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde çam kabukları ekstraktlarında tespit edilen piknogenol bileşenlerinin tümüne ilişkin verilere LC-MS analizlerinde de rastlanmıştır.

Standartlar karışım halinde verildiğinde kateşin ve epikateşin için; 244.8 ve 108.6 m/z değerleri elde edilmiştir. Taksifolin için 124.6, Ferrulik asit için 145 ve 177, ECG için ise 122.8, 272.72 m/z değerleri elde edilmiştir. Literatürde de kateşin ve epikateşinin parçalanma ürünleri aynıdır (Jianping Sun et al. 2007). Bizim çalışmamız için yapılan analizde alıkonma zamanları epikateşin için RT: 0,72 ve kateşin için RT: 2,27 olduğundan bu bileşenlerin kütle değerleri birbirine karışmamaktadır. Karışımda standartlar için elde edilen kütle değerleri her bir örnek içerisinde de tespit edilmiştir. Bu durum nitel olarak tüm bileşenlerin tüm örneklerde var olduğunu göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Çalışmada dedektör olarak kullanılan UV cihazı başlangıçta 210 nm dalga boyuna ayarlanmışsa da çıkan sorunlardan dolayı (tekrarlanabilirliğin düşük olması, dedektörün dengeye zor gelmesi vb.) dalga boyu 280 nm olarak değiştirilmiştir. HPLC cihazı ile başlangıçta isokratik elüsyon sistemi ile çalışmaya başlanmış ancak bileşenlerin alıkonma süreleri arasında büyük farklar olması ve toplam alıkonma süresinin çok uzun olması nedeniyle laboratuvarında bulunan isokratik sistem gradient sisteme upgrade edilmiş ve gradient elüsyon sistemi kullanılarak çalışmaya devam edilmiştir.

Çam kabuğu ekstraktları içinde epikateşingallata sadece sarı çam kabuğu ekstraktında rastlanmıştır. Kateşin miktarı fıstık çam ağacı ve kızıl çam ağacı kabuklarında yüksektir. Ferulik asit karaçam ve sarı çam ağacı kabuklarında bulunurken taksifolin tüm çam ağaçlarının kabuklarında bulunmaktadır. Tüm çam kabuklarının sonuçları karşılaştırmalı olarak Tablo 5.1.'da verilmiştir.

Tablo 5.1 Farklı tür çam ağaçları kabuklarında bulunan piknogenol bileşenleri ve miktarları (mg/g)

Çam Ağacı Türleri / Bileşenler	Kateşin mg/g	Epikateşin mg/g	Ferulik Asit mg/g	Taksifolin mg/g	Epikat.Gallate mg/g
Kara Çam	0,086±0,002	0,076±0,002	0,022±0,001	0,209±0,005	*
Kızıl Çam	1.454±0,004	0,027±0,000	*	23,164±0,322	*
Halep Çamı	0,093±0,003	0,046±0,000	*	0,219±0,002	*
Sarı Çam	0,065±0,002	0,066±0,002	0,010±0,000	0,015±0,000	0,025±0,000
Fıstık Çamı	1.923±0,021	*	*	1.801±0,001	*

- Yöntemin belirtme sınırının altında

Literatürdeki çalışmalar farklı bölgelerde yer alan aynı tür çam kabuklarının içeriklerinin değiştiğini göstermektedir. Aynı türe ait sonuçların bölgeden bölgeye 10 ile 100 kat arası farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Fransız çam ağacı kabuklarından elde edilen piknogenolde bulunan taksifolin miktarları 17-33 mg arası değişmektedir (I. Ince et al. 2009). Bu miktar literatürde bulunan çeşitli çam kabuklarının sonuçlarıyla karşılaştırıldığında oldukça yüksektir. Bizim, kızıl çam ağacı kabuklarında bulduğumuz değer (23.16 mg/g) diğer çam kabuklarına göre oldukça

yüksek olup bu miktar piknogenol standardı olarak kullanılan Fransız çam ağaçlarındaki miktarlara yakındır.

Türkiye'den ve Almanya'dan alınan örneklerle yapılan bir çalışmada sarı çam ve kara çam kabuğu ekstraktları karşılaştırılmıştır. Çalışmada piknogenol bileşenlerinden olan kateşin, epikateşin, kateşin gallat ve taksifolin bileşenlerine ait sonuçlar karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 5.2'de verilmiştir.

Tablo 5.2 Türkiye ve Almanya'dan toplanan bazı çam ağacı kabuklarındaki piknogenol bileşenlerine ait miktarlar (mg/g).

Türler	Kateşin	Epikateşin	Kateşin gallat	Taksifolin
<i>P.pinea (fıstık çamı)</i> (Türkiye)	7.703 ± 0.02	0.684 ± 0.08	1.529 ± 0.05	0.138 ± 0.00
<i>P.sylvestris (sarı çam)</i> (Türkiye)	3.207 ± 0.46	0.466 ± 0.04	0.332 ± 0.05	0.041 ± 0.01
<i>P.nigra (kara çam)</i> (Türkiye)	1.817 ± 0.02	0.563 ± 0.01	0.025 ± 0.00	0.266 ± 0.00
<i>P.sylvestris (sarı çam)*</i> (Almanya)	0.299 ± 0.01	0.215 ± 0.01	0.231 ± 0.03	0.018 ± 0.00
<i>P.nigra (kara çam)*</i> (Almanya)	0.161 ± 0.01	0.068 ± 0.01	0.002 ± 0.00	0.10 ± 0.00

Sonuçlardan görebileceğimiz gibi değişik bölgelerden toplanan aynı türler arasında, kateşin miktarları karşılaştırıldığında yaklaşık 10 katlık farklar görülmektedir. Örneğin Türkiye'den toplanan sarı çam kabuklarında 3.207 mg/g kateşin bulunurken, Almanya'dan toplanan sarı çam kabuklarında bu miktar 0.299 mg/g'a kadar düşmektedir. Diğer bileşenler açısından baktığımızda farklılık bu kadar çok değildir. Yine Türkiye'den toplanan kara çam kabuklarında kateşin miktarı 1.817 mg/g iken Almanya'dan toplanan kara çam kabuklarında bu miktar 0.161 mg/g civarındadır. Karaçam açısından bakıldığında Türkiye'de yetişen türde

epikateşin ve kateşin gallatın Almanya'daki türe göre 10 kat fazla olduğu görünmektedir. Almanya'daki kara çam türünde taksifolin bulunmamaktadır. Bu farklılık toprak yapısından, iklim koşullarından, bölgenin yapısından, kabukların toplandığı mevsimden kaynaklanıyor olabilir. Bizim çalışmalarımız sonucu elde edilen değerlere baktığımızda kara çam kabuğu için kateşin 0.086 mg/g, epikateşin 0.076 mg/g ve taksifolin 0.2088 mg/g civarındadır. Bu değerler içerisinde kateşin Almanya'daki türe göre yarı değerinde, epikateşin ve taksifolin değerleri ise Almanya'daki türden fazladır. Bizim çalışmamızdaki taksifolin değeri Türkiye'deki çam kabuklarının analizinde elde edilen değerle hemen hemen aynıdır.

Literatürdeki çalışmalarda piknogenol için verilen sonuçlara baktığımızda kateşin 7.92 mg/g, epikateşin 4.81 mg/g, kateşin gallat 0.81 mg/g ve taksifolin 17.04 mg olarak verilmiştir (I.Ince et al 2009). Bir başka literatür ise piknogenolde bulunan taksifolin miktarını 33 mg/g olarak vermiştir (Ozlem Yesil-Celiktas et al. 2009). Bizim elde ettiğimiz sonuçlar içinde kateşin miktarı en çok 1.92 mg/g olacak şekilde fıstık çam kabuğunda görülmektedir. Çalışmalarımızda hiçbir türde kateşin gallata rastlamamakla birlikte epikateşin gallat sadece sarı çam kabuğu ekstraktında gözlenmiştir ve miktarı 0.0253 mg/g'dır. Epikateşin ise en fazla karaçam kabuğu ekstraktında 0.0756 mg/g olarak tayin edilmiştir. Çam kabuğu ekstraktları içinde dikkat çeken en yüksek miktar taksifolin bileşenine aittir. Taksifolin bileşeni kızıl çam kabuğunda 23.16 mg/g olarak tespit edilmiştir. Bu miktar Fransız çam kabuklarının ekstraktında bulunan 17-33 mg/g aralığı içindedir ve diğer türlerden oldukça yüksektir. Taksifolin miktarının fazlalığı özellikle kızıl çam kabuğunun ticari amaçla gıda veya ilaç sektöründe kullanılabileceğini göstermektedir.

Piknogenol bileşenleri, flavanodiler ve proantosyanidinler üzerine literatürde çokça çalışma olmasına rağmen çam kabukları üzerine çok az çalışmaya rastlanmaktadır. Bu çalışmaların hemen hemen hepsi de Fransız çam kabuğu ekstraktını analizlemek amacıyla standart yöntem geliştirme çalışmalarıdır. Diğer çalışmalar ise çeşitli çaylar ya da bitkisel örnekler üzerinedir. Literatürde çam kabuğu ekstraktı ile yapılan çalışmalarda, ekstraksiyon aşamaları hakkında yeterli bilginin yer almaması bizim çalışmalarımızı etkilemiş ve yeni yöntemler bulmak zorunda olmamızı gerektirmiştir. Ekstraksiyonda deriştirme (evaporatör) ve katı madde elde etme aşamalarında (çalışmanın son aşaması) proantosyanidinlerin oksijen ile teması sonucu kahverengileştiği gözlenmiştir. Bu durum piklerde ayrımın sağlanmasını engellemiştir. Oksitlenmeden kurtulmak amacıyla evaporatör ve vakumlu pompa ile süzme işlemleri atlanarak etil asetat içine alınan ekstrakt direk azot gazı altında uçurulmuş ve elde edilen katı madde metanol-su karışımında çözülmüştür. Bu sayede son aşamada elde edilen bej renkli katı maddenin havayla teması engellenmiştir. Standart yöntemde uygulanan etil asetat fazın evaporatör ile deriştirilmesi, etil asetat fazına kloroform katarak çöktürmenin yapılması ve vakumlu pompa yardımı ile katıyı süzme işlemlerinin hepsi atlanmıştır. Bu kademelerin atlanması çalışmanın zamanını azaltmış hem de daha fazla kimyasalın harcanmasını engellemiştir. Bunlardan daha da önemlisi bileşenlerin oksijenle temasının engellenmesi

olmuştur. Böylece ekstrakt okside olmamış ve kahverengileşme önlenmiştir. Yaptığımız çalışmalar sonucu gözlemlerimize göre, çam kabukları nemsiz ortamda saklandıklarında uzun süre kararlı kalabilmektedirler. Ancak ekstrakt hava ile temas edince kısa sürede bozulmaktadır.

Sonuç olarak hala literatürde çok az çalışma örneği olan çam kabukları analizi için, ekstraksiyon kademelerinde değişikliğe gidilerek yeni yöntemler uygulanmış, böylece ekstraksiyon zamanı kısaltılmış, daha az kimyasal harcanmış ve yaklaşık 28 dakika içinde tüm bileşenler HPLC ile analizlenmiştir. Literatüre baktığımızda ferrulik asit bileşeni çay örneklerinde sıklıkla analizlenirken çam kabuklarında gözden kaçırılmıştır. Bizim çalışmamızda bu bileşenin kara çam ve sarı çam kabuklarında bulunduğu tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

Amiot, M.J.; Tacchini, M; Aubert, S.; Nicolas, J. J. Food Sci, 57, 958,1992Bagchi, D.; Preuss, H. G. Oligomeric proanthocyanidins in human health and disease prevention. In Critical Reviews of Oxidative Stress and Aging: Advances in Basic Science, Diagnostics and Intervention; Cutler, R. G., Rodriguez, H., Eds.; World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.: Singapore, pp 640-660, 2003.

Baldi, A.; Romani, A.; Mulinacci, N.; Vincieri, F.F.; Ghiselli, A. In ACS Symposium Series. Wine. Nutritional and Therapeutic Benefits', Watkins, T.R., Ed.; American Chemical Society: Washington D.C., Vol. 661, pp. 166- 179,1997

Belcaro, G., Cesarone, M.R., Ricci, A., Cornelli, U., Rohdewald, P., Ledda, A., Di Renzo, A., Stuard, S., Cacchio, M., Vinciguerra, G., Gizzi, G., Pellegrini, L., Dugall, M., Fano, F., Control of Edema in Hypertensive Subjects Treated With Calcium Antagonist (Nifedipine) or Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors With Pycnogenol®. Clin Appl Thromb Hemost, 12(4): 440-444, 2006.

Blazso, G., Gabor, M., Sibbel, R., and Rohdewald, P. Antiinflammatory and superoxide radical scavenging activities of a procyanidins containing extract from the bark of Pinus pinaster Sol. and its fractions. Pharm. Pharmacol. Lett. 3,217-220, 1994.

-Blazso, G., Rohdewald, P., Sibbel, R., and Gabor, M. Antiinflammatory activities of procyanidin-containing extracts from Pinus pinaster Sol. In "Flavonoids and Bioflavonoids" (S. Antus, M. Gabor, and K. Vetschera, eds.). Proceedings of the International Bioflavonoid Symposium, Vienna, Austria, 1995.

Blazso, G., Gabor, M., and Rohdewald, P. Anti-inflammatory activities of procyanidin-containing extracts from Pinus pinaster Ait. after oral and cutaneous application. Pharmazie 52, 380-382, 1997.

Blazso, G. Gabor, M., Schönlaui, F. and Rohdewald, P. (2004) Short communication: Pycnogenol® accelerates wound healing and reduces scar formation. Phytother Res, 18: 579-581,2004.

Borges, C.; Martinho, P.; Martins, A.; Rauter, A.P. & Ferreira, M.A. Structural characterisation of flavonoids and flavonoid-O-glycosides extracted from *Genista tenera* by fast-atom bombardment tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 15, 18, 1760-1767, 2001.

Butler, L.G.; Rogler, J.C. In ACS Symposium Series. Phenolic Compounds in Food and their Effects on Health I. Analysis, Occurrence and Chemistry; Ho, CT.; Lee, C.Y.; Huang, M.-T., Eds.; American Chemical Society: Washington DC, Vol. 506, pp. 298-317, 1992.

Cesarone, M.R., Belcaro, G., Rohdewald, P., Pellegrini, L., Ledda, A., Vinciguerra, G., Ricci, A., Gizzi, G., Ippolito, E., Fano, F., Dugall, M., Acerbi, G., Cacchio, M., Di Renzo, A., Hosoi, M., Stuard, S., Corsi, M. Rapid Relief of Signs/Symptoms in Chronic Venous Microangiopathy With Pycnogenol®: A Prospective, Controlled Study. *Angiology*, 57(5): 569-576, 2006.

Cesarone, M.R., Belcaro, G., Rohdewald, P., Pellegrini, L., Ledda, A., Vinciguerra, G., Ricci, A., Gizzi, G., Ippolito, E., Fano, F., Dugall, M., Cipollone, G., Acerbi, G., Cacchio, M., Del Boccio, G., Di Renzo, A., Stuard, S., Corsi, M. Improvement of Diabetic Microangiopathy With Pycnogenol®: A Prospective, Controlled Study. *Angiology*, 57(4): 431-436, 2006.

Chandler, E R., Freeman, L. and Hooper, S. N. Herbal remedies of the Maritime Indians. *J. Ethnopharmacol.* 1, 49-68, 1979.

Chang S. K., Sung P. M., Characterization of proanthocyanidin in hot water extract isolated from *Pinus radiata* bark. *Wood Sci Technol.* 41:235–247 DOI 10.1007/s00226-006-0103-8, 2007.

Chen P., Song F., and Lin. L.. 2009. Chromatographic Fingerprint Analysis of Pycnogenol®

Dietary Supplements, *Journal of AOAC International*, Vol. 92, No. 2, 2009.

Cheyrier, V.; Ricardo da Silva, J.M. *J. Agric. Food Chemistry.*, 39, 1047, 1991

Chida, M., Suzuki, K., Nakanishi-Ueda, T., Ueda, T., Yasuhara, H., Koide, R. and Armstrong, D. In vitro testing of antioxidants and biochemical end-points in bovine retinal tissue. *Ophthalmic Res*, 31: 407-415, 1999.

Chovanova, Z., Muchova, J., Sivonova, M., Dvorakova, M., Zitnanova, I., Waczulikova, I., Trebaticka, J., Skodacek, I. and Durackova, Z. Effect of polyphenolic extract, Pycnogenol®, on

the level of 8-oxoguanine in children suffering from attention deficit/hyperactivity disorder. *Free Radic Res*, 40(9): 1003-1010, 2006.

Clifford, M. N. Appendix 1. A Nomenclature for Phenols with Special Reference to Tea, Washington, DC, 11/1999, CRC Press LLC.: Boca Raton, Florida, Vol. 41, Supplement 5, pp 393- 397, 1999.

Cossins, E., Lee, R. and Packer, L. ESR studies of vitamin C regeneration, order of reactivity of natural source phytochemical preparations. *Biochem Mol Biol Int*, 45(3): 583-597, 1998.

Croteau, R.; Kutchan, T. M.; Lewis, N. G. Natural Products (Secondary Metabolites). In *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*; Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R., Eds.; American Society of Plant Physiologists: pp 1250-1318, 2000.

D'Andrea G., Pycnogenol: A blend of procyanidins with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia* 81 724–736, 2010.

Dawei Wen, Chenchen Li, Hao Di, Yiping Liao, And Huwei Liu, A Universal HPLC Method for the Determination of Phenolic Acids in Compound Herbal Medicines, *J. Agric. Food Chemistry*., 53, 6624-6629, 2005.

Devaraj, S., Vega-López, S., Kaul, N., Schönlaue, F., Rohdewald, P. and Jialal, I. Supplementation with a pine bark extract rich in polyphenols increases plasma antioxidant capacity and alters plasma lipoprotein profile. *Lipids*, 37(10): 931-934, 2002.

Dragendorff, G. "Die Heilpflanzen der verschiedenen Völker und Zeiten. Ihre Anwendung, wesentlichen Bestandteile und Geschichte," p. 66. Ferd. Enke, Stuttgart, 1898..

Drehse G., in: L. Parker, M. Hiramatsu, T. Yoshikawa (Eds.), *Antioxidant Food Supplements in Human Health*, Academic Press, San Diego, p. 311, 1999.

Drehse G., *From Ancient Pine Bark Uses to Pycnogenol. Antioxidant Food Supplements in Human Health* Copyright by Academic Press. All rights of reproduction in any form reserved, 1999.

Dumon, M. C. *Recherches Analytiques sur les Pycnogenols*, Ph.D. thesis: University of Bordeaux II, France, 1990.

Durackova, Z., Trebaticka, B., Novotny, V., Zitnanova, I. and Breza, J. Lipid metabolism and erectile function improvement by Pycnogenol®, extract from the bark of Pinus pinaster in patients suffering from erectile Dysfunction - a pilot study. *Nutr Res*, 23: 1189-1198, 2003.

Dvorakova, M., Sivonova, M., Trebaticka, J., Skodacek, I., Waczulikova, I., Muchova, J. and Durackova, Z. Research Article: The effect of polyphenolic extract from pine bark, Pycnogenol®, on the level of glutathione in children suffering from attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Redox Rep*, 11(4): 163-172, 2006.

Eidlitz, K. "Food and Emergency Food in the Circumpolar Area." Inaugural Ph.D. Dissertation, University of Uppsala. Fielder, M. (1975). "Plant Medicine and Folklore," pp. 55-195. Winchester Press, New York, 1969.

Farid, R., Mifteizi, Z., Mirheidari, M., Yasdi, S., Torghabeh, H., Esmaelli, H., Zibadi, S., Rohdewald, P. and Watson, RR. Pycnogenol® supplementation reduces pain and stiffness and improves physical function in adults with knee osteoarthritis. *Nutr Res*, in print, 2007.

Fielder, M. "Plant Medicine and Folklore," pp. 55-195. Winchester Press, New York, 1975.

Forlines, D. R., Tavenner, T., Malan, J. C. S., and Karchesy, J. J. Plants of the olympic coastal forests: Ancient knowledge of materials and medicines and future heritage. In "Plant Polyphenols" (R. W. Hemingway and P. E. Laks, eds.), pp. 767-782. Plenum Press, New York, 1992.

Ferreira, D.; Steynberg, J.P.; Burger, J.F.W.; Bezuidenhoudt, B.C.B. In *Recent Advances in Phytochemistry. Phenolic Metabolism in Plants*, Stafford, H.A.; Ibrahim, R.K., Eds.; Plenum Press: New York, London, Vol. 26, pp. 255- 295, 1992.

Ferreira, D.; Bekker, R. *Nat. Prod. Rep.*, 13, 411, 1996.

Grimm, T., Chovanova, Z., Muchova, J., Sumegova, K., Liptakova, A., Durackova, Z. And Högger, P. Inhibition of NF-kappaB activation and MMP-9 secretion by plasma of human volunteers after ingestion of maritime pine bark extract (Pycnogenol®). *J Inflamm*, 3(1): 1-6, 2006.

Guanghou Shui, Lai Peng Leong*Analysis of polyphenolic antioxidants in star fruit using liquid chromatography and mass spectrometry, , Journal of Chromatography A, 1022, 67–75, 2004.

Guochang, T. "Ultraviolet Radiation-Induced Oxidative Stress in Cultured Human Skin Fibroblasts and Antioxidant Protection. Inaugural Ph.D. Dissertation, University of Jyviskylfi, Finland, 1993.

Gündüz T., Instrümental Analiz, Altıncı Baskı, Gazi Kitapevi Ankara, 2002

Harborne, J.B. and Mabry, T.J. .Advances in Research. Chapman and Hall, New York, 1982.

Haslam, E. Plant Polyphenols. Vegetable Tannins revisited, Cambridge University Press: Cambridge, New York, 1st ed., pp. 1-89,1989.

Hemingway, R.W.; Foo, L.Y.; Porter, L.J. J. Chem. Soc, Perkin Trans. 1, 1209,1982.

Holly A. Weber,† Andrew E. Hodges,† Jill R. Guthrie, Brandon M. O'Brien, David Robaugh, Alice P. Clark, Roger K. Harris, Joseph W. Algaier,*, and Cynthia S. Smith, Comparison of Proanthocyanidins in Commercial Antioxidants: Grape Seed and Pine Bark Extracts. J. Agric. Food Chem., 55, 148-156,2007.

Ho, C.-T. In ACS Symposium Series. Phenolic Compounds in Food and their Effects on Health I. Analysis, Occurrence and Chemistry; Ho, C.-T.; Lee, C.Y.; Huang, M.-T., Eds.; American Chemical Society: Washington D.C., Vol. 506, pp. 2-7,1992.

Hoppe, B. (1969). Das Kr~iuterbuch des Hieronymus Bock. Wissenschafts-historische Untersuchung, pp. 377-378. Anton Hiersemann, Stuttgart,1969.

Hosseini, S., Pishnamazi, S., Sadrzadeh, M.H., Farid, F., Farid, R. and Watson, R.R. Pycnogenol® in the management of asthma. J Med Food, 4(4): 201-209,2001.

Hosseini, S., Lee, J., Sepulveda, R.T., Rohdewald, P. and Watson, R.R. (2001). A randomized, double-blind, placebo-controlled, prospective, 16 week crossover study to determine the role of Pycnogenol® in modifying blood pressure in mildly hypertensive patients. *Nutr Res*, 21: 1251-1260, 2001.

Huafu Wang, Keith Helliwell, Xiaoqing You, Isocratic elution system for the determination of catechins, caffeine and gallic acid in green tea using HPLC. *Food Chemistry* 68, 115-121, 2000.

I. Ince, O.Yesil-Celiktas , N.U.Karabay-Yavasoglu, G.Elgin. Effects of *Pinus brutia* bark extract and Pycnogenols in aratmodelof carrageenan induced inflammation *Phytomedicine* 16, 1101–1104, 2009.

M.P. Kahkonen, A.I. Hopia, H.J. Vuorela, J.-P. Rauha, K. Pihlaja, T.S. Kujala, M. Heinonen, J. Agric. Food Chem 47 3954, 1999.

Klick, S.; Herrmann, K. Glucosides and glucose esters of hydroxybenzoic acids in plants. *Phytochemistry*, 27, 2177- 2180, 1998.

Kohama T. and Inoue M. Pycnogenol® Alleviates Pain Associated with Pregnancy. *Phytother Res*, 20: 232-234. Kollesch, J., and Nickel, D. (1994). *Antike Heilkunst. Ausgewählte Texte aus den medizinischen Schriften der Griechen und Römer*. Reclam, Stuttgart, 2006.

Kohama, T., Herai, K and Inoue, M., Effect of French Maritime Pine Bark Extract on endometriosis as compared with Leuprorelin acetate. *J Reprod Med*, 52(8): 703-708, 2007.

Lau, B.H.S., Riesen, S.K., Truong, K.P., Lau, E.W., Rohdewald, P. and Barreta, R.A. Pycnogenol® as an adjunct in the management of childhood Asthma. *J Asthma*, 41(8): 825-832, 2004.

Lee, C.Y. In ACS Symposium Series. Phenolic Compounds in Food and their Effects on Health I. Analysis, Occurrence and Chemistry; Ho, C.-T.; Lee, C.Y.; Huang, M.-T., Eds.; American Chemical Society: Washington D.C., Vol. 506, pp. 305-317, 1992.

Lescarbot, M. (1911). History of New France. In "The Publications of the Champlain Society," Vol. 2, pp. 149-154. The Champlain Society, Toronto, 1911.

Lindgren, J. (1918). *Läkemedelsnamn. Ord förklaring och Historik*, pp. 286-288. Berlingska Boktryckeriet, Lund, 1918.

Liu, F.J., Zhang, Y.X. and Lau B.H.S. Pycnogenol® enhances immune and haemopoietic functions in senescence-accelerated mice. *Cell Mol Life Sci*, 54: 1168-1172, 1998.

Liu, F., Zhang, Y., and Lau, B.H.S. . Pycnogenol® improves learning impairment and memory deficit in senescence-accelerated mice. *J Anti Aging Med*, 2(4): 349-355, 1999.

Maarit Karonen, Jyrki Loponen, Vladimir Ossipov, Kalevi Pihlaja, Analysis of procyanidins in pine bark with reversed-phase and normal-phase high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 522, 105–112, 2004.

Macheix, J.-J.; Fleuriet, A.; Billot, J. *Fruit Phenolics*, CRC Press, Inc.: Boca Raton, Florida; pp. 265-271, 1990.

Maimoona A., Ismat N., Zeb S., Khalid J., A review on biological, nutraceutical and clinical aspects of French maritime pine bark extract, *Journal of Ethnopharmacology* 133, 261–277, 2011.

Mari´a Jerez, Manuel Pinelo, Jorge Sineiro, Maria Jose´ Nu´n˜ez, Influence of extraction conditions on phenolic yields from pine bark: assessment of procyanidins polymerization degree by thiolysis. *Food Chemistry* 94, 406–414, 2006.

Mari´a Jerez, Ariadna Selga, Jorge Sineiro, Josep Lluı´s Torres, Mari´a Jose´ Nu´n˜ez, A comparison between bark extracts from *Pinus pinaster* and *Pinus radiata*: Antioxidant activity and procyanidin composition, *Food Chemistry* 100, 439–444, 2007.

Mari´a Jerez, Sonia Tourin˜o, Jorge Sineiro, Josep Lluı´s Torres, Mari´a Jose´ Nu´n˜ez, Procyanidins from pine bark: Relationships between structure, composition and antiradical activity. *Food Chemistry* 104, 518–527, 2007.

Masquelier J, Michaud J, Laparra J, et al. Flavonoides and pycnogenols. *Intern J Vit Nutr Res*; 49:307–11,1979.

Matsumori, A., Higuchi, H. and Shimada, M. French maritime pine bark extract inhibits viral replication and prevents development of viral myocarditis. *J Card Fail*, 20, in print, 2007.

Matthews, S.; Mila, I.; Scalbert, A.; Donnelly, D.M.X. *Phytochem.*, 45, 405, 1997.

Minner, H. (1479). "Thesaurus Medicaminum." Codex 81 University Library, Marburg, 1479.

Mc Murrough, I.; Baert, T. J. *Inst. Brew.*, 100, 409, 1994.

Mc Murrough, I.; Kelly, R.; Byrne, J.; O'Brien, M. J. *Am. Soc. Brew. Chem.*, 50,61, 1992.

Nelson, A.B., Lau, B.H.S., Ide, N. and Rong, Y. Pycnogenol inhibits macrophage oxidative burst, lipoprotein oxidation and hydroxyl radicalinduced DNA damage. *Drug Dev Ind Pharm*, 24(2): 139-144, 1998.

Nishioka, K., Hidaka, T., Nakamura, S., Umemura, T., Jitsuiki, D., Soga, J., Goto, C., Chayama, K., Yoshizumi, M. and Higashi, Y. Pycnogenol®, French Maritime Pine Bark Extract, augments endothelium-dependent vasodilation in humans. *Hypertens Res*, 30: 775-780, 2007.

Noda, Y., Anzai, K., Mori, A., Kohno, M., Shinmei, M., and Packer, L. Hydroxyl and superoxide anion radical scavenging activities of natural source antioxidants using the computerized JES-FR30 ESR spectrometer system. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 42, 35-44, 1997.

Nozzolillo C. and Matilde de Bezeda, Browning of Lentil Seeds, Concomitant Loss of Viability, and the Possible Role of Soluble Tannins in Both Phenomena, *Can. J. Plant Sci.* 64:815-824.

Packer, L., Hiramatsu, M., Yoshikawa, T., From ancient Bark uses to Pycnogenol. *Antioxidant Food Supplements in Human Health*. Academic Press, chapter 20, pp. 311–322, 1999.

Packer,L.,Rimbach,G.,Virgili,F. Antioxidantactivityandbiologicproperties of aprocyanidin-richextractfrompine(Pinus maritime) bark,Pycnogenol.*Free Radical Biol.Med.*27,704–724, 1999.

Packer, L. Solar ultraviolet-induced erythema in human skin and nuclear factor-kappa-B dependent gene expression in keratinocytes are modulated by French maritime pine bark extract. *J Free Radic Biol Med*, 30(2): 154-160, 2001.

Passwater R. A., Kandaswarmi C. Pycnogenol: The Super “Protector” Nutrient.Keats Publishing Inc., Connecticut, 1994.

Peng, S.; Jay-AUemand, Ch. *J. Chem. Ecol.*, 17, 887, 1991.

U.S. Pharmacopeia (2005) 30th Ed., U.S. Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, MD, pp 965–966 Schönlau, F. and Rohdewald, P. Pycnogenol® for diabetic retinopathy: A review. *Int Ophthalmol*, 24: 161-171, 2005..

Piretti, M.V. *Fitoterapia*, 62, 3, 1991.

Porter, L.J. In *The Flavonoids*, Harborne, J.B., Ed.; Chapman and Hall Ltd.: London; pp. 21-62, 1998.

Robbins. R. J., Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 51(10):2866-87. DOI:10.1021/jf026182t, 2003.

Rohdewald, P. Pycnogenol in: Rice Evans CA, Packer L. (eds) *Flavonoids in Health and Disease* Marcel Dekker, New York, 405-419, 1998.

Rohdewald, P. Bioavailability and metabolism of Pycnogenol®. *Eur Bull Drug Res*, 7(2): 5-7, 1999.

Rohdewald P. A review of the French maritime pine bark extract (Pycnogenol), a herbal medication with a diverse clinical pharmacology. *Int J Clin Pharmacol Ther*; 40:158–168, 2002.

P. Rohdewald, A Review of the French Maritime Pine Bark Extract (Pycnogenol), A Herbal Medication with a Diverse Clinical Pharmacology. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, Vol. 40. (158-168), No. 4/2002.

Rohdewald, P. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 40, 158–168, 2002.

Rohr G.E., B. Meier and O. Sticher, Analysis of Procyanidins, Atta-ur-Rahman (Ed.) *Studies in Natural Products Chemistry*, Vol. 21. Elsevier Science B.V. All rights reserved, 2000.

G.E. Rohr, G. Riggio, B. Meier, O. Sticher, *Phytochem. Analysis* 11, 113, 2000.

A. Romania, F., B. Turchetti, N. Mulinacci, F.F. Vincieri, P. Buzzini, Analysis of condensed and hydrolysable tannins from commercial plant extracts, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41, 415–420, 2006.

Rong, Y., Li, L., Shah, V., and Lau, B. Pycnogenol protects vascular endothelial cells from t-butyl hydroperoxide induced oxidant injury. *Biotechnol. Ther.* 5, 117-126, 1995.

Roseff, S. J. Improvement in sperm quality and function with French maritime pine tree bark extract. *J Reprod Med*, 47(10): 821-824, 2002.

Sarikaki, V., Rallis, M., Tanojo, H., Panteri, I., Dotsikas, Y., Loukas, Y.L. Papaioannou, G. Demetzos, C., Weber, S., Moini, H., Maibach, H.I. and Packer, L. In vitro Percutaneous Absorption of Pine Bark Extract (Pycnogenol®) in Human Skin. *J Toxicol Cutaneous Ocul Toxicol*, 23(3): 149-158, 2004.

Saliou, C., Rimbach, G., Moini, H., McLaughlin, L., Hosseini, S., Lee, J., Watson R.R. and Sime, S. and Reeve, V.E. Protection from inflammation, immunosuppression and carcinogenesis induced by UV radiation in mice by topical Pycnogenol®. *Photochem Photobiol*, 79(2): 193-198, 2004.

Schäfer, A., Chovanová, Z., Muchová, J., Sumegová, K., Liptáková, A., Duracková, Z. And Högger P. Inhibition of COX-1 and COX-2 activity by plasma of human volunteers after ingestion of French maritime pine bark extract (Pycnogenol®). *Biomed Pharmacother*, 60: 5-9, 2005.

Schäfer, A. and Högger, P. Oligomeric procyanidins of French maritime pine bark extract (Pycnogenol®) effectively inhibit alpha-glucosidase. *Diabetes Res Clin Pract*, 77: 41-46, 2007.

Schmitz, U. (1974). Edition and commentary on the "Thesaurus medicaminum" of Minner. Inaugural Ph.D. Dissertation, Philipps University, Marburg, 1974.

Schönlau, F. The cosmeceutical Pycnogenol®. *J Appl Cosmetol*, 20: 241-246, 2002.

Scientific Consultative Committee of National Defence. (1979). Report Series A. 5/A/79 On the possibilities of relying on wild plants and animals as a source of nutrition. Part IV OSA. Helsinki, 1979.

Sime, S. and Reeve, V.E. Protection from inflammation, immunosuppression and carcinogenesis induced by UV radiation in mice by topical Pycnogenol®. *Photochem Photobiol*, 79(2): 193-198, 2004.

Scientific Consultative Committee of Natural Defence, 1979

Shahat, A.A.; Hammouda, F.; Ismail, S.I.; Azzam, S.A.; De Bruyne, T.; Lasure, A.; Van Poel, B.; Pieters, L.; Vlietinck, A.J. *Planta Med.*, 62, 10, 1996.

Singleton, V.L. In Modern Methods of Plant Analysis, Wine Analysis; Linskens, H.F.; Jackson, J.F., Eds.; Springer-Verlag: New York, London; Vol. 6, pp. 173-218, 1998.

Skoog D.A., Holler F.J., Nieman T.A., 1998. Principles of Instrumental Analysis, fifth edition, In: Kılıç E., Köseoğlu F., Yılmaz H., Enstrümental Analiz İlkeleri, Bilim Yayıncılık Ankara, 1998

Skoog D.A., West D.M. , Holler F.J., Fundamentals of Analytical Chemistry, In: Kılıç E., Köseoğlu F. seventh edition, Analitik Kimya Temelleri, Bilim Yayıncılık Ankara, 1999

Speck, E G., and Dexter, R. W. Utilization of animals and plants by the Micmac Indians of New Brunswick. J. Wash. Acad. Sci. 41, 250-259, 1951.

Speck, E G., and Dexter, R. W. Utilization of animals and plants by the Malecite Indians of New Brunswick. J. Wash. Acad. Sci. 42, 1-7, 1951.

Spencer, J.P.; Vauzour, D. & Rendeiro, C. Flavonoids and cognition: the molecular mechanisms underlying their behavioural effects. Archives of Biochemistry and Biophysics, 492, 1-2, 1-9, 2009.

Swain, T. In Herbivores. Their Interaction with Secondary Plant Metabolites', Rosenthal, G.A.; Janzen, D.H., Eds.; Academic Press: New York, London; pp. 657-682, 1979.

Tarnai, E.A.; Pagliuca, G.; Piretti, M.V.; Cipollone, M. Fitoterapia, 65, 541, 1994.

Tempel, A.S. J. Chem. EcoL, 8, 1289, 1982.

The Dispensatory of the United States of America (1955). 25th Edition. Lippincott, Philadelphia, 1995.

Torras, M.A.C., Faura, C.A., Schönlaue, F. and Rohdewald, P. Short Communication: Antimicrobial activity of Pycnogenol®. Phytother Res, 19: 647-648, 2005.

Trebaticka, J., Skodacek, I. and Durackova, Z. Effect of polyphenolic extract, Pycnogenol®, on the level of 8-oxoguanine in children suffering from attention deficit/hyperactivity disorder. Free Radic Res, 40(9): 1003-1010, 2006.

Tulp, M., Bohlin, L., 2004. Unconventional natural sources for future. Drug Discovery Today 9, 450–458, 2004.

U.S. Pharmacopeia, 30th Ed., U.S. Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, MD, pp 965–966, 2005.

Veurink, G., Liu, D., Taddei, K., Perry, G., Smith, M.A., Robertson, T.A., Hone, E., Groth, D.M., Atwood, C.S. and Martins R.N. Reduction of inclusion body pathology in ApoE-deficient mice fed a combination of antioxidants. *J Free Radic Biol Med*, 34(8): 1070-1077, 2003.

Vinciguerra, G., Belcaro G., Cesarone, M.R., Rohdewald P., Stuard, S., Ricci, A., Di Renzo A., Hosoi, M., Dugall, M., Ledda, A., Cacchio M., Acerbi, G., Fano, F. Cramps and Muscular Pain: Prevention with Pycnogenol® in Normal Subjects, Venous Patients, Athletes, Claudicants and in Diabetic Microangiopathy. *Angiology*, 57(3): 331-339, 2006.

Virgili F., Kim, D. and Packer, L. Procyanidins extracted from pine bark protect α -tocopherol in ECV 304 endothelial cells challenged by activated RAW 264.7 macrophages: role of nitric oxide peroxynitrite. *FEBS Lett*, 431: 315-318, 1998.

Voss, P., Horakova, L., Jakstadt, M., Kiekebusch, D., Grune, T. Ferritin oxidation and proteasomal degradation: Protection by antioxidants. *Free Radic Res*, 40(7): 673-683, 2006.

Yanagida, A.; Shoji, T.; Shibusawa, Y. Separation of proanthocyanidins by degree of polymerization by means of size exclusion chromatography and related techniques. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 56, 311-322, 2003.

Yesil-Celiktas, O., Markus Ganzera, b Ismail Akgun, Canan Sevimli, Kemal S Korkmaza and Erdal Bedir, Determination of polyphenolic constituents and biological activities of bark extracts from different Pinus species. *J Sci Food Agric* 2009; 89: 1339–1345, 2009.

Yuegang Zuo, Hao Chen, Yiwei Deng. Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector. *Talanta* 57, 307-316, 2002.

Zibadi, S., Yu, Q., Rohdewald, P.J., Larson, D.F. and Watson, R.R. Impact of Pycnogenol® on cardiac extracellular matrix remodeling induced by L-NAME administration to old mice. *Cardiovasc Toxicol*, 7: 10-18, 2007.

Wallis, W. D., and Wallis, R. S. (1955). "The Micmac Indians of Eastern Canada." University of Minnesota Press, Minneapolis, 1955.

Weber H.A., Andrew E. Hodges,† Jill R. Guthrie, Brandon M. O'Brien, David Robaugh, Alice P. Clark, Roger K. Harris, Joseph W. Algaier,* and Cynthia S. Smith, Comparison of Proanthocyanidins in Commercial Antioxidants: Grape Seed and Pine Bark Extracts. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 148-156, 2007.

WHO, Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines, Munich, Germany, June 28, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1991.

Williams, V.M.; Porter, L.J.; Hemingway, R.W. *Phytochem.*, 22, 569, 1983.

Winter, M.; Herrmann, K. Esters and glucosides of hydroxycinnamic acids in vegetables. *J. Agric. Food Chem.*, 34, 616-620, 1986.