

T.C.

İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI FENOLİK BİLEŞİKLERİN
HPLC TEKNİĞİYLE
YÖRESEL KIRMIZI ŞARAPLARDA
TAYİN EDİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ESRA PORBALI
ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. S. Ebru BÜYÜKTUNCEL**

MALATYA-2011

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI FENOLİK BİLEŞİKLERİN
HPLC TEKNİĞİYLE
YÖRESEL KIRMIZI ŞARAPLARDA
TAYİN EDİLMESİ**

ESRA PORGALI

Danışman Öğretim Üyesi: Yrd. Doç. Dr. S. Ebru BÜYÜKTUNCEL

**Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
2008/67 proje numarası ile desteklenmiştir.**

MALATYA-2011

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafından Analitik Kimya Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

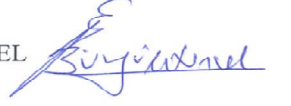
Doç. Dr. Sema ERDEMOĞLU

İmza



Danışman

Yrd. Doç. Dr. Ebru BÜYÜKTUNCEL



Üye

Doç. Dr. Burhan ATEŞ



ONAY :

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu...../...../2011 tarih ve 2011/.....sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ali OTLU
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tezimin her aşamasında bana yardımcı olan danışmanım Sn. Yrd. Doç. Dr.

S. Ebru Büyüktüncel' e;

Desteğini bizden esirgemeyen ve şarapların teminini sağlayan Kim. Hanifi Çetin' e;

Bana her zaman destek olan babama, anneme ve kardeşime teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Kırmızı şarapta 14 fenolik bileşiğin eş zamanlı tayini için ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi metodu geliştirilmiştir. Belirlenen bileşikler, gallik asit, kateşin, 3,4-dihidroksibenzoik asit, klorogenik asit, epikateşin, 4-hidroksibenzoik asit, şiringik asit, kafeik asit, p-kumarik asit, rutin, resveratrol, mirisetin, kuersetin ve kampferoldür. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu metodu, katı faz ekstraksiyonu metoduyla karşılaştırılmıştır.

Metot asidik pH'da etil asetatla sıvı-sıvı ekstraksiyonunu içerir. Zorbax Eclipse XDB-C18 kolon (5µm, 4.6mm x 250 mm) kullanılmıştır. Bileşiklerin kromatografik ayrımı %0.2 formik asit içeren metanol su karışımıyla çözücü programlaması yapılarak, oda sıcaklığında, 1 mL dak⁻¹ akış hızında gerçekleştirilmiştir. Tayin hem UV-GB dedektörüyle dört farklı dalgaboyunda, hem de floresans dedektörle gerçekleştirilmiştir. Her analizin tamamlanması için 14 dakika analiz süresi ve sonrasında 10 dakika dengelenme zamanı gereklidir. Optimize edilmiş kromatografik metot valide edilmiştir. Floresans dedektör kullanımı, kateşin, epikateşin ve resveratrol için artan seçicilik ve duyarlılık sağlamıştır. Sonuç olarak, tanımlanan bu metot, yöresel kırmızı şaraplarda fenolik bileşiklerin tayininde başarıyla uygulanmıştır.

Anahtar kelimeler: HPLC-DAD, florimetrik tayin, fenolik bileşikler, kırmızı şarap, flavanoidler

Destekleyen kurumlar: İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi (Proje no: 2008/67)

ABSTRACT

A reversed-phase high performance chromatographic method for simultaneous determination of 14 phenolic compounds in red wines was developed in this study. The identified compounds contained gallic acid, catechin, 3,4-dihydroxybenzoic acid, chlorogenic acid, epicatechin, 4-hydroxybenzoic acid, syringic acid, caffeic acid, p-coumaric acid, rutin, resveratrol, myricetin, quercetin and kaempferol. The liquid-liquid extraction method was compared with solid-phase extraction method.

The method includes liquid-liquid extraction of acidic pH with ethylacetate. The analysis used a Zorbax Eclipse XDB-C18 column (5 μ m, 4.6mm x 250 mm). The chromatographic separation of these compounds performed in a single run by using the mobile phase gradient elution of methanol water mixture (% 0.2 formic acid) at room temperature, with flow rate at 1 mL/min. Detection was carried out by UV-Vis detector at four different wavelengths and fluorescence detector. Each analysis required an equilibration period of 10 min and a run time of 14 min for completion. The optimized chromatographic method was carefully validated for precision and accuracy. The use of a fluorescence detector allowed increasing selectivity and sensitivity for the determination of catechin, epicatechin and resveratrol. Consequently, the described method was successfully employed to study phenolic compounds in local red wines.

Keywords: HPLC-DAD, fluorimetric detection, phenolic compounds, red wine, flavanoids

Supported By: İnönü University Scientetific Researches Unit (Project no: 2008/67)

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	x
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Antioksidan Nedir?	3
2.2. Polifenoller	5
2.2.1. Polifenollerin Sınıflandırılması	5
2.2.1.1. Flavanoidler	6
2.2.2.2. Fenolik Asitler	9
2.2.1.3. Fenolik Polimerler (Tanenler)	10
2.2.1.4. Stilbenler	11
2.2.2. Polifenollerin Antioksidan Aktivitesi ve Yapısı Arasındaki İlişki	12
2.2.3. İnsan Sağlığı Açısından Önemi	13
2.3. Polifenollerin Tayini için Stratejiler	17
2.3.1. Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu (LLE)	18
2.3.1.1. Teori	20

2.3.1.2. Dezavantajları	20
2.3.2. Katı Faz Ekstraksiyon Metodu (SPE)	21
2.3.2.1. Avantajları	21
2.3.2.2. Dezavantajları	22
2.3.2.3. Kullanım Amaçları	22
2.3.2.4. SPE Materyalleri	23
2.3.2.5. SPE Cihazı	23
2.3.2.6. SPE Yönteminin Uygulanması	24
2.3.3. Kromatografik Yöntemler	26
2.3.3.1. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	27
2.3.3.1.1. Çözücü Haznesi	28
2.3.3.1.2. Pompa Sistemi	29
2.3.3.1.3. Enjeksiyon Sistemi	31
2.3.3.1.4. Kolon Sistemi	32
2.3.3.1.5. Kolon Dolgu Maddesi	32
2.3.3.1.6. Dedektörler	33
2.3.3.1.6.1. UV/GB Absorbans Dedektörleri	34
2.3.3.1.6.2. Fotodiyot Dizisi Dedektörü (PDA)	35
2.3.3.1.6.3. Floresans Dedektörleri	35
2.3.3.1.6.4. Kırılma İndisi Dedektörleri	35
2.3.3.1.6.5. Elektrokimyasal Dedektörler	36
2.3.3.1.6.6. Evaporatif Işık Saçma Dedektörü (ELSD)	36

2.3.3.1.6.7. Kütle Spektrometresi (MS)	37
2.3.3.2. Dağılma Kromatografisi (Partisyon Kromatografisi)	38
2.3.3.2.1. Ters Faz Kromatografi	38
2.3.3.2.2. Normal Faz Kromatografi	38
2.3.4. Kromatografide Sistem Uygunluk Testleri	39
2.3.4.1. Kapasite faktörü (k')	39
2.3.4.2. Seçicilik Faktörü (α)	39
2.3.4.3. Ayırıcılık (R)	39
2.3.4.4. Kolon Etkinliği (Teorik Plaka Sayısı)	40
2.3.4.5. Kuyruklanma Faktörü (T) ve Asimetri Faktörü	40
2.3.5. Analitik Yöntem Validasyonu Parametreleri	41
2.3.5.1. Seçicilik	41
2.3.5.2. Kesinlik (Precision)	41
2.3.5.3. Doğruluk (Accuracy)	41
2.3.5.4. Geri Kazanım (Recovery)	42
2.3.5.5. Kalibrasyon/ Standart Eğrisi	42
2.3.5.6. Hassasiyet (Sensitivity)	42
2.3.5.7. Saptama Alt Sınırı (LOD)	43
2.3.5.8. Alt Tayin Sınırı (LOQ)	43
2.3.5.9. Sağlamlık (Robustness)ve Tutarlık (Ruggedness)	43
2.3.5.10. Kararlılık (Stabilite)	44

2.4. Literatür Özeti	45
3.GEREÇ VE YÖNTEM	48
3.1. Reaktif ve Materyaller	48
3.2. Cihazlar	49
3.3. Yöntem	52
3.3.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması	52
3.3.2. Sentetik Şarap Örneğinin Hazırlanması	52
3.3.3. Sentetik Şarap Örneği Matriksinde Kalibrasyon	52
3.3.4. Katı Faz Ekstraksiyonu Yöntemi	52
3.3.5. Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu Yöntemi	53
3.3.6. Kromotografik Şartların Ayarlanması	55
4. BULGULAR	56
4.1. Foto Diyot Dizisi Dedektörü Kullanarak Polifenollerin Ayrımının Optimize Edilmesi	56
4.2. Sistem Uygunluk Parametrelerinin Hesaplanması	60
4.2.1. Kapasite Faktörü (k') ve Teorik Tabaka Sayısı (N)	60
4.2.2. Seçicilik Faktörü (α) ve Ayrıcılık(R)	60
4.2.3. Teorik Tabaka Sayısı (N), Kuyruklanma ve Asimetrik Faktör	61
4.3. Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu	62
4.4. Katı Faz Ekstraksiyonu	64
4.5. Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonunda Metot Validasyonu	65
4.5.1. Seçicilik ve Kalibrasyon Eğrisi	65

4.5.2. Kesinlik ve Doğruluk	67
4.6. Şarap Örneklerindeki Polifenol Miktarları	68
4.7. Floresans Dedektör ile Kateşin, Epikateşin ve t-Resveratrol Tayini	71
5. TARTIŞMA	75
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	80
8.KAYNAKLAR	82
ÖZGEÇMİŞ	91

SİMGELER VE KISALTMALAR

HPLC	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
GC-MS	Gaz- Kütle spektrometresi
GC-FID	Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
LC	Sıvı Kromatografisi
CZE	Kapiler Zone Elektroforez
UV-GB	Ultraviyole-Görünür bölge
TLC	İnce Tabaka Kromatografisi
DAD	Diyot Dizisi Dedektörü
GE	Kapiler Elektroforez
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
HPL	Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
SPE	Katı Faz Ekstraksiyonu
LLE	Sıvı Sıvı Ekstraksiyonu
R ²	Korelasyon Katsayısı
% CV	Varyasyon Katsayısı
ACN	Asetonitril
MeOH	Metanol
HCOOH	Formik asit
LOD	Saptama Alt Sınırı
LOQ	Alt Tayin Sınırı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Reaktif oksijen türlerinin neden olduğu hastalıklar ve hasarlar

Şekil 2.2. Hastalıklarda reaktif oksijen türlerinin yarattığı sonuçlar ve fenoliklerin önleyici rolü

Şekil 2.3. Polifenollerin sınıflandırması

Şekil 2.4. Difenilpropan yapısı

Şekil 2.5. Flavan yapısı

Şekil 2.6. Flavon yapısı

Şekil 2.7. Flavonoidlerin alt sınıfları ve kimyasal yapıları

Şekil 2.8. Fenolik asitlerin alt sınıfları ve kimyasal yapıları

Şekil 2.9. Fenolik polimerlerin yapısı.

Şekil 2.10. Şarapta sıklıkla bulunan stilbenlerin kimyasal yapıları

Şekil 2.11. Biyolojik sıvılar, içecekler, bitkiler ve gıdalarda flavonoidlerin tayini için stratejiler

Şekil 2.12. Sıvı-sıvı ekstraksiyonunun şematik gösterimi

Şekil 2.13. Tek kullanımlık kartüj

Şekil 2.14. Çok kartüjlü manifold sisteminin şematik gösterimi

Şekil 2.15. SPE’da ayırma işlemi

Şekil 2.16. SPE fazları ve çözücü seçimi

Şekil 2.17. HPLC sisteminin şematik gösterimi

Şekil 2.18. On-line solvent vakum degazörünün şematik gösterimi

Şekil 2.19. Gradient programlama sisteminin şematik gösterimi

Şekil 2.20. HPLC sisteminde kullanılan pistonlu bir pompanın şematik diyagramı

Şekil 2.21. Lupa örnek yüklenmesi ve mobil faz akışıyla pompadan kolona gönderilmesi

Şekil 2.22. HPLC’de UV dedektörlerdeki sıvı akış hücresi

Şekil 2.23.PDA’nın şematik gösterimi

Şekil 2.24. Evaporatif ışık saçma dedektörünün şematik gösterimi

Şekil 2.25. LC/MS sisteminin blok gösterimi

Şekil 2.26. Pik kuyruklanma faktörünün tayini

Şekil. 3.1 Katı faz ekstraksiyonu yönteminin şematik gösterimi

Şekil. 3.2. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu yönteminin şematik gösterimi

Şekil 4.1. Gallik asidin %30 (v/v) metanolde farklı pH değerlerinde elde edilen kromatogramları

Şekil 4.2. Polifenollerin kromatografik ayrımının gösterimi

Şekil 4.3. Boş sentetik şarap (A) ve standart madde eklenen sentetik şarabın (B) etil asetat ile (pH=2) yapılan sıvı-sıvı ekstraksiyonundan elde edilen kromatogramları

Şekil 4.4. Boş sentetik şarap (A) ve standart madde eklenen sentetik şarabın (B) etil asetat ile (pH=2) yapılan sıvı-sıvı ekstraksiyonundan elde edilen kromatogramlar ($\lambda = 280 \text{ nm}$).

Şekil 4.5. Güzay Karaoğlan (2007) şarabının A. HPLC sistemine direk enjeksiyonu B. Etil asetat ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu uygulandıktan sonra HPLC sistemine enjeksiyonu C. Standart Bileşiklerin HPLC sistemine enjeksiyonu ($\lambda=280 \text{ nm}$).

Şekil 4.6. Güzay Karaoğlan (2007) şarabının B. Etil asetat ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu uygulandıktan sonra HPLC sistemine enjeksiyonu C. Standart Bileşiklerin HPLC sistemine enjeksiyonu ($\lambda=323 \text{ nm}$).

Şekil 4.7. A. Kateşin ve epikateşin standartlarının floresans spektrumu, B. Güzay Karaoğlan-Öküzgözü (2007) şarabının floresans spektrumu

Şekil 4.8. A. 10 mg.L^{-1} derişimdeki resveratrol standardı B. Karpata Kalecik Karası (2007) C. Buzbağı Klasik Öküzgözü-Boğazkere (2008) nın floresans spektrumu

Şekil 6.1. Sıvı-sıvı ve katı-faz ekstraksiyonundaki % gerikazanım oranlarının gösterilmesi

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1. Yaygın gıda flavanoidleri ve besin kaynakları

Tablo 2.2. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu için solventler

Tablo 2.3. Kolon kromatografisinin sınıflandırılması

Tablo 2.4. Gazların sudaki çözünürlükleri

Tablo 2.5. Kolonlar için Akış Hızları

Tablo 2.6. Yaygın HPLC Dedektörleri ve Özellikleri

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan polifenol bileşikleri

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan reaktifler

Tablo 3.3. Kullanılan kimyasalların molekül şekilleri ve IUPAC göre adlandırılması

Tablo 3.4. HPLC'de kromatografik koşullar

Tablo 3.5. Polifenol tayininde kullanılan dalgaboyları

Tablo 3.6. Polifenol tayininde kullanılan dalgaboyları (Floresans dedektör)

Tablo 4.1. HPLC gradient programı

Tablo 4.2. Polifenollerin iç standarta göre alıkonma zamanları

Tablo 4.3. Kapasite faktörleri

Tablo 4.4. Seçicilik faktörleri ve ayırıcılık değerleri

Tablo 4.5. Teorik tabaka sayısı, kuyruklanma faktörü ve asimetri faktörü değerleri

Tablo 4.6. Sıvı-sıvı ekstraksiyonunda kullanılan solventlerin % geri kazanım değerleri

Tablo 4.7. Etilasetat ile yapılan sıvı-sıvı ekstraksiyonunda pH taraması sonucunda elde edilen % geri kazanım değerleri

Tablo 4.8. Katı Faz Ekstraksiyonunda Kullanılan Kartuşlerin % Geri Kazanım Değerleri

Tablo 4.9. Polifenol bileşiklerinin kali brasyon eğrileri

Tablo 4.10. Polifenol bileşiklerinin kalibrasyon eğrileri (Floresans dedektör)

Tablo 4.11. Polifenol bileşiklerinin kesinlik ve doğruluk değerleri

Tablo 4.12. Yöresel kırmızı şaraplarda tayin edilen polifenolik bileşiklerin derişim değerleri

Tablo 5.1. İtalyan şaraplarındaki polifenolik madde miktarları ve LOD değerleri

Tablo 5.2. Kanarya Adaları kırmızı şaraplarının polifenol içeriği polifenol içeriği

Tablo 5.3. Farklı ülkelerin kırmızı şaraplarının polifenol içerikleri (mg. L⁻¹)

1. GİRİŞ

Son on yıl içinde, polifenolik bileşikler, şarabın kalitesinin değerlendirilmesindeki (renk ve tat gibi) rolü ve tıp açısından önemi nedeniyle (antioksidant, antitümör, koroner kalp hastalığını önleyici vb etkileri) ilgi çekmeye başlamıştır.

Polifenolik bileşikler meyvelerde, sebzelerde, hububatlarında, çay ve şarapta yaygın olarak bulunur. Bununla beraber, monomerik formda buldukları şarapta, polimerik formda buldukları katı gıdalara göre, daha fazla mevcuttur. Polifenolik bileşikler kırmızı şarapta, beyaz şaraba göre 10-20 kat daha fazla bulunurlar. Polifenollerin çeşitli tedavi edici özellikleri tanımlanmıştır. Bunlar, kolesterol HDL seviyesini artırması, damarlarda trombositlerin birbirine yapışıp kümeleşmesini ve endotelial (epitel dokusundan kaynaklanan) yapışmayı azaltması, antioksidant aktivitesi, serbest radikal süpürücüsü olması, hücre çoğalmasını ve anjiyogenezini (damar oluşumunu) inhibe etmesidir.

Spesifik bir non-flavanoid fenolik bileşik olan resveratrol (3,5,4'-trihidroksistilben), yer fıstığında bulunmasından başka, önemli seviyede yalnızca kırmızı şarapta bulunur. Resveratrol, üzümün kabuğunda dış darbe aldıklarında (patojenlerden korunmak amacıyla) sentezlenir. Şaraptaki derişimi, üzümün fermantasyon zamanına bağlıdır. Beyaz şarabın hazırlanmasında kabuklar daha önce uzaklaştırıldığından, kırmızı şarapta daha fazla miktarda resveratrol içerir (1).

Şarabın biyolojik olarak aktif flavanoidlerinin önemi göz önünde bulundurulduğunda, bunların analizi için doğru ve hızlı bir metot geliştirilmesi gereklidir.

GC-FID, GC-MS, CZE ve LC polifenollerin şarapta tayininde en çok kullanılan tekniklerdir. Flavanoidlerin ve stilbenlerin şarapta tayin edilmesi için, LC cihazına MS spektrometreleri yanında, UV-GB, floresans, kemilüminesans ve elektrokimyasal dedektörler de bağlanmıştır (2).

GC, CE ve TLC yöntemleri, LC yöntemine nazaran daha az sıklıkla kullanılır. GC'ye dayanan metotlar, yüksek ayırıcılık ve düşük gözlenebilirlik limitleri sağlar. Fakat bunlar yoğun emek gerektirirler. Çünkü flavonoidlerin

uçuculuğunu artırmak ve ısısız kararlılığını artırmak için türevlendirme kaçınılmazdır. Çoğu durumda, trimetilsilileter (TMS) türevleri oluşturulur (3).

Çoğu araştırmacı, şarap örneklerinin, filtrasyon dışında herhangi bir ön işlem yapılmaksızın kromatografi cihazına direkt enjeksiyonunu önermesine rağmen, sıvı-sıvı ekstraksiyonu (LLE) ve katı-faz ekstraksiyonunu (SPE) içeren örnek hazırlama uygulandığında, artan metot duyarlılığı ve seçiciliği elde edilmiştir (2).

Arce ve arkadaşları, trans-resveratrol ve yedi polifenolik bileşik için, katı faz ekstraksiyonunun kullanıldığı bir metot önermişlerdir (4). Puzorek ve arkadaşları ise, katı faz ekstraksiyonunun pik yüksekliklerini ve pik alanlarını azalttığını göstermişlerdir (5). Farklı örnek hazırlamalar arasındaki bu çelişme, alternatif çalışmalar geliştirmeyi gerektirir.

Kırmızı şarap polifenolleri, dünyada en güçlü antioksidanlara olan sahip üzüm tanenleri ve antosiyanin pigmentlerinden türeyen bileşiklerdir. İnsan sağlığı üzerinde yararlı etkileri düşünüldüğünde yöresel şarapların polifenol içeriğini saptamak özel önem taşımaktadır.

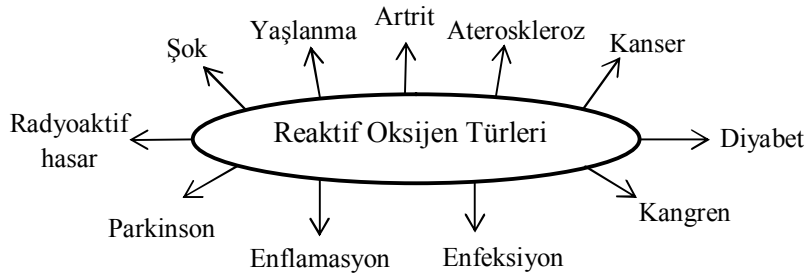
Bu çalışmanın amacı, şarapta bazı polifenolik bileşiklerin (gallik asit, kateşin, 3,4-dihidroksibenzoik asit, klorogenik asit, epikateşin, 4-hidroksibenzoik asit, şiringik asit, kafeik asit, p-kumarik asit, rutin, resveratrol, mirisetin, kuersetin ve kaempferol) tayini için, basit enstrümantasyonlu bir LC metodu geliştirmektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ANTIOKSİDAN NEDİR?

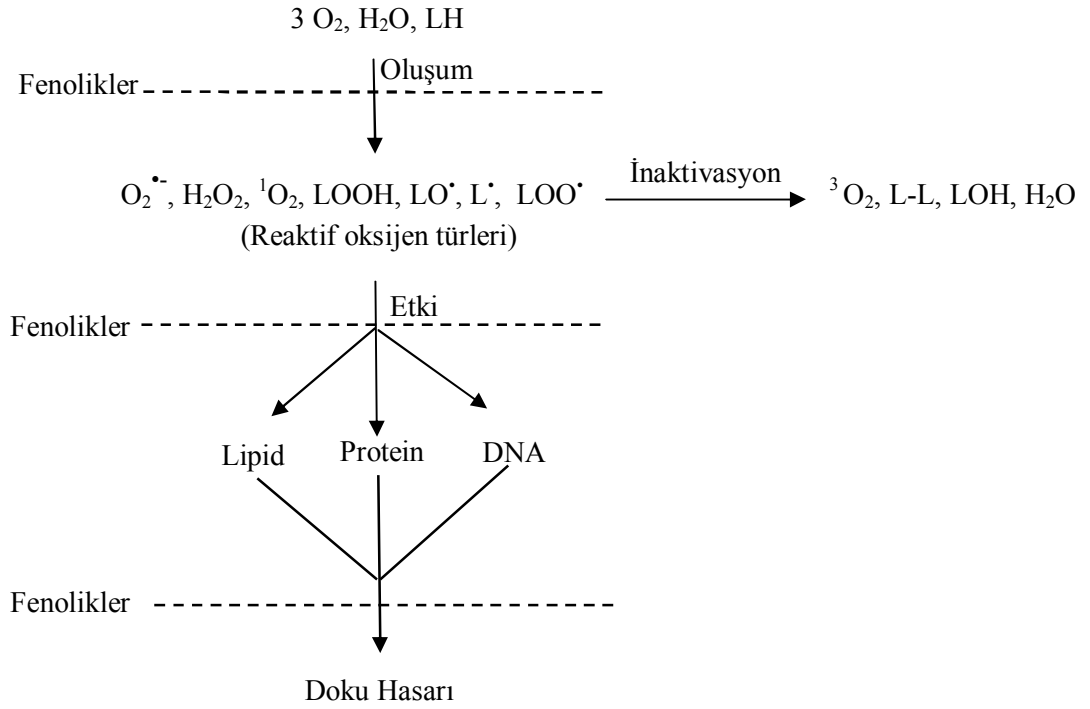
Canlı organizmalar, insan yaşamı için zararlı olan, reaktif türleri etkisiz hale getirmek için kompleks bir antioksidan ağı geliştirmiştir (6).

Redüksiyon, oksijen kaybı veya elektron kazanması iken, oksidasyon oksijen kazanma veya elektron kaybı anlamındadır. Redoks reaksiyonları, biyolojik oksidasyonların kalbidir. İndirgen ve yükseltgen kimyasal terim olarak kullanılırken, antioksidan ve prooksidan terimleri biyolojik sistemlerde kullanılmaktadır. Prooksidanlar, lipidler, proteinler ve nükleik asitlerde oksidatif hasara neden olan ve bu nedenle çeşitli patolojik olaylara ve/veya hastalıklara yol açan toksik maddelerdir. Prooksidan reaktif türler için kullanılan bir terimdir (7). Antioksidanlar, gıdalarda veya vücutta, yükseltgenebilen substratlara göre daha düşük konsantrasyonlarda bulunurlar ve oksidatif hasara sebep olan substratın oksidasyonunu büyük ölçüde geciktirir veya engellerler (8, 9). Reaktif oksijen türleri, reaktif azot türleri ve reaktif klor türleri lipid, protein, karbonhidrat ve DNA ile reaksiyona girerek, yapılarının bozulmasına ve doku hasarına neden olup, kanser, kalp ve damar hastalıkları ve katarakt gibi bir çok dejeneratif hastalıklara yol açmaktadır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Reaktif oksijen türlerinin neden olduğu hastalıklar ve hasarlar (10).

Antioksidanlar, singlet oksijeni tutarlar, hidroksil radikalleri gibi başlangıç radikallerini süpürerek, ilk zincir reaksiyonun başlamasını engellerler. Metal iyon katalizörlerine bağlanırlar. Radikal olmayan türlerin birincil oksidasyon ürünlerini parçalarlar ve substratlardan hidrojen ayrılmasıyla devam eden reaksiyonları önlemek için zincir reaksiyonları sona erdirirler (9,11). Böylece, lipid oksidasyonu, protein çapraz bağlanması, DNA mutasyonu ve bir sonraki adım olan hücre hasarını önlenmiş olurlar (Şekil 2.2.) (10).



Şekil 2.2. Hastalıklarda reaktif oksijen türlerinin yarattığı sonuçlar ve fenoliklerin önleyici rolü.

Yiyeceklerde doymamış yağların otooksidasyonu prosesi, bir serbest radikal zincir reaksiyonunu içerir. Bu reaksiyon genellikle, yağların ışığa, ısıya, metal iyonlarına veya metalloprotein katalizörlerine maruz kalması sonucunda başlar. Otooksidasyonun klasik rotası, başlama (yağ serbest radikallerinin oluşumu), ilerleme ve sonlanma (radikal olmayan ürünlerin oluşumu) reaksiyonlarıdır (Reaksiyon 2.1, 2.2, 2.3 ve 2.4).

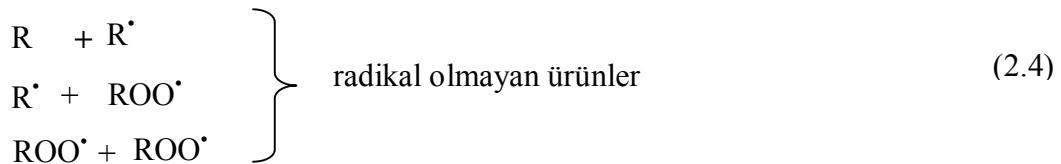
Başlama



İlerleme



Sonlanma



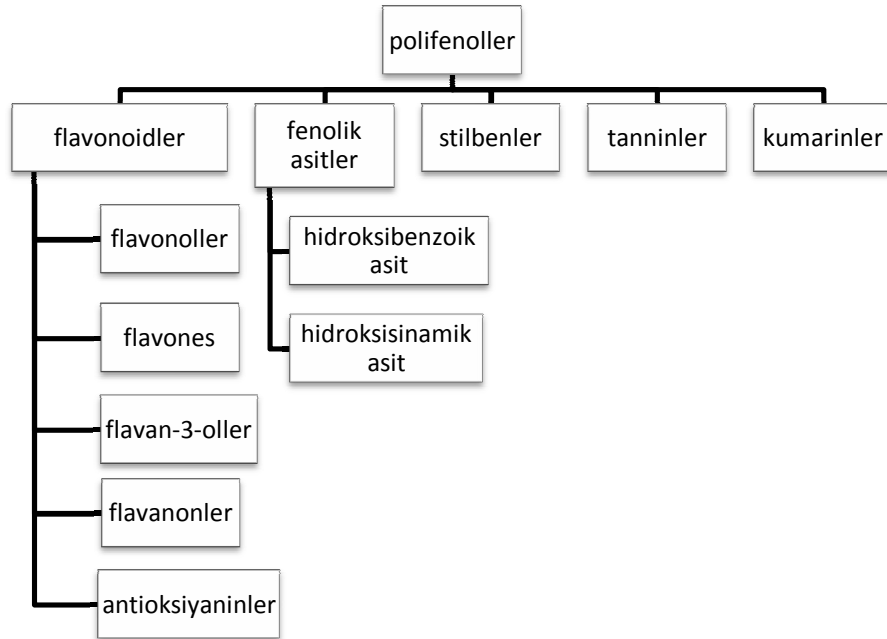
Antioksidanlar otooksidasyon olaylarını geciktirici, durdurucu veya önleyici bileşikler olarak kabul edilirler. Antioksidanlar, oksidasyon yoluyla gıdaların bozunmasını, bayatlamasını ve rengini kaybetmesini geciktirerek gıdaları korumak için kullanılan maddelerdir. İdeal bir gıda antioksidanın, güvenli olması, renk, koku veya tat vermemesi, düşük konsantrasyonlarda etkili olması, kolay ilave edilmesi, sonuç ürününde kararlı olması ve bunlara ilaveten düşük maliyetli olması gerektiği önerilmiştir (10).

2.2. POLİFENOLLER

2.2.1. Polifenollerin Sınıflandırılması

Fenolik bileşikler veya polifenoller, bitki aleminde en fazla sayıda ve yaygın olarak dağılmış gruplardan biridir (12).

Fenolik bileşikler, bitkilerden sentezlenen sekonder metabolitlerdir. Yaygın olarak tüketilen pek çok meyve, sebze, tahıl ürünleri, herbal ürünler ve içeceklerde önemli ölçüde bulunurlar. Farklı doğal ürünlerden, flavonoidleri, fenolik asitleri, kumarinleri, stilbenleri ve taninleri içeren sekiz binin üzerinde fenolik bileşik izole edilmiştir. Her bir grup, kimyasal yapısına göre kendi içinde alt gruplara bölünür. Bu gruplama Şekil 2.3' de gösterilmiştir (13).

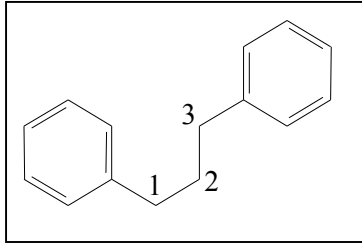


Şekil 2.3. Polifenollerin sınıflandırması

Besin fenolikleri; flavanoidleri, fenolik asitleri ve fenolik polimerleri içerir.

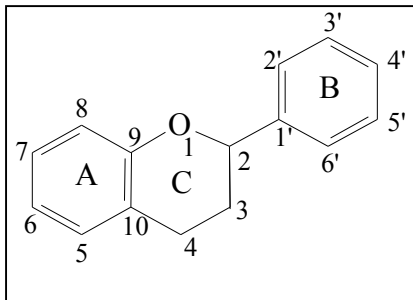
2.2.1.1. Flavanoidler

Flavanoidlerin karbon iskeletini, iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşan, 15 karbon atomu içeren, difenilpropan ($C_6-C_3-C_6$) yapısı teşkil eder (Şekil 2.4).

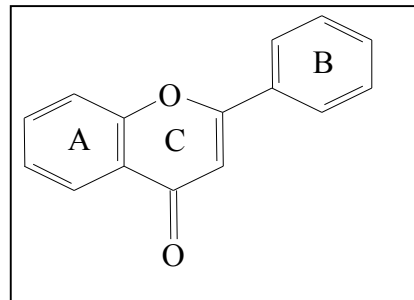


Şekil 2.4. Difenilpropan yapısı

Fenil halkalarının propan zincirine farklı pozisyonlarda bağlanması nedeniyle, flavonoidler alt sınıflara ayrılırlar. Genellikle flavon türevlerine flavonoidler, flavan türevlerine ise flavanoidler denir (Şekil 2.5). Flavan ve flavon yapılarındaki aromatik halkalar A ve B, hetero halka ise C ile gösterilir. A ve C halkalarındaki karbon atomları oksijen atomundan başlayarak numaralandırılır. B halkasındaki atomlar ise, üssü (') rakamlarla numaralandırılır. (14).

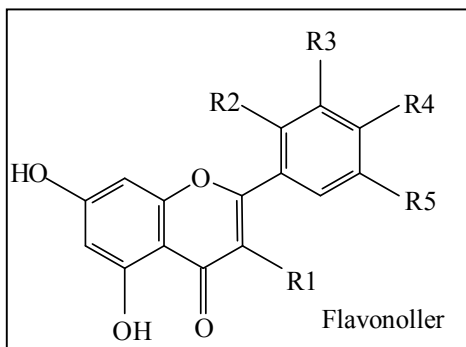


Şekil 2.5. Flavan yapısı

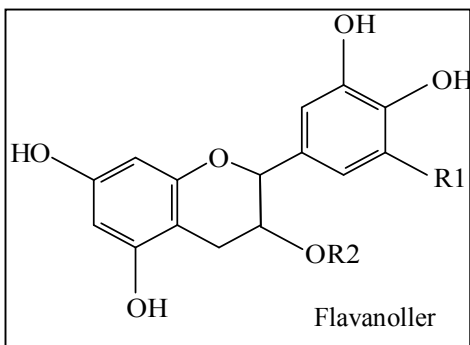


Şekil 2.6. Flavon yapısı

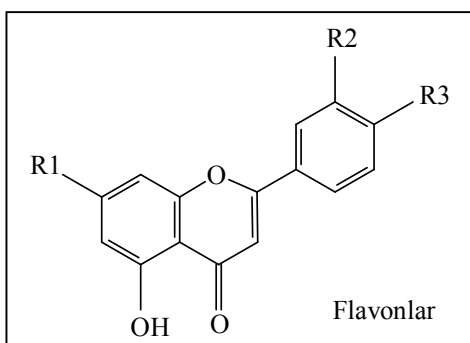
A, B ve C halkalarından oluşan halka yapısında çeşitli hidroksil, metoksi ve glikozid yan gruplar içerirler. Halkalar arasındaki yapısal değişiklikler flavonoidleri çeşitli sınıflara ayırmaktadır (15). Flavanoidlerin alt sınıfları ve kimyasal yapıları Şekil 2.7' de verilmiştir.



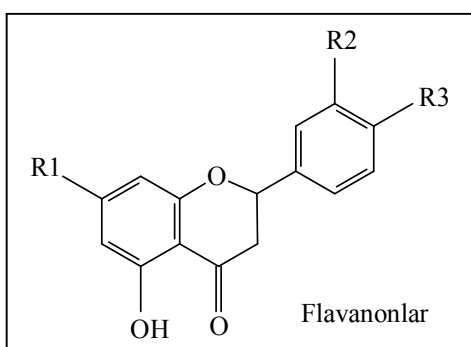
Flavonoller	R1	R2	R3	R4	R5
Rutin	3-O-Rha-glu	H	OH	OH	H
Kampferol	OH	H	H	OH	H
Kuersetin	OH	H	OH	OH	H
Morin	OH	OH	H	OH	H
İzorhamnetin	OH	H	OCH ₃	OH	H
Mirisetin	OH	H	OH	OH	OH
Fisetin	OH	H	H	OH	OH



Flavanoller	R1	R2
Kateşin	H	H
Epikateşin	H	H
EGC	OH	H
ECG	H	Gallat
EGCG	OH	Gallat

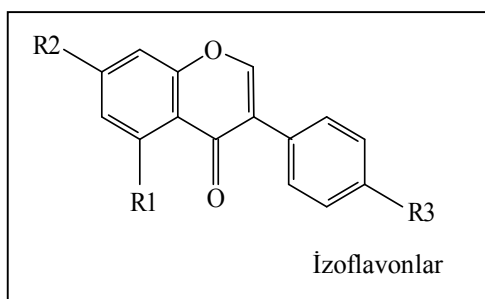


Flavonlar	R1	R2	R3
Apigenin	OH	H	OH
Luteolin	OH	OH	OH
Krisin	OH	H	H
Asasetin	OH	H	OCH ₃
Genkwanin	OCH ₃	H	OH

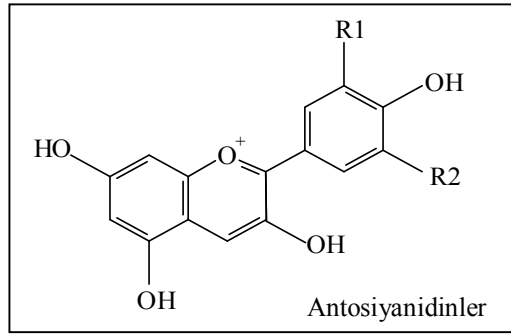


Flavanonlar	R1	R2	R3
Hesperetin	OH	OH	OCH ₃
Hesperidin	7-O-Rha-glu	OH	OCH ₃
Naringenin	OH	H	OH
Naringin	7-O-Rha-glu	H	OH
Eriositrin	7-O-Rha-glu	OH	OH
Eriodiktiol	OH	OH	OH

Glu: Glukozid, Rha-glu: Rhamnoglukozil



İzoflavonlar	R1	R2	R3
Genistein	OH	OH	OH
Genistin	OH	7-O-Glu	OCH ₃
Daidzein	H	OH	OH
Daidzin	H	7-O-Glu	OH
Formononetin	H	OH	OCH ₃
Ononin	H	7-O-Glu	OCH ₃
Sissotrin	OH	7-O-Glu	OCH ₃



Antosiyanidinler	R1	R2
Delphinidin	OH	OH
Malvidin	OCH ₃	OCH ₃
Siyanidin	OH	H
Pelargonidin	H	H

Şekil 2.7. Flavanoidlerin alt sınıfları ve kimyasal yapıları (3, 16).

Flavanoller, gıdalarda en yaygın olarak bulunan flavanoidlerdir. Gıdalarda en göze çarpan flavanoller kuersetin ve kampferoldür. Flavonollerce en zengin gıda kaynakları, soğan, kıvırcık lahana, pırasa, brokoli, elma ve yaban mersinidir (17, 18). Kırmızı şarap ve çay da flavanollerin önemli bir miktarını içerir.

Flavonlar, flavanollere göre meyvelerde ve sebzelerde daha azdırlar. Yiyeceklerde en belirgin flavonlar luteolin ve apigenindir. Maydanoz ve kereviz başlıca gıda kaynaklarıdır.

Flavanonlar, turunçgillerde yüksek konsantrasyonlarda bulunurlar. Limondaki temel aglikon naringenin ve hesperetindir.

İzoflavonlar, östrojene yapısal olarak benzeyen flavanoidlerdir. Soya ve soya fasülyesinden elde edilmiş gıdalar, beslenmede izoflavonların temel kaynaklarıdır. Üç soya izofalavanolü, genistein, daidzein ve glisiteindir.

Flavan-3-oller üzüm ürünlerinde (şarap ve üzüm suyu gibi), çaylarda (yeşil, siyah ve kokulu çay), kakao ve çikolatada bulunurlar. Bunlar ya monomerleri (epikateşin ve kateşin) ya da oligomerleri (proantosiyandinler gibi) halindedirler. Polimerler, bazen yoğun tanenler olarak da adlandırılırlar ve çeşitli meyve ve meyveden elde edilmiş ürünün burukluğundan sorumludurlar. Epikateşin gallat (ECG), gallokateşin, epigallokateşin (EGC) ve epigallokateşin gallat (EGCG) baklagillerin tohumlarında, üzümde ve çayda bulunurken, kateşin ve epikateşin meyvelerde ve kakaoda bulunan başlıca flavan-3-ollerdir (19).

Antosiyaninler, çoğu kırmızı, mavi ve mor meyvelerin, sebzelerin ve diğer bitki dokuları ve ürünlerinin renginden sorumlu, suda çözünebilen pigmentlerdir. En çok üzüksü meyve kategorisindeki meyvelerde (böğürtlen, ahududu gibi) ve üzümde

bulunur. Kırmızı şarap, tahılların bazı çeşitlerinde ve lahana, fasulye, soğan ve turp gibi bazı yapraklı ve kök sebzelerde de bulunur (20). Tablo 2.1' de öne çıkan gıda flavanoidleri ve besin kaynakları gösterilmiştir (19, 21).

Tablo 2.1. Yaygın gıda flavanoidleri ve besin kaynakları

Sınıfı	Yaygın gıda flavanoidleri	Besin kaynakları
Flavonoller	İzoharmnetin, kampferol, mirisetin, kuersetin	Soğan, kıvırcık lahana, pırasa, brokoli, yaban mersini, kiraz, kırmızı şarap, çay
Flavonlar	Apigenin, luteolin	Yeşil yapraklı baharatlar (maydanoz, kereviz sapı gibi)
Flavanonlar	Hesperetin, naringenin, eriodiktiyol	Turunçgiller (portakal, greylift gibi)
İzoflavonlar	Daidzein, genistein, glisitein	Soya fasulyesi, soya gıdaları (soya fıstığı gibi), baklagiller
Flavan-3-oller	(+)-Kateşin, (+)-gallokateşin, (-)-epikateşin, (-)-epigallokateşin, (-)-epikateşin 3-gallat, (-)-epigallokateşin 3-gallat	Çay, kırmızı üzüm, kırmızı şarap, kakao, çikolata, kayısı
Antosiyanidinler	Siyanidin, delphinidin, malvidin, pelargonidin, peonidin, petunidin	Kırmızı, mor ve mavi böğürtlen, ahududu, çilek, yapraklı ve kök sebzeler (lahana, turp gibi)

2.2.1.2. Fenolik Asitler

Fenolik asitler, ya benzoik asit ya da sinamik asitlerin hidroksile olmuş türevleridir (Şekil 2.8). Bitki alemine geniş ölçüde yayılmış maddelerdir ve hem serbest halde hem de esterleri veya glikozidleriyle kombine halde bulunurlar (22). Bazı kırmızı meyveler, karaturp ve soğan hariç, yenilebilir bitkilerde hidroksi benzoik asit içeriği çok düşüktür (23). Çay önemli bir gallik asit kaynağıdır (24). Ayrıca, hidroksibenzoik asitler hidrolize olabilen taninler gibi (mangoda gallotannin, çilek, ahududu, böğürtlen gibi kırmızı meyvelerde ellagitannin) kompleks yapıların bileşenleridir (25).

Hidroksisinnamik asitler, hidroksibenzoik asitlerden daha yaygındır. Bu asitler dondurma, sterilizasyon veya fermantasyona uğrayarak işlem görmüş gıdalar haricinde, nadiren serbest formda bulunurlar. Kafeik asit ve kuinik asidin oluşturduğu klorojenik asit (kafeik asit ester) pek çok meyve çeşidinde ve yüksek

konsantrasyonlarda kahvede bulunur. En yüksek sinamik asit içeren meyve türleri, yaban mersini, kivi, erik, kiraz ve elmadır (26).

Hem serbest hem de esterleşmiş haldeki kafeik asit en fazla bulunan fenolik asittir. Çoğu meyvenin toplam hidrosinamik asit içeriğinin %75-%100 aralığında olduğu belirtilir. Hidroksisinamik asitlerin, en yüksek konsantrasyonları olgunlaşmış meyvelerin dış kısımlarında görünmekle beraber, meyvelerin tüm kısımlarında bulunurlar (18).

Ferulik asit, başlıca besin kaynağımızı oluşturan tahıllarda en fazla bulunan fenolik asittir (27, 28). Ferulik asit bilhassa tahılın dış kısmında bulunur. Buğday tanesinin aleuron tabakası ve perikarbi toplam ferulik asidin %98'ini içerir (28).

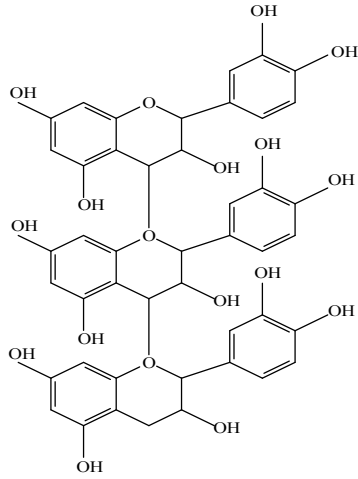
Sinamik tip	R1	R2	R3	R4	R5
Klorojenik asit		H	OH	OH	H
Kafeik asit	H	H	OH	OH	H
p-Kumarik asit	H	H	H	OH	H
Ferulik asit	H	H	OCH ₃	OH	H
o-Kumarik asit	H	OH	H	H	H
Sinapik asit	H	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Sinamik asit	H	H	H	H	H

Benzoik tip	R1	R2	R3	R4
Benzoik asit	COOH	H	H	H
Gallik asit	COOH	OH	OH	OH
Protokateşuik asit	COOH	OH	OH	H
p-hidroksibenzoik asit	COOH	H	OH	H
Vanilik asit	COOH	OCH ₃	OH	H
Şiringik asit	COOH	OCH ₃	OH	OCH ₃

Şekil 2.8. Fenolik asitlerin alt sınıfları ve kimyasal yapıları (22, 30).

2.2.1.3. Fenolik Polimerler (Tanenler)

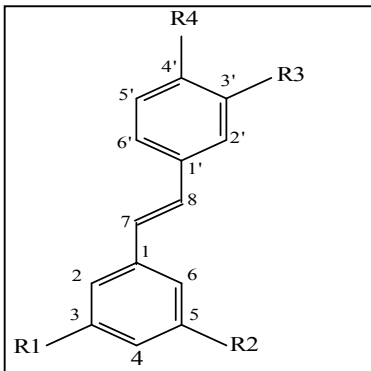
Fenolik polimerler, yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerdir (Şekil 2.9). Yoğunlaşmış tanenler bu gruba girerler. Bugün besin tanenleri denilince, genellikle kateşin ve epikateşinin polimerleri anlaşılmaktadır. Koyu renkli ve tadı buruk bileşiklerdir. Kırmızı ve beyaz şarapta, elma ve nar suyunda bulunurlar (31).



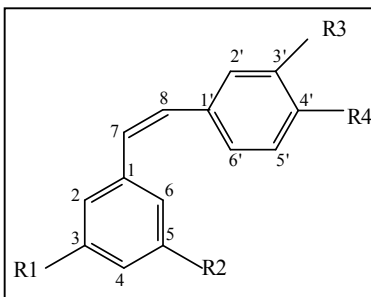
Şekil 2.9. Fenolik polimerlerin yapısı.

2.2.1.4. Stilbenler

Bitkiler strese, zarara, enfeksiyona veya UV ışımaya maruz kaldığında, hastalık direncini artırmak için stilbenleri sentezlerler. Stilbenler, daha çok üzüm asmaları, yerfıstığı ve çam ağaçları tarafından sentezlenen fitoaleksinlerdir (32). İskeletleri 1,2-difeniletilen yapısına dayanır (Şekil 2.10).



	R1	R2	R3	R4
trans-resveratrol	OH	OH	H	OH
trans-piseid	GlcO	OH	H	OH
trans-astringin	GlcO	OH	OH	OH



	R1	R2	R3	R4
cis-resveratrol	OH	OH	H	OH
cis-piseid	GlcO	OH	H	OH

Şekil 2.10. Şarapta sıklıkla bulunan stilbenlerin kimyasal yapıları (33).

Resveratrol (3,5,4'-trihidroksistilben) ve piceid (3,5,4'-trihidroksistilben-3- β -D-glukozid) üzüm asmasından üretilen iki ana stilben fitoaleksindir (34). Dut, üzüm ve şarap stilbenlerin en önemli beslenme kaynağı olarak düşünülür (34, 35).

Stilben monomerleri arasında, trans-resveratrol, şarapta düşük konsantrasyonda bulunmasına rağmen (1-3 mg mL⁻¹), insan sağlığı üzerine etkisi nedeniyle en fazla çalışılan bileşiktir (36).

2.2.2. Polifenollerin Antioksidan Aktivitesi ve Yapısı Arasındaki İlişki

Bir gıdanın 'antioksidan gücü' , onun hem insan organizmasını serbest radikallerden koruma, hem de oksidatif stresten kaynaklanan dejeneratif hastalıkları önleme kabiliyetinin ifadesidir (37).

Birçok epidemiyolojik çalışma, dengesiz beslenme ile koroner kalp hastalıkları, birkaç kanser türü ve diyabet oluşumu arasında bir korelasyon olduğunu göstermiştir (38). Epidemiyoloji uzmanları, polifenolik bileşiklerince zengin bir beslenmenin, bunların antioksidan özellikleri sayesinde pozitif bir etki sağlayabileceğini gözlemlemiştir (39).

Polifenollerin, hidrojen veya elektron verici ajanlar olarak, indirgeme özellikleri açısından kimyasal aktiviteleri, bunların serbest radikal süpürücüler olarak potansiyel davranışını öngörür. Bir antioksidanın aktivitesi, şu esaslara göre belirlenir:

- 1) Hidrojen veya elektron verici ajan olarak reaktivitesi (Bu onun indirgenme potansiyeli ile ilgilidir).
- 2) Çiftleşmemiş elektronu delokalize ve stabilize etme kabiliyetiyle yönetilen, antioksidandan türeyen radikalın ömrü.
- 3) Diğer antioksidanlarla olan etkileşimi.
- 4) Metal şelatlama potansiyeli.

Polifenoller, serbest radikal süpürücü aktivite için ideal bir yapıya sahiptirler. Molar bazda, *in vitro* olarak, vitamin E ve C'ye göre daha etkin antioksidanlar olduğu gösterilmiştir. Bu durum, puls radyoliz çalışmalarıyla, polifenollerin,

hidroksil radikali (OH^\bullet), azid radikali (N_3^\bullet), superoksit anyon ($\text{O}_2^{\bullet-}$), lipid peroksil radikali (LOO^\bullet) ve t-butilalkoksil radikal modelleri (tBuO^\bullet) ile etkileşimleri, reaksiyon hız sabitleri ve antioksidan radikalın stabilitesi araştırılmış ve onaylanmıştır. Buna ilaveten, özellikle demir ve bakırla metal şelat oluşturma eğilimi, metal katalizli serbest radikal oluşumuna geçişi engellemesi açısından, polifenollerin koruyucu antioksidan olarak rollerini desteklemektedir (15).

2.2.3. Polifenollerin İnsan Sağlığı Açısından Önemi

Kalp ve damar hastalıkları, gelişmekte olan ülkeler kadar, gelişmiş ülkelerin çoğunda da, ölüm nedenlerinin başında gelen hastalıklardan birisidir. Kalp ve damar hastalıkları için yaş, cinsiyet, genetik yatkınlık gibi başlıca risk faktörleri değiştirilememesine rağmen, beslenme ve yaşam stili değiştirilebilir başlıca risk faktörleridir. Örneğin aşırı beslenmeyle doymuş yağ ve kolesterol alımının, plazmadaki düşük yoğunluklu lipoprotein-kolesterolü (LDL-c) değiştirerek kalp ve damar hastalıkları gelişmesinde negatif etkileri tespit edilmiştir (40). Bununla birlikte bazı nonlipid risk faktörleri de bunların gelişimini etkileyebilir. Çünkü koroner kalp hastalıklarından ölümlerin yarısı, normal kolesterol seviyesine sahip kişilerde görülmüştür (41). Bu mevcut bilgi, yüksek plazma kolesterolünden başka risk faktörlerinin de bu hastalıkların gelişiminde önemli bir rol oynadığını belirtmektedir (42).

Son tespitler, kalp damar hastalıklarının gelişmesinde oksidatif stres, vaskular enflamasyon ve endotelial disfonksiyonları öne çıkarmıştır (43). Hastalık süreci bilgisindeki böyle ilerlemeler, damar hastalıklarının gelişmesine engel olmak için, ilaç kullanımına ait ve/veya beslenmeye yönelik yeni stratejiler geliştirmeyi öngörmüştür. Buna, kalp sağlığının desteklenmesini amaçlayan nutrasötikler ve fonksiyonel gıdaların gelişen ve artan popülaritesi örnek olarak gösterilebilir. Epidemiyolojik gözlemlerin, böyle ürünlerin gelişmesinde önemli rol oynadığını görmek ilginçtir. En dikkate değer örnekler, Eskimolarda, daha düşük iskemik kalp hastalığı oluşma derecesi ve Fransızlarda daha iyi damar sağlığı ve daha düşük kardiyak ölüm oranları bulgularının olmasıdır. Her iki örnekte, orijinal epidemiyolojik gözlemler temeline dayanan araştırma hızla ilerlemiştir ve beslenmeyle alınan koruyucu ajanların isim olarak tespiti ve doğrulanmasıyla

sonuçlanmıştır. Bunlar Eskimolarda uzun zincirli n-3 poli doymamış yağ asitleri ve Fransızlarda üzüm asması (*Vitis vinifera*) polifenolleridir (43).

Renaud ve Lorgeril, diğer ülkelerle karşılaştırıldığında, Fransız popülasyonunun, yüksek kolesterol diyetine rağmen, koroner kalp hastalıklarında daha düşük ölüm oranına sahip olduğunu göstermiştir. Son zamanlarda, “Fransız paradoksu” olarak bilinen bu çelişkili bulguların, düzenli şarap tüketimine ve kırmızı şarap polifenollerinin eşsiz anti aterosklerotik etkilerine bağlanabileceği rapor edilmiştir (44). Aterosklerotik plağın gelişimi, endotel hücrelerin disfonksiyonu, LDL (düşük yoğunluklu lipoprotein) oksidasyonu ve makrofajdan köpük oluşumu ile karakterize edilir (45). LDL-c gibi lipoproteinlerin oksidasyonu, damar tıkanıklığının gelişiminde önemli bir basamaktır ve bu yüzden, yeteri kadar yüksek plazma antioksidanı olması koruyucu olabilir. Okside olmuş LDL’ler, makrofajların, köpük hücrelere transformasyonunu destekler ve bu yüzden aortada köpük hücrelerin gelişimi, damar tıkanıklığı lezyonlarının iyi bir modeli ve göstergesidir (46, 47). Kırmızı şarap polifenollerinin, *in vitro* ve *in vivo* olarak LDL oksidasyonunu engellediği rapor edilmiştir. Kırmızı şarap polifenollerinin bu anti-oksidatif etkileri, Fransız paradoksu mekanizmasının bir bölümüyle ilgili olabilir.

Polifenoller, bitkilerde geniş yelpazede dağılmasına rağmen, yüksek konsantrasyonlarda yalnızca birkaç yiyecek ve içecekte bulunurlar. Bunlara örnek kırmızı şarap ve çaydır. Üzüm dünyada en fazla tüketilen meyvelerden biridir ve polifenollerce zengindir. Üzüm polifenollerinin %90-95’i, üzüm çekirdeği ve üzüm kabuğunda bulunurlar. Üzüm çekirdeği polifenollerinin çoğu çay polifenollerinden oldukça farklıdır. Üzüm çekirdeği polifenollerini polimerce zengindir. Oysa çoğu çay polifenollerini, kateşin gibi monomerlerdir (48).

Üzüm polifenollerinin, kardiyoprotektif etki gösterebilen diğer potansiyel mekanizmaları; oksidatif strese azalma, enflamatuvar basamağın modülasyonu, vasküler endotel hücre fonksiyonunda gelişme, platelet agregasyonunun önlenmesidir.

Kırmızı şarabın aktif bileşenlerinden biri resveratroldür (trans-3,4,5-trihidroksistilben). Üzümün kabuğunda doğal olarak oluşan bir fitoaleksindir. Resveratrol dahil olmak üzere fitoaleksinler, patojenlerin neden olduğu enfeksiyona karşı savunma olarak bitkiler tarafından üretilen antibakteriyel ve antifungal

kimyasallardır (49). Üzüm kabuklarında bulunan resveratrol miktarı, fungal enfeksiyona maruz kalmasına ve coğrafi orijinine göre değişir. Kırmızı şarapta resveratrol düzeyi, üzüm çeşidinden ve şarap yapma prosesinden de (örneğin üzüm kabuklarıyla temasta geçirilen fermantasyon süresi) etkilenebilir ve Merlot şaraplarında 5.87 mg mL^{-1} e kadar bulunabilir (50).

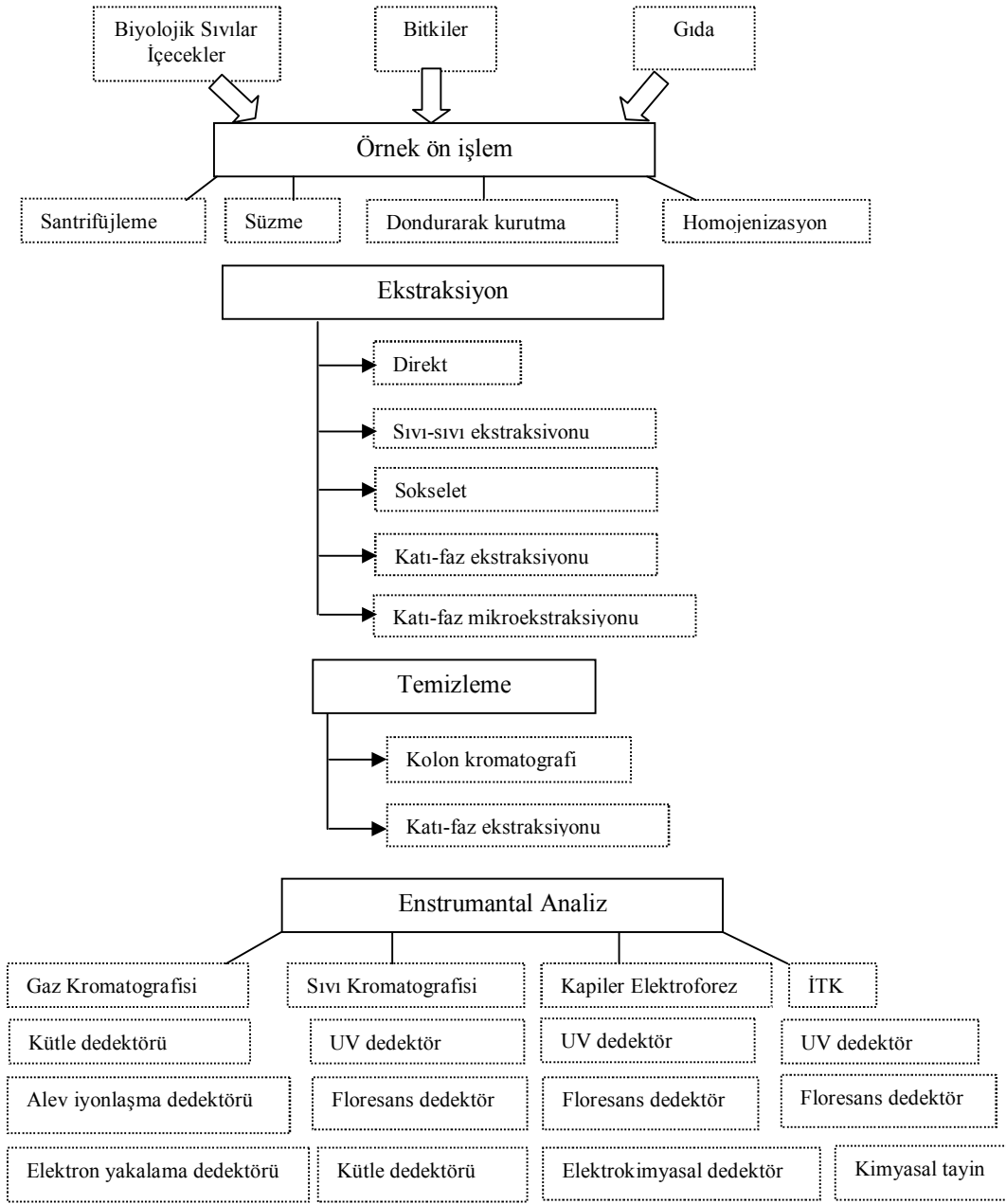
Polifenoller, *in vitro* ortamda, reaktif oksijen, azot ve klor türlerini (süperoksit anyonu, hidroksil radikali, peroksil radikalleri, hipokloröz asit ve peroksinitröz asit gibi) süpürme yeteneğiyle güçlü bir antioksidan aktiviteye sahiptirler. Metal iyonlarıyla da şelat oluştururlar. Böylece onların prooksidan aktivitelerini azaltırlar. Artan oksidatif hasarın yaşa bağlı çoğu dejeneratif hastalıkların gelişimiyle ilgili olduğunu gösteren önemli bulgudan dolayı, polifenollerin böyle durumlara karşı koruyucu etkilere sahip olabileceği düşünülmüştür. Yüksek polifenol alımı ile kanser, kardiyovasküler hastalık ve nörodejeneratif bozukluk risklerinin azalması ilişkilendirilmiştir. Bu biyolojik aktivite, çoğunlukla, *in vitro* olarak, aglikon veya glikozit formunda gıdalar kullanılarak izole edilen dokular, saf enzimler veya üretilmiş hücreler üzerinden değerlendirilir (18, 51).

Polifenollerin insan sağlığı üzerine etkileriyle ilgili pek çok epidemiyolojik çalışma bulunmasına rağmen, kapsamlı veriler yalnız flavonoidler için mevcuttur. Epidemiyolojik çalışmalar, yüksek flavonoid alımının, koroner damar hastalıklarından ölümü %65'e kadar azalttığı ve genellikle felç riskini, bunun yanında akciğer ve rektal kanserleri, astım ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı riskini azalttığını, tatmin edici kanıtlarla ileri sürmektedir. Buna karşılık bağırsak, epitelyum, yumurtalık, testis kanserleri ve mide, idrar yolları, prostat ve meme kanseri üzerine etkisi açık değildir (52, 53, 54).

Polifenollerin antimikrobiyal aktivitesi (55), bulaşıcı hastalıklara karşı yararlıdır. Örneğin, anti-HIV aktivitenin, revers transkriptaz (56), proteinaz, integras ve CD4 reseptörleri gibi enzimlerin inhibisyonu yoluyla olduğu ileri sürülür (57). Sitomegalovirüse karşı, polifenol aktivite, epidermal büyüme faktörü reseptörlerinin inhibisyonuna bağlanırken, insan ve kuş gribi virüslerine karşı polifenol aktivite, viral hemaglutinin inhibisyonu yoluyla olur (58, 59).

İlginç olan, insan hastalıklarına karşı, hayvanlarda ve *in vitro* ortamda yapılan polifenol aktivite çalışmaları, genellikle insan çalışmalarıyla teyit edilmemiştir. Bu nedenle artan bir soru, deneysel çalışmaların, insan hastalık sonuçları için uygun olup olmadığıdır. Epidemiyolojik ve deneysel sonuçlar arasındaki böyle farklılıklar, insan çalışmalarındaki pek çok metodolojik problemle açıklanabilir. Aslında, polifenol alımını incelemek için kullanılan sözkonusu metotlar, aktif formda ve doku düzeyinde polifenol biyoyararlanımı hakkında yararlı bilgi sağlamaz (60). Buna ilaveten, farklı polifenoller farklı biyolojik özelliklere sahiptirler (61). İnsan ve deneysel çalışmalar arasındaki farklılık için diğer bir örnek, polifenollerin *in vivo* ortamdaki etki mekanizmasının, *in vitro* mekanizmadan farklı olabilmesidir. Gerçekte, polifenollerin klasik antioksidan aktivitesinin, spesifik olmayan protein/enzim modülasyon mekanizmasını içeren insandaki hücresel etkileri açıklaması olası değildir. Bu hipotez iki nedene dayanır. Birincisi, polifenol metabolizması, onların redoks potansiyellerini önemli ölçüde değiştirir. Gerçekte, polifenol konjugatları ve metabolitlerinin antioksidan kapasitesi, aglikonlarına göre daha düşüktür. İkincisi, plazma ve organlardaki polifenol derişimi, askorbik asit ve α -tokoferol gibi diğer antioksidan mikrobeseinlerden daha düşük olmasına rağmen, doku düzeyinde oksidatif strese karşı askobatdan daha etkindirler (62). Bu hipoteze göre, farklı kanser türlerine, hücre bölünmesi yoluyla çoğalan (proliferatif) hastalıklara, enflamasyona ve nörodejenerasyona karşı polifenol aktivitesi, çok sayıda reseptör, enzim ve transkripsiyon molekülüne karşı engelleyici ve değiştirici etkinlikleri sayesinde gösterilir (63). Örneğin, birkaç polifenolün anti-kanser aktivitesi, kanser oluşumu (karsinogenez) ve tümör gelişimini içeren enzimleri inhibe etmesi kabiliyeti sayesinde (63, 64). Benzer değiştirici etkiler, kardiyovasküler hastalıklara karşı, koruyucu polifenol etkisinin açıklanmasını da kapsar (53). İlginç biçimde, bazı yükseltgenmiş polifenol metabolitleri, pro-oksidan olarak davranır, fakat kanser hücresi mitokondrisine karşı, toksik reaktif oksijen türleri üreterek, hücrelerin ölümünü indükler (65). Diğer taraftan, böyle pro-oksidan aktiviteyle, besinle yüksek polifenol alımının yarardan çok oksidatif risk getireceği akla gelir. Flavonoid alımı ve kolon kanseri arasındaki doğrudan ilişkinin rapor edildiği epidemiyolojik bir çalışma bu endişeyi kuvvetlendirmektedir (66). Bu durum, büyük miktarda yalnız polifenol içeren besinsel katkıların insan sağlığı için gerçekten zararlı olabileceğini, öne sürmektedir (64, 67).

2.3. Polifenollerin Tayini için Stratejiler

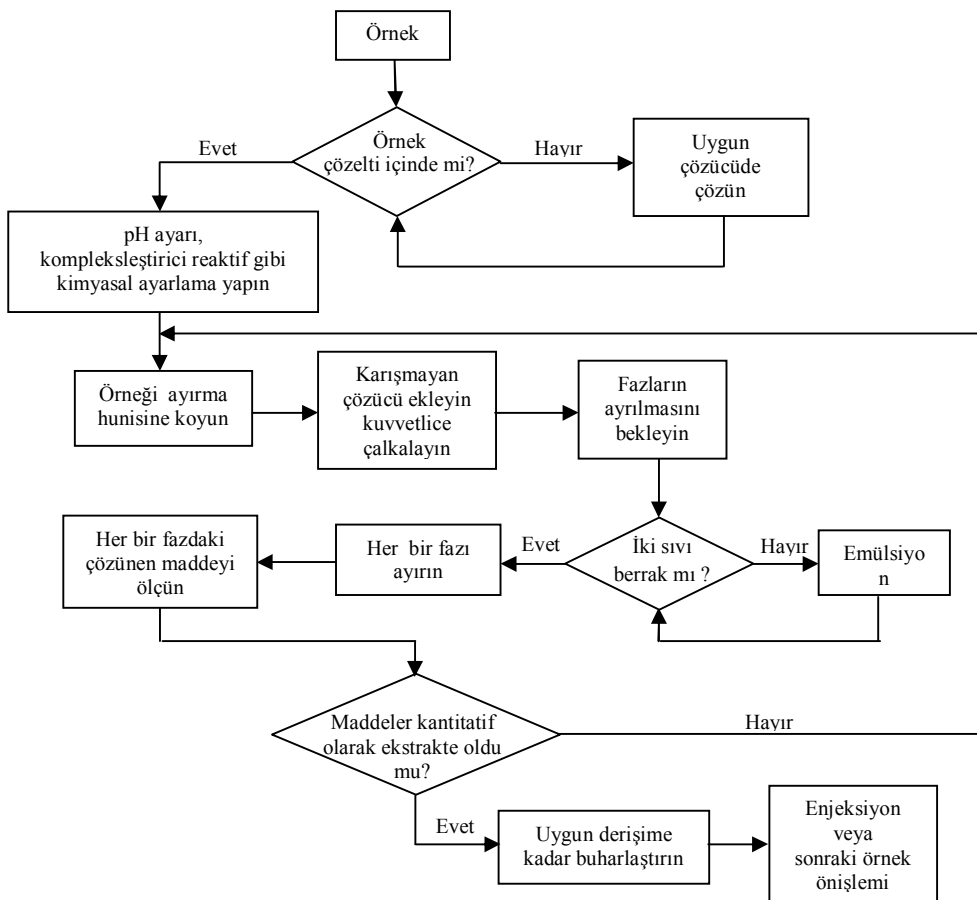


Şekil 2.11. Biyolojik sıvılar, içecekler, bitkiler ve gıdalarda flavonoidlerin tayini için stratejiler (3).

2.3.1. Sıvı-sıvı ekstraksiyon (LLE)

Sıvı-sıvı ekstraksiyonu, birbiri ile karışmayan iki sıvı faz arasında, örneğin dağılması yoluyla, analitlerin matristen ayrılması için kullanılır. Sıvı-sıvı ekstraksiyonunda genellikle bir faz sulu, ikinci faz organik bir çözücüdür. Daha hidrofobik bileşikler, büyük ölçüde organik fazda bulunurken, daha hidrofilik bileşikler polar sulu fazı tercih ederler. Sulu faz içine ekstrakte edilen analitler, ters faz HPLC kolonuna direk olarak enjekte edilebilirken, organik faz içine ekstrakte edilen analitler, buharlaşma yoluyla solventten kolaylıkla geri kazanılırlar.

Şekil 2.12’de sıvı-sıvı ekstraksiyonu ayırımını içeren basamaklar özetlenmektedir. Ekstraksiyon sınırlı verim ile yürüyen bir denge olayı olduğundan, analitin önemli miktarı, her iki fazda da kalabilir. pH, iyon çifti, kompleksleşme ve benzeri değişiklikleri içeren kimyasal denge, analitin geri kazanımını artırmak ve/veya girişim yapan maddeleri elimine etmek için kullanılabilir.



Şekil 2.12. Sıvı-sıvı ekstraksiyonunun şematik gösterimi

LLE organik bir solventi aşağıdaki özellikleri göre seçilir:

- Su içinde düşük çözünürlük (< % 10)
- Ekstraksiyondan sonra kolay uzaklaştırma için uçuculuk
- Analiz için kullanılan HPLC tayin teknolojisi ile uyumluluk (güçlü UV absorpsiyonu veren çözücülerden kaçınılmalı)
- Organik fazda analitlerin geri kazanımını artıran, polarite ve hidrojen bağ yapabilme özelliği
- Örnek kirliliğini azaltmak için yüksek saflık

Tablo 2.2' de sıvı-sıvı ekstraksiyonu için solventler verilmiştir

Tablo 2.2. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu için solventler

Sulu Çözücüler	Su ile Karışmayan Organik Çözücüler	Su ile Karışabilen Organik Çözücüler
Saf su	Alifatik hidrokarbonlar (hekzan, izooktan, petrol eteri vs.)	Alkoller (düşük molekül ağırlıklı)
Asidik su	Dietil eter veya diğer eterler	Ketonlar (düşük molekül ağırlıklı)
Bazik su	Metilen klorid	Aldehitler (düşük molekül ağırlıklı)
Aşırı tuz (Salting-out etkisi)	Kloroform	Karboksilik asitler (düşük molekül ağırlıklı)
Kompleksleştirici ajanlar (iyon çifti, şelatlaştırıcı, kiral gibi)	Etil asetat ve diğer esterler	Asetonitril
Yukarıdakilerin iki veya daha fazlasının kombinasyonu	Alifatik ketonlar (C ₆ ve yukarısı)	Dimetil sülfoksit
	Alifatik alkoller (C ₆ ve yukarısı)	Dioksan
	Toluen, ksilen (UV absorbans verir)	
	Yukarıdakilerin iki veya daha fazlasının kombinasyonu	

2.3.1.1. Teori

Sıvı-sıvı ekstraksiyonunda geçerli olan Nernst dağılma kanununa göre, karışmayan iki sıvıda farklı miktarlarda çözünen bir üçüncü maddenin, denge kurulduğunda, her iki fazdaki derişimleri oranı, sabit bir sıcaklıkta sabittir.

$$K_D = \frac{C_0}{C_{aq}} \quad (2.5)$$

K_D = Dağılma katsayısı

C_0 = Organik faz içindeki analit konsantrasyonu

C_{aq} = Sulu faz içindeki analit konsantrasyonu

Daha faydalı bir eşitlik, organik faza ekstrakte edilen analitin fraksiyonu (E) eşitliğidir.

$$E = \frac{C_0 V_0}{C_0 V_0 + C_{aq} V_{aq}} = \frac{K_D V}{1 + K_D V} \quad (2.6)$$

$$E = 1 - \left(\frac{1}{1 + K_D V} \right)^n \quad (2.7)$$

V_0 = Organik fazın hacmi

V_{aq} = Sulu fazın hacmi

$V = V_0/V_{aq}$

n = ekstraksiyon sayısı

K_D değerini artırmak için farklı yaklaşımlar kullanılabilir:

- Organik solvent değiştirilebilir,
- Analit iyonikse veya iyonize olabiliyorsa, organik fazda daha fazla çözüdür hale getirmek için, iyonlaşması bastırılarak K_D değeri artırılabilir. Analit, organik faza iyon çifti ajanı eklenerek de ekstrakte edilebilir.
- Analitin sulu faz içindeki konsantrasyonunu azaltmak için, sodyum sülfat (NaSO_4) gibi inert nötral bir tuz sulu faza eklenerek salting out yapılabilir.

2.3.1.2. Dezavantajları

Sıvı-sıvı kromatografisinde ile ilgili bazı pratik problemler şunlardır:

- Emülsiyon oluşumu,
- Partiküllere kuvvetli olarak tutunan partiküller,

- Büyük molekül ağırlıklı bileşiklere bağlanan bileşikler (proteine bağlanan ilaçlar gibi),
- İki fazın birbiri içinde çözünürlüğü.

Emülsiyonlar, sulu ve organik faz arasında keskin bir sınırla ayrılmazsa, analit geri kazanımı olumsuz olarak etkilenebilir. Emülsiyonlar, sulu faza tuz eklenmesiyle, ekstraksiyon kabının ısıtılması veya soğutulmasıyla, faz ayırıcı filtre kağıdı ile süzerek, küçük bir miktar farklı organik solvent ekleyerek ve santrifüjleme yoluyla kırılabilir (68).

Analiz öncesi yapılması gereken örnek hazırlama, çoğu zaman zor, pahalı ve uzun süren bir işlemdir. Yıllardan beri en sık kullanılan örnek hazırlama yöntemi olan sıvı-sıvı ekstraksiyonu, fazla miktarda çözücü harcanması, ekstraksiyon sırasında emülsiyon faz oluşması, gerekli saflığa sahip olmayan ekstraktlar elde edilmesi, çözücülerin yeterince uzaklaştırılmaması ve duyarlı kantitatif sonuçlar elde edilememesi gibi bazı sakıncalara sahiptir (69).

2.3.2. Katı Faz Ekstraksiyon Metodu (SPE)

2.3.2.1. Avantajları

Katı faz ekstraksiyonu HPLC için örnek ön hazırlamada kullanılan en önemli tekniktir. Sıvı-sıvı kromatografisine göre bir takım avantajlara sahiptir (68, 69, 70):

- Analitin matristen ayrılması daha verimlidir. En az düzeyde örnek transferi yapıldığından yüksek geri kazanımlar ile yüksek yoğunluk ve saflıkta örnekler elde edilebilmektedir.
- Organik solvent tüketimi ve kimyasal atık daha azdır. Dolayısıyla çevreyi kirletme riski düşüktür, daha ekonomiktir.
- Toplam analit fraksiyonunun toplanması daha kolaydır.
- Örnek hazırlama süresinin oldukça kısalmasını sağlar.
- Partiküller uzaklaşır.
- Çok sayıda örneğin aynı anda ve tekrarlanabilir şekilde işlenebilmesine olanak sağlayacak şekilde çok kolay otomasyon sağlanabilir.
- Düşük miktarda madde işlendiğinden sıvı-sıvı ekstraksiyonundaki gibi emülsiyon oluşma problemi yoktur.

SPE, LLE metoduna göre daha etkili bir ayırma işlemidir. SPE ile analitlerin daha büyük bir geri kazanım sağlaması daha kolaydır. Analitin % 99'dan fazlasını geri kazanmak için, birkaç ardarda ekstraksiyon gerektiren LLE işlemleri, tek basamakta gerçekleştirilen SPE metodu ile yer değiştirebilir. SPE ile analit fraksiyonundan matriksi daha etkin uzaklaştırmak mümkündür. Ters-faz SPE tekniği en popüler olanıdır. Elüsyon için yalnızca küçük bir miktar organik solvent ile analitin yüksek konsantrasyonu sağlanır. SPE' de faz ayırma ihtiyacı olmadığından, toplam analit fraksiyonu, farklı veya yanlış ölçülen ekstrakt hacimlerinden kaynaklı hatalar elimine edilerek kolayca toplanır. Sonunda, daha büyük partiküller SPE kartüjleri tarafından tutulurlar ve analit fraksiyonu içine geçemezler.

2.3.2.2. Dezavantajları

Sıvı-sıvı kromatografisine göre bazı dezavantajlar da içerir:

- SPE kartüjlerinin değişkenliği,
- SPE kartüjleri üzerine bazı analitlerin tersinmez adsorpsiyonu,
- LLE nun filtre edilmeyen bir örneğe kompleks bir matriks olsa bile direkt olarak uygulanabilmesi

LLE da kullanılan solventler saftır ve iyi tanımlanmıştır. Bu yüzden LLE ayırımları tekrarlanabilir. Tam tersine, SPE'de kullanılan katı-faz kartüjleri çok çeşitlidir. Bu yüzden metod tekrarlanabilirliği bazen SPE prosedürleri ile ilgilidir. LLE de kullanılan malzemenin yüzey alanı SPE kartüjüyle karşılaştırılınca, çok küçüktür. Bu nedenle, LLE' da analitin tersinmez olarak bağlanması SPE'den daha azdır.

2.3.2.3. Kullanım Amaçları

SPE metodu örnek hazırlamada altı amaç için kullanılır:

- Girişim yapan maddeleri ve kolon öldürücüleri uzaklaştırma,
- Analiti zenginleştirme,
- Tuzunu giderme,
- Solvent değişimi,
- In situ türevlendirme,

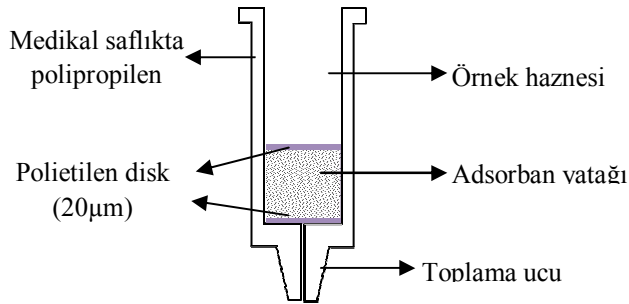
HPLC ayırımında, girişimlerin analit bantlarını kapatması, metot geliştirmeyi zorlaştırır ve sonuçları olumsuz etkiler. Bazı durumlarda, orijinal örnekteki girişimlerin çokluğu, analit bantlarından bunları ayırmayı imkansız kılar. SPE böyle girişimleri azaltır veya elimine eder. HPLC kolonunu tıkayan veya deaktive edebilen kolon öldürücü denen yağ, petrol, makine yağı gibi hidrofobik maddeler, polimerik materyaller ve partiküller, ters faz-SPE yöntemiyle çoğunlukla uzaklaştırılabilir (68).

2.3.2.4. SPE Materyalleri

SPE için kullanılan materyaller kartüjler ve disklerdir.

Bu materyaller, tek kullanımlık ekstraksiyon kolunu veya disklere çeşitli adsorban maddelerin doldurulmasıyla hazırlanır. Bir kolon düzeneğine katı bir adsorban yatağının yerleştirilmesi, bu yatağın iki ucu sabit disklerle tutturulmasıyla oluşturulur. Bu kolonda yukarıdan aşağıya doğru sırasıyla örnek haznesi, adsorban yatağı ve en uç kısımda toplama ucu bulunur.

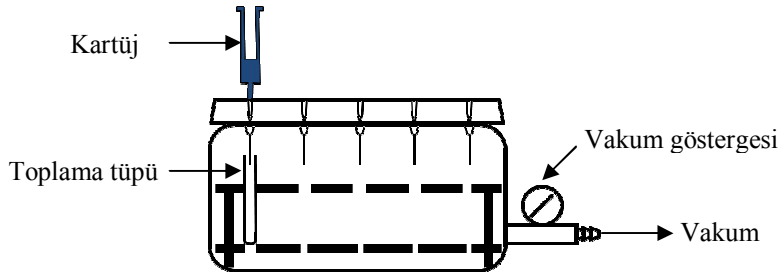
SPE diskleri geniş süzülme alanları ve ince yapıları sayesinde yüksek örnek akış hızlarına sahiptir.



Şekil 2.13. Tek kullanımlık kartüj (68, 69)

2.3.2.5. SPE Cihazı

Sıvı örneğin kolondan geçirilmesi, yerçekimi vasıtasıyla (manuel olarak) gerçekleşirken, zaman kaybını önlemek amacıyla vakum manifoldları kullanılır. Çok sayıda örneğin aynı anda işlem görebilmesi için, çok kartüj girişli vakum manifold sistemi önerilir (68).



Şekil 2.14. Çok kartüjlü manifold sisteminin şematik gösterimi

2.3.2.5. SPE Yönteminin Uygulanması

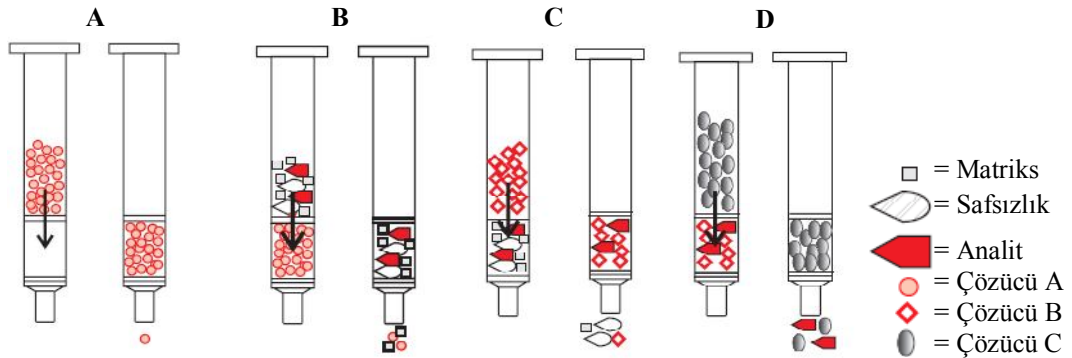
SPE metodunda kolondan geçirilme esnasında, örnek molekülleri ile adsorban madde arasında kimyasal bir etkileşim meydana gelir. SPE’de maddelerin ayrılması iki yolla gerçekleşir:

- 1) Seçici ekstraksiyon: Analiz edilecek bileşik adsorban maddeye bağlanarak kolon içinde tutulurken, çözelti ve istenmeyen bileşenler bu madde ile herhangi bir etkileşime girmezler. Analiz edilecek bileşen adsorban maddeden uygun bir çözelti yardımıyla elue edilir.
- 2) Seçici yıkama: Matriksteki istenmeyen bileşenler tutucu madde tarafından sıkı şekilde bağlanırlar. Asıl aranan madde ise tutucu madde ile etkileşime girmez ve uygun çözelti yardımıyla çözülerek toplanır.

İki ayırma işleminde de SPE kolonuna aşağıdaki işlemler uygulanır:

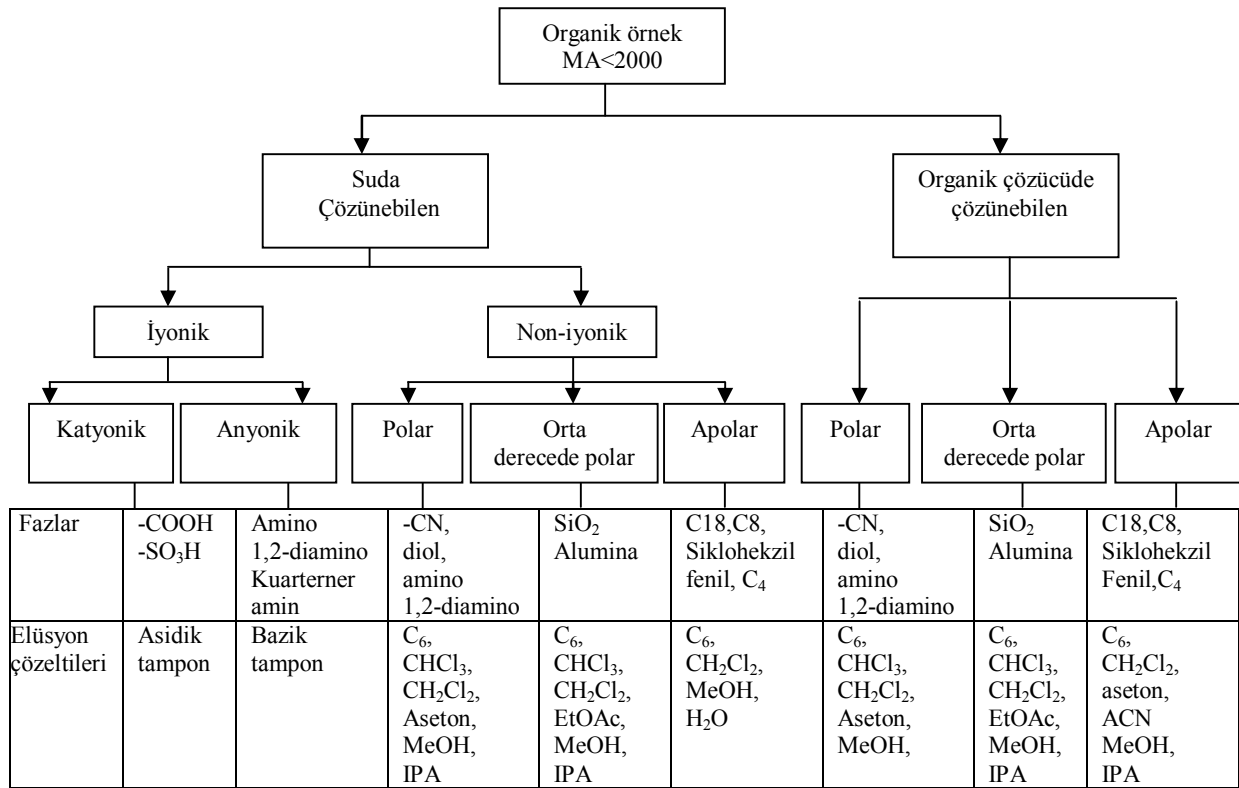
1. Dolgu maddesinin şartlanması: SPE kolonundaki adsorbanın önce şartlandırılması gerekir. Şartlandırma işleminin amacı, kolondan uygun çözelti geçirilerek dolgu maddesinin aktif hale getirilmesi ve matriksteki maddeler ile tekrarlanabilir etkileşim için gerekli ortamın sağlanabilmesidir.
2. Örnek uygulanması: Bir numune şartlandırılmış kolona uygulanır ve vakum yardımıyla kolondan geçirilirse, örnekte bulunan adsorbanla kuvvetle etkileşen maddeler yüzeyde tutulurlar.
3. Dolgu maddesinin yıkanması (girişim yapan maddelerin uzaklaştırılması): Adsorban üzerinde kalan yabancı maddeleri, uygun çözücüler kullanarak yıkama ile uzaklaştırmak mümkündür.
4. Analitin geri kazanımı: Analit fraksiyonunun elüsyonu ve toplanmasında, başlıca amaç tayin duyarlılığı ise, analit mümkün olan küçük bir hacme

toplanmalıdır. Bu güçlü bir çözücü ile başarılabilir. Alternatif olarak, daha zayıf bir çözücü, kuvvetli olarak tutunan girişim yapan maddelerin elüsyonunu azaltırken, analitin elüsyonunu sağlar (71).



Şekil 2.15. SPE'da ayırma işlemi **A:** Dolgu maddesinin şartlanması **B:** Örnek uygulanması **C:** Dolgu maddesinin yıkanması **D:** Analitin geri kazanımı

SPE metodunda ayırma işleminin gerçekleşmesi için adsorbanlar ve çözücüler büyük önem taşımaktadır. Tablo 2.3.'de SPE'de kullanılan adsorbanlar ve uygulama alanları ve çözücü seçimleri gösterilmektedir (68).



Şekil 2.16. SPE fazları ve çözücü seçimi

2.3.3. Kromatografik Yöntemler

Kromatografi, kompleks karışımları tek tek bileşenlerine ayırmak ve bu bileşiklerin miktarlarını kantitatif olarak tayin etmek için kullanılan bir ayırma tekniğidir. En önemli kromatografik metotlar; gaz kromatografisi (GC), yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), ince tabaka kromatografisi (TLC) dir. Buna ilaveten daha yeni metotlardan bazıları süper kritik akışkan kromatografisi, kapiler elektroforez, çok-boyutlu kromatografik tekniklerdir (72).

Kromatografik metotlar iki yolla sınıflandırılabilir. İlk sınıflandırma uygulama biçimine göre dir.

1. Düzlemsel Kromatografi
2. Kolon Kromatografisi

Daha önemli olan ikinci sınıflandırma ayrılma mekanizmalarına göre dir (Tablo 2.3).

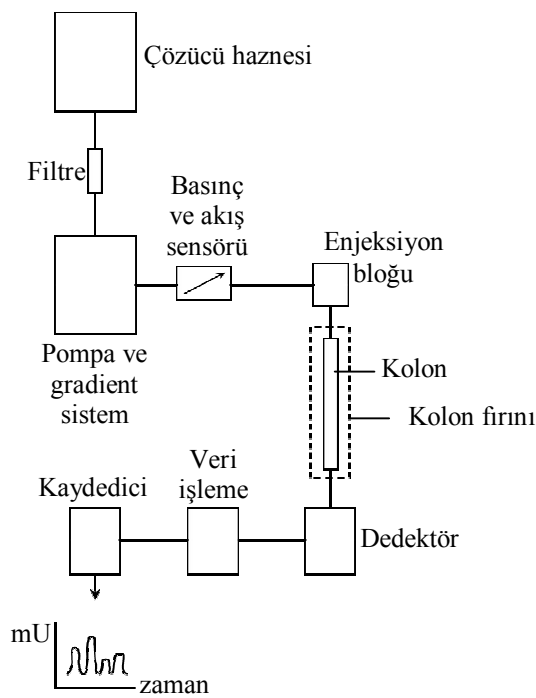
Tablo 2.3. Kolon kromatografisinin sınıflandırılması (73).

Genel Sınıflandırma	Spesifik Yöntem	Sabit Faz	Denge Türü
1. Gaz kromatografisi (GC)	a-Gaz-sıvı kromatografisi (GLC)	Sıvının katı bir yüzeye bağlanması veya adsorbe olması	Gaz ve sıvı arasındaki partisyon
	b-Gaz-katı kromatografisi	Katı	Adsorpsiyon
2. Sıvı kromatografisi (LC)	a- Sıvı-sıvı veya partisyon	Sıvının katı bir yüzeye bağlanması veya adsorbe edilmesi	Karışmayan sıvılar arasındaki partisyon
	b- Sıvı-katı yada adsorpsiyon	Katı	Adsorbsiyon
	c- İyon değişimi	İyon değiştirici reçine	İyon değişimi
	d- Boyut eleme	Polimerik bir katının boşlukları içindeki sıvı	Partisyon / eleme
	e- Afinite	Katı bir yüzeye özel bir grup sıvının bağlanması	Sıvı yüzey ile sıvı mobil faz arasındaki partisyon
3.Süperkritik akışkan kromatografisi (SFC)		Katı bir yüzeye organik bir grubun bağlanması	Süperkritik sıvı ve bağlı yüzey arasında dağılıma

2.3.3.1. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Şekil 2.17’de şematik olarak gösterilen bir HPLC sistemi aşağıdaki bileşenlerden oluşur:

- 1- Çözücü haznesi
- 2- Pompa
- 3- Enjektör
- 4- Kolon
- 5- Dedektör



Şekil 2.17. HPLC sisteminin şematik gösterimi (74).

Sistemin çalışma prensibi basittir. Pompa, çözücüyü kolon boyunca belli bir hızda iter. Örnek enjeksiyonu esnasında, çözücü enjeksiyon bloğundan geçerek, örneği kolona taşır. Kolonda örnek bileşenleri ayrılır ve ayrılan bileşenler dedektörde tayin edilir. Çoğu cihazda, eluent ve kolonun sıcaklığını kontrol etmek mümkündür. Pik genişlemesini azaltmak için, özellikle enjeksiyon sistemi ve dedektördeki ölü hacim küçük tutulmalıdır (72).

2.3.3.1.1. Çözücü Haznesi

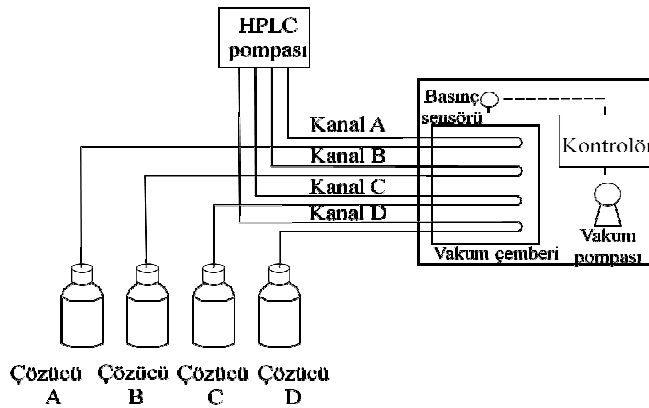
Çözücü hazneleri, cam veya paslanmaz çelikten yapılırlar. HPLC’de mobil faz olarak kullanılan tüm çözücüler, haznelere konmadan önce, LC sistemini kolaylıkla tıkayabilecek asılı partikülleri uzaklaştırmak için süzülmalıdır.

HPLC’de karşılaşılan problemlerin biri, mobil faz içinde çözünmüş havadır. Oluşan hava kabarcıkları, kolonun içine yayılabilir. Bu kabarcıklar, dedektörden geçtiklerinde, ciddi ve kabul edilemez bir gürültüye ve akış hızında azalmaya neden olurlar. Bu yüzden çözünmüş gazlar ya helyum veya azot gazıyla, ya da ultrasonik banyoda uzaklaştırılmalıdır. Tablo 2.4’ de oksijen gazının sudaki çözünürlüğünün helyum ve azotla karşılaştırıldığında en yüksek olduğu görülmektedir (75).

Tablo 2.4. Gazların sudaki çözünürlükleri

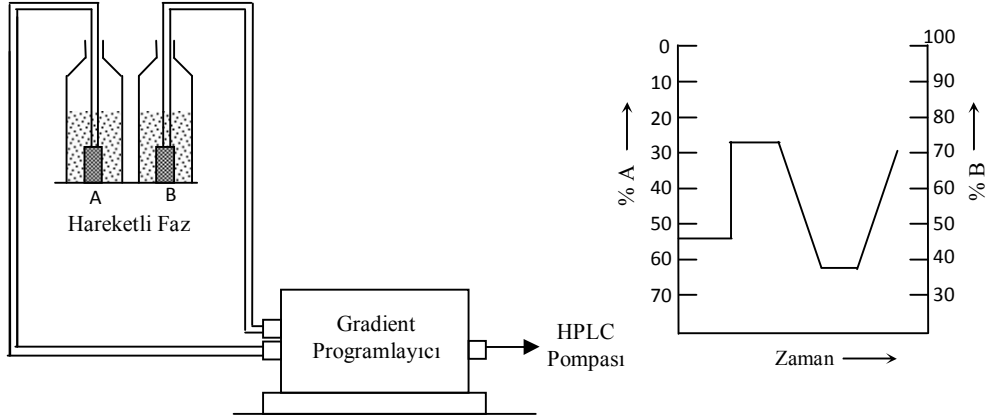
Gaz	Çözünürlük (mL/100 mL su) 15°C
He	0.94
N ₂	2.37
O ₂	4.89

Helyum gazı kullanmak külfetli ve pahalıdır. On-line vakum degazörlerinin kullanımı daha pratik ve etkilidir. Şekil 2.18 vakum degazörünü şematik olarak göstermektedir. Degazörün içindeki solvent, yarı geçirgen polimer membranlar yoluyla, havası boşaltılmış çemberin içine geçer. Burada daha küçük gaz molekülleri elimine edilir. Günümüzde vakum degazörleri, çoğu HPLC sisteminde bulunmaktadır (76).



Şekil 2.18. On-line solvent vakum degazörünün şematik gösterimi

HPLC’de, ayırma ya izokratik ya da gradient elüsyonla gerçekleştirilebilir. İzokratik metotta solvent bileşimi ayırma boyunca değişmez. Daha kısa analiz süresinde daha iyi ayırma, genellikle eluent bileşiminin analiz boyunca aşamalı olarak değiştiği gradient elüsyon kullanılarak elde edilir. Gradient elüsyonda, polaritede farklılık gösteren iki veya daha fazla solvent sistemi kullanılır (72).



Şekil 2.19. Gradient programlama sisteminin şematik gösterimi (77).

İki tür solvent programlayıcı vardır:

- Düşük basınç gradient programlayıcı
- Yüksek basınç gradient programlayıcı

1) Düşük basınç gradient programlayıcı: Düşük basınç gradient programlayıcı adından da anlaşılacağı gibi, haznelerden çözücüyu atmosfer basıncında alır, gerekli oranlarda karıştırır ve sonra bu karışım, örnek valfini ve kolonu besleyen uygun bir yüksek basınç pompasına geçer.

2) Yüksek basınç gradient programlayıcı: Bu programlayıcıda, çözücü haznedan doğrudan bir pompayla çekilir. Bu, her bir solvent için bir pompa demektir. Örnek valfine ve kolona dağılan solvent karışımı yüksek basınçta oluşturulur (75).

2.3.3.1.2. Pompa Sistemi

LC sistemlerinde üç kritik kısım vardır. Bunların en önemlisi ayırmanın gerçekleştiği kolondur. İkincisi, ayrılmanın izlendiği ve her elue olan maddenin kantitatif tayinini sağlayan dedektördür. Üçüncüsü, yüksek kolon verimi ve yüksek çözünürlük sağlamak için, çok küçük partiküllerden oluşan kolon yatağından,

hareketli fazı akış için zorlayan pompadır. HPLC kolonlarından iyi performans almak, dolgu maddesi olarak küçük partiküllerin kullanılması ve bu yüzden de yüksek basınç pompaları kullanılması sonucunda olur.

Sıvı kromatografisi pompaları için belli kritik özellikler vardır. Bunlar;

- 1- Pompa 6000 psi a kadar basınçta (en yüksek 10.000 psi) sürekli olarak çalışma yeteneğine sahip olmalıdır.
- 2- Akış hızı aralığı uygun olmalıdır. Tablo 2.5' de farklı tipte kolon çalışmaları için gerekli akış hızı aralıkları gösterilmektedir.
- 3- Doğru kalitatif ve kantitatif analiz için, akış hızı doğruluğu $\% \pm 1$ ve akış hızı kesinliği $\% \pm 0,1$ olması tavsiye edilir.
- 4- Pompadan gelen akış pulssuz (vurusuz) olmalıdır. Tamamen vurusuz akış, diyagram ve piston tipi pompalarda hemen hemen imkansızdır. Bununla birlikte pompa böyle vuruları azaltacak şekilde tasarlanmalıdır (75).
- 5- Korozyona karşı dayanıklı olmalıdır (73). Paslanmaz çelik, teflon veya seramik malzeme kullanılır (72).

Tablo 2.5. Kolonlar için akış hızları

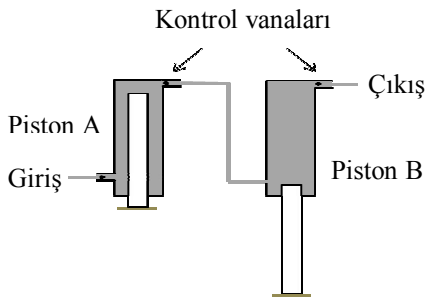
Kolon tipi	Pompa akış hızı aralığı (mL/dak)
Küçük kolonlar (çap: 0.25-2.0 mm)	0.002-2.00
Normal analitik kolon (çap:1.5-10 mm)	0.2-10.0

LC sisteminde başlıca iki tip pompa kullanılır:

- Sürgülü pompalar (Şırınga tipi pompalar)
- Pistonlu pompalar

1) Sürgülü pompalar: Sürgülü pompalar bir motor yardımıyla elektriksel olarak çalışan şırınga tipi bir pistondan oluşur (75). Yaklaşık 200 mL hacmi içine çeker ve sonra vurusuz olarak HPLC sistemine verir (72). Bu pompalar da, viskozite ve geri basınçtan bağımsız bir akış üretir. Avantajı vurusuz çıktı vermesidir. Dezavantajı sınırlı solvent kapasitesidir. Bu tip pompalar, ayırım için küçük mobil faz hacimleri gerektiren, mikrogözenekli kolonlara mobil faz sağlamak için kullanılır (73, 75).

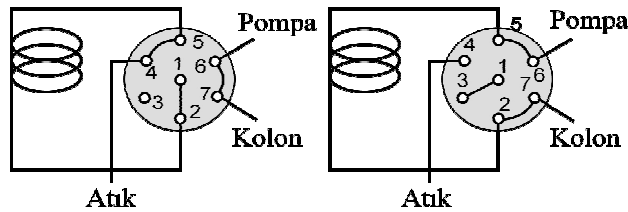
2) Pistonlu pompalar: Pistonlu pompalar, genellikle motor kontrollü bir pistonun ileri-geri hareketle çözücüyu pompaladığı küçük bir bölmeden meydana gelmiştir. Sırasıyla açılıp kapanan iki küresel kontrol valfi, silindirin içine ve dışına çözücü akışını kontrol eder. Çözücü doğrudan piston ile temas halindedir. Pistonlu pompaların dezavantajı vurulu bir akış üretmeleridir. Vurular kromatogramda zemin çizgisinde gürültü olarak görüleceğinden, sönümlenmesi gereklidir. Modern LC cihazları, bu vuruları azaltmak için, çift yönlü pompa başlıkları kullanırlar. Pistonlu pompaların avantajları, küçük iç hacimleri (35-400 μ L), yüksek çıkış basınçları (10000 psi'a kadar), gradient elüsyona uyumlulukları, büyük solvent kapasitesi, kolon geri basıncı ve solvent viskozitesinden büyük ölçüde bağımsız sabit akış hızlarıdır (73).



Şekil 2.20. HPLC sisteminde kullanılan pistonlu bir pompanın şematik diyagramı (77).

2.3.3.1.3. Enjeksiyon Sistemi

Örnek enjeksiyon sistemi $1\mu\text{L}$ - $500\mu\text{L}$ aralıktaki hacimlere olanak vermelidir. Mikro HPLC'de, örnek hacimleri çok daha düşüktür ($<1\mu\text{L}$). Sistemde enjeksiyon boyunca basınç sabit tutulmalıdır. En çok kullanılan enjeksiyon sistemi Şekil 2.21'de gösterilmektedir.



Şekil 2.21. Lupa örnek yüklenmesi ve mobil faz akışıyla pompadan kolona gönderilmesi (77).

Enjeksiyon sistemi, örnek halkasına (lupuna) bağlı altı yollu bir valftan oluşur. Yükleme pozisyonunda, örnek, bir şırıngayla halkanın içine enjekte edilir. Bu sırada mobil fazın pompadan kolona akışı devam etmektedir. Valfin enjeksiyon pozisyonuna çevrilmesiyle, mobil faz akışı örnek halkasının içinden geçerek örneği kolona taşır.

Otomatik örnek enjeksiyon sistemleri, yüksek kesinlikle örnek verilmesi için tercih edilir (72). Çok sayıda örneğin kısa sürede analizine imkan sağlar.

2.3.3.1.4. Kolon Sistemi

Çoğu HPLC kolonları, paslanmaz çelikten veya metal bir tüpün içine yerleştirilmiş kalın duvarlı cam tüpten oluşmuştur. Kolon materyali olarak PEEK (polieter eter keton) da kullanılabilir. Kolon iç çapı: 2.1 ile 7.6 mm arasında değişirken, kolon uzunluğu genellikle 1cm'den yaklaşık 30 cm' e kadar değişir. Sıvı kromatografi kolonları 3-10 µm partikül boyutunda dolgu maddesi ile doldurulur. Standart bir kolon, 250 mm uzunluğunda, 4.6 mm iç çapındadır ve 5 µm'lik partiküllerle doldurulmuştur. Böylece, yaklaşık olarak metre başına 50000 teorik tabaka sayısı elde edilebilir.

Daha uzun ve daha ince bir kolon ve daha küçük partikül boyutu daha iyi ayırım demektir. Bununla birlikte, kolonun geri basıncı artar. Bir pompanın kapasitesi, kolon boyutlarını ve partikül boyutunu belirler (72).

2.3.3.1.5. Kolon Dolgu Maddesi

Sıvı kromatografisinde peliküller (kabuklu) ve gözenekli partiküller olmak üzere iki tür dolgu maddesi kullanılır. Peliküller partiküller, 30-40 µm çapında küresel, gözeneksiz, cam veya polimerik taneciklerdir. İnce, gözenekli silika, alumina, polistiren-divinilbenzen sentetik reçinesi veya iyon değiştirici bir reçine tabakası bu taneciklerin yüzeyine yerleştirilir. Küçük gözenekli mikropartiküller, bu büyük peliküller partiküllerin yerini almıştır.

LC için gözenekli dolgu maddeleri, 3-10 µm çapında, gözenekli mikropartiküllerden meydana gelir. Bu partiküller, silika, alumina, sentetik reçine polistiren-divinilbenzen veya iyon değiştirici bir reçineden oluşur. Silika sıvı kromatografide en yaygın olan dolgu maddesidir (73).

1) Silika: Silika-bazlı malzemeler yüksek kolon verimi sağlar ve bunlar yüksek mekanik güce sahiptirler.

Bir silika partikülün yüzeyi uygun kimyasal reaksiyonlarla kolaylıkla modifiye edilebilen siyanol (SiOH) gruplarıyla kaplıdır. Bir silika partikülün en önemli özellikleri, şekli, boyutu, gözenekliliği, gözenek boyutu ve yüzey alanıdır. Bu özellikler, üretim süreçlerine bağlıdır. Farklı üreticilerin partikülleri, oldukça farklı karakteristik ve performans gösterebilirler (72).

2) Polimerik Partiküller: Son zamanlarda polimerik malzemelerin HPLC’de kullanımı artmıştır. Bunun bir nedeni polimer partiküllerin pH kararlılığının iyi olmasıdır. Tüm pH aralığında kullanılabilirler. Silika ile karşılaştırıldığında bu maddelerin dezavantajı düşük kolon etkinliğidir. Buna ek olarak; bazı polimerik malzemeler çok yüksek basınca dayanamazlar veya solvent tarafından şişebilirler.

En sık kullanılan polimerik maddeler polistiren-divinilbenzen ve metakrilattır. Polimerik dolgu maddeleri özellikle iyon kromatografisinde yaygın olarak kullanılır (72).

2.3.3.1.6. Dedektörler

Sıvı kromatografide dedektörler iki grupta toplanırlar:

- 1) Maddeye Yönelik (Spesifik) Dedektörler: Hareketli faz içindeki maddenin özelliklerini tayin ederler (Maddenin absorpsiyonu, floresansı veya difüzyon akımı gibi)
- 2) Çözeltiye Yönelik (Genel) Dedektörler: Mobil fazın genel bir özelliğinin tayin ederler (kırılma indisisi veya iletkenliği gibi). Burada madde, hareketli fazın özelliklerindeki değişimle dolaylı olarak belirlenir (72, 73).

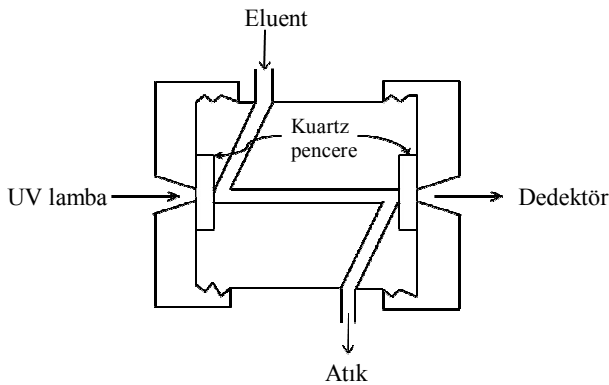
Tablo 2.6. Yaygın HPLC dedektörleri ve özellikleri (76).

Dedektör	Analit/Özellikler	Duyarlılık
UV/GB absorbands	Spesifik: UV kromofor gruplu bileşikler	ng
Diyot dizisi	Spesifik: UV/GB dedektörleriyle aynı, UV spektrumu da sağlar	ng
Floresans	Spesifik: Doğal floresans maddeler veya floresan etiketli bileşikler	fg-ng
Kırılma indisi	Genel: Polimerler, şekerler, trigliseritler, organik asitler, ekspiyanlar.	0.1-10 µg
Evaporatif ışık-saçma	Genel: Uçucu olmayan veya yarı uçucu bileşikler, gradiente uyumludur	ng'dan düşük
Elektrokimyasal	Spesifik: Elektro-aktif bileşikler	pg
İletkenlik	Spesifik: Anyonlar ve katyonlar, organik asitler, yüzey aktif maddeler	ng ppm-ppb
Radyoaktivite	Spesifik: Radyoaktif-etiketlenmiş bileşikler	Düşük düzeyler
Kütle spektrometre	Hem genel hem spesifik: Kesin tespit	fg-pg-ng

2.3.3.1.6.1. UV/GB Absorbans Dedektörleri

En fazla kullanılan dedektörlerdir. Tipik bir UV/GB absorbands dedektörü, döteryum lambası ve küçük bir akış hücresine ışığı odaklamak için bir monokromatörden oluşur (76).

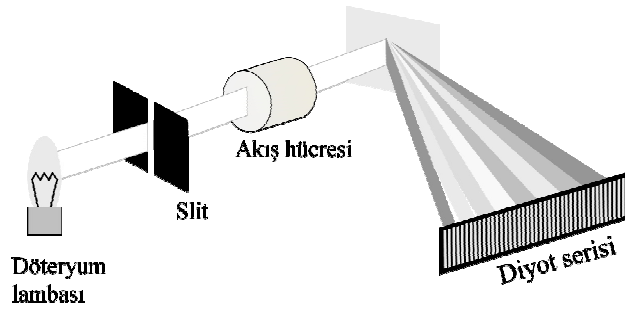
Şekil 2.22'de Z şeklinde sıvı akış hücresi şekli görülmektedir. Bu hücre kromatografik kolon çıkışında eluentin absorpsiyonu ölçmek için kullanılır. Pik genişlemesini önlemek için küvet hacmi azaltılır ve 1-10 µL arasında tutulur. Hücrenin yol uzunluğu 2 ila 10 mm arasında değişir. UV bölgede ölçümler için hücre pencereleri kuartz olmalıdır.

**Şekil 2.22.** HPLC'de UV dedektörlerdeki sıvı akış hücresi (72).

UV/GB absorbans dedektörlerinin önemli performans karakteristikleri, duyarlılıkları ve doğrusal aralığının geniş olmasıdır (76).

2.3.3.1.6.2. Fotodiyot Dizisi Dedektörü (PDA)

Fotodiyot serisi dedektörü, çok kanallı bir dedektördür. UV kaynağından çıkan ışık akış hücresinden geçene kadar dalgaboyu bileşenlerine ayrılmaz (77). Akış hücresinden geçtikten sonra her bir dalgaboyunda ışığın şiddetini ölçen diyod dizisi üzerinde dağılır (Şekil 2.23). PDA'nın sahip olduğu 512 ila 1024 diyot bütün dalgaboylarında tarama yaparak sürekli spektral bilgi verir (76). Fotodiyot serisi dedektörü tek bir analizle farklı dalgaboylarında eşzamanlı kromatogramların toplanmasına imkan sağlar (68). Bilgi absorbansın alıkonma zamanı ve dalgaboyuna bağlı olarak kaydedilmesiyle üç boyutlu gösterim şeklinde elde edilir (72).



Şekil 2.23. PDA'nın şematik gösterimi (76)

2.3.3.1.6.3. Floresans Dedektörleri

UV dedektörlerle karşılaştırıldığında 1000 kat daha yüksek hassasiyete sahiptirler (72). Bir floresans dedektörü, civa buhar lambası veya ksenon yüksek basınç lambası, uyarma ve emisyon dalgaboylarını seçmek için, uyarma ve emisyon monokromatörü, kare akış hücresi ve yayılan ışığı güçlendirmek için bir fotoçoğaltıcıdan oluşur (76).

2.3.3.1.6.4. Kırılma İndisi Dedektörleri

Bir kırılma indisi dedektörü, saf eluent ile örnek bileşenini içeren eluent arasındaki kırılma indisi farkını ölçer. Hemen hemen bütün maddelere cevap verir. Fakat bu dedektörler diğer dedektörlere göre daha düşük hassasiyete sahiptirler. Sıcaklığa büyük ölçüde bağımlıdır ve bu yüzden sabit sıcaklık sağlanmalıdır.

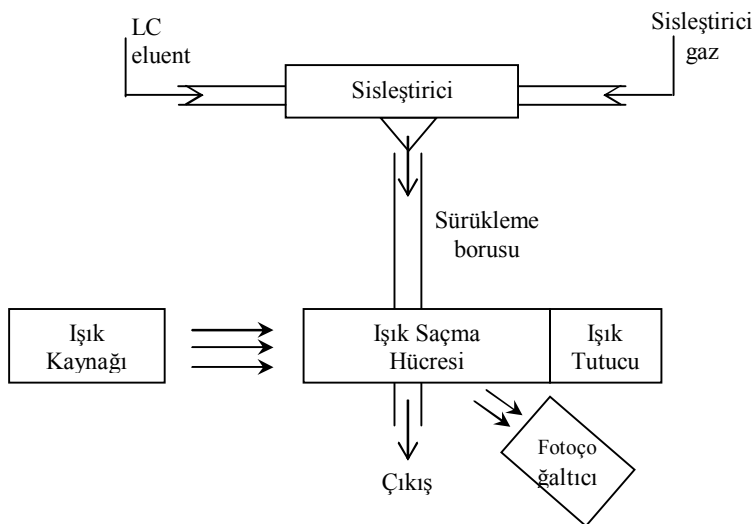
($\pm 0.001^\circ\text{C}$). Mobil faz içindeki değişimlere duyarlı olduğundan, gradient elüsyon için uygun değildir. Kırılma indisi tayini, şeker, trigliserit, organik asit, farmasötik katkı maddeleri ve polimerler gibi düşük kromoforik aktivite gösteren bileşikler için kullanılır (72, 73, 76).

2.3.3.1.6.5. Elektrokimyasal Dedektörler

Elektrokimyasal dedektörler, en hassas dedektörlerden birisidir. Bu dedektör, indirgenebilen ve yükseltgenen maddelere cevap verir. Elektriksel çıktısı, elektrot yüzeyinde meydana gelen reaksiyonların neden olduğu elektron akışından kaynaklanır (75). Elektrokimyasal tayin için amperometri, voltametri, kulorimetri ve iletkenlikten yararlanılabilir (72). Elektroanalitik prosedürler henüz optik dedektörler kadar kapsamlı kullanılsa da, yüksek hassasiyet, kolaylık ve yaygın uygulanabilirlik gibi pek çok avantaja sahiptir. Elektrokimyasal dedektörlerin başlıca kısıtlaması, gradient elüsyona uyumlu olmamasıdır (73).

2.3.3.1.6.6. Evaporatif Işık Saçma Dedektörü (ELSD)

HPLC için yeni tip dedektörlerden biridir. Bu dedektörde, kolondan çıkan eluent sisleştiriciye geçer. Burada azot veya hava akışıyla ince bir sise dönüştürülür. Daha sonra bu ince zerrecikler, mobil fazın buharlaştığı ve ince analit partiküllerinin oluştuğu, sıcaklık kontrollü bir sürüklenme borusuna taşınır. Bir lazer veya polikromatik ışın, analit partikül bulutunun içinden geçer (73). Saçılan ışığa bir fotoçoğaltıcıyla tayin edilir (76). Bu yüzden ELS dedektörleri, uçucu olmayan analit ve uçucu mobil fazla sınırlandırılmıştır. Bununla beraber, gradient elüsyonla kullanıma uygundur (68). Ayrıca, refraktif indeks dedektöründen önemli ölçüde daha hassastır (gözlenebilme limiti $0.2 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) (73).

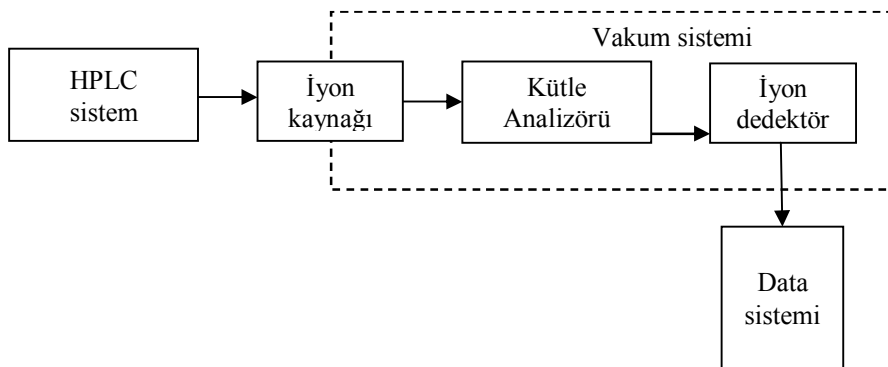


Şekil 2.24. Evaporatif ışık saçma dedektörünün şematik gösterimi

2.3.3.1.6.7. Kütle Spektrometresi (MS)

HPLC'nin çok yönlülüğü ve kütle spektrometresinin teşhis gücünün birleşmesiyle oluşan en son analitik teknik LC/MS'dir (76). Bununla birlikte, bu iki tekniğin birleştirilmesinde, önemli problemler vardır. Kütle spektrometresi için, gaz fazında örnek gereklidir. Sıvı kromatografisinin çıktısı, bir çözücü içinde çözünmüş sıvıdır. İlk olarak bu solvent buharlaştırılmalıdır. Buharlaştırıldığında da, LC solventi, GC'deki taşıyıcı gazdan 10-1000 kat daha fazla gaz hacmi oluşturur. Bundan dolayı, solventlerin çoğu uzaklaştırılmalıdır.

Solvent uzaklaştırma ve LC kolon arayüzey problemlerini çözmek için farklı cihazlar geliştirilmiştir. Bugün en popüler yaklaşımlar, düşük akış hızı atmosferik basınç iyonlaştırma tekniğini kullanır. Şekil 2.25'de tipik bir LC/MS sisteminin blok diyagramı gösterilmektedir. HPLC sistemleri, çoğunlukla $\mu\text{L}/\text{dak}$ akış hızında nanoölçekli kapiler LC sistemleridir. Alternatif olarak, bazı arayüzeyler, geleneksel HPLC'ler için tipik olan 1-2 mL/dak akış hızına imkan verir. En yaygın iyonlaştırma kaynakları elektron sprey iyonlaştırma ve atmosferik basınçta kimyasal iyonlaştırmadır. HPLC'nin kütle spektrometresi ile kombinasyonu yüksek seçicilik sağlar. Çünkü ayrılmayan pikler, yalnızca seçilen kütle ile izlenmesiyle izole edilebilir. Bu kombinasyon molekül kütlesi, yapısal bilgi ve kesin kantitatif analiz de sağlar. Bazı kompleks karışımlar için LC/MS kombinasyonu yeterli çözünürlük sağlamaz. Son yıllarda, tandem kütle spektrometreleri oluşturmak için iki veya daha fazla kütle analizörü bağlanması uygulanabilir hale gelmiştir (73).



Şekil 2.25. LC/MS sisteminin blok gösterimi

2.3.3.2. Dağılma Kromatografisi (Partisyon Kromatografisi)

En çok HPLC’de kullanılan dağılma kromatografisinde sabit faz, hareketli fazla karışmayan bir sıvıdır. Dağılma kromatografisinin ilk formlarında sıvı-sıvı kolonlar kullanılmıştır. Modern LC sistemlerinde, bunlar sıvı bağlı faz kolonları ile yer değiştirmiştir. Sıvı-sıvı kromatografide sabit sıvı faz dolgu maddesine fiziksel adsorpsiyonla tutturulmuştur. Bağlı faz kromatografisinde ise kimyasal olarak bağlanmıştır. Böylece, hareketli fazda çözünmeyen yüksek kararlılıkta dolgular elde edilmiştir. Bağlı faz kolonlar, gradient elüsyon teknikleriyle de uyumludur (73).

2.3.3.2.1. Ters Faz Kromatografi

Dağılma kromatografisi, hareketli faz ve sabit fazların polaritelerine göre farklılandırılabilir. Ters faz sıvı kromatografide sabit faz, nonpolardır. Hareketli faz polar çözücülerdir (Su, metanol, asetonitril ve sulu tampon çözeltiler gibi). En çok kullanılan ters faz dolgu maddeleri, silika yüzeyine bağlanmış alkil zincirleridir. Pratikte en sık kullanılan alkil grupları C_{18} (n-oktadesil) ve C_8 (n-oktil) dir. Alıkonma, sabit fazın hidrokarbon zincirleri ve analitin hidrokarbon zincirleri arasındaki hidrofobik etkileşime dayanır. Analitin polaritesi ters faz kromatografideki elüsyon sırasını belirler. En polar analitler önce elue olur, bunu nonpolar bileşikler izler. Moleküllerin dissosiasyonu, alıkonma üzerinde güçlü bir etkiye sahiptir. Yüklü formda analitler, daha hidrofilitirler ve nötral formlarına göre daha erken elue olurlar (72, 73, 79).

2.3.3.2.2. Normal Faz Kromatografi

Ters faz kromatografinin tersine, normal faz kromatografide sabit faz polar, hareketli faz nonpolardır. Mobil faz olarak genellikle organik solvent karışımları kullanılır (dietileter, diklorometan, kloroform, hekzan gibi). Ticari normal faz bağlı dolgular, silika yüzeyin siyano, diol, amino, dimetilamino gibi polar fonksiyonel gruplarla kimyasal olarak modifiye edilmesiyle elde edilir. Analit ve sabit faz arasındaki baskın etkileşimler polar etkileşimlerdir. Daha az polar bileşikler ilk elue olurken, daha polar bileşikler kolonu daha geç terk eder (72, 73, 79).

2.3.4. Kromatografide Sistem Uygunluk Testleri

Sistem uygunluk parametreleri, analiz esnasında sistemin doğru olarak işlediğini göstermek için incelenmelidir. Bu parametreler sırasıyla açıklanmıştır (80).

2.3.4.1. Kapasite faktörü (k')

Bir bileşene ait kapasite faktörü, k' , bu bileşenin sabit ve hareketli fazlardaki mol sayılarının oranı olarak tanımlanır. Kapasite faktörü (alınma faktörü), verilen mobil faz bileşimi ve kolonla, numunedeki bir bileşenin alınma zamanından hesaplanabilir. Optimum ayırım için, alınma faktörü, $0.5 < k' < 10$ aralığında olmalıdır.

$$k'_A = \frac{t_A - t_0}{t_0} \quad (2.8)$$

t_A : Bileşiğin alınma zamanı

t_0 : Ölü zaman (tutunmayan bileşiğin alınma zamanı)

2.3.4.2. Seçicilik Faktörü (α)

Seçicilik parametresi, verilen koşullar altında, iki bileşiğin ayrılmasının ölçümüdür. A ve B bileşenleri için seçicilik faktörü aşağıdaki formüllerle hesaplanır.

$$\alpha = \frac{k'_A}{k'_B} \quad (2.9)$$

$$\alpha = \frac{t_A - t_0}{t_B - t_0} \quad (2.10)$$

Seçicilik faktörü, iki bileşiğin relatif alınmalarının oranıdır. A daha kuvvetle tutunan, B ise daha hızlı elue olan bileşiktir. Buna göre α değeri daima 1'den büyük olur. α değeri bire ne kadar yakınsa iki pikin birbirinden ayrılması o kadar güçleşir.

2.3.4.3. Ayırıcılık (R)

R bir numunede bulunan bileşenlerin birbirinden ne derece ayrıldıklarını gösteren kantitatif bir terimdir. A ve B bileşeni için bu terim şu şekilde ifade edilir:

$$R = \frac{2(t_A - t_B)}{(w_A + w_B)} \quad \text{w: pik taban genişliği} \quad (2.11)$$

R değerinin 1.5 olması iki bileşiğin tamamen ayrıldığını gösterir.

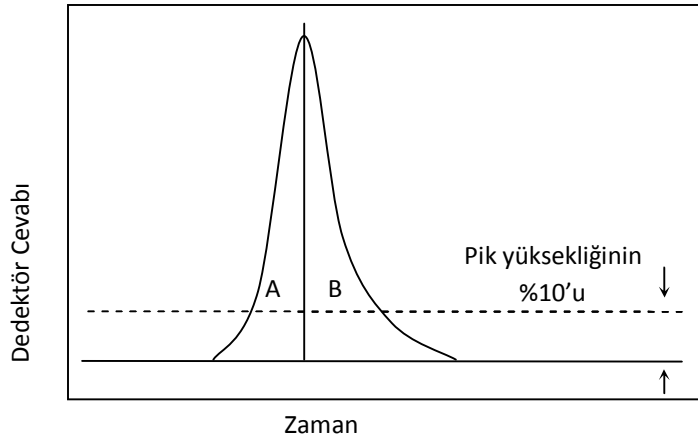
2.3.4.4. Kolon Etkinliği (Teorik Plaka Sayısı)

Bir ayırmada kolon etkinliği, sabit fazın performansına dayanır. Teorik tabaka sayısı kromatografik kolon etkinliğini kantitatif olarak ifade etmek için kullanılır. Bir kromatografik kolonun etkinliği tabaka sayısı ile artar. N değeri, kromatogramlardan ölçülen alıkonma süresi ile o pikin taban genişliğinden hesaplanır.

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 \quad (2.12)$$

2.3.4.5. Kuyruklanma Faktörü (T) ve Asimetri Faktörü

Kuyruklanma faktörü pik asimetrisini gösterir.



Şekil 2.26. Pik kuyruklanma faktörünün tayini

$$\text{Pik kuyruklanma faktörü} = \frac{A + B}{2A} \quad (2.13)$$

Pik kuyruklanma faktörünün 1 olması pikin simetrik olduğunu gösterir. Bu değer, $0.5 \leq T \leq 2$ aralığında olmalıdır,

$$\text{Pik simetri faktörü} = \frac{B}{A} \quad (2.14)$$

Pik asimetri faktörü değerinin >1.5 olması kolonun değişmesi gerektiğini gösterir. (68).

2.3.5. Analitik Yöntem Validasyonu Parametreleri

Kimyasal analiz yöntemleri, analizi yapanların ihtiyaçlarına cevap verecek belirli kriterlere sahip olmalıdır.

2.3.5.1. Seçicilik

Seçicilik, bir metodun ilgilenilen analiti, bir örnek matriksindeki diğer bileşenler varlığında ve deneyde belirtilen koşullar altında, doğru ve spesifik olarak tayin etme kabiliyetidir (81).

2.3.5.2. Kesinlik (Precision)

Aynı homojen örnekten alınan çoklu örneklerden elde edilen bir seri ölçüm arasındaki uyuşmanın yakınlığıdır. Kesinlik 3 seviyede değerlendirilebilir:

- 1) Tekrarlanabilirlik (Repeatability); Aynı çalışma koşullarında kısa bir zaman aralığındaki kesinlik olarak ifade edilir. Tekrarlanabilirlik, aynı analizcinin, aynı yöntemi, aynı ekipmanı ve aynı reaktifleri kullanarak, aynı zaman aralığında, örneğin; gün içinde tekrar etme kabiliyetini tanımlar. Tekrarlanabilirlik, gün içi kesinlik (intra-assay precision) olarak da tanımlanır.
- 2) Orta Kesinlik (Intermediate precision); Laboratuvar içi değişiklikler (varyasyonlar) olarak ifade edilir. Farklı günler, farklı analizciler, farklı ekipman gibi. Aynı yöntemin farklı koşullarda tekrarlanma kabiliyetidir.
- 3) Tekrar üretilebilirlik (Reproducibility); Laboratuvarlar arası kesinlik olarak ifade edilir. Tekrar üretilebilirliğin gerçekleştirildiği durumlarda, orta düzey kesinliğe ihtiyaç olmaz (82).

Biyoanalitik bir metodun kesinliği, yüzde varyasyon katsayısı veya tekrarlanan ölçümlerin relatif standart sapması olarak ifade edilir (83).

$$\%CV = (\text{standart sapma} / \text{ortalama}) \times 100 \quad (2.15)$$

2.3.5.3. Doğruluk (Accuracy)

ISO 5725-6 (1994)' e göre doğruluk, bir test sonucu elde edilen değer ve kabul edilen referans değeri arasındaki uyuşmanın yakınlığıdır (84). FDA Bioanalitik Metot Validasyonu Dokümanında (2001); analitik bir metodun doğruluğu, analitin

gerçek konsantrasyon değerine, metotla elde edilen ortalama test sonuçlarının yakınlığı olarak tanımlanır (85).

Doğruluk çalışmaları:

- a) Sertifikalı referans materyal (CRM) ile,
- b) Yeterlilik testi örneği ile,
- c) “Spiked” örneklerle (geri alma-recovery testleri)

yapılabilir.

2.3.5.4. Geri Kazanım (Recovery)

Bir testteki analitin geri kazanımı, saf güvenilir standartın doğru konsantrasyonu için elde edilen dedektör cevabıyla, biyolojik matrikse eklenen ve oradan ekstrakte edilen bir miktar analitten elde edilen dedektör cevabının karşılaştırılmasıdır. Analitin geri kazanımı %100 olmak zorunda değildir, fakat tekrarlanabilir olmalıdır.

$$\text{Geri kazanım} = \frac{\text{Matrikse eklenen analitin cevabı (işlem görmüş)}}{\text{Saf standart analitin cevabı (işlem görmemiş)}} \quad (2.16)$$

2.3.5.5. Kalibrasyon/ Standart Eğrisi

Bir kalibrasyon eğrisi, analitin bilinen konsantrasyonları ile cihaz cevabı arasındaki ilişkidir. Bir kalibrasyon eğrisi örnekteki her bir analiz için üretilmelidir. Cevap ve konsantrasyon arasındaki ilişkiyi tanımlamak için yeterli sayıda standart kullanılmalıdır.

2.3.5.6. Hassasiyet (Sensitivity):

Analitik bir metodun hassasiyeti kalibrasyon doğrusunun eğiminden tayin edilir. Eğer konsantrasyondaki küçük değişimler, cevap fonksiyonunda daha büyük değişimlere neden oluyorsa, metodun hassas olduğu söylenir. Analitin bir birim artışının, sinyal büyüklüğüne etkisini gösteren bir kriterdir.

$$\text{Hassasiyet} = \frac{\text{Ölçüm sinyali}}{\text{Konsantrasyon}} \quad (2.17)$$

2.3.5.7. Saptama Alt Sınırı (LOD)

Bir biyoanalitik prosedürün analiti, sistemin gürültü sinyalinin güvenilir olarak farklılandığı en düşük derişime karşılık gelen sinyaldir. LOD'nin tayini, görerek sinyal:gürültü oranının ölçülmesiyle veya blank örneğinin cevabının standart sapmasının ölçülmesiyle gerçekleştirilir. Genellikle gürültü düzeyinin üç katı olarak kabul edilir. Kesinliği (%CV) nin %20'den küçük veya eşit olması gerekir. Elde edilen pikler, kromatografik kriterlere uygun olmalıdır (pik şekli, pik simetrisi) (86).

2.3.5.8. Alt Tayin Sınırı (LOQ)

Uygun kesinlik ve doğrulukla örnek içindeki analitin tayin edilebildiği en düşük miktar ya da örnek içindeki analitin doğru ve kesin olarak ölçülebildiği en düşük derişimdir. Kromatografi gibi sürekli kayıt alan teknikler için, genellikle gürültü düzeyinin 10 katı olarak kabul edilir (87).

2.3.5.9. Sağlamlık (Robustness)ve Tutarlık (Ruggedness)

Sağlamlık, USP (United States Pharmacopeia) ve ICH (International Conference on Harmonization) tarafından şöyle tanımlanmıştır:

Metot parametrelerindeki küçük fakat daha önceden düşünülmüş değişikliklerden etkilenmeden kalan bir ölçümün kapasitesi, onun normal uygulamalar esnasında güvenilirliğinin bir göstergesidir.

Tipik varyasyonlara örnekler:

- a) Analitik çözeltilerin kararlılığı (Stabilitesi),
- b) Ekstraksiyon zamanı.

Sıvı kromatografisinde, tipik varyasyonlara örnekler:

- a) Hareketli fazın pH sınırının değişiminin etkisi,
- b) Hareketli faz bileşiminin değişiminin etkisi,
- c) Farklı kolonlar,
- d) Sıcaklık,
- e) Akış Hızı.

Gaz kromatografisinde, tipik varyasyonlara örnekler:

- a) Farklı kolonlar,
- b) Sıcaklık,
- c) Akış hızı.

Eğer ölçümler, analitik koşullardaki değişimlere hassas ise (çabuk etkilenirse), analitik koşullar uygun olarak kontrol edilmeli veya prosedür ihtiyati açıklamalar içermelidir.

USP Tutarlılığı şöyle tanımlamıştır;

- a) Farklı laboratuvarlar,
- b) Farklı analizciler,
- c) Farklı enstrümanlar,
- d) Farklı reaktif lotları (partileri),
- e) Farklı analiz günleri,

gibi normal deney koşullarının farklı olduğu durumda, aynı örneklerin analiziyle elde edilen test sonuçlarının tekrar üretilebilirlik derecesidir.

Sağlamlık test sonuçları üzerine iç etkilerin eksikliğini ölçer. Tutarlık, test sonuçları üzerine dış etkilerin eksikliğini ölçer.

2.3.5.10. Kararlılık (Stabilite)

Bir biyolojik sıvıdaki ilaç stabilitesi, depolama koşullarının, ilacın kimyasal özelliklerinin ve matriksin bir fonksiyonudur. Stok çözelti ve stok çözelti eklenerek hazırlanan matriks içindeki örnekler, farklı saklama koşullarında depolandıktan sonra analiz edilir (Örneğin; 4°C'de, oda koşullarında, derin dondurucuda gibi). Eklenen analit miktarının depolama koşulları ile değişmemesi gerekir.

2.4. Literatür Özeti

García-Falcón ve arkadaşları, kırmızı şarapta 38 fenolik bileşiğin tayini ters faz HPLC-DAD yöntemini kullanmışlardır. Antisyonin ve hidroksisinamik asitleri şarap örneklerinin direkt enjeksiyon ile tayin edilirken, hidroksibenzoik asitleri, kateşinleri, prosiyanidinleri ve flavonoller, dietil eter ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve bunu izleyen katı-faz ekstraksiyonunu içeren bir analitik ön işlem gerektirmişlerdir. (88).

Rodríguez- Delgado ve arkadaşları, 16 polifenol bileşiğini (Gallik asit, protokateşuik asit, protokateşuik aldehit, kateşin, vanilik asit, kafeik asit, şiringik asit, epikateşin, şiringaldehit, p-kumarik asit, ferulik asit, t-resveratrol, mirisetin, kuersitrin, kuersetin ve kampferol) kırmızı şarapta HPLC' ye bağlı floresans ve DAD ile tayin etmişlerdir. Örnek hazırlanma basamağında, dietil eterle pH 2'de 20 dakika süreyle sıvı-sıvı ekstraksiyonu uygulamışlardır. Floresans dedektör kullanımı, kateşin, vanilik asit, şiringik asit, epikateşin ve trans-resveratrolün tayininde seçiciliği ve hassasiyeti artırmıştır (89).

İtalya'da yapılan bir çalışmada, UV-GB dedektörü bağlı, ters-faz HPLC yöntemi ile 10 adet ticari İtalyan kırmızı şarabındaki, 9 biyolojik olarak aktif fenolik bileşik (kateşin, epikateşin, t-resveratrol, c-resveratrol, gallik asit, klorojenik asit, kafeik asit, rutin ve kuersetin) tayin edilmiştir. Ayırım, 150 mm x 4.6 mm, 3µm boyutunda C₁₈ ters faz kolonunda metanol, su ve asetik asit çözücüleriyle gradient elüsyon yapılarak gerçekleştirilmiştir. Örnekler, herhangi bir ön işlem yapılmaksızın doğrudan HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Çalışılan dalgaboyları 300 ve 370 nm'dir. Enjeksiyon hacmi 20 µL'dir. Analiz süresi 27 dakikadır. Kararlılık deneyleri, şarap şişeleri hemen açıldıktan sonra yapılan analizle, şarap şişeleri açıldıktan yaklaşık bir hafta sonra (4°C'de ışıktan korunarak saklanmıştır) yapılan analizler arasında önemli bir fark olmadığını göstermiştir (90).

İtalya'da yapılan bir başka çalışmada, şaraptaki fenolik bileşiklerin analizi için kromatografik bir metot geliştirilmiştir. 24 fenolik bileşik, herhangi bir ön işlem yapılmaksızın doğrudan enjeksiyon ile, 22 farklı ticari Sicilya kırmızı şarabında analiz edilmiştir. Fotodiyot serisi dedektörü ve Elektron sprey iyonlaştırıcılı kütle spektrometresi bağlı (ESI-MS) HPLC sistemi kullanılmıştır. En yüksek fenolik

bileşik içeriğine, Merlot üzümlerinden elde edilen şarap örneklerinin sahip olduğu gösterilmiştir (91).

Tarola ve Giannetti, t-resveratrol, cis-resveratrol, kateşin, epikateşin, kuersetin ve rutin ayrımını 150 mm x 2.1 mm, 5µm boyutunda C₁₈ kolonda, %5'lik formik asit ve asetonitril ile gradient elüsyon uygulayarak, sıvı kromatografi yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Fotodiyot serisi dedektörü kullanılarak 270, 285 ve 306 nm dalgaboylarında çalışılmıştır. Analiz süresi 25 dakikadır. Kateşin ve epikateşin bütün şarap örneklerinde diğer bileşiklere göre daha yüksek oranda bulunmuştur (92).

Haşim Kelebek ve arkadaşları, Denizli ve Elazığ yöresindeki Öküzgözü üzümlerinden elde edilen şaraplardaki renk verici ve renksiz polifenolik bileşikleri HPLC-DAD-MS kullanarak karakterize etmişlerdir. 2005 ve 2006 yılında Denizli'deki bağlardan hasat edilen üzümlerden üretilen şarapların, Elazığ yöresindeki üzümlerden elde edilen şaraplardan, daha yüksek antosiyanin, flavanol ve flavonol içeriğine sahip olduğu bulunmuştur. Fenolik içeriklerdeki bu farklılığın, Öküzgözü üzüm asmaları ile üzüm bağının özellikleri (iklim değişikliği, toprak ve mekan) arasındaki kompleks etkileşim sonucu olduğu belirtilmiştir. (93).

Šeruga ve arkadaşları yaptığı bir çalışmada, Hırvatistan'ın üç farklı bölgesinde üretilen kırmızı şarapların, toplam polifenol içeriği, tek tek polifenollerin konsantrasyonu ve antioksidan aktivitesi tayin edilmiştir. Toplam polifenol içeriği, diferansiyel puls voltametri, Folin-Ciocalteu ve HPLC metotları ile ölçülmüştür. Tek tek polifenoller, fotodiyot serisi dedektörü bağlı HPLC ile, antioksidan aktivite, ABTS ve DPPH metotları ile belirlenmiştir. Sonuçlar, toplam polifenol içerik tayininde en hassas metodun diferansiyel puls voltametri olduğunu göstermiştir. Şarapta bulunan major polifenollerin gallik asit ve (+)- kateşin olduğu bulunmuştur. Toplam polifenol içeriği, tek tek polifenoller ve antioksidan aktivitenin, farklı bölgelerde üretilen şaraplar arasında değiştiği görülmüştür (94).

Nikfardjam ve arkadaşları, 1996 ve 2003 yılları arasında Macaristan'ın Villány bölgesinden 67 kırmızı şarap örneğinin fenolik ve antosiyanin bileşimini, ters faz HPLC-UV-GB yöntemiyle analiz etmişlerdir. Polifenol içeriğinde, tür veya

şaraphane bağı bir ayırım yapamamışlardır. Fakat polifenol içeriğinde bağbozumu yılına bağı ayırım gözlemiştir (95).

Yunanistan'da yapılan bir çalışmada, farklı bölgelerden alınan 33 Yunan şarabının sınıflandırılmasında, hem enstrumental hem de sensör analizi kullanılması amaçlanmıştır. Deneysel verilere temel bileşen analizi (PCA) uygulanması, yalnızca kırmızı şarapların, coğrafik orijinine dayanarak başarıyla sınıflandırılmasıyla sonuçlanmıştır (96).

Çin' de yapılan bir çalışmada, HPLC yöntemiyle 10 flavonol ve 2 flavon bileşiğinin eş zamanlı olarak tayini gerçekleştirilmiştir. Üretim yeri ve zamanına göre farklılık gösteren yedi kırmızı şarap örneği, doğrudan enjeksiyonla analiz edilmiştir. Analiz sonuçları, mirisetin, luteolin, kuersetin, kampferol, isoharmnetin ve galanın varlığını göstermiştir. Ayrıca, kırmızı şaraptaki flavanoidlerin analizi, üç farklı meşe fiçisinde, 0, 30, 60, 90, 105, 120 ve 135 gün olgunlaştırmada sonra yapılmıştır. 0'dan 135 güne olgunlaştırma boyunca, kullanılan tüm meşe fiçilerinde, flavonoidlerin içeriklerinde önemli değişiklikler gözlenmiştir (97).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Reaktif ve Materyaller

Çalışmamızda kullanılan polifenol bileşikleri ve reaktifler Tablo 3.1 ve 3.2’de liste halinde verilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan polifenol bileşikleri

Bileşimin Adı	Özellikleri	Firmanın Adı			
		Sigma	Fluka	Aldrich	Katalog no
Gallik Asit		✓			028K0113
(+)- Kateşin Hidrat	≥%96, HPLC saflıkta		✓		WA13685
3,4-Dihidroksibenzoik Asit				✓	37580
Klorojenik Asit	≥%95	✓			048K1313
(-)- Epikateşin		✓			WA23030
4-hidroksibenzoik Asit	≥%99	✓			574444-299
Kafeik Asit		✓			088K1060
Şiringik Asit		✓			118K1469
p-kumarik Asit		✓			078K1386
Rutin Trihidrat	≥%95, HPLC saflıkta		✓		WA19902
Resveratrol	%99, GC	✓			038K5202
Mirisetin	≥%96, HPLC saflıkta		✓		WA10960
Kampferol	%96		✓		WA12099
Kuersetin dihidrat	%98, HPLC saflıkta			✓	118K0888
2,5dihidroksibenzaldehit	%98			✓	1194985

DetectabaseTM (Biochemical Diagnostics, Inc), Strata-C18 E (Phenomenex), Strata-X (Phenomenex), Bondelute (Varian) ve AccuBOND II SAX (Agilent) katı faz kartüjleri kullanılmıştır.

Deiyonize su (18 MΩcm⁻¹), su saflaştırma sisteminden elde edildi. Çalışmamızda analiz edilen yöresel şaraplar, Malatya-Arapgir yöresindeki şarap fabrikasından ve Elazığ ilimizdeki yerel tedarikçilerden temin edilmiştir. Analizi yapılan şaraplar; Güzay Karaoğlan Rezerv 2007 (Malatya, Arapgir), Güzay Karaoğlan-Öküzgözü 2007 (Malatya, Arapgir), Buzbağ Klasik 2008 Öküzgözü-Boğazkere (Elazığ), Karpata Kalecik Karası 2007 (Elazığ), Sofen 2007 (Elazığ), Alia

2007 (Elazığ). Şaraplar açıldıktan sonra 4°C’de saklanmış ve analizler birkaç gün içerisinde yapılmıştır.

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan reaktifler

Reaktifin Adı	Özellikleri	Firmanın Adı		
		Merck	Aldrich	Katalog No
Metanol	% 99.9, HPLC saflıkta	✓		106007.2500
Asetonitril	% 99.9, HPLC saflıkta	✓		100030.2500
Etanol	% 99.8, HPLC saflıkta		✓	34870
Etil asetat	% 99.5	✓		101884.2500
Dietileter	% 99.5	✓		100926.5000
t-butil metil eter	% 99.8	✓		101845.2500
Asetik asit	% 99.5-100.5		✓	302011
Formik asit	% 98-100.5		✓	27001
Hidroklorik asit	% 37		✓	30721
Tartarik asit	%99		✓	139157
Sodyum hidroksit	≤%98	✓		106495.5000

3.2. Cihazlar

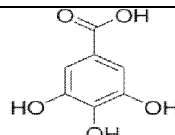
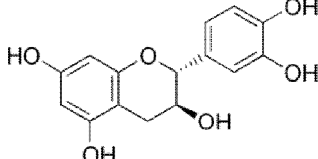
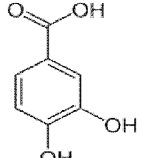
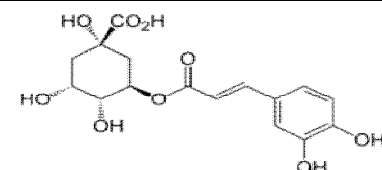
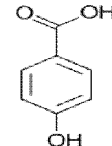
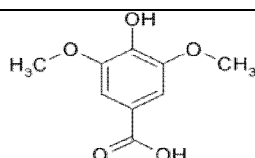
Kullanılan HPLC sistemi; G1379A model degazör, G1311A kuarternar pompa, G1315B diyot dizisi dedektör (DAD), 20 µL enjeksiyon lupuna sahip 7725İ Rheodyne enjeksiyon bloğu ve kolon fırını ile donatılmış Agilent 1100 G serisi yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazıdır. Ayırım, koruyucu kolon bağı Zorbax Eclipse XDB C18 analitik kolon (4,6mm x 250mm, 5µ) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizler yapılırken kullanılan diğer cihazlar aşağıda belirtilmiştir:

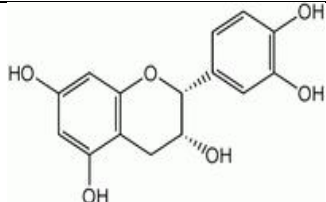
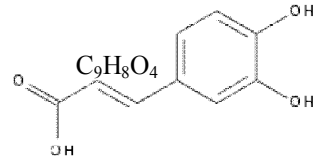
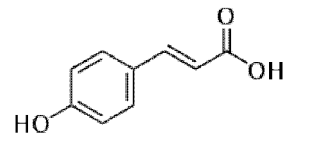
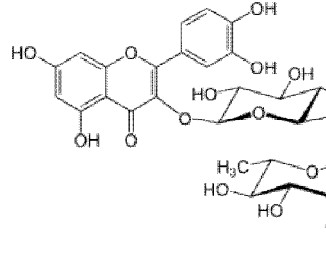
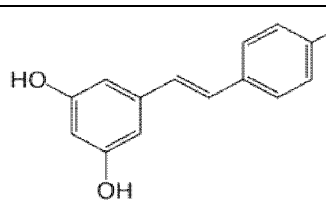
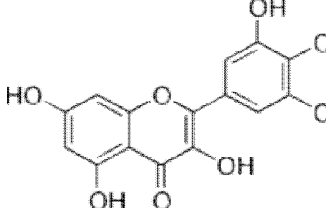
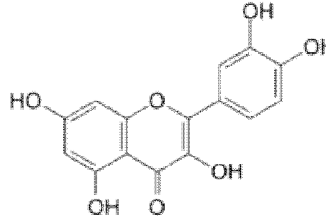
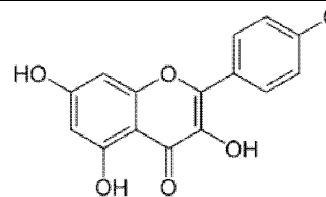
- pH metre (Hanna instruments pH 211 microprocessor)
- Vorteks karıştırıcı (Velp scientifica)
- Magnetik karıştırıcı (RO5 power IKA-Werke)
- Evaporator, azot atmosferi altında (TBT12-W)
- Vakumlu döner evaporator, sıcaklık kontrollü, su devir daimli (Laborata 4011-dijital)

- Derin dondurucu, -45 °C' de (Shin)
- Santrifüj cihazı (EBA 21)
- Hassas terazi (Acculab ATL 224-İ)
- SPE cihazı için 12 çıkışlı vakum manifoldu sistemi (Macherey-Nagel)
- Sıcaklık ve zaman ayarlı degazör, (Sonorex dijital 10p, Bandelin)
- Su saflaştırma sistemi (New Human Power I, Korea)

Çalışmamızda kullanılan polifenollerin IUPAC adlandırması, molekül formülü, molekül ağırlığı ve molekül şekli Tablo 3.3' de verilmiştir.

Tablo 3.3 Kullanılan kimyasalların molekül şekilleri ve IUPAC göre adlandırılması

Polifenoller	IUPAC ismi	Molekül formül (C _x H _y O _z)	Molekül ağırlığı (g mol ⁻¹)	Molekül Şekli
Gallik Asit	3,4,5 trihidroksi benzoik asit	C ₇ H ₆ O ₅	170.12	
Kateşin (Epikateşin)	(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-2-(3,4-dihidroksifenil)-3,4-dihidro-2 <i>H</i> -chromene-3,5,7-triol	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290.26	
Protokateşuik Asit	3,4-Dihidroksi benzoik asit	C ₇ H ₆ O ₄	154.120	
Klorogenik Asit	1 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-3-{{(2 <i>Z</i>)-3-(3,4-dihidroksifenil)prop-2-enol}oksi}-1,4,5-trihidrosisikloheksan karboksilik asit	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.31	
p-Hidroksi Benzoik Asit	4-Hidroksibenzoik asit	C ₇ H ₆ O ₃	138.1207	
Şiringik Asit	4-hidroksi-3,5-dimetoksi benzoik asit	C ₉ H ₁₀ O ₅	198.17	

Epikateşin	(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-2-(3,4-dihidroksifenil)-3,4-dihidroksi-2 <i>H</i> -chromene-3,5,7-triol	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290.26	
Kafeik Asit	3-(3,4-Dihidroksifenil)-2-propenoik asit	C ₉ H ₈ O ₄	180.16	
p-Kumarik Asit	3-(4-hidroksifenil)-2-propenoik asit	C ₉ H ₈ O ₃	164.16	
Rutin	2-(3,4-dihidroksifenil)-5,7-dihidroksi-3-{{(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3,4,5-trihidroksi-6-({[(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-3,4,5-trihidroksi-6-metiloksiyan-2-yl]oksi}metil)oksiyan-2-yl]oksi}-4 <i>H</i> -chromen-4-bir	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610.517	
Resveratrol	trans-3,5,4'-Trihidroksistilben	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	228.24	
Myrisetin	3,5,7-Trihidroksi-2-(3,4,5-trihidroksifenil)-4-chromenone	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	318.235	
Kuersetin	2-(3,4-dihidroksifenil)-3,5,7-trihidroksi-4 <i>H</i> -chromen-4-bir	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.236	
Kaempferol	3,5,7-trihidroksi-2-(4-hidroksifenil)-4 <i>H</i> -1-benzopiran-4-bir	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.23	

3.3. Yöntem

3.3.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Analitik saflıktaki standart maddeler hassas terazide 0,0025 gr tartılıp metanol ile balon jode 5 mL' ye seyreltilerek, 500 ppm'lik ana stok çözeltisi hazırlanmıştır. Stoklar karanlık ortamda derin dondurucuda -45°C'de muhafaza edilmiştir. Arastok çözeltileri günlük olarak, ana stoklardan çözeltilerinden hazırlanmıştır. Seyreltmeler mobil faz çözeltisiyle yapılmıştır.

3.3.2. Sentetik Şarap Örneğinin Hazırlanması

García-Falcón ve arkadaşlarının önerdiği şekilde , 2.5 g tartarik asit tartılarak 120 mL etonolde çözülmüş ve deiyonize suyla 1L' ye tamamlanmıştır. 2 M' lik NaOH ile çözeltinin pH: 3.2' ye ayarlanarak sentetik şarap örneği hazırlanmıştır (88).

3.3.3. Sentetik Şarap Örneği Matriksinde Kalibrasyon

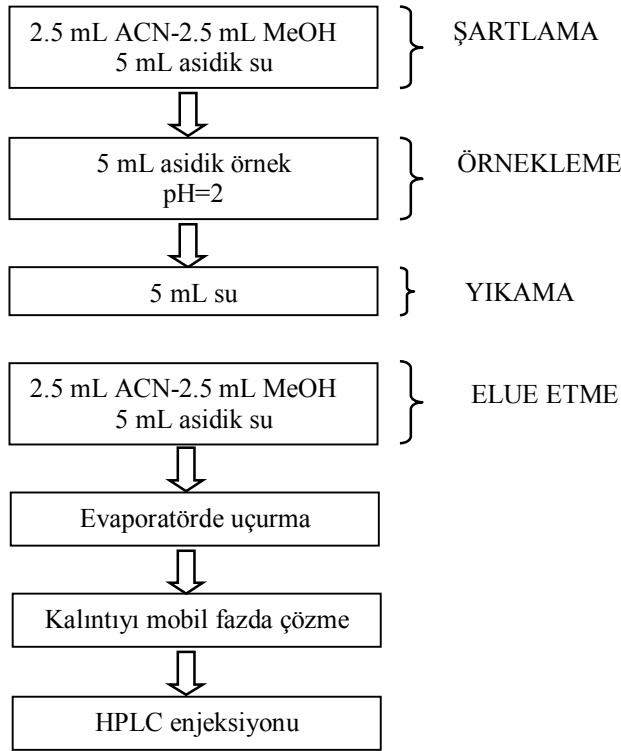
Şaraptan gelecek matriks etkisini görmek için, kalibrasyon eğrileri, polifenol içermeyen sentetik şarap matriksinde oluşturulmuştur. 5 mL sentetik şarap örneğine, farklı derişimlerde analitler ilave edilerek kalibrasyon kontrolleri oluşturulmuştur. 2,5-dihidroksibenzaldehit iç standart olarak kullanılmış ve kalibrasyon kontrollerine eklenmiştir.

3.3.4. Katı Faz Ekstraksiyonu Yöntemi

Örnek hazırlama basamağında kullanılan SPE sisteminde farklı SPE kartüjleri denenmiştir. Bu kartüşler; DetectAbuseTM, Strata-C₁₈ E (50 µm, 70A 500 mg/ 6 mL), polimerik ters faz içeren Strata-X (33u, 500 mg/600 mL), Bondelute (130 mg/6 mL) ve kuvvetli bir anyon değıştirici reçine olan AccuBOND II SAX , (500 mg/6 mL) dir.

Farklı kartüjler önce 2.5 mL asetonitril, 2.5 mL metanol ve 5 mL asidik deiyonize su ile şartlandırılmıştır. Daha sonra 3 M HCl asitle, pH'ı 2'ye getirilen 5 mL kalibrasyon kontrolleri, kartüjlerden geçirilmiştir. 5 mL deiyonize su ile yıkama yapıldıktan sonra, bileşikler 2.5 mL asetonitril ve 2.5 mL metanol ile elue edilmiştir. Bu eluent vakumlu döner evaporatörde kuruluğa kadar uçurulmuştur. Daha sonra kalıntı 500 µL hareketli fazda çözülmüştür. 20 µL HPLC-DAD sistemine enjekte

edilmiştir. 14 polifenol bileşiği içeren (5 mg/ml) sentetik şarap örneği için geri kazanım değerleri hesaplanmıştır.



Şekil. 3.1. Katı faz ekstraksiyonu yönteminin şematik gösterimi

3.3.5. Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu Yöntemi

Sıvı-sıvı ekstraksiyonu yönteminde tersiyer bütül metil eter, dietil eter ve etil asetat olmak üzere üç farklı organik çözücü denenmiştir. 5 mL kalibrasyon kontrolü 3M HCl ile asitlendirildikten sonra (pH=2) 20 mL'lik cam tüpe konulmuş ve 5 mL organik çözücü eklenerek vorteks karıştırıcıda en yüksek devirde 1 dak süreyle karıştırılmıştır. Daha sonra sıvı ve organik fazlar 3500 dev/dak'da 5 dak santrifüjlenerek ayrılmıştır. Üstteki organik faz pastör pipet yardımıyla temiz bir tüpe aktarılmıştır. Kalan sulu faz üzerine 5 mL daha organik çözücü eklenerek aynı işlemler tekrarlanmıştır. Üstteki organik faz ayrılarak, bir önceki basamakta ayrılan fazın üzerine eklenmiştir. Ayrılan organik faz vakumlu döner evaporatörde kuruluğa kadar uçurulmuştur. Kalıntı 500 µL hareketli fazda çözüldü ve HPLC-DAD sistemine enjekte edilmiştir.

Kalibrasyon kontrolleriyle aynı miktarda referans standart madde içeren hiçbir işlem görmemiş 5 mL hacimdeki metanolik referans standart, vakumlu döner evaporatörde kuruluğa kadar uçurulmuştur. Kalıntı 500 μ L hareketli fazda çözülmüş ve HPLC-DAD sistemine enjekte edilmiştir. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu uygulanan kalibrasyon kontrolleri, işlem görmemiş referans standartlarla karşılaştırılarak, geri kazanım oranları hesaplanmıştır. Böylece sıvı-sıvı ekstraksiyonunda kullanılacak en uygun çözücüye karar verilmiştir.

HPLC-floresans dedektörle çalışıldığında, kalıntı 500 μ L yerine, 1000 μ L hareketli fazda çözüldükten sonra sisteme enjekte edilmiştir. Kalıntı 500 μ L hareketli fazda çözülerek kalibrasyon doğrusu oluşturulduğunda, negatif sapmalar gözlenmiştir.

Daha sonra seçilen organik çözücüyle hacim taraması yapılmıştır. 4, 5 ve 6 mL organik çözücüyle sıvı-sıvı ekstraksiyonu çalışılmıştır. Geri kazanım oranlarına bakılarak organik çözücü hacmine karar verilmiştir.

Tüp, 5 mL sentetik şarap (3 M HCl ile asitlendir) vorteks 3 sn	
Tüp, 5 mL sentetik şarap (3 M HCl ile asitlendir) CA1, CA2, CA3, CA4, CA5 vorteks 3 sn	Tüp, 5 mL metanolik RS1, RS2, RS3, RS4, RS5 Vorteks 3 sn
5 mL t-bütül metil eter, dietil eter, etil asetat vorteks 1 dak	↓
Santrifüj, 3500 rpm, 5 dak Organik fazı aktar	
5 mL t-bütül metil eter, dietil eter, etil asetat vorteks 1 dak	
Santrifüj, 3500 rpm, 5 dak Organik fazı önceden ayırdığın faza aktar	
	vakumlu döner evaporatörde uçur
	500 μ L mobil fazda çöz
	HPLC sistemine enjekte et

Şekil. 3.2. Sıvı-sıvı ekstraksiyonunun yönteminin şematik gösterimi

3.3.6. Kromatografik Şartların Ayarlanması

Polifenoller tayininde ters faz sıvı kromatografisi kullanılmıştır. Farklı oranlarda metanol, su ve formik asit ile gradient elüsyon uygulanarak polifenollerin optimum şartlarda ayrılması sağlanmıştır.

Tablo 3.4. HPLC’de kromatografik koşullar

Kromatografik Koşulların Belirlenmesi	
Cihaz	Agilent 1100G serisi
Kolon	Eclipse XDB C ₁₈ kolonu (4,6 mm x 250 mm, 5µm)
Dedektör	Diyot dizisi dedektörü (DAD), Floresans dedektör
Hareketli Faz	MeOH:H ₂ O:HCOOH gradient elüsyon
Akış Hızı	1mL / dak
Analiz Süresi	14 dakika
Enjeksiyon Hacmi	20 µL

Tablo 3.5. Polifenol tayininde kullanılan dalgaboyları (DAD dedektör)

Madde	λ_{maks}
Gallik asit	270 nm
(+)- Kateşin (-)-Epikateşin Kafeik asit	280 nm
Klorogenik asit p-kumarik asit Şiringik asit t-resveratrol	323 nm
Rutin	270, 354 nm
Mirisetin Kuersetin Kampferol	365 nm
3,4-dihidroksibenzoik asit 4-hidroksibenzoik asit	254 nm

Tablo 3.6. Polifenol tayininde kullanılan dalgaboyları (Floresans dedektör)

Madde	Uyarma (nm)	Emisyon (nm)
(+)- Kateşin	280	315
(-)-Epikateşin	280	315
t-resveratrol	330	374

4. BULGULAR

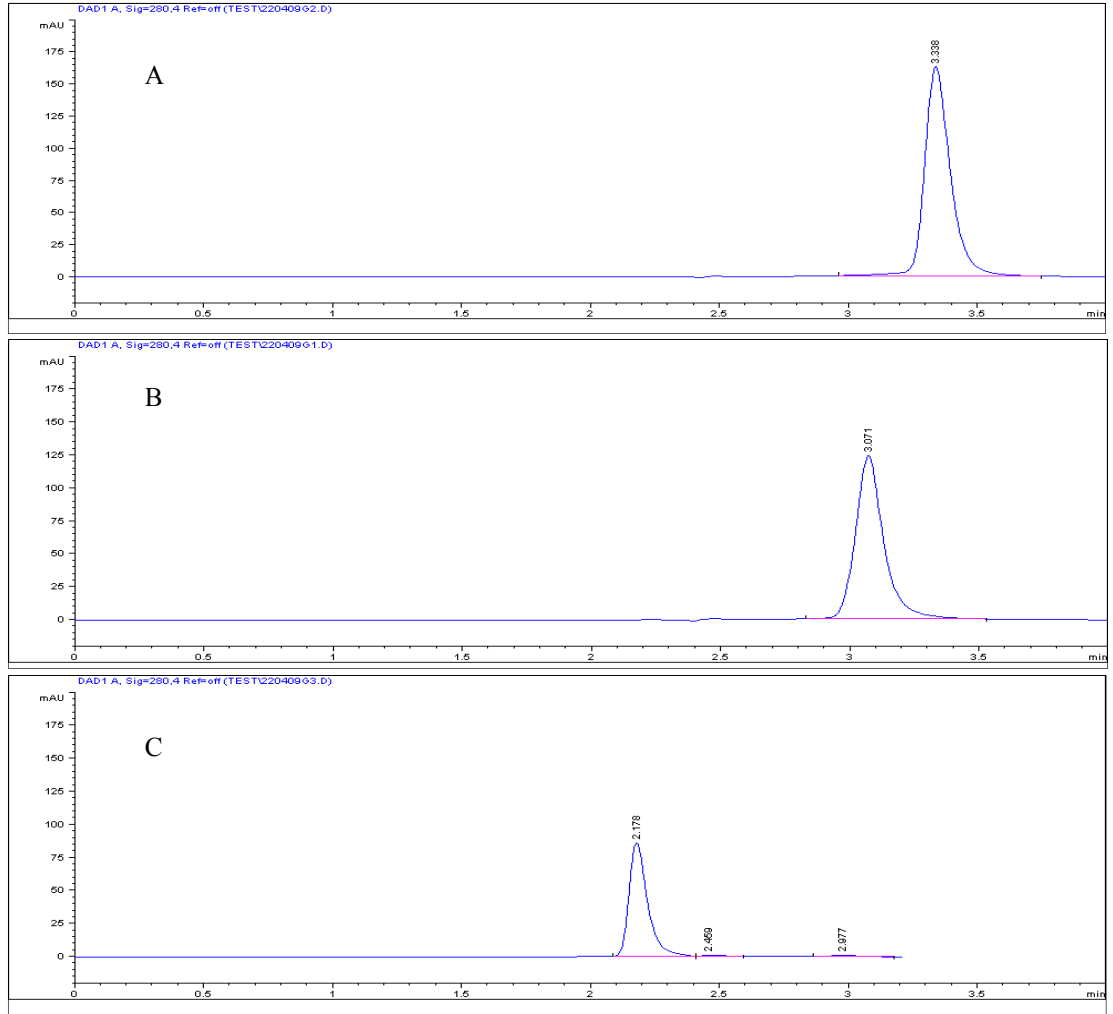
4.1. Foto Diyot Dizisi Dedektörü Kullanarak Polifenollerin Ayrımının Optimize Edilmesi

Polifenoller suda çözünürlüğü düşüktür. Alkoldeki çözünürlükleri ise oldukça yüksektir. Bu yüzden çalışmamızda ters faz sıvı kromatografisi tercih edilmiştir. Polifenollerin metanoldeki yüksek çözünürlüğü nedeniyle, organik çözücü olarak metanol seçilmiştir. Farklı oranlarda metanol-su karışımı kullanılarak, polifenollerin birbirinden ayrılması için çeşitli deneyler gerçekleştirilmiştir. Polifenollerin pK değerleri yaklaşık 9 civarındadır. Hidroksil gruplarının iyonlaşmasını engellemek için pH kontrolü gereklidir (68).

Polifenollerin hidroksil gruplarının iyonizasyonunu engellemek için (ki bu onların alıkonma zamanını azaltır), alıkonma davranışları asidik ortamda incelenmiştir. Asetik asit ve formik asit varlığında çalışıldı. Formik asit eklendiğinde, bütün standartlar başarıyla birbirinden ayrılmıştır.

%30'luk mobil faz çözeltisinin (30:70-metanol:su) pH'sı sırasıyla 3.0, 4.5 ve 6.5'e ayarlanmıştır. Asidik pH'da alıkonma zamanının ve pik alanının arttığı görülmüştür. Gallik asitin pH'a bağlı olarak alıkonma zamanındaki değişim Şekil 4.1' de görülmektedir.

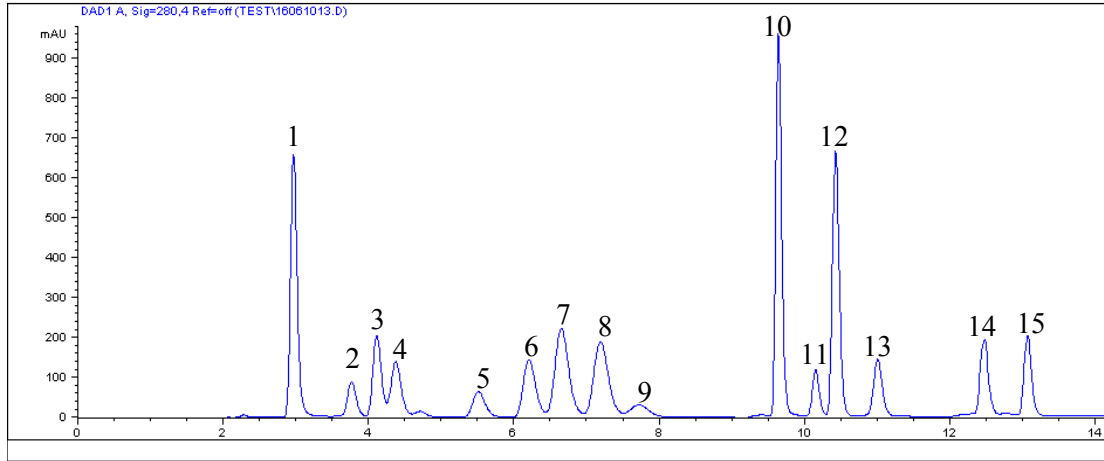
Ters faz HPLC, farklı oranlarda formik asit (A), metanol (B) ve su (C) kullanılarak kademeli elüsyonla gerçekleştirilmiştir. Bunun için ön denemeler yapıldıktan sonra, MeOH yüzdesi %35, %60 ve %80 olacak şekilde artırılarak hazırlanmış, üç mobil faz kademeli olarak kolondan geçirilmiştir. Başlangıç koşulları 1 mL.dak⁻¹ akış hızında, A-B-C oranı 0.2:35:64.8 olarak belirlenmiştir. 6 dakikadan sonra, bu oran 0.2:60:39.8'e ayarlanmıştır. 9. dakikadan analiz sonlanıncaya kadar A-B-C oranı 0.2:80:19.8'de tutulmuştur (Tablo 4.1). Sistemin, diğer bir enjeksiyon için, dengeye gelmesinin 10 dakika sürdüğü saptanmıştır. Analizler rutin olarak, 254, 270, 280, 323 ve 365 nm dalgaboylarında gerçekleştirilmiştir. Mobil faz kullanılmadan önce 0.45 µm'lik naylon filtrelerden, vakumlu süzme sistemiyle süzülüp ve ultrasonik banyoda degaze edilmiştir. 14 polifenol bileşiğinin ayrımı Şekil 4.2'deki kromatogramda görülmektedir.



Şekil 4.1. Gallik asidin %30 (v/v) metanolde farklı pH değerlerinde elde edilen kromatogramları A: pH=3.0, B: pH=4.5, C: pH=6.5

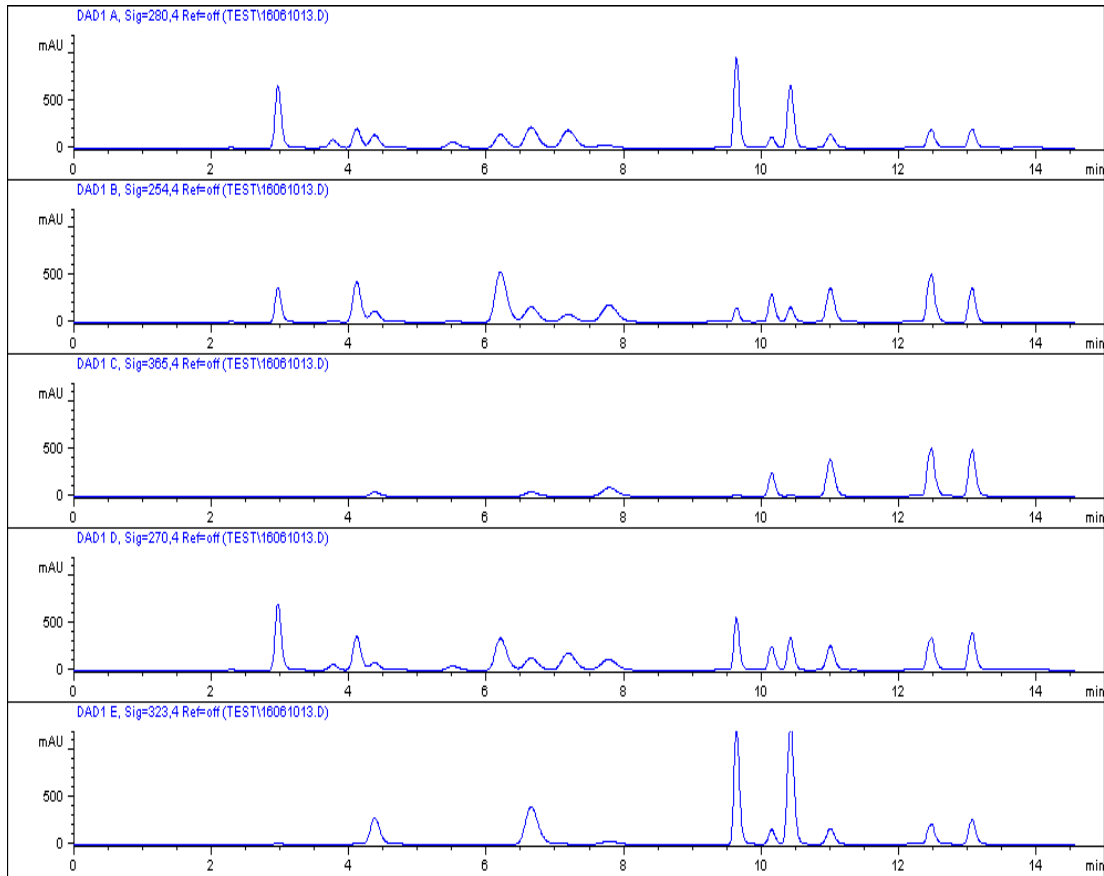
Tablo 4.1 HPLC gradient programı

zaman	Formik asit: metanol:su			pH
0-6.0 dak	0.2:35:64.8	-	-	2.60
6.1-9.0 dak	-	0.2:60:39.8	-	2.90
9.1- 14 dak	-	-	0.2:80:19.8	3.10



Şekil 4.2. Polifenollerin kromatografik ayrımının gösterimi ($\lambda = 280 \text{ nm}$)

(1. Gallik asit, 2. (+)-kateşin, 3. protokateşuik asit, 4. klorogenik asit, 5. (-)-epikateşin, 6. p-hidroksibenzoik asit, 7. şiringik asit, 8. kafeik asit, 9. 2,5-dihidroksibenzaldehit (iç standart), 10. p-kumarik asit, 11. Rutin, 12. trans-resveratrol, 13. Mirisetin, 14. Kuersetin, 15. kampferol).



Şekil 4.3. Polifenollerin kromatografik ayrımının farklı dalgaboylarında gösterimi ($\lambda = 280 \text{ nm}, 254 \text{ nm}, 365 \text{ nm}, 270 \text{ nm}, 323 \text{ nm}$)

Polifenollerin bağıl alıkonma zamanları, altı farklı günde, her bir polifenolik bileşiğin alıkonma zamanının, iç standartın (2,5-dihidroksibenzaldehit) alıkonma zamanına oranlanmasıyla hesaplanmıştır.

Tablo 4.2. Polifenollerin alıkonma zamanları (n=6)

Pik	Standartlar	Bağıl Alıkonma zamanı	% CV
1	Gallik Asit	0.384	1.913
2	(+)-Kateşin	0.479	1.578
3	3,4 Dihidroksi Benzoik Asit	0.537	1.848
4	Klorogenik Asit	0.562	0.560
5	(-)-Epikateşin	0.697	0.340
6	p- Hidroksi Benzoik Asit	0.821	1.765
7	Şiringik Asit	0.889	1.282
8	Kafeik Asit	0.915	1.074
9	2,5-dihidroksibenzaldehit	1.000	0.769
10	p-Kumarik Asit	1.273	1.122
11	Rutin	1.342	0.248
12	Resveratrol	1.381	0.781
13	Mirisetin	1.490	0.881
14	Kuersetin	1.615	0.962
15	Kaempferol	1.729	0.645

4.2. Sistem Uygunluk Parametrelerinin Hesaplanması

4.2.1. Kapasite Faktörü (k') ve Teorik Tabaka Sayısı (N)

t_0 zamanı, Urasil kullanılarak hesaplanmıştır ve $2.549 \pm 0,001$ dak olarak bulundu. Buna göre her bir madde için kapasite faktörleri Tablo 4.3' de verilmiştir. Gallik asit ve kateşin haricinde kapasite faktörleri $0.5 < k' < 10$ aralığında hesaplanmıştır.

4.2.2. Seçicilik Faktörü (α) ve Ayırıcılık(R)

Hesaplanan seçicilik faktörü ve ayırıcılık değerleri Tablo 4.4' de verilmiştir. Kateşin ve 3,4-dihidroksi benzoik asit için ayırıcılık değeri 1.2 olarak bulunmuştur. Diğer bütün maddelerin ayırıcılık değerleri 1.5' in üzerindedir.

Tablo 4.3. Kapasite faktörleri

Standartlar	Kapasite Faktörü (k')
Gallik Asit	0.180
(+)-Kateşin	0.490
3,4- Dihidroksi Benzoik Asit	0.628
Klorogenik Asit	0.701
(-)-Epikateşin	1.111
p- Hidroksi Benzoik Asit	1.486
Şiringik Asit	1.690
Kafeik Asit	1.771
p-Kumarik Asit	2.856
Rutin	3.062
Resveratrol	3.179
Mirisetin	3.511
Kuersetin	3.962
Kaempferol	4.235

Tablo 4.4. Seçicilik faktörleri ve ayırıcılık değerleri

Standartlar	Seçicilik Faktörü(α)	Ayırıcılık (R)
Gallik Asit- (+)-kateşin	2.751	2.66
(+)-Kateşin-3,4- dihidroksi benzoik asit	1.396	1.81
3,4- dihidroksi benzoik asit- klorojenik asit	1.116	1.20
Klorojenik asit- (-)-epikateşin	1.585	3.24
(-)-Epikateşin-p-hidroksi benzoik asit	1.338	2.40
p- hidroksi benzoik asit - şiringik asit	1.137	1.47
Şiringik Asit-kafeik asit	1.132	1.50
Kafeik Asit-p-kumarik asit	1.613	6.98
p-Kumarik Asit-rutin	1.072	1.71
Rutin-resveratrol	1.038	1.50
Resveratrol-mirisetin	1.104	2.10
Mirisetin-kuersetin	1.246	3.92
Kuersetin-kampferol	1.069	1.82

4.2.3. Teorik Tabaka Sayısı (N), Kuyruklanma ve Asimetri Faktör

Hesaplanan kuyruklanma faktörü değerleri $0.5 \leq T \leq 2$ aralığında bulunmuştur. Asimetri faktörü değerleri ise 1.5' den küçüktür.

Tablo 4.5. Teorik tabaka sayısı, kuyruklanma faktörü ve asimetri faktörü değerleri

Standartlar	Teorik Tabaka Sayısı (N)	Kuyruklanma Faktörü	Asimetri Faktörü
Gallik Asit	2304.07	0.95	0.90
(+)-Kateşin	2521.38	0.90	0.80
3,4- Dihidroksi Benzoik Asit	3005.96	1.06	1.11
Klorojenik Asit	3398.13	0.90	0.80
(-)-Epikateşin	3963.96	1.17	1.33

p- Hidroksi Benzoik Asit	3847.72	1.19	1.38
Şiringik Asit	4420.92	1.20	1.40
Kafeik Asit	5166.73	1.17	1.35
p-Kumarik Asit	16500.26	1.14	1.27
Rutin	18300.68	1.07	1.14
Resveratrol	27795.56	1.15	1.31
Mirisetin	21503.29	1.11	1.22
Kuersetin	20307.06	1.14	1.28
Kaempferol	30331.71	1.13	1.25

4.3. Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu

Üç farklı organik çözücü kullanılarak yapılan sıvı-sıvı ekstraksiyonunda her bir madde için hesaplanan % geri kazanım Tablo 4.6' da verilmiştir. Sentetik şarap numunesinde, en yüksek % geri kazanım değerlerinin etilasetat ile elde edildiği görülmektedir.

Tablo 4.6. Sıvı-Sıvı ekstraksiyonunda kullanılan solventlerin % geri kazanım değerleri

Bileşikler	% Geri Kazanımı		
	t-Bütil metileter	Dietileter	Etilasetat
Gallik asit	73.4	75.8	99.2
(+)-Kateşin	94.7	42.1	89.7
3,4 Dihidroksibenzoik asit	72.3	74.6	98.8
Klorogenik asit	34.1	20.8	98.5
(-)-Epikateşin	63.9	29.3	89.2
p-Hidroksibenzoik asit	73.6	76.7	99.5
Şiringik asit	97.0	101.8	100.3
Kafeik asit	91.5	86.2	107.5
p-Kumarik asit	101.1	117.4	100.3
Rutin	19.9	38.6	74.0
Resveratrol	81.7	104.4	95.4
Mirisetin	118.7	90.6	102.1
Kuersetin	122.8	95.2	103.7
Kaempferol	124.6	101.1	104.4

Sıvı-sıvı ekstraksiyonunda organik çözücü olarak en yüksek % geri kazanım değerini veren etilasetat seçilmiş ve hacim taraması yapılmıştır. Etil asetat sırasıyla 4 mL, 5 mL ve 6 mL eklenerek ekstraksiyon gerçekleştirildi. En iyi verim 5 ve 6 mL çözücü hacimde elde edilmiştir. Daha az çözücü kullanmak için hacim 5 mL olarak kabul edilmiştir. 5 mL çözücü hacminde ortamın pH'ı taranmıştır. En yüksek verim pH 2'de elde edilmiştir. Ekstraksiyon iki basamakta gerçekleştirildiğinde verimin daha da yükseldiği, üç basamakta ise değişmediği görülmüştür. Tablo 4.7'de sentetik şarabın, 5 mL etilasetat ile 2 basamakta farklı pH değerlerinde yapılan ekstraksiyonunda elde edilen %geri kazanım değerleri görülmektedir. En yüksek %geri kazanım değeri pH 2'de elde edilmiştir. Bu pH'da her bir polifenol bileşiği için 5 tekrarda elde edilen % RSD (bağıl standart sapma) değerleri 1.3 ile 2.8 aralığındadır.

Tablo 4.7. Etilasetat ile yapılan sıvı-sıvı ekstraksiyonunda pH taraması sonucunda elde edilen % geri kazanım değerleri

Bileşikler	% Geri Kazanım			
	pH:2	pH:3	pH:4	pH:5
Gallik asit	101.4	100.3	61.2	46.0
(+)-Kateşin	89.6	88.7	96.3	86.9
3,4 Dihidroksibenzoik asit	99.5	97.4	58.4	55.3
Klorogenik asit	97.3	80.1	49.2	17.3
(-)-Epikateşin	89.5	91.2	93.2	93.2
p- Hidroksi benzoik asit	99.1	95.2	60.8	57.7
Şiringik asit	100.1	99.5	101.5	94.5
Kafeik asit	105.4	97.8	95.2	76.7
p- Kumarik asit	99.8	96.6	95.1	78.3
Rutin	74.7	59.1	52.9	43.9
Resveratrol	97.5	96.3	89.3	73.1
Mirisetin	103.9	79.2	51.4	52.6
Kuersetin	102.4	85.9	89.5	77.2
Kaempferol	105.1	93.5	90.7	90.2
2,5-dihidroksibenzaldehit (İç Standart)	98.5	97.0	94.3	91.8

4.4. Katı Faz Ekstraksiyonu

Katı faz ekstraksiyonu Detectabuse™, Strata-C₁₈-E, Strata-X, Bondelute ve AccuBOND II SAX katı faz kartüjleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. En iyi verim Strata-C₁₈-E kartüjü ile elde edildi (Tablo 4-8).

Tablo 4.8. Katı Faz Ekstraksiyonunda Kullanılan Kartüjlerin % Geri Kazanım Değerleri

Bileşikler	% Geri Kazanımı				
	Strata C ₁₈	Deduct Abuse	AccuBOND SAX	Bondelute	StrataX
Gallik asit	24.56	11.05	27.41	8.43	75.85
(+)-Kateşin	69.16	15.47	61.49	17.13	-*
3,4 Dihidroksibenzoik asit	73.67	20.54	65.24	19.58	80.62
Klorogenik asit	67.89	15.38	79.93	30.51	88.21
(-)-Epikateşin	77.31	28.66	90.83	19.52	-*
p- Hidroksi benzoik asit	86.64	32.76	85.66	25.27	85.37
Şiringik asit	87.92	30.24	88.61	32.81	102.08
Kafeik asit	87.99	43.08	89.51	39.81	103.45
p- Kumarik asit	93.36	58.84	85.91	59.11	92.37
Rutin	77.63	53.43	82.57	46.88	-*
Resveratrol	95.14	77.51	85.51	74.13	75.17
Mirisetin	98.10	93.97	87.89	71.17	85.92
Kuersetin	87.72	86.11	82.42	47.87	90.27
Kaempferol	92.83	95.33	82.19	54.44	86.06

*- ile gösterilen bileşikler elüe edilememiştir.

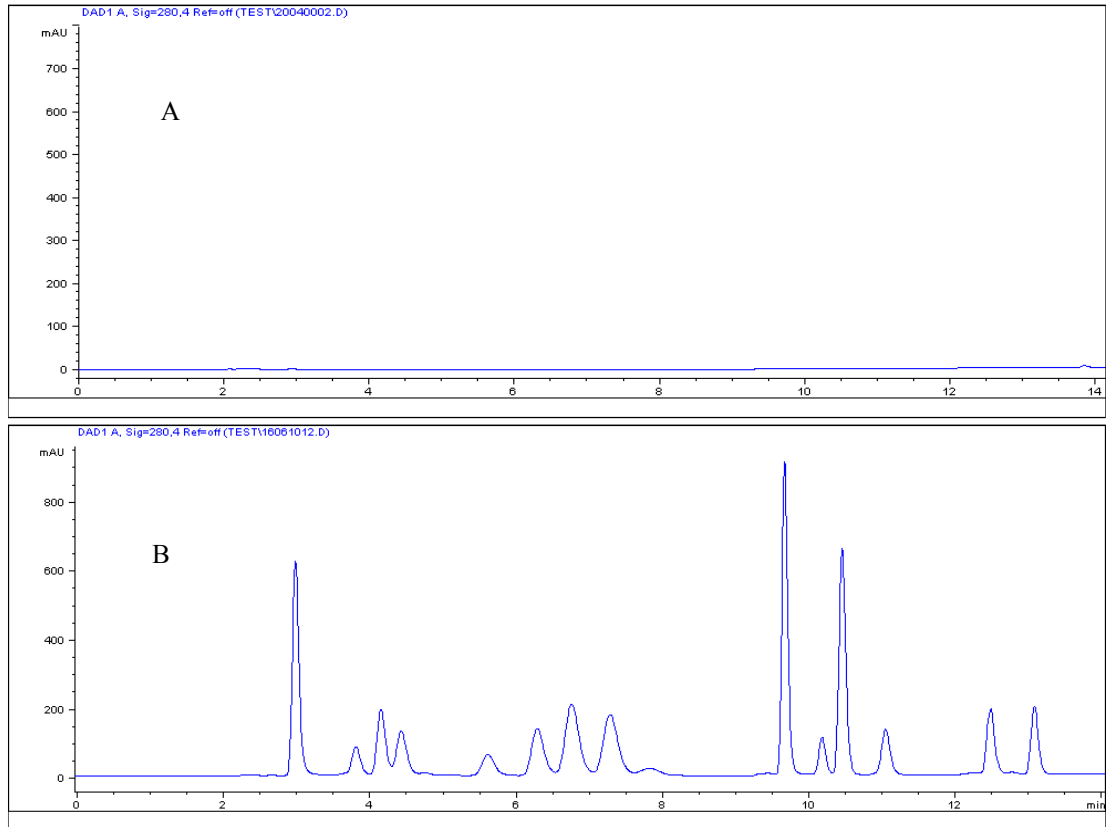
Katı faz ekstraksiyonu ile sıvı-sıvı ekstraksiyonunda daha az polar olan türler için hemen hemen aynı verim elde edilmiştir. Fakat kolonu erken terk eden daha polar türler için katı faz ekstraksiyonunda % geri kazanım değerleri, etil asetat ile yapılan sıvı-sıvı ekstraksiyonuna göre oldukça düşük çıkmıştır.

Gerçek şarap numunelerinde sıvı-sıvı ekstraksiyonu uygulanmaya karar verilmiştir. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu yöntemi valide edilmiştir.

4.5. Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonunda Metot Validasyonu

4.5.1. Seçicilik ve Kalibrasyon Eğrisi

Yöntemin seçici olup olmadığını göstermek için boş sentetik şarap ve standart madde eklenen sentetik şaraba etil asetat ile pH 2’de sıvı-sıvı ekstraksiyonu uygulanmıştır. Standart maddenin alıkonma zamanında veya bağıl alıkonma zamanında, sentetik şaraptan kaynaklı herhangi bir örtücü pik bulunmadığı saptanmıştır.



Şekil 4.4. Boş sentetik şarap (A) ve standart madde eklenen sentetik şarabın (B) etil asetat ile (pH=2) yapılan sıvı-sıvı ekstraksiyonundan elde edilen kromatogramlar ($\lambda = 280 \text{ nm}$).

Her bir polifenol bileşiğinin, çalışma aralıkları tespit edilmiştir ve kalibrasyon eğrileri pik alanları baz alınarak oluşturulmuştur. Doğrusal aralıkta, 6 farklı günde, altı farklı konsantrasyonda gerçekleştirilen enjeksiyonlar sonucu elde edilen

kalibrasyon eğrilerinin denklemleri Tablo 4.9’de verilmiştir. Elde edilen kalibrasyon eğrilerinin açıklayıcılık katsayıları $R^2 > 0.99$ olarak hesaplanmıştır.

Saptama alt tayin sınırı belirlenirken sentetik şaraba eklenen polifenolik bileşikler, S/N oranı yaklaşık olarak 3 oluncaya kadar seyreltilmiştir. Alt tayin sınırı belirlenirken, sentetik şaraba eklenen polifenolik bileşikler, S/N oranı yaklaşık olarak 10 oluncaya kadar seyreltilmiştir. Sinyal düzeyinin gürültü düzeyine oranının üç katına (S/N=3) karşılık gelen derişim değeri, saptama alt sınırı (LOD) değeri olarak verilmiştir. Sinyal düzeyinin gürültü düzeyine oranının on katına (S/N=10) karşılık gelen derişim değeri alt tayin sınırı (LOQ) değeri olarak verilmiştir. Her bir maddenin saptama alt sınırı ve alt tayin sınırı için elde edilen kesinlik değerleri, % CV <5.3 olarak bulunmuştur (n=6).

Tablo 4.9. Polifenol bileşiklerinin kalibrasyon eğrileri (DAD dedektör)

Standartlar	Çalışma Aralığı	Kalibrasyon Denklemi (y=mx+b)	R ²	%CV (Eğim)	LOQ (mg/L)	LOD (mg/L)
Gallik Asit	5-80	382.28x+151.5	0.9935	5.72	0.020	0.005
(+)-Kateşin	5-300	111.15x+299.52	0.9964	4.96	0.100	0.025
3,4 Dihidroksi Benzoik Asit	1-20	690.45x+124.55	0.9991	1.14	0.050	0.020
Klorojenik Asit	1-20	459.71x-141.11	0.9993	5.29	0.020	0.010
(-)-Epikateşin	5-80	106.46x-113.57	0.9998	1.82	0.200	0.100
p- Hidroksi Benzoik Asit	1-20	1247.2x+307.95	0.9997	2.07	0.025	0.010
Şiringik Asit	1-40	982.69x+147.71	0.9995	5.31	0.030	0.010
Kafeik Asit	1-40	501.19x+912.46	0.9991	4.29	0.020	0.010
p-Kumarik Asit	1-40	1041.2x+1056.2	0.9987	3.24	0.010	0.004
Rutin	1-20	324.22x+66.529	0.9981	5.27	0.200	0.050
t-resveratrol	0.20-5	1884.3x+128.65	0.9973	1.36	0.100	0.020
Mirisetin	0.5-10	528.41x+71.362	0.9991	1.20	0.050	0.020
Kuersetin	0.5-10	632.51x+94.8	0.9989	3.73	0.020	0.005
Kaempferol	0.20-10	646.81x+248.96	0.9971	0.35	0.020	0.010

Tablo 4.10. Polifenol bileşiklerinin kalibrasyon eğrileri (Floresans dedektör)

Standartlar	Çalışma Aralığı	Kalibrasyon Denklemi (y=mx+b)	R ²	%CV (Eğim)	LOQ (mg/L)	LOD (mg/L)
(+)- Kateşin	1-30	232.22x + 43.54	0.9997	2.24	0.05	0.02
(-)-Epikateşin	1-30	219.79x - 65.41	0.9994	2.75	0.075	0.05
t-resveratrol	0.25-5	79.969x-2.23	0.9987	3.15	0.04	0.01

4.5.2. Kesinlik ve Doğruluk

Kesinlik ve doğruluk değerleri, düşük, orta ve yüksek olmak üzere 3 farklı konsantrasyonda hazırlanan kontrol örneklerinde, birbirini izleyen 5 farklı günde hesaplanmıştır. Kesinlik, bağıl standart sapma olarak ve doğruluk yüzde geri kazanım olarak ifade edilmiştir.

Tablo 4.11. Polifenol bileşiklerinin kesinlik ve doğruluk değerleri

Bileşik	Eklene (µg/mL)	Doğruluk (%Geri kazanım)	Kesinlik (%RSD)
Gallik asit	5	96.2 ± 1.3	1.4
	20	102.3 ± 2.1	2.1
	40	102.9 ± 2.7	2.6
(+) - Kateşin	20	89.7 ± 2.9	3.2
	40	88.9 ± 3.5	3.9
	80	91.8 ± 3.1	3.4
Klorogenik asit	2	97.4 ± 2.1	2.2
	4	98.7 ± 1.7	1.7
	8	100.4 ± 2.7	2.7
3,4-dihidroksibenzoik asit	2.5	96.6 ± 3.1	3.2
	5	97.6 ± 2.5	2.6
	10	98.4 ± 1.9	1.9
(-)-Epikateşin	5	91.6 ± 3.2	3.5
	10	92.1 ± 2.8	3.0
	20	94.7 ± 2.6	2.7
p-hidroksibenzoik asit	2.5	102.4 ± 2.9	2.8
	5	99.8 ± 3.3	3.3
	10	101.3 ± 1.6	1.6
Şiringik asit	2.5	98.3 ± 2.5	2.5
	5	101.4 ± 1.5	1.5
	10	103.1 ± 2.9	2.8
Kafeik asit	5	100.7 ± 1.5	1.5
	10	102.5 ± 2.7	2.6
	20	101.7 ± 2.1	2.1
p-kumarik asit	2.5	100.1 ± 1.6	1.6
	5	101.2 ± 1.4	1.4
	10	100.0 ± 1.1	1.1

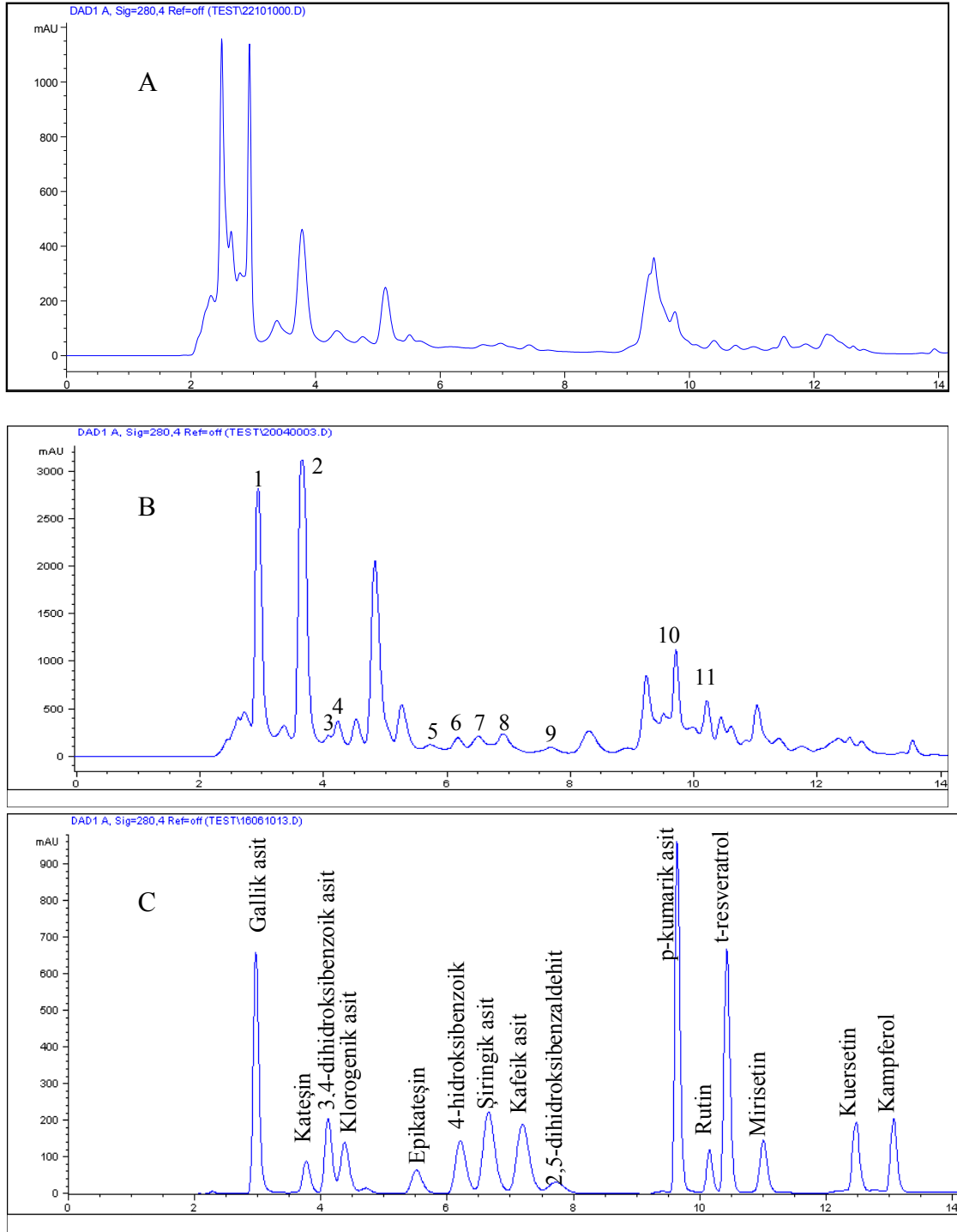
Rutin	2	68.6 ± 2.3	1.9
	4	72.9 ± 2.5	3.4
	8	73.4 ± 1.9	2.6
Resveratrol	0.5	92.7 ± 3.1	3.3
	1	97.1 ± 2.5	2.6
	2.5	96.4 ± 2.1	2.2
Mirisetin	1	101.2 ± 2.2	2.2
	2	104.1 ± 2.5	2.4
	4	103.3 ± 2.7	2.6
Kuarsetin	1	100.3 ± 1.9	1.9
	2	101.4 ± 2.4	2.4
	4	103.1 ± 2.3	2.2
Kampferol	0.4	100.2 ± 1.1	1.1
	0.8	101.5 ± 1.7	1.7
	1.6	102.7 ± 1.5	1.5

4.6. Şarap Örneklerindeki Polifenol Miktarları

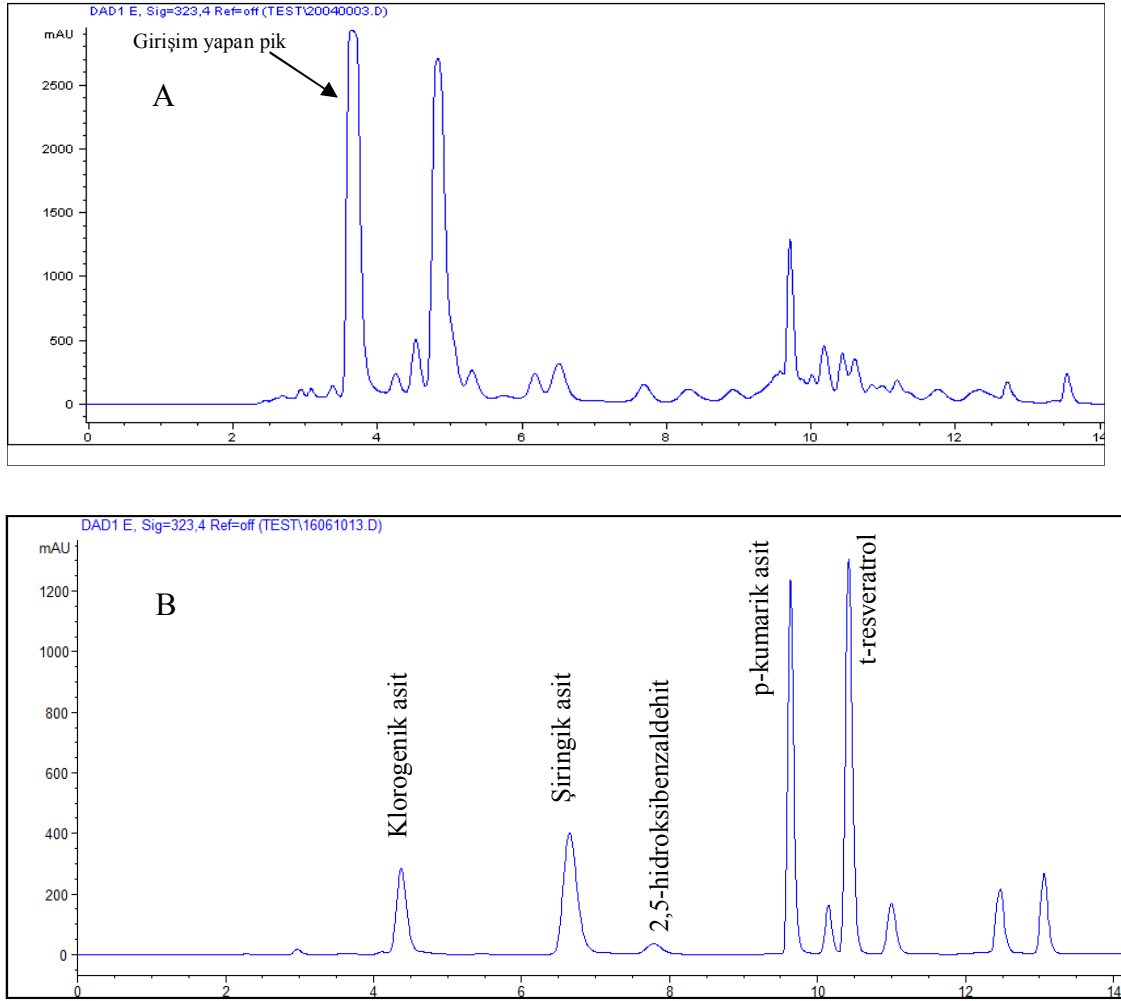
Arapgir yöresinde üretilen Güzay Karaoğlan (2007) şarabının hiçbir ön işlem yapılmaksızın HPLC sistemine doğrudan enjeksiyonu ve etilasetat ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu uygulandıktan sonra HPLC sistemine enjeksiyonu sonucu elde edilen 280 nm'deki kromatogramlar, standartların kromatogramıyla beraber Şekil 4.5' de verilmiştir.

Kromatogramlardan görüldüğü gibi, şarabın direk enjeksiyonunda iyi bir ayırım olmamaktadır. Etil asetat ile sıvı- sıvı ekstraksiyonu uygulandıktan sonra ise, pikler belirginleşmekte, pik yükseklikleri önemli oranda artmaktadır.

Her bir polifenolik bileşik maksimum absorbans verdiği dalgaboyunda değerlendirilmiştir. Örneğin Güzay Karaoğlan şarabında, klorogenik asit, p-kumarik asit, şiringik asit ve resveratrol 323 nm'de 280 nm'den çok daha belirgin pikler vermektedir (Şekil 4.6). Aynı şekilde mirisetin, kuarsetin ve kampferolün 365 nm dalgaboyunda verdiği pikler oldukça belirgindir.



Şekil 4.5. Güzay Karaoğlan (2007) şarabının A. HPLC sistemine direk enjeksiyonu B. Etil asetat ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu uygulandıktan sonra HPLC sistemine enjeksiyonu C. Standart Bileşiklerin HPLC sistemine enjeksiyonu ($\lambda=280$ nm).



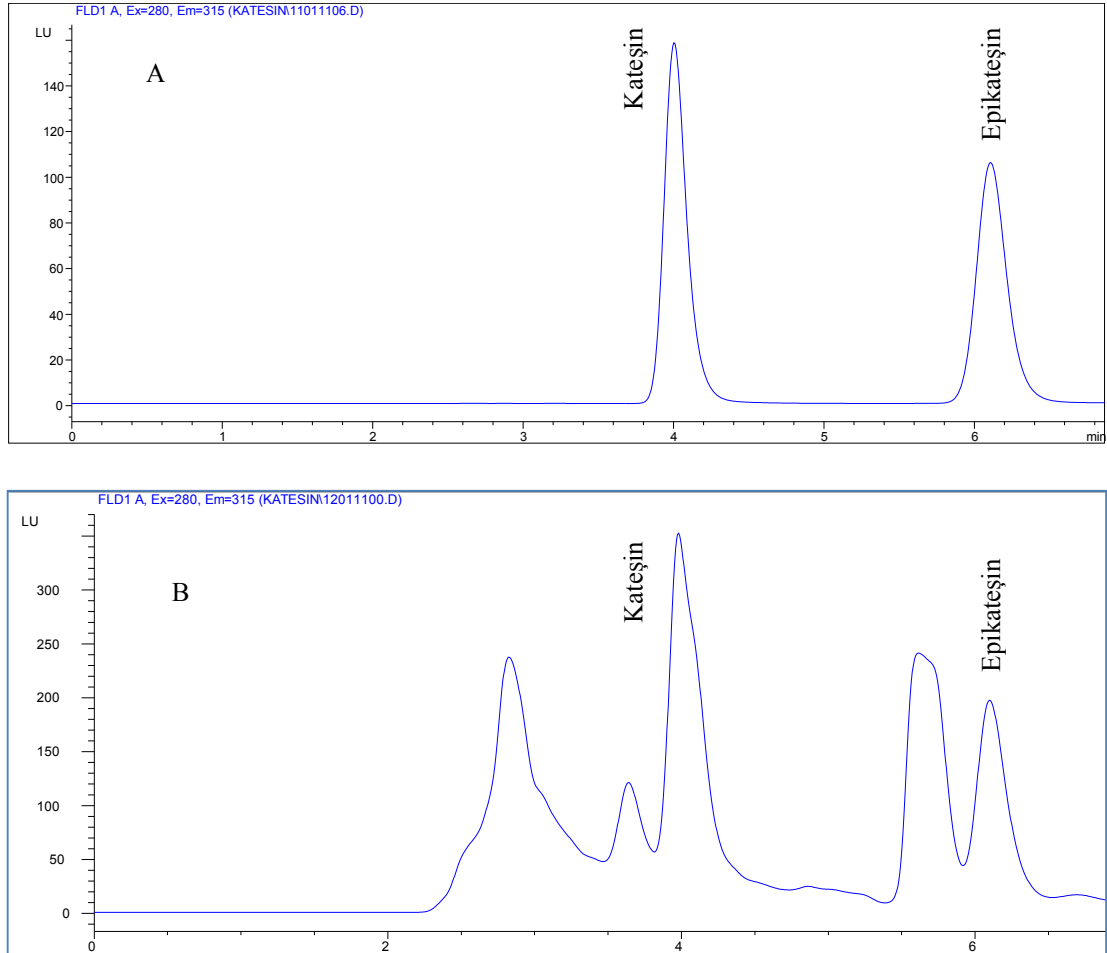
Şekil 4.6. Güzay Karaoğlan (2007) şarabının A. Etil asetat ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu uygulandıktan sonra HPLC sistemine enjeksiyonu B. Standart Bileşiklerin HPLC sistemine enjeksiyonu ($\lambda=323$ nm).

Çalışmamızda kateşin miktarını oldukça yüksek bulmamız ve kateşinin absorbands vermediği dalgalarda (323 ve 365 nm) fakat kateşinin alıkonma zamanında büyük bir pik gelmesi, bu pikin 280 nm'de kateşinin absorbandsını da etkileyebileceği kuşkusunu yaratmıştır. Bu yüzden çalışmamızın sonraki aşamasında, kateşin, epikateşin ve trans resveratrol miktarlarının floresans dedektörle tekrar tayin edilmesi gerektiği değerlendirilmiştir.

4.7. Floresans Dedektör ile Kateşin, Epikateşin ve t-resveratrol Tayini

Şarap örneklerinin absorpsiyon spektrumlarında, (+)- kateşin pikinin alıkonma zamanında, floresans özellik göstermeyen bilinmeyen bir bileşiğin girişim yaptığı görülmüştür. Çünkü bu pik floresans spektrumunda gözlenmemektedir. Aynı şekilde (-)- epikateşine de bazı şarap örneklerinde girişim olmaktadır. Bu yüzden, kateşin ve epikateşin için floresans dedektörle tayininin uygun olduğuna karar verilmiştir. Şekil 4.7’de 10 mg.L^{-1} derişimdeki kateşin ve epikateşin standartlarının ve Güzay Karaoğlan-Öküzgözü (2007) şarabının floresans spektrumları verilmiştir.

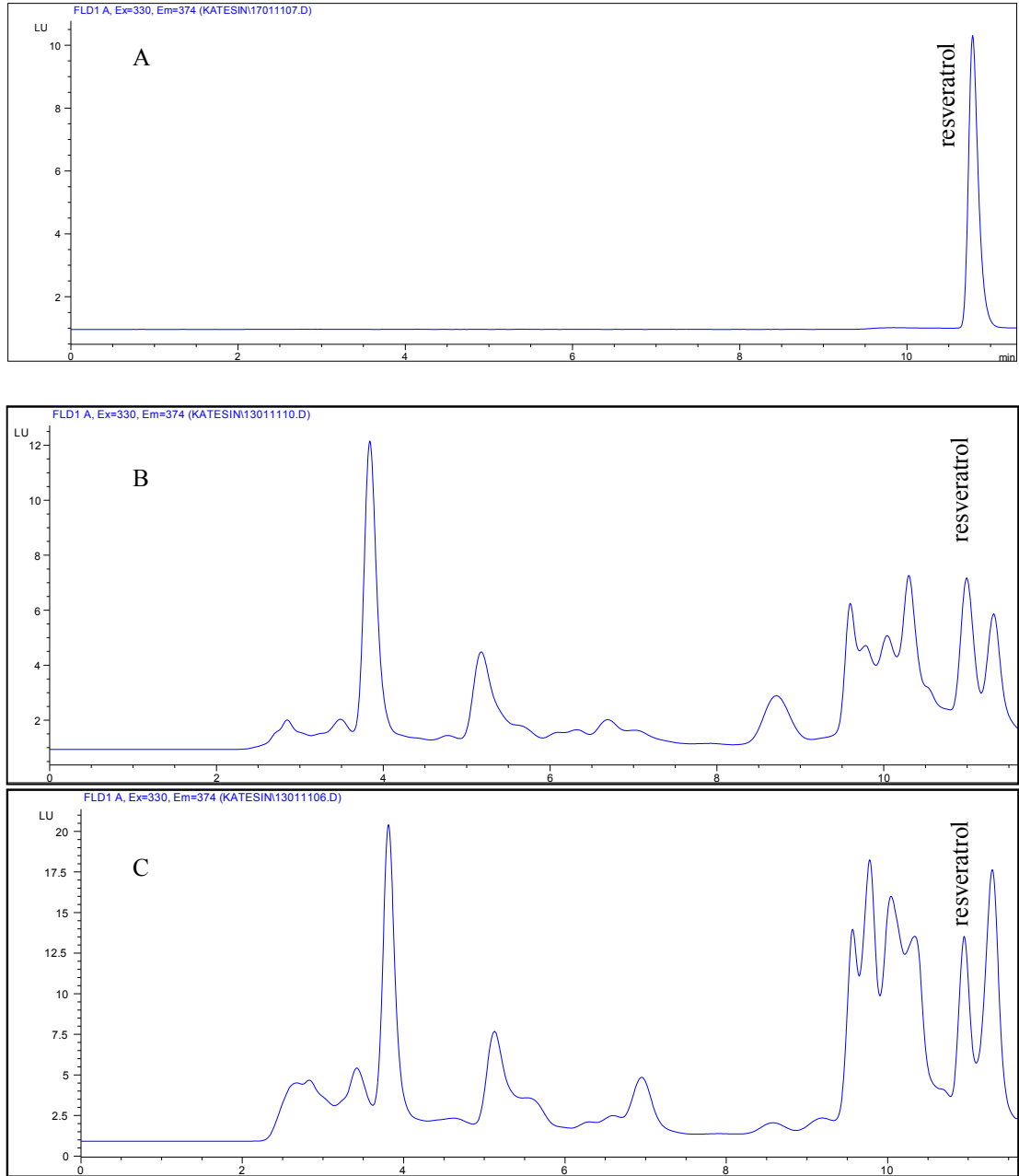
Kateşin ve epikateşin tayininde floresans dedektör ile yüksek seçicilik elde edilmiştir.



Şekil 4.7. A. Kateşin ve epikateşin standartlarının floresans spektrumu

B. Güzay Karaoğlan-Öküzgözü (2007) şarabının floresans spektrumu

(+)- kateşin ve (-)-epikateşin ile birlikte, floresans özellik gösteren t-resveratrol de hem DAD dedektör ile hem de floresans dedektörle tayin edilmiştir. t-resveratrol için her iki dedektörde elde edilen sonuçlar benzerdir. Fakat, daha duyarlı olan floresans dedektörle elde edilen sonuçlar, biraz daha yüksek bulunmuştur. Şekil 4.8'de 10 mg.L^{-1} derişimdeki resveratrol standardı, Karpata Kalecik Karası (2007) ve Buzbağı Klasik Öküzgözü-Boğazkere (2008) şarabının floresans spektrumları görülmektedir.



Şekil 4.8. A. 10 mg.L^{-1} derişimdeki resveratrol standardı B. Karpata Kalecik Karası (2007) C. Buzbağı Klasik Öküzgözü-Boğazkere (2008) nın floresans spektrumu

Her şarap numunesi 3 kere çalışılmıştır. Tablo 4.12’de polifenolik bileşiklerin yöresel kırmızı şaraplarda hesapladığımız derişim değerleri verilmiştir. DAD ve floresans dedektörle tayin edilen (+)- kateşin derişimleri arasında büyük bir farklılık görölmektedir. Şarap örneklerinin absorbands ve floresans spektrumları karşılaştırıldığında, (+)- kateşin standart çözeltisinin pikinin alıkonma zamanında, floresans özellik göstermeyen, bilinmeyen bir bileşğin girişim yaptığı görölmüştür. Bu yüzden, (+)- kateşin tayini için, floresans dedektör kullanımının uygun olduğu belirlenmiştir. (-)- epikateşin için de , çoğu şarap numunelerinde girişim olmaktadır. Floresans dedektörün seçiciliği bu iki madde için çok yüksektir. t-resveratrol sonuçları, her iki dedektörde de benzerdir. Fakat daha yüksek duyarlık gösteren floresans dedektörde elde edilen sonuçlar daha yüksektir. Yöresel şaraplarda en fazla bulunan polifenolik bileşiklerin gallik asit ve (+)- kateşin ve (-)- epikateşin olduğu bulunmuştur.

Tablo 4.12. Yöresel kırmızı şaraplarda tayin edilen polifenolik bileşiklerin derişim değerleri

	Derişim (mg.L ⁻¹) (n=3)											
	Buzbağı Öküzgözü Boğazkere 2008		Güzay Karaoğlan Öküzgözü 2007		Güzay Karaoğlan Rezerv 2007		Karpata Kalecik Karası 2007		Sofen Öküzgözü 2007		Alia 2007	
	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F
Gallik Asit	47.00±0.12		42.50±0.05		50.89±0.87		24.07±0.77		50.03±0.69		35.59±1.27	
(+)-Kateşin	201.20±0.19	10.85±0.08	183.05±2.84	19.74±0.54	197.65±3.16	11.30±0.42	182.45±4.48	2.81±0.23	154.5±2.05	1.80±0.05	183.30±0.05	1.85±0.07
3,4-Dihidroksi	1.61±0.02		1.50±0.37		1.11±0.21		2.84±0.13		1.67±0.03		1.25±0.04	
Klorogenik Asit	3.05±0.35		2.25±0.12		2.00±0.15		2.47±0.18		5.81±0.17		5.51±0.57	
(-)-Epikateşin	11.97±1.08	5.23±0.82	15.36±0.61	12.51±0.73	16.02±0.56	5.35±0.65	12.15±0.42	10.09±0.83	40.94±0.81	9.82±0.78	45.06±0.49	7.53±0.47
p-Hidroksi Benzoik Asit	0.73±0.07		0.69±0.03		0.80±0.07		0.89±0.06		0.82±0.14		1.21±0.06	
Şirngik Asit	3.35±0.11		3.95±0.14		4.14±0.31		4.34±0.62		5.08±0.23		4.40±0.40	
Kafeik Asit	0.98±0.40		1.32±0.12		3.47±0.20		0.96±0.08		2.25±0.40		3.67±0.61	
p-kumarik asit	8.24±0.26		4.14±0.01		6.33±0.16		1.22±0.33		2.24±0.12		2.13±0.05	
Rutin	9.03±0.24		6.21±0.02		8.75±0.54		7.54±0.16		3.39±0.47		3.20±0.19	
t-resveratrol	0.97±0.05	1.44±0.09	0.71±0.03	1.09±0.08	0.34±0.04	0.67±0.06	0.45±0.04	0.84±0.08	0.43±0.05	0.54±0.06	0.31±0.02	0.32±0.04
Mirisetin	4.61±0.60		2.98±0.28		4.39±0.35		1.82±0.08		0.78±0.09		1.21±0.05	
Kuersetin	4.65±0.12		1.19±0.01		1.78±0.08		0.79±0.09		0.60±0.08		0.86±0.03	
Kampferol	0.87±0.06		0.30±0.02		0.57±0.06		0.14±0.03		0.10±0.02		0.16±0.03	

A: Diyot serisi dedektörü

F: Floresans dedektör

5. TARTIŞMA

Literatürde HPLC-DAD yöntemiyle şarapta polifenol tayin eden çalışmalar mevcuttur.

Malovana ve arkadaşları, 17 polifenol bileşimini (Gallik asit, protokateşuik asit, protokateşuik aldehit, kateşin, 2,5-dihidroksibenzaldehit, vanilik asit, kafeik asit, şiringik asit, epikateşin, şiringaldehit, p-kumarik asit, ferulik asit, t-resveratrol, mirisetin, kuersetin, kuersetin ve kampferol) kırmızı şarapta HPLC-DAD yöntemiyle tayin etmişlerdir. Ayırma metanol: asetik asit: su çözücü karışımlarıyla gradient elüsyon yapılarak, Nova Pak C18 (150 mm x3.9 mm, 4µm) kolonda 280 nm dalgaboyunda 35 dakikada gerçekleştirilmiştir. Örnek hazırlanma basamağında, şaraplara dietil eterle pH 2'de 20 dakika süreyle sıvı-sıvı ekstraksiyonu uygulanmıştır. Geri kazanım değerleri kateşin (49.78) ve epikateşin hariç (39.53) diğer maddeler için >73.54 olarak bulunmuştur. Çalışmanın dezavantajı, analiz ve ekstraksiyon süresinin uzun olması, geri kazanım oranlarının özellikle kateşin ve epikateşin için oldukça düşük olmasıdır (89).

Diğer bir çalışmada, Anastasia Zotou ve Eleni Frangi rutin, mirisetin, kuersetin, kampferol ve t-resveratrolü eşzamanlı olarak kırmızı şarapta SPE-LC metoduyla tayin etmişlerdir. Ayırma 0.05 M %1 (h/h) asetik asit içeren asetat tamponu (pH=3.6) ve metanol çözücüleri kullanılarak gradient elüsyonla, Inertsil ODS-3 (250mmx4mm, 5µm) kolonda, 320 nm dalgaboyunda, 25 dakikada gerçekleştirilmiştir. Örnekler, Nexus ABS ELUT (30 mg mL⁻¹) katı faz kartuşlerinden geçirilmiştir. Mutlak geri kazanım %77.4 ve %94.3 aralığında bulunmuştur. Rutin, resveratrol, mirisetin, kuersetin ve kampferol için saptama alt sınırı (LOD) değerleri sırasıyla 0.15, 0.02, 0.15, 0.2, 0.2 mg.L⁻¹'dir (2).

Çalışmamızda elde ettiğimiz saptama alt sınırı (LOD) değerleri rutin, resveratrol, mirisetin, kuersetin ve kampferol için sırasıyla, 0.005, 0.02, 0.02, 0.005, 0.010 mg.L⁻¹'dir. Oldukça düşük saptama alt sınırı değerleriyle yöntemimizin daha hassas olduğu görülmektedir.

İtalya'da yapılan bir çalışmada, UV-GB dedektörü bağlı, ters-faz HPLC yöntemi ile 10 adet ticari İtalyan kırmızı şarabındaki, 9 biyolojik olarak aktif fenolik bileşimin (kateşin, epikateşin, t-resveratrol, c-resveratrol, gallik asit, klorojenik asit,

kafeik asit, rutin ve kuersetin) miktar tayinleri yapılmıştır. Mobil faz olarak metanol, su ve asetik asit kullanılmıştır. Örnekler, herhangi bir ön işlem yapılmaksızın doğrudan HPLC sistemine enjekte edilmişlerdir. Enjeksiyon hacmi 20 µL'dir. Kateşin, epikateşin, gallik asit, t-resveratrol ve c-resveratrol 300 nm'de, kuersetin, rutin kafeik asit ve klorogenik asit 370 nm'de tayin edilmiştir. Analiz süresi 27 dakikadır (89). Tablo 5.1' de tayin edilen maddelerin saptama alt sınırı ve şarapta bulunan miktarları verilmiştir.

Tablo 5.1. İtalyan şaraplarındaki polifenolik madde miktarları ve LOD değerleri

Bileşik	En düşük miktar (µg.mL ⁻¹)	En yüksek miktar (µg.mL ⁻¹)	LOD (µg.mL ⁻¹)
t-resveratrol	0.77±0.7	2.58±0.4	0.3
c-resveratrol	0.60±0.1	1.54±0.5	0.5
Kateşin	48.01±2.5	179.41±2.9	1.5
Epikateşin	23.45±0.7	116.34±3.1	0.6
Kuarsetin	1.18±1.7	7.72±1.9	0.5
Gallik asit	47.21±2.7	320.31±3.3	1.6
Kafeik asit	5.89±3.3	33.11±0.8	0.8
Klorogenik asit	16.62±1.6	48.55±1.6	0.7
Rutin	3.22±1.6	7.78±0.8	0.5

Kanarya adalarından alınan şarap örneklerinde, 17 polifenol bileşiğinin tayini için, HPLC sistemine bağlı absorban ve floresans dedektör birlikte kullanılmıştır. Örnek hazırlama basamağında en verim dietil eter ile pH 2'de sıvı-sıvı ekstraksiyonu yapılarak elde edilmiştir. Kateşin, vanilik asit, şiringik asit, epikateşin ve trans-resveratrol tayininde floresans dedektör kullanımı, seçiciliği ve duyarlılığı artırmıştır. (+)- kateşin tayininde, her iki dedektörle bulunan derişim değerlerinin birbiriyle uyumlu olmadığı görülmüştür. Şarabın absorban ve floresans spektrumları, kateşinin standart çözeltisiyle karşılaştırıldığında, floresans özellik göstermeyen bir bileşiğin kateşin pikiyle üst üste geldiği görülmektedir. Floresans dedektör kullanıldığında bu pik görünmemektedir. Bu yüzden floresans dedektörün kateşine seçiciliği çok daha yüksektir (91). Bu çalışmada bulunan kırmızı şaraplardaki polifenol miktarları Tablo 5.2' de görülmektedir.

Tablo 5.2. Kanarya Adaları kırmızı şaraplarının polifenol içeriği

	Derişim (mg.L ⁻¹)									
	Şarap1		Şarap 2		Şarap 3		Şarap 4		Şarap 5	
	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F
Gallik asit	26.8		43.09		34.80		41.10		15.13	
Protokateşuik asit	0.55		-		1.10		0.37		-	
(+)- Kateşin	104.51	31.69	112.25	23.73	118.85	25.57	132.04	26.79	102.22	10.66
Vanilik asit	1.12	1.63	1.00	1.51	1.58	2.11	1.11	1.58	0.80	1.22
Kafeik asit	4.42		2.80		3.41		2.95		2.12	
Şiringik asit	2.36	2.19	2.69	2.61	2.49	1.93	2.73	2.64	1.04	1.64
(-)- Epikateşin	-	19.77	-	8.93	-	7.25	-	9.44	-	7.04
p-kumarik asit	0.11		0.27		0.13		0.30		0.27	
Ferulik asit	0.61		0.68		0.78		0.77		0.55	
t-resveratrol	2.70	3.69	2.29	3.64	1.36	2.90	2.56	3.76	1.45	1.90
Mirisetin	-		-		0.56		-		-	
Kuersetin	17.00		15.70		2.88		17.35		21.06	
Kampferol	0.68		1.05		0.57		1.41		2.37	

A: Absorpsiyon ölçümüyle tayin

F: Florimetrik yöntemle tayin

Çalışmamızda kateşin miktarını oldukça yüksek bulmamız, ve kateşinin absorbands vermediği 323 ve 365 nm dalgaboyunda, kateşinin alıkonma zamanında büyükçe bir pik gelmesi, bu pikin 280 nm'de kateşinin absorbandsını da etkileyebileceği kuşkusunu yaratmıştır. Yukarıda belirtilen çalışmada olduğu gibi, kateşinin başka bir maddeyle üst üste çakışma olasılığını düşünmemize neden olmuştur. Tablo 5.2' de floresans dedektörle tayin edilen trans-resveratrol miktarının daha yüksek sonuçlar verdiği görülmektedir.

Tablo 5.3' de literatürde çalışılan, farklı ülkelerin kırmızı şaraplarının polifenol içerikleri'de mg. L⁻¹ olarak verilmiştir. Tabloda görüldüğü gibi kırmızı şaraptaki polifenol miktarları gerek ülke içindeki değişik bölgelerde, gerekse ülkeden ülkeye oldukça büyük farklılıklar göstermektedir. Genellikle kırmızı şaraptaki en yüksek miktardaki polifenollerin gallik asit, kateşin, epikateşin, kafeik asit ve kuersetin olduğu görülmektedir. Kaliforniya kırmızı şaraplarında bulunan kateşin miktarları 120-390 mg.L⁻¹ aralığında (99), Fransız kırmızı şaraplarındaki kateşin miktarı 4.4-212 mg. L⁻¹ aralığında (100) bulunmuştur. En düşük kateşin miktarına

sahip Çin şaraplarında bu miktar 3. 56-13.17 mg. L⁻¹'dir (101). Türkiye'de yapılan bir çalışmada, Denizli ve Elazığ yöresi Öküzgözü üzümlerinden üretilen kırmızı şaraplardaki bazı polifenolik bileşikler HPLC-DAD-MS yöntemiyle tayin edilmiştir (93). Şaraplar HPLC sistemine doğrudan enjekte edilmişlerdir. Çalışmada, Denizli yöresindeki şaraplardaki kateşin konsantrasyonunun (64.0-72.2 mg.L⁻¹), Elazığ yöresindeki şaraplardaki kateşin konsantrasyonundan (51.8-64.4) daha yüksek olduğu bulunmuştur.

Çalışmamızda Malatya ve Elazığ yöresinde üretilmiş ticari kırmızı şaraplarda en fazla bulunan polifenol bileşiklerinin gallik asit, (+)- kateşin ve ve (-)-epikateşin olduğu saptanmıştır. Tayin edilen gallik asit 35.59 -50.89 mg L⁻¹, kateşin 1.80-19.74 mg L⁻¹ ve (-)- epikateşin 5.23-12.51 mg L⁻¹ aralığındadır. En yüksek t-resveratrol miktarı 1.44 mg L⁻¹ olarak Buzbağı Klasik Öküzgözü-Boğazkere (2008) kırmızı şarabında bulunmuştur.

Sistem uygunluk parametrelerini hesapladığımız, valide ettiğimiz yöntemimiz, kısa bir analiz süresinde oldukça fazla sayıda polifenolik bileşiğin, yüksek hassasiyetle, kırmızı şarapta tayinine imkan sağlamaktadır.

Tablo 5.3 Farklı ülkelerin kırmızı şaraplarının polifenol içerikleri (mg. L⁻¹)

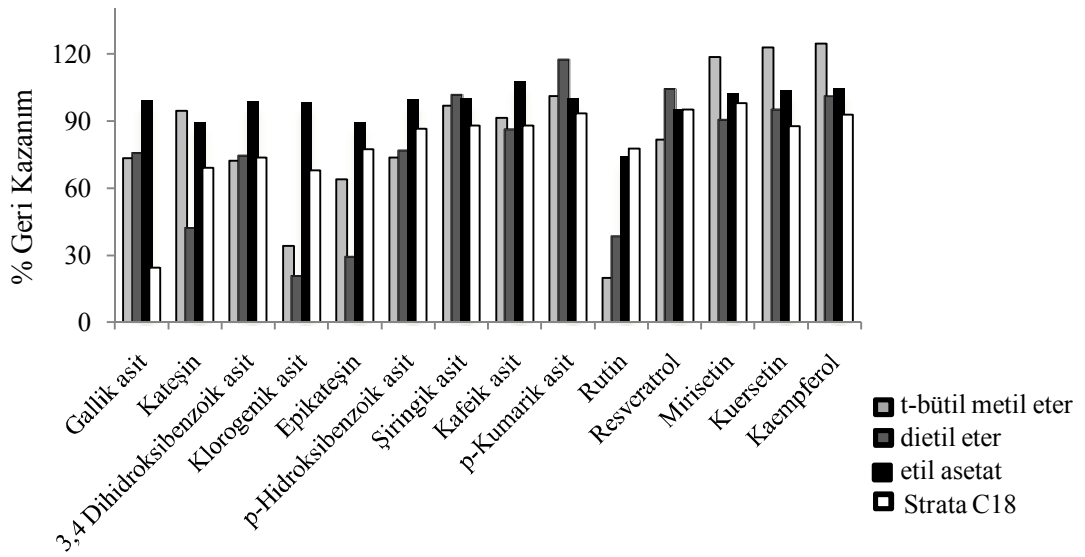
Derişim (mg. L⁻¹)											
	Fransız şarabı	İtalyan şarabı	İspanyol şarabı	Brezilya şarabı	Türk şarabı	Hırvat şarabı	Macar şarabı	Kaliforniya şarabı	Yunan şarabı	Çin şarabı	
Gallik asit	2.2-141.3 (102)	47.21-320.31(90) 28.34-107.83(91)	27.7-53.3 (104) 5.16-44.69 (89)		8.66-19.41(93) 15.31-51.66	51.2-179.4 (94)	45.3-70.9 (95)	65-126 (99)	16.4-226.0 (96)		
Kateşin	1.4-85.1(100) 32.8-209.8(103) 4.4-212 (102)	22.44-86.54(92) 48.01-179.41(90) 5.45-99.00 (91)	30.5-124.8 (105) 33.11-85.30 (89)	7.51-73.20 (106)	51.79-72.2 (93) 1.80-19.74 3.03-14.36(107)	31-138 (94)	21.3-89.1 (95)	120-390 (199)	35.8-116.0 (96)	1.44-3.83 (97)	
3,4 -dihidroksi benzoik asit		0.85-4.05 (91)	0.05-0.94 (89)		0.28-2.84						
Klorogenik asit		16.62-57.69 (90)			1.59-5.51						
Epikateşin	ND-106.6 (100) 22.1-130.7 (103) 10-70 (102)	9.94-24.10 (92) ND-116.34 (90) 23.23-136.01(91)	2.74-24.8 (105) 7.64-28.25 (89)	5.08-43.32 (106)	51.79-72.2(93) 5.23-12.51 0.55-11.78(107)	7.8-37.7 (94)	11.7-126 (95)	25-162 (99)	10.2-90.1 (96)	3.59-13.1 (97)	
p-hidroksi benzoik asit					0.41-1.21						
Şiringik asit		3.62-9.90 (91)	1.05-5.41 (89)		0.76-3.3(93) 3.35-6.15				0.0-37.5 (96)		
Kafeik asit	2.9-40.6 (102)	5.89-33.11(90) 2.25-24.42 (91)	3.04-22.54 (89)		0.50-2.40(93) 0.96-3.67	3.2-18.6 (94)	5.9-37 (95)	5-13 (99)	1.0-185.0 (96)		
p-kumarik asit		0.18-2.78 (96)			0.17-0.80 (93) 0.83-12.10	1.8-4.4 (94)	0-10.5 (95)				
Rutin		0.00-8.56 (92) 2.63-7.78 (90)	0.00 (100)		0.32-10.17		9.5-20.2 (95)	2.4-31.7 (99)	6.74-10.69 (2)		
Resveratrol	0.9-3.8(100)	ND-3.79 (92) 0.10-2.44 (91)	0.38-2.35 (105) 0.48-5.45(89)		0.31-1.44 0.116.403(107)		0.8-3.9 (95)	0.61-2.97 (99)	1.26-5.30 (2)		
Mirisetin		1.91-30.92(91)	0.20-2.17 (89)		0.33-0.91(93)					1.57-4.45 (101)	
Kuersetin		0.00-5.79 (92) 0.00-4.59 (90) 3.19-16.70 (91)	12.6-43.1(105) 0.00-38.55 (89)		0.76-2.01(93) 0.60-5.24	1.2-7.0(94)	2.4-11.3 (95)	2.1-17.1 (99)	3.09-7.40 (2)	1.2-7.0(101)	
Kampferol		0.13-0.54 (91)	0.00-6.49 (89)		0.10-1.13				0.00 (2)	0.06-0.20 (101)	

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

İlk olarak, ters faz HPLC yöntemiyle, formik asit (A), metanol (B) ve su (C) çözücüleriyile gradient elüsyon yapılarak, 1 mL.dak⁻¹ akış hızında, 254, 270, 280, 323 ve 365 nm dalgaboylarında, 14 polifenol bileşiğinin, 13.5 dakikada gibi kısa bir sürede ayrımı gerçekleştirilmiştir. Her bir madde için sistem uygunluk parametreleri hesaplanmıştır.

Sentetik şarap numuneleri hazırlanarak, sırasıyla sıvı-sıvı ve katı-faz ekstraksiyonu uygulanmıştır. En yüksek verim asidik ortamda etil asetatla yapılan sıvı-sıvı ekstraksiyonuyla elde edilmiştir (Şekil 6.1).

Şarap numuneleri, herhangi bir ön işlem yapılmaksızın HPLC sistemine doğrudan enjekte edildiğinde, pik yükseklikleri önemli ölçüde azalmış ve pik ayırıcılığı düşmüştür.



Şekil 6.1. Sıvı-sıvı ve katı-faz ekstraksiyonundaki % geri kazanım oranlarının gösterimi

Sıvı-sıvı ekstraksiyonu yöntemi valide edilerek ve yöntemimizin seçici, doğru ve kesin olduğu tespit edilmiştir. Her bir bileşik için saptama alt sınırı değeri bulunmuş ve literatür değerleriyle karşılaştırıldığında, oldukça düşük derişimlere inildiği görülmüştür.

Geliştirilen yöntemimiz Elazığ ve Malatya yöresinde üretilen kırmızı şaraplarda polifenol içeriklerini belirlemek için uygulanmıştır.

İspanya'da yapılan bir çalışmada, kırmızı şarapta polifenol tayininin, hem floresans hem de absorbans dedektörü kullanılarak yapıldığından bahsetmiştik (92). Her iki dedektörle saptanan kateşin ve epikateşin derişim değerlerinin birbiriyle uyumlu olmadığı görülmüştü. Şarabın absorbans ve floresans spektrumları karşılaştırıldığında, floresans özellik göstermeyen bir bileşimin kateşin pikiyle üst üste geldiği saptanmıştır.

Çalışmamızda HPLC-DAD ile sentetik şarapla yapılan ön denemelerde, standart madde pikleriyle çakışan herhangi örtücü bir pik gelmemiştir. Gerçek şarap numunelerine geçildiğinde ise, 323 ve 365 nm dalgaboyunda ve kateşinin alıkonma zamanında girişim yapan bir pik geldiği gözlenmiştir. Bu yüzden çalışmamızın bir sonraki aşamasında, (+)- kateşin, (-)- epikateşin ve t-resveratrol miktarlarının floresans dedektörle tekrar tayin edilmesi gerektiği değerlendirilmiştir.

DAD ve floresans dedektörle tayin edilen (+)- kateşin miktarları arasında büyük bir farklılık olduğu saptanmıştır. Bunun nedeni, şarap örneklerinin absorbans ve floresans spektrumları karşılaştırıldığında anlaşılmıştır. (+)- kateşin standart çözeltisinin pikinin alıkonma zamanında, floresans özellik göstermeyen, bilinmeyen bir bileşik girişim yapmaktadır. Bu yüzden, (+)- kateşin tayini için, floresans dedektör kullanımının uygun olduğu belirlenmiştir. (-)- epikateşin için de, çoğu şarap numunelerinde girişim olmaktadır. (+)-kateşin ve (-)- epikateşin için floresans dedektör kullanımı seçiciliği artırmıştır. t-resveratrol sonuçları, her iki dedektörde de benzerdir. Fakat daha duyarlı olan floresans dedektörde elde edilen sonuçlar daha yüksektir. Yöresel şaraplarda en fazla bulunan polifenolik bileşiklerin gallik asit, (+)- kateşin ve (-)- epikateşin olduğu bulunmuştur. Gallik asit 35.59 -50.89 mg L⁻¹, kateşin 1.80-19.74 mg L⁻¹ ve (-)- epikateşin 5.23-12.51 mg L⁻¹ aralığındadır. En yüksek t-resveratrol miktarı 1.44 mg L⁻¹ olarak Buzbağı Klasik Öküzgözü-Boğazkere (2008) kırmızı şarabında saptanmıştır.

8. KAYNAKLAR

1. Bianchini, F., Vainio, H. (2003). Wine and Resveratrol: Mechanisms of Cancer Prevention?. *European Journal of Cancer Prevention*, 12, 417-425.
2. Zotou, A., Frangi, E. (2008). Development and Validation of an SPE-LC Method for the Simultaneous Determination of trans-Resveratrol and Selected Flavonoids in Wine. *Chromatographia*, 67, 789-793.
3. Rijke, E., Out, P., Niessen, W. M. A., Ariese, F., Goojier, C., Brinkman, U. A. (2006). Analytical Separation and Detection Methods for Flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1112, 31-63.
4. Arce, L., Tena, M. T., Rios, A., Valcarcel, M. Anal. (1998). Determination of trans-Resveratrol and Other Polyphenols in Wines by A Continuous Flow Sample Clean-Up System Followed by Capillary Electrophoresis Separation *Chim. Acta*, 359, 27-38.
5. Pazourek, J., Gonzalez, G., Revilla, A. L., Havel, J., (2000). Separation of Polyphenols in Canary Islands Wine by Capillary Zone Electrophoresis without Preconcentration. *Journal of Chromatography A*, 874, 111-119.
6. Prior, R. L., Cao, G. (1999). Assessing Antioxidant Capacity in Plant Foods. *Free Radical Biology and Medicine*, 27, 11-15.
7. Gutteridge, J. M. C., Halliwell, B. (2010). Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 393, 561-564.
8. Halliwell, B. (1999). Antioxidant Defence Mechanisms: From Beginning to the end (of the Beginning). *Free Radical Research*, 31, 261-272.
9. Shahidi, F. (2000). Antioxidants in Food and Food Antioxidants. *Nahrung-Food* 44, 158-163.
10. Shahidi, F., Naczk, M. (2003). Phenolics in Food and Nutraceuticals, New York: Crc Press.
11. Shahidi, F. (2002). Antioksidants in Plants and Oleaginous Seeds, in Free Radicals in Food: Chemistry, Nutrition and Health Effects, *American Chemical Society*, 12, 162-175.
12. Wollgast, J., Anklam, E. (2000). Review: on Polyphenols in Theobroma Cacao. *Food Reserarch International*, 33, 423-447.

13. Erdman, J. W., Balentine, D., Arab, L., Beecher, G., Dwyer, J. T., Folts, J., Hollman, J., Keen, P., Mazza, G., Messina, M., Scalbert, A., Vita J., Williamson G., Burrowes, J. (2007). Flavonoids and Heart Health: Proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop, *the Journal of Nutrition*, 137, 718-737.
14. Guliyev, V. B., Harmandar, M. (2003). *Flavonoidler*, İstanbul: Aktif Yayınevi
15. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G. (1997). Reviews: Antioxidant Properties of Phenolic Compounds. *Trends in Plant Science*, 2, 152-158.
16. Pannala, A. S., Peter, C., O'Brien, J., Rice-Evans, C. A. (2001). Biochemical and Biophysical Research Communications, 282, 1101-1168.
17. Hertog, M. G., Hollman, P. C., Katan, M. B. (1992). Content of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids of 28 Vegetables and 9 Fruits Commonly Consumed in the Netherlands. *J Agric Food Chem*, 40, 2379–383.
18. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004). Polyphenols: Food Sources and Bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, 79, 727–47.
19. Arts, I. C., Vande, P. B., Hollman, P. C. (2000). Catechin Contents of Foods Commonly Consumed in the Netherlands. 2. Tea, Wine, Fruit Juices and Chocolate Milk. *J Agric Food Chem*, 48, 1752–57.
20. Mazza, G. (1995). Anthocyanins in Grapes and Grape Products. *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 35, 341–71.
21. Gu, L., Kelm, M. A., Hammerstone, J. F., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., Gebhardt, S., Prior, R. L. (2004). Concentrations of Proanthocyanidins in Common Foods and Estimations of Normal Consumption. *Journal of Nutrition*, 134, 613–17.
22. Spacil, Z., Novakova, L., Solich, P. (2008). Analysis of Phenolic Compounds by High Performance Liquid Chromatography and Ultra Performance Liquid Chromatography. *Talanta*, 76, 189-199.
23. Shahidi, F., Naczk, M. (1995). *Food Phenolics, Sources, Chemistry, Effects, Applications*. Lancaster, PA: Technomic Publishing Co Inc.
24. Tomas-Barberan, F. A., Clifford, M. N. (2000). Dietary Hydroxybenzoic acid Derivatives and Their Possible Role in Health Protection. *J. Sci. Food Agric.*, 80, 1024-32.
25. Clifford, M. N., Scalbert, A. (2000). Ellagitannins-Occurrence in Food, Bioavailability and Cancer Prevention. *J. Food Sci. Agric.*, 80, 1118–25.

26. Macheix, J.J., Fleuriet, A., Billot, J.(1990). Fruit Phenolics. Boca Raton: FL: CRC Press.
27. Sosulski, F., Krygier, K., Hogge, L. (1982). Esterified, and Insoluble-Bound Phenolic acids. 3. Composition of Phenolic acids in Cereal and Potato Flours. *J. Agric Food Chem.*, 30,337–40.
28. Lempereur, I., Rouau, X., Abecassis, J. (1997). Genetic and Agronomic Variation in Arabinoxylan and Ferulic acid Contents of Durum Wheat (*Triticum Durum* L.) Grain and its Milling Fractions. *J Cereal Sci.*, 25, 103–10.
29. Hatcher, D. W., Kruger, J. E. (1997). Simple Phenolic acids in Flours Prepared From Canadian Wheat: Relationship to Ash Content, Color, and Polyphenol Oxidase Activity. *Cereal Chem.*, 74, 337–43.
30. Matejcek, D., Klejdus, B., Mikes, O., Sterbova, D. (2003). Application of Solid-Phase Extraction for Determination of Phenolic Compounds in Barrigue Wines. *Anal. Bioanal. Chem.*, 377, 340-345.
31. Cadenas, E., Packer, L. (2002). Handbook of Antioxidants (2bs.), New York: Marcel Dekker.
32. Giachetti, C., Tognolo, C., Gnemi, P., Tenconi, A. (1999). Simultaneous Determination of trans- and cis- Resveratrol in Spiked Plasma by High-Performance Liquid Chromatography with Photo-Diode Array Uv-Vis and Fluorimetric Detection. *Chromatographia*, 50, 9-10.
33. Moreno-Labanda, J. F., Mallavia, R., Rez-Fons, L. P., Lizama, V., Saura, D., Micol, V. (2004). Determination of Piceid and Resveratrol in Spanish Wines Deriving From Monastrell (*Vitis Vinifera* L.) Grape Variety. *Agric. Food Chem.*, 52, 5396-5403.
34. Jeandet, P., Douillet-Breuil, Anne-Ceä L. Bessis, R., Debord, S., Sbaghi, M., Adrian, M. (2002). Phytoalexins from the Vitaceae: Biosynthesis, Phytoalexin Geneexpression in Transgenic Plants, Antifungal Activity and Metabolism. *Laboratoire J. Agric. Food Chem.*, 50, 2731-2741.
35. Langcake, P., Pryce, R. J. (1977). A New Class of Phytoalexins from Grapevines. *Experientia*, 33, 151-152.
36. Vitrac, X., Bornet, A., Vanderlinde, R., Vals, J., Richard, T., Delaunay, J. C., Merillon, J. M., Teissédre, P. L. (2005). Determination of Stilbenes (*l*-Viniferin,

trans-Astringin, trans-Piceid, cis- and trans-Resveratrol, ϵ -Viniferin) in Brazilian Wines. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 5664-69.

37. D., Di Majo, M., La Guardia, S., Giammanco, L., La Neve, M., Giammanco. (2008). The Antioxidant Capacity of Red Wine in Relationship with its Polyphenolic Constituents. *Food Chemistry*, 111, 45–49.

38. Fernández-Pachòs, M. S., Villano, D., Garcia-Parrilla, M. C., Troncoso, A. M. (2004). Antioxidant Activity of Wines and Relation with their Polyphenolic Composition, *Analytical Chimica Acta*, 513, 113–118.

39. Frankel, E. N., Waterhouse, A. L., Teissedre, P. L. (1995). Principal Phenolic Phytochemicals in Selected California Wines and their Antioxidant Activity in Inhibiting Oxidation of Human Low-Density Lipoproteins. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 43, 890–894.

40. Murray, C. J., Lopez, A. D., Evidence-Based Health Policy-Lessons from the Global Burden of Disease Study. (1996). *Science*, 274, 740-43.

41. Castelli, W. P. (1998). The New Pathophysiology of Coronary Artery Disease. *Am. J. Cardiol*, 82, 60-65.

42. Abeywardena, M. Y. (2003). Dietary Fats, Carbohydrates and Vascular Disease: Sri Lankan Perspectives. *Atherosclerosis*, 171, 157-61.

43. Zalba, G., Fortuno, A., San Jose, G., Moreno, M. U., Beloqui, O. D. J. (2007). Oxidative Stress, Endothelial Dysfunction and Cerebrovascular Disease. *Cerebrovasc Dis.*, 24, 24-29.

44. Renaud, S., De Lorgeril, M. (1992). Wine, Alcohol, Platelets, and the French Paradox for Coronary Heart Disease. *Lancet*, 339, 1523-26.

45. Ros, R., (1993). the Pathogenesis of Atherosclerosis: A Perspective Fort He 1990s. *Nature*, 362, 801-809.

46. Delmas, D., Jannin, B., Latruffe, N. (2005). Resveratrol: Preventing Properties Against Vascular Alterations and Ageing. *Mol Nutr Food Res.*, 49, 377-95.

47. Leifert, W. R., Abeywardena, Y. (2008). Cardioprotective Actions of Grape Polyphenols. *Nutrition Research*, 28, 729-37.

48. Lijima, K., Yoshizumi, M., Ouchi, Y. (2002). Effect of Red Wine Polyphenols on Vascular Smooth Muscle Cell Function- Molecular Mechanism of the “French Paradox”. *Mechanisms of Ageing and Development*, 123, 1033-1039.

49. Hain, R., Reif, H. J., Krause, E., Langebartels, R., Kindl H, V. B. (1993). Disease Resistance Results from Foreign Phytoalexin Expression in A Novel Plant. *Nature*, 361, 153-56.
50. Perrone, G., Nicoletti, I., Pascale, M., Rossi, A. D., Girolamo, A. D., Visconti, A. (2007). Positive Correlation Between High Levels of Ochratoxin A and Resveratrol-Related Compoun in Red Wines. *J Agric Food Chem.*, 55, 6807-812.
51. Halliwell, B., Rafter, J., Jenner, A. (2005). Health Promotion by Flavonoids, Tocopherols, Tocotrienols, and Other Phenols: Direct or Indirect Effects? Antioxidant or Not? *AmericanJournal of Clinical Nutrition*, 81, 268–76.
52. Duthie, G. G., Duthie, S. J., Kyle, J. A. M. (2000). Plant Polyphenols in Cancer and Heart Disease: Implications as Nutritional Antioxidants. *Nutrition Research Reviews*, 13, 79–106.
53. Stoclet, J.C., Chataigneau, T., Ndiaye, M., Oak, M. H., El Bedoui J, C. M. (2004). Vascular Protection by Dietary Polyphenols. *European Journal of Pharmacology*, 500, 299–313.
54. Arts, L. C. W., Hollman, P. C. H. (2005). Polyphenols and Disease Risk in Epidemiologic Studies. *American Journal Of Clinical Nutrition*, 81, 317–25.
55. Cushnie, T. P. T., Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial Activity of Flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, 343–56.
56. Kitamura, K., Honda, M., Yoshizaki, H., Yamamoto, S., Nakane, H., Fukushima, M. (1998). Baicalin, an Inhibitor of HIV-1Production in Vitro. *Antiviral Research*, 37, 131–40.
57. Li, B. Q., Fu, T., Dongyan, Y., Mikovits, J. A., Ruscetti, F. W., Wang, J. M. (2000). Flavonoid Baicalin Inhibits HIV-1 Infection at the Level of Viral Entry. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 276, 534–38.
58. Ehrhardt, C., Hrincius, E. R., Korte, V., Mazur, I., Droebner, K., Poetter, A. (2007). A Polyphenol Rich Plant Extract, CYSTUS052, Exerts Anti Influenza Virus Activity in Cell Culture Without Toxic Side Effects or the Tendency to Induce Viral Resistance. *Antiviral Research*, 76, 38–47.
59. Evers, D .L., Chao, C. F., Wang, X., Zhang, Z., Huong, S. M., Huang, E. S. (2005). Human Cytomegalovirus-Inhibitory Flavonoids: Studies on Antiviral Activity and Mechanism of Action. *Antiviral Research*, 68, 124–34.

60. Sies, H.(2007). Total Antioxidant Capacity: Appraisal of A Concept. *Journal of Nutrition*, 137, 1493–95.
61. Scalbert, A., Williamson, G. (2000). Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *Journal of Nutrition*, 130, 2073–85.
62. Schroeter, H., Williams, R. J., Matin, R., Iversen, L., Rice-Evans, C. A. (2000). Phenolic Antioxidants Attenuate Neuronal Cell Death Following Uptake of Oxidized Low-Density Lipoprotein. *Free Radical Biology and Medicine*, 29, 1222–33.
63. Williams, R. J., Spencer, J. P. E., Rice-Evans, C. (2004). Flavonoids: Antioxidants or Signalling Molecules? *Free Radical Biology and Medicine*, 36, 838-49.
64. Galati, G., O'brien, P. J. (2004). Potential Toxicity of Flavonoids and Other Dietary Phenolics: Significance for Their Chemopreventive and Anticancer Properties. *Free Radical Biology and Medicine*, 37, 287-303.
65. Decker, E. A. (1997). Phenolics: Prooxidants or Antioxidants? *Nutrition Reviews*, 55, 396-407.
66. Hirvonen, T., Virtamo, J., Korhonen, P., Albanes, D., Pietinen, P. (2001). Flavonol and Flavone Intake and the Risk of Cancer in Male Smokers. *Cancer Causes and Control*, 12, 789-96.
67. Boudet, A. M. (2007). Evolution and Current Status of Research in Phenolic Compounds. *Phytochemistry*, 68, 2722-35.
68. Snyder, L. R., Kirkland, J. J., Glajch, J. L. (1997). *Practical HPLC Method Development (2.Bs.)*, Kanada: A Wiley-Interscience Publication.
69. Yavuz, O., Aksoy, A. (2006). Örnek Hazırlamada Katı Faz Ekstraksiyonu Metodu. *F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi*, 20(3), 259-269.
70. Cengiz, G., Çeçen, Ş. Ş., Söylemezoğlu, T. (2004). GC/MS Yöntemi ile İdrarda Kokain Tayini. *J. Fac. Pharm.*, 33 (3), 139-149.
71. Guide to Solid Phase Extraction (1998). *Sigma-Aldrich Co. Bulletin*, 910, 1-12.
72. Mermet, M., Otto, M. V. (2004). *Analytical Chemistry: A modern Approach to Analytical Science (2.bs.)*. Germany: Wiley-Vch.
73. Skoog, D. A., Holler E. J., Crouch, S. R. (2007). *Principles of Instrumental Analysis (6.bs.)*. Kanada: Thomson Brooks / Cole.
74. Settle, F. A. (1997). *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*. New Jersey: Prentice Hall Ptr, Inc.

75. Cazes, J. (2005). *Ewing's Analytical Instrumentation Handbook (3.bs.)*. New York, U.S.A: Marcel Dekker.
76. Ahuja, S., Dong, M. W. (2005). *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC*. (6. Bs.). New York, North Carolina: Elsevier, Academic Press.
77. Kenkel, J. (1994). *Analytical Chemistry for Technicians (2.bs.)* Washington, D.C: Lewis Publishers.
78. Currell, G., (2000). *Analytical Instrumentation Performance Characteristics and Quality*. University of the West of England at Bristol, Bristol, Uk: John Wiley-Sons.
79. Rubinson, J. F., Rubinson, K. A. (1998). *Contemporary Chemical Analysis*. New Jersey: Prentice Hall Ptr, Inc.
80. Zakeri-Milani, P., Barzegar-Jalali, M., Tajerzadeh, H., Azarmi, Y., Valizadeh, H. (2005). Simultaneous Determination of Naproxen, Ketoprofen and Phenol Red in Samples from Rat Intestinal Permeability Studies: HPLC Method Development and Validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 39, 624-630.
81. The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics (1998). *EURACHEM Guide*, this Edition is Copyright © LGC (Teddington) Ltd, 3-75.
82. ICH Harmonised Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1) (2005) 1-17.
83. Causon, R. (1997). Validation of Chromatographic Methods in Biomedical Analysis Viewpoint and Discussion. *Journal of Chromatography B*, 689, 175-180.
84. ISO 5725-6: 1994 Accuracy (Trueness And Precision) of Measurement Methods and Results - Part 6: Use in Practice of Accuracy Values International Organization for Standardization / 01-Dec-1994 / 41.
85. Guidance for Industry U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM) May 2001 BP: Bioanalytical Method Validation.
86. Jimenez, C., Venturaa, R., Seguraa, J. (2002). Validation of Qualitative Chromatographic Methods: Strategy in Q Antidoping Control Laboratories. *Journal of Chromatography B*, 767, 341-351.
87. Gonzalez, A., G., Herrador, M.,A. (2007). A Practical Guide to Analytical Method Validation, Including Measurement Uncertainty and Accuracy Profiles. *Trac Trends in Analytical Chemistry*, 26 (3), 227-238.

- 88.** Garcia-Falcon, M. S., Perez-Lamela, C., Martinez-Carballo, E., Simal-Gandara, J. (2007). Determination of Phenolic Compounds in Wines: Influence of Bottle Storage of Young Red Wines on Their Evolution. *Food Chem.*, 105, 248-259.
- 89.** Rodriguez-Delgado, M. A., Malovana, S., Pelez, J. P., Borges, T. (2001). Separation of Phenolic Compounds by High-Performance Liquid Chromatography with Absorbance and Fluorimetric Detection. *J. Chromatogr. A*, 912, 249-24
- 90.** Tarola, A. M., Milano, F., Giannetti, V. (2007). Simultaneous Determination of Phenolic Compounds in Red Wines by HPLC-UV. *Analytical Letters*, 40, 2433-2445.
- 91.** La Torre, G. L., Saitta, M., Vilasi, F., Pellicanò, T., Dugo, G. (2006). Direct Determination of Phenolic Compounds in Sicilian Wines Liquid Chromatography with PDA and MS Detection. *Food Chemistry*, 94, 640-650.
- 92.** Tarola, A. M., Giannetti, V. (2007). Determination by LC Polyphenols in Italian Red Wine, *Chromatographia*, 65, 367-371.
- 93.** Kelebek, H., Canbas, A., Jourdes, M., Teissedre, P. L. (2010). Characterization of Colored and Colorless Phenolic Compounds in Öküzgözü Wines from Denizli and Elazığ Regions Using HPLC-DAD-MS. *Industrial Crops and Products*, 31, 499-508.
- 94.** Šeruga, M., Novak, I., Jakobek, L. (2011). Determination of Polyphenols Content and Antioxidant Activity of Some Red Wines by Differential Pulse Voltammetry, HPLC and Spectrophotometric Methods. *Food Chemistry*, 124, 1208-1216.
- 95.** Pour-Nikfardjam, M. S., Márk, L., Avar, P., Figler, M., Ohmacht, R. (2006). Polyphenols, Anthocyanins and t-Resveratrol in Red Wines from Hungarian Villany Region. *Food Chemistry*, 98, 453-462.
- 96.** Kallithraka, S., Arvanitoyannis, I. S., Kefalas, P., El-Zajouli, A., Soufleros, E., Psarra, E. (2001). Instrumental and Sensory Analysis of Greek Wines; Implementation of Principal Component Analysis (PCA) for Classification According to Geographical Origin. *Food Chemistry*, 73, 501-514.
- 97.** Fang F., Li, J. M., Pan, Q. H., Huang, W. D. (2007). Determination of Red Wine Flavanoids by HPLC and Effect of Aging. *Food Chemistry*, 101, 428-433.
- 98.** Malovana, S., Garcia-Montelongo, F. J., Perez, J. P., Rodriguez-Delgado, M. A. (2001). Optimization of Sample Preparation for Determination of t-Resveratrol and Other Polyphenolic Compounds in Wines by HPLC. *Analytica Chimica Acta*, 428, 245-253.

- 99.** Frankel, E. N., Waterhouse, A. L., Teissedre, P. L. (1995). Principal Phenolic Phytochemicals in Selected California Wines and Their Antioxidant Activity in Inhibiting Oxidation of Human Low-Density Lipoproteins. *J. Agr. Food Chem.*, 43, 890-894.
- 100.** Vitrac, X., Monti, J. P., Vercauteren, J., Deffieux, G., Mérillon, J. M. (2002). Direct Liquid Chromatographic Analysis of Resveratrol Derivatives and Flavanols in Wines with Absorbance and Fluorescence Detection, *Analytica Chimica Acta*, 458, 103-110.
- 101.** Woraratphoka, J., Intarapichet, K.O., Indrapichate, K. (2007). Phenolic Compounds and Antioxidative Properties of Selected Wines from Northeast of Thailand. *Food Chemistry*, 104, 1485-1490.
- 102.** Landrault, N., Poucheret, P., Ravel, P., Gasc, F., Cros, G., Teissedre, P. L. (2001). Antioxidant Capacities and Phenolics Levels of French Wines from Different Varieties and Vintages. *J. Agr Food Chem*, 49, 3341-3348.
- 103.** Carando, S., Teissedre, P. L., Pascual-Martinez, L., Cabanis, J. L.(1999).Levels of Flavan-3-ols in French Wines. *J. Agr. Food Chem*, 47, 4161-4166.
- 104.** Lo'pez, M., Mart'neza, F., Vallea, C. D., Ortea, C., Miró, M. (2001). Analysis of Phenolic Constituents of Biological Interest in Red Wines by HPLC. *Journal Chromatography A*, 922, 359-363.
- 105.** Viñas, P., C. López-Erroz, C., Mari nHernández, J. J., Hernández-Córdoba, M. (2000). Determination of Phenols in Wines by Liquid Chromatography with Photodiode Array and Fluorescence Detection. *Journal Of Chromatography A*, 871, 85-93.
- 106.** Dias, F. S., Lovillo, M. P., Barroso, C. G., David, J. M. (2010). Optimization and Validation of a Method for the Direct Determination of Catechin and Epicatechin in Red Wines by HPLC/Fluorescence. *Microchemical Journal*, 96, 17-20.
- 107.** Gürbüz, O., Göçmen, D., Dağdelen, F., Gürsoy, M., Aydın, S., Şahin, İ., Büyükuysal, L., Usta, M. (2007). Determination of flavan-3-ols and trans-resveratrol in Grapes and Wine Using HPLC with Fluorescence Detection. *Food Chemistry*, 100, 518-525.

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Malatya’ da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Malatya’da tamamladı. 2001 yılında İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesinde Kimya Bölümüne başladı. 2005 yılında mezun oldu. 2008 yılında İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı’nda yüksek lisansa başladı.