

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

**( DOKTORA TEZİ )**

**KAHVE ÖRNEKLERİNDE FENOLİK ASİTLERİN HPLC  
İLE TAYİNİ İÇİN METOT GELİŞTİRİLMESİ VE  
VALİDASYONU**

**PELİN KÖSEOĞLU YILMAZ**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. UFUK KOLAK**

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI  
ANALİTİK KİMYA PROGRAMI**

**İSTANBUL-2015**

## TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalı Doktora Programında Pelin Köseoğlu Yılmaz tarafından hazırlanan Kahve Örneklerinde Fenolik Asitlerin HPLC ile Tayini için Metot Geliştirilmesi ve Validasyonu başlıklı Doktora tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

12 / 05 / 2015

### Tez Sınav Jürisi

<u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>	<u>İmzası</u>
1.Prof. Dr. Gülaçtı Topçu (Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı)	
2.Prof. Dr. Ufuk Kolak (İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı) (Tez Danışmanı)	
3.Prof. Dr. Serap Sağlık Aslan (İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı)	
4.Doç. Dr. Olcay Sağırlı (İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı)(Tez İzleme Komitesi Üyesi)	
5.Yrd. Doç. Dr. Abdülislam Ertaş (Dicle Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı) (Tez İzleme Komitesi Üyesi)	

**BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün saffhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Pelin Köseoğlu Yılmaz

## İTHAF

Annem Nadire Köseoğlu, babam Engin Köseoğlu, kardeşim Sezin Köseoğlu  
ve eşim Mert Yılmaz'a ithaf ediyorum.

## TEŞEKKÜR

Bu doktora çalışmasının yapılmasına olanak sağlayan İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı'na teşekkür ederim.

Doktora tezi çalışmamın her aşamasında bilgisi, tecrübesi ve ilgisini benden esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ufuk Kolak'a her türlü yardımı ve değerli tavsiyeleri için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Sena Çağlar ve Araş. Gör. Ece Merve Yılmaz'a teşekkür ederim.

Tezimin gerek deneysel çalışmaları, gerekse yazım aşamasında hiçbir zaman desteğini esirgemeyen ve daima yanımda olan Araş. Gör. Dr. Işıl Gazioğlu'na teşekkür ederim.

Manevi desteğini her zaman hissettiğim Yrd. Doç. Tuğba Yılmaz Özden'e teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca olduğu gibi bana yine sonuna kadar destek olan ve güvenen annem Nadire Köseoğlu, babam Engin Köseoğlu ve kardeşim Sezin Köseoğlu'na sonsuz teşekkür ederim.

Son olarak, her türlü desteği, sevgisi, anlayışı ve sabrı için hayatımı paylaştığım eşim Mert Yılmaz'a sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 36622

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	İİ
BEYAN .....	İİİ
İTHAF .....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER .....	VI
TABLolar LİSTESİ .....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....	Xİİİ
ÖZET.....	XVII
ABSTRACT.....	XVIIİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kahve Hakkında Botanik Bilgiler ve Kahvenin Tarihçesi.....	3
2.2. Kahve Üretimi ve Tüketimi.....	4
2.3. Sekonder Metabolitler.....	5
2.3.1. Fenolik Bileşikler.....	5
2.3.2. Yeşil Kahve Çekirdeğinin Kimyasal İçeriği.....	10
2.3.3. Kavurma İşlemi ve Kimyasal İçerik Üzerindeki Etkileri.....	13
2.4. Kahvenin Biyolojik Aktiviteleri.....	14
2.5. Fenolik Bileşiklerin Tayini için Kullanılan Yöntemler .....	18
2.5.1. Örnek Ön-Hazırlama Yöntemleri .....	18
2.5.2. Ekstraksiyon Yöntemleri.....	19
2.5.2.1. Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu .....	19
2.5.2.2. Katı-Sıvı Ekstraksiyonu.....	19
2.5.2.3. Soxhlet Ekstraksiyonu .....	20
2.5.2.4. Matriks Katı-Faz Dispersiyonu (MSPD).....	20
2.5.2.5. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu.....	21
2.5.2.6. Ultrasonik Dalga Destekli Ekstraksiyon.....	21
2.5.2.7. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon.....	21
2.5.2.8. Katı Faz Ekstraksiyonu.....	22

2.5.3. Temizleme ve İzolasyon Yöntemleri .....	23
2.5.4. Tayin Yöntemleri .....	23
2.5.4.1. Kağıt Kromatografisi ve İnce Tabaka Kromatografisi .....	23
2.5.4.2. Folin-Ciocalteu Yöntemi .....	24
2.5.4.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) .....	24
2.5.4.4. Gaz Kromatografisi (GC) .....	25
2.6. Kahve Örneklerinde Fenolik Asitlerin Tayini için Kullanılan Yöntemler .....	26
2.7. Analitik Yöntem Geliştirme ve Validasyon Parametreleri .....	32
2.7.1. Seçicilik (Selectivity) .....	32
2.7.2. Doğrusallık (Linearity) .....	32
2.7.3. Doğruluk (Accuracy) .....	32
2.7.4. Kesinlik (Precision) .....	32
2.7.5. Aralık (Range) .....	33
2.7.6. Gözlenebilme Sınırı (Limit of Detection, LOD) .....	33
2.7.6.1. Gözlenebilme Sınırının Görsel Değerlendirme ile Belirlenmesi .....	33
2.7.6.2. Gözlenebilme Sınırının Sinyal/Gürültü Oranı ile Belirlenmesi .....	33
2.7.6.3. Gözlenebilme Sınırının, Yanıtın Standart Sapması ve Eğim ile Belirlenmesi .....	34
2.7.7. Tayin Sınırı (Limit of Quantification, LOQ) .....	34
2.7.7.1. Tayin Sınırının Görsel Değerlendirme ile Belirlenmesi .....	34
2.7.7.2. Tayin Sınırının Sinyal/Gürültü Oranı ile Belirlenmesi .....	34
2.7.7.3. Tayin Sınırının, Yanıtın Standart Sapması ve Eğim ile Belirlenmesi .....	34
2.8. Ağırlıklı (Weighted) Regresyon Analizi .....	35
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	36
3.1. Analizin Yapıldığı Yer .....	36
3.2. Materyal .....	36
3.3. Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler .....	36
3.4. Cihaz ve Gereçler .....	38
3.5. Fenolik Asit Miktar Tayini için Yöntem Koşullarının Belirlenmesi .....	39
3.5.1. Kolon, Hareketli Faz ve Dedektör Dalga Boylarının Seçimi .....	39
3.5.2. Ölçü Eğrilerinin Hazırlanması .....	39
3.5.3. Fenolik Asitlerin Ekstraksiyonu .....	40
3.6. Geliştirilen Yöntemin Validasyon Parametreleri .....	42

3.6.1. Doğrusallık .....	42
3.6.2. Uygunluk Parametreleri .....	42
3.6.3. Doğruluk.....	42
3.6.4. Kesinlik .....	42
3.6.5. Geri Kazanım.....	43
3.6.6. Gözlenebilme Sınırı .....	43
3.6.7. Tayin Sınırı .....	43
4. BULGULAR.....	44
4.1. Kahve Örneklerinde Fenolik Asit Miktar Tayini için Geliştirilen Yöntemin Koşulları.....	44
4.1.1. Kolon, Hareketli Faz ve Dedektör Dalga Boyu.....	44
4.1.2. Ölçü Eğrilerinin Hazırlanması.....	45
4.1.3. Fenolik Asitlerin Ekstraksiyonu .....	61
4.2. Fenolik Asitlerin Miktar Tayini için Geliştirilen Yöntemin Validasyon Sonuçları .....	62
4.2.1. Doğrusallık .....	62
4.2.2. Uygunluk Parametreleri .....	62
4.2.3. Doğruluk.....	64
4.2.4. Kesinlik .....	67
4.2.5. Geri Kazanım.....	72
4.2.6. Gözlenebilme Sınırı (LOD).....	72
4.2.7. Tayin Sınırı (LOQ).....	72
4.3. Geliştirilen ve Valide Edilen Yöntem ile Kahve Örneklerinde Fenolik Asit Miktar Tayini Sonuçları .....	73
5. TARTIŞMA .....	88
KAYNAKLAR .....	91
ÖZGEÇMİŞ .....	101

## TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Yeşil kahve çekirdeğinin kimyasal içeriği.....	10
Tablo 2-2: Yeşil kahvede bulunan klorojenik asit miktarları.....	12
Tablo 2-3: Kavurma derecesinin kahvede bulunan fenolik asitlerin miktarları üzerindeki etkisi .....	14
Tablo 2-4: Yeşil ve kavrulmuş kahve çekirdeklerinde bulunan fenolik asitlerin biyolojik aktiviteleri.....	17
Tablo 2-5: Kahve örneklerinde fenolik asitlerin tayini için geliştirilen HPLC yöntemleri .....	27
Tablo 3-1: Analiz örneklerinin menşeleri ve kodları .....	36
Tablo 4-1: Hareketli fazın gradient programlaması.....	44
Tablo 4-2: F-testinin sonuçları ve ağırlıklı regresyon analizinde kullanılan dönüşüm katsayıları.....	46
Tablo 4-3: 5CQA'nın ölçü eğrisine ait pik alanları (A), ortalama pik alanları ve yüzde bağıl standart sapma değerleri (% RSD) .....	52
Tablo 4-4: CA'nın ölçü eğrisine ait pik alanları (A), ortalama pik alanları ve yüzde bağıl standart sapma değerleri (% RSD).....	53
Tablo 4-5: 3CQA'nın ölçü eğrisine ait pik alanları (A), ortalama pik alanları ve yüzde bağıl standart sapma değerleri (% RSD) .....	54
Tablo 4-6: 4CQA'nın ölçü eğrisine ait pik alanları (A), ortalama pik alanları ve yüzde bağıl standart sapma değerleri (% RSD) .....	55
Tablo 4-7: FA'nın ölçü eğrisine ait pik alanları (A), ortalama pik alanları ve yüzde bağıl standart sapma değerleri (% RSD).....	56
Tablo 4-8: SNA'nın ölçü eğrisine ait pik alanları (A), ortalama pik alanları ve yüzde bağıl standart sapma değerleri (% RSD) .....	57
Tablo 4-9: PrCA'nın ölçü eğrisine ait pik alanları (A), ortalama pik alanları ve yüzde bağıl standart sapma değerleri (% RSD) .....	58
Tablo 4-10: PHBA'nın ölçü eğrisine ait pik alanları (A), ortalama pik alanları ve yüzde bağıl standart sapma değerleri (% RSD) .....	59
Tablo 4-11: VA'nın ölçü eğrisine ait pik alanları (A), ortalama pik alanları ve yüzde bağıl standart sapma değerleri (% RSD) .....	60

Tablo 4-12: Ortalama pik alanları kullanılarak elde edilen regresyon analizi sonuçları.	61
Tablo 4-13: SPE kartuşları ile geri kazanım (%) sonuçları .....	62
Tablo 4-14: Uygunluk parametreleri.....	63
Tablo 4-15: Standart çözelti ile yapılan doğruluk çalışmasının sonuçları.....	65
Tablo 4-16: K-2 örneği ile yapılan doğruluk çalışmasının sonuçları.....	66
Tablo 4-17: Standart çözeltiler ile gerçekleştirilen tekrarlanabilirlik çalışmasının sonuçları.....	68
Tablo 4-18: K-2 örneği ile gerçekleştirilen tekrarlanabilirlik çalışmasının sonuçları ....	69
Tablo 4-19: Standart çözeltiler ile gerçekleştirilen ara tekrarlanabilirlik çalışmasının sonuçları.....	70
Tablo 4-20: K-2 örneği ile gerçekleştirilen ara tekrarlanabilirlik çalışmasının sonuçları .....	71
Tablo 4-21: LOD ve LOQ değerleri.....	72
Tablo 4-22: K-1 örneğinde fenolik asit miktar tayini analiz sonuçları <sup>a</sup> .....	82
Tablo 4-23: K-2 örneğinde fenolik asit miktar tayini analiz sonuçları <sup>a</sup> .....	83
Tablo 4-24: K-3 örneğinde fenolik asit miktar tayini analiz sonuçları <sup>a</sup> .....	84
Tablo 4-25: K-4 örneğinde fenolik asit miktar tayini analiz sonuçları <sup>a</sup> .....	85
Tablo 4-26: K-5 örneğinde fenolik asit miktar tayini analiz sonuçları <sup>a</sup> .....	86
Tablo 4-27: K-6 örneğinde fenolik asit miktar tayini analiz sonuçları <sup>a</sup> .....	87
Tablo 4-28: K-7 örneğinde fenolik asit miktar tayini analiz sonuçları <sup>a</sup> .....	88

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Fenolik bileşikler.....	6
Şekil 2-2: Fenolik asitlerin ve türevlerinin biyosentezi.....	8
Şekil 2-3: Bitki, içecek ve gıda örneklerinde fenolik bileşiklerin analizi için kullanılan genel stratejiler.....	18
Şekil 3-1: C <sub>18</sub> kartuş prosedürü.....	41
Şekil 3-2: SAX kartuş prosedürü.....	41
Şekil 3-3: HLB kartuş prosedürü.....	41
Şekil 4-1: Standart çözeltilinin kromatogramı, a) 325 nm b) 215 nm.....	45
Şekil 4-2: 5CQA'ya ait ölçü eğrisi ( $y = 25142,124x - 9715,787$ ).....	47
Şekil 4-3: CA'ya ait ölçü eğrisi ( $y = 54784,900x - 18278,156$ ).....	47
Şekil 4-4: 3CQA'ya ait ölçü eğrisi ( $y = 26802,756x - 6289,579$ ).....	48
Şekil 4-5: 4CQA'ya ait ölçü eğrisi ( $y = 28503,942x - 6584,385$ ).....	48
Şekil 4-6: FA'ya ait ölçü eğrisi ( $y = 55529,062x - 19292,406$ ).....	49
Şekil 4-7: SNA'ya ait ölçü eğrisi ( $y = 51609,255x - 20405,394$ ).....	49
Şekil 4-8: PrCA'ya ait ölçü eğrisi ( $y = 66544,934x - 20722,503$ ).....	50
Şekil 4-9: PHBA'ya ait ölçü eğrisi ( $y = 44866,145x - 13411,303$ ).....	50
Şekil 4-10: VA'ya ait ölçü eğrisi ( $y = 63218,102x - 18349,719$ ).....	51
Şekil 4-11: Kahve örneklerinde miktar tayini yapılan fenolik asitler.....	74
Şekil 4-12: K-1 örneğine ait kromatogramlar, a: 325 nm c: 215 nm; Standart katılmış K-1 örneğine ait kromatogramlar, b: 325 nm d: 215 nm.....	75
Şekil 4-13: K-2 örneğine ait kromatogramlar, a: 325 nm c: 215 nm; Standart katılmış K-2 örneğine ait kromatogramlar, b: 325 nm d: 215 nm.....	76
Şekil 4-14: K-3 örneğine ait kromatogramlar, a: 325 nm c: 215 nm; Standart katılmış K-3 örneğine ait kromatogramlar, b: 325 nm d: 215 nm.....	77
Şekil 4-15: K-4 örneğine ait kromatogramlar, a: 325 nm c: 215 nm; Standart katılmış K-4 örneğine ait kromatogramlar, b: 325 nm d: 215 nm.....	78
Şekil 4-16: K-5 örneğine ait kromatogramlar, a: 325 nm c: 215 nm; Standart katılmış K-5 örneğine ait kromatogramlar, b: 325 nm d: 215 nm.....	79
Şekil 4-17: K-6 örneğine ait kromatogramlar, a: 325 nm c: 215 nm; Standart katılmış K-6 örneğine ait kromatogramlar, b: 325 nm d: 215 nm.....	80

Şekil 4-18: K-7 örneğine ait kromatogramlar, a: 325 nm c: 215 nm; Standart katılmış K-7 örneğine ait kromatogramlar, b: 325 nm d: 215 nm.....81

**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

$\mu\text{m}$	: Mikrometre
3-C-5-FQA	: 3- <i>O</i> -Kafeoil-5- <i>O</i> -feruloilkinik asit
4-C-5-FQA	: 4- <i>O</i> -Kafeoil-5- <i>O</i> -feruloilkinik asit
3-CoQA	: 3-Kumaroilkinik asit
4-CoQA	: 4-Kumaroilkinik asit
5-CoQA	: 5-Kumaroilkinik asit
3CQA	: 3- <i>O</i> -Kafeoilkinik asit
4CQA	: 4- <i>O</i> -Kafeoilkinik asit
5CQA	: 5- <i>O</i> -Kafeoilkinik asit
3,4-diCQA	: 3,4-Dikafeoilkinik asit
3,5-diCQA	: 3,5-Dikafeoilkinik asit
4,5-diCQA	: 4,5-Dikafeoilkinik asit
3,4-diFQA	: 3,4-Diferuloilkinik asit
3,4-diMCA	: 3,4-Dimetoksisinnamik asit
4-MCA	: 4-Metoksisinnamik asit
3,4,5-triMCA	: 3,4,5-Trimetoksisinnamik asit
3,4-diMCA	: 3,4-Dimetoksisinnamik asit
3-F-4-CQA	: 3- <i>O</i> -Feroil-4- <i>O</i> -kafeoilkinik asit
3FQA	: 3- <i>O</i> -Feroilkinik asit

4FQA	: 4- <i>O</i> -Feruloilkinik asit
5FQA	: 5- <i>O</i> -Feruloilkinik asit
A	: Pik alanı
ABTS	: 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
C <sub>18</sub>	: Oktadesil
CA	: Kafeik asit
CGA	: Klorojenik asit
cm	: Santimetre
CO <sub>2</sub>	: Karbondioksit
CoA	: Koenzim A
CQA	: Kafeoilkinik asit
CUPRAC	: Bakır (II) indirgeme antioksidan kapasitesi
diCQA	: Dikafeoilkinik asit
dk	: Dakika
DPPH	: 1,1-Difenil-2-pikril hidrazil
F <sub>exp</sub>	: Deneysel F değeri
F <sub>tablo</sub>	: F tablosundaki değer
FA	: Ferulik asit
FQA	: Feruloilkinik asit
FRAP	: Demir (III) indirgeme antioksidan gücü

g	: Gram
GC	: Gaz kromatografisi
HCOOH	: Formik asit
HLB	: Hidrofilik-lipofilik denge (hydrophilic-lipophilic balance)
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (high performance liquid chromatography)
HETP	: Teorik plaka eşdeğer yüksekliği (height equivalent of a theoretical plate)
ICH	: Beşeri tıbbi ürünlerin ruhsatlandırılmasına ilişkin teknik koşullar hakkında uluslararası uyum konferansı (The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)
ID	: İç çap (inner diameter)
kHz	: Kilohertz
L	: Litre
LOD	: Gözlenebilme sınırı
LOQ	: Tayin sınırı
MS	: Kütle spektrometrisi
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
N	: Teorik plaka sayısı
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	: Sodyum hidrojen fosfat

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	: Sodyum dihidrojen fosfat
NaOH	: Sodyum hidroksit
nm	: Nanometre
PHBA	: p-Hidroksibenzoik asit
PrCA	: Protokateşik asit
r <sup>2</sup>	: Korelasyon katsayısı
RME	: Bağıl ortalama hata (relative mean error)
RSD	: Bağıl standart sapma (relative standard deviation)
s <sup>2</sup>	: Varyans
SAX	: Kuvvetli iyon deęiřtirici (strong anion exchanger)
SNA	: Sinapik asit
SPE	: Katı faz ekstraksiyonu (solid phase extraction)
T	: Kuyruklanma faktörü
t <sub>R</sub>	: Alıkonma süresi
UV	: Ultra viyole
VA	: Vanilik asit

## ÖZET

Köseoğlu Yılmaz, P. (2015). Kahve Örneklerinde Fenolik Asitlerin HPLC ile Tayini için Metot Geliştirilmesi ve Validasyonu. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı. Doktora Tezi. İstanbul.

Bu doktora tezi kapsamında, kahvede bulunan fenolik asitlerin (5-O-kafeoilkinik asit, kafeik asit, 3-O-kafeoilkinik asit, 4-O-kafeoilkinik asit, ferulik asit, sinapik asit, protokateşik asit, p-hidroksibenzoik asit ve vanilik asit) kantitatif tayini için yeni bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirildi ve valide edildi. Geliştirilen yöntemde ayırmalar C<sub>18</sub> koruyucu kolon (2,1 × 10 mm, 3 µm ID) ve C<sub>18</sub> analitik kolon (2,1 × 50 mm, 3 µm ID) ile gerçekleştirildi. Hareketli faz olarak % 0,08'lik o-fosforik asit çözeltisi (suda) ile metanol/su/asetonitril (85:10:5) çözeltisi kullanıldı ve gradient program uygulandı. Spektrofotometrik dedektör ile çalışıldı ve dedeksiyon dalga boyu 5-O-kafeoilkinik asit, kafeik asit, 3-O-kafeoilkinik asit, 4-O-kafeoilkinik asit, ferulik asit ve sinapik asit için 325 nm, protokateşik asit, p-hidroksibenzoik asit ve vanilik asit için 215 nm olarak belirlendi. Kolon sıcaklığı 40°C'ye ayarlandı. Doğrusal aralık 5-O-kafeoilkinik asit, kafeik asit, ferulik asit, sinapik asit, protokateşik asit, p-hidroksibenzoik asit ve vanilik asit için 0,50-75,00 mg/L, 3-O-kafeoilkinik asit 0,50-1000,00 mg/L ve 4-O-kafeoilkinik asit için 0,50-250,00 mg/L olarak belirlendi. Gözlenebilme ve tayin sınırları sırasıyla 0,48-0,84 mg/L ve 1,45-2,54 mg/L aralıklarında bulundu. Kesinlik ve doğruluk değerleri 1,00 ve 25,00 mg/L'lik standart çözeltilerin ve 2 farklı miktarda (1,00 ve 25,00 mg/L) standart katılmış kahve örneğinin analiz sonuçları ile hesaplandı. Fenolik asitlerin kahve örneklerinden ekstraksiyonu hidrofilik-lipofilik denge kartuşları kullanılarak katı faz ekstraksiyonu yöntemiyle gerçekleştirildi. Farklı menşeli 7 adet kahve örneği ile çalışıldı. Sonuç olarak, geliştirilen ve valide edilen yöntemin kahve örneklerinde 9 adet fenolik asidin yüksek doğruluk ve tekrarlanabilirlik ile aynı anda kantitatif tayini için uygun olduğu saptandı.

**Anahtar Kelimeler:** Kahve, Fenolik Asit, HPLC, Katı Faz Ekstraksiyonu, Metot Geliştirme ve Validasyon

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 36622

## ABSTRACT

Köseoğlu Yılmaz, P. (2015). Method Development and Validation for Determination of Phenolic Acids in Coffee Samples by HPLC. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Analytical Chemistry. PhD Thesis. İstanbul.

In this PhD thesis, a new high performance liquid chromatography method for quantitative determination of phenolic acids (5-O-caffeoylquinic acid, caffeic acid, 3-O-caffeoylquinic acid, 4-O-caffeoylquinic acid, ferulic acid, sinapic acid, protocatechuic acid, p-hydroxybenzoic acid and vanillic acid) in coffee was developed and validated. Separations were performed using C<sub>18</sub> guard column (2.1 × 10 mm, 3 µm ID) and C<sub>18</sub> analytical column (2.1 × 50 mm, 3 µm ID) in the developed method. 0.08 % o-Phosphoric acid solution (aqueous) and methanol/water/acetonitril (85:10:5) solution were used as mobile phase and gradient program was applied. Spectrophotometric detector was used, and detection wavelength was determined as 325 nm for 5-O-caffeoylquinic acid, caffeic acid, 3-O-caffeoylquinic acid, 4-O-caffeoylquinic acid, ferulic acid, sinapic acid, and 215 nm for protocatechuic acid, p-hydroxybenzoic acid and vanillic acid. Column temperature was fixed at 40°C. Linear range was 0.50-75.00 mg/L for 5-O-caffeoylquinic acid, caffeic acid, ferulic acid, sinapic acid p-hydroxybenzoic acid and vanillic acid, 0.50-1000.00 mg/L for 3-O-caffeoylquinic acid and 0.50-250.00 mg/L for 4-O-caffeoylquinic acid. Limits of detection and quantification were in the range of 0.48-0.84 mg/L and 1.45-2.54 mg/L, respectively. Precision and accuracy values were calculated by analysis results of standard solutions at 1.00 and 25.00 mg/L and coffee sample spiked at 2 different amounts (1.00 and 25.00 mg/L). Extraction of phenolic acids from coffee samples were performed by solid phase extraction method using hydrophilic-lipophilic balance cartridges. Seven coffee samples from different origins were studied. As a result, the developed and validated method was found to be appropriate for simultaneous quantitative determination of 9 phenolic acids in coffee samples with high accuracy and repeatability.

**Key Words:** Coffee, Phenolic Acid, HPLC, Solid Phase Extraction, Method Development and Validation

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 36622

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Fenolik asitler karboksilik asit grubu içeren fenollerdir. Fenolik asitler hidroksibenzoik ve hidroksisinnamik asit türevleri olmak üzere iki farklı iskelete sahiptirler. Hidroksil gruplarının sayısı ve aromatik halkadaki pozisyonu fenolik asitlerde çeşitlilik sağlamaktadır.

Doğal ürünlerde bulunan sekonder metabolit gruplarından biri olan fenolik asit türevlerinin biyosentezi aromatik bir amino asit olan L-fenilalanine dayanmaktadır. Fenolik asitler bitkilerde, protein sentezi, enzim aktiviteleri, fotosentez gibi biyolojik süreçlerde görev almaktadır. Fenolik asitlerin gıda kalitesi üzerinde de çeşitli etkileri bulunmaktadır. Fenolik asit içerikleri gıdaların renk, tat ve antioksidan özellikleri ile bağlantılıdır. Gıda endüstrisinde, gıdaların fenolik asit içeriklerinin belirlenmesi, fenolik asitlerin meyve olgunlaşması ve enzimatik reaksiyonların inhibisyonu üzerindeki etkileri ile gıda koruyucusu olarak kullanılmaları üzerine pek çok araştırma yapılmaktadır.

Bitki kökenli yiyecekler (meyve, sebze, baharat, çay, kahve, v.b.) zengin fenolik asit içeriğine sahiptirler. Bu tip gıdalar koroner kalp hastalığı, inme ve kanser gibi pek çok hastalığın inhibisyonunda etkilidirler. Ayrıca fenolik asitler yapılarındaki aromatik halkada bulunan hidroksil grubunun aktifliği sebebiyle antioksidan özelliğe sahiptirler. Bunun yanı sıra antiviral ve antibakteriyel etki de göstermektedirler.

Rubiaceae familyasına ait *Coffea* cinsi altmıştan fazla türe sahiptir. *Coffea* cinsinin kavrulmuş çekirdekleri ile hazırlanan kahve, dünyada su ve çaydan sonra en fazla tüketilen içecektir. Günümüzde tüketiciler genellikle daha kaliteli kabul edilen *C. arabica* türünü tercih etmektedirler.

Kavrulmamış kahve çekirdeklerinin kimyasal içeriği polisakkaritler, monosakkaritler, lipitler, steroller, yağ asitleri, fenolik asitler, polifenoller, alkaloidler, pentasiklik diterpenler, diterpenik alkoller, diterpenik ve triterpenik esterlerden meydana gelmektedir. Kavrulma süresine ve sıcaklığa bağlı olarak kahvenin kimyasal bileşimi ve biyolojik aktivitesi değişmektedir. Bu işlem sırasında bazı bileşikler parçalanabilmekte ve diğer birçoğu da Maillard reaksiyonları, karbonhidrat

karamelizasyonu ve organik bileşiklerin pirolizi gibi reaksiyonlar sonucu yeni makromoleküller oluşturabilmektedir.

Kahve çekirdekleri klorojenik asitler açısından oldukça zengindir ve önemli miktarda 3-*O*-kafeoilkinik asit, 4-*O*-kafeoilkinik asit, 5-*O*-kafeoilkinik asit ve feruloilkinik asit analogları olan 3,4-*O*-, 3,5-*O*- ve 4,5-*O*-dikafeoilkinik asit ve daha düşük oranlarda 4-*O*-*p*-kumaroilkinik asit ile 5-*O*-*p*-kumaroilkinik asit içermektedir. Ayrıca kahve çekirdeklerinde sirinjik asit, *p*-kumarik asit, gallik asit, sinapik asit, kafeik asit, *p*-hidroksibenzoik asit, protokateşik asit, vanilik asit ve ferulik asit gibi çeşitli fenolik asitler de bulunmaktadır.

Kahve çekirdeklerinde bulunan fenolik asitlerin kahvenin kalitesi ve biyolojik aktiviteleri üzerindeki etkileri sebebiyle kahve örneklerinin fenolik asit profillerinin belirlenmesi ve miktar tayinleri üzerine pek çok çalışma yapılmaktadır.

Bu doktora tezi kapsamında, kahvede bulunan 5-*O*-kafeoilkinik asit, kafeik asit, 3-*O*-kafeoilkinik asit, 4-*O*-kafeoilkinik asit, ferulik asit, sinapik asit, protokateşik asit, *p*-hidroksibenzoik asit ve vanilik asidin aynı anda kantitatif tayini için yeni bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirilmesi ve valide edilmesi amaçlandı.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kahve Hakkında Botanik Bilgiler ve Kahvenin Tarihçesi

Kahve çekirdeği Rubiaceae familyasının üyesi olan *Coffea* cinsine ait türlerin kurutulmuş tohumudur. Kahve çekirdeği elde etmek için yetiştirilen başlıca türler *C. arabica* L., *C. canephora* L., *C. liberica* L. ve bunların varyeteleridir (Baytop 1977 pp. 299). Bu türler 5-8 metre uzunluğunda, basit yapraklı, beyaz çiçekli ve kırmızı meyveli ağaçlardır. Kahve çekirdeği 8-12 mm uzunlukta, 6-8 mm genişlikte, sert, soluk yeşil veya sarımsı yeşil renklidir. Bir tarafı düz diğer tarafı kabarık tanelerden oluşmaktadır. Kokusu hafif, tadı acımsıdır. Anayurdu Habeşistan ve Sudan'dır. Ayrıca tropikal Afrika ve Güney Amerika'da da yetiştirilmektedir (Baytop 1984 pp. 266-267).

İlk zamanlarda kahve içecek olarak tüketilmemiştir. Kahve çekirdekleri genellikle yağ ile karıştırılıp uzun yolculuklar için besin kaynağı olarak kullanılmıştır. M.S. I. ve V. yüzyıllar arasında Arabistan ve Doğu Afrika arasındaki ticaret yolunda çalıştırılan kölelerin de gıda olarak kahve çekirdeklerini tükettiği belirtilmiştir. Bu sayede kahvenin Etiyopya üzerinden bugünkü adı Yemen olan Moka bölgesine taşındığı rivayet edilmektedir (Bond 2012).

Diğer pek çok yiyecek ve içecek türleri gibi kahvenin de şu anki tüketim şekli ilk haline göre oldukça farklıdır. Günümüzde kahve olarak adlandırılan içecek *Coffea* türlerinin meyvelerinin dış kısmının çıkarılması, çekirdeğinin kurutulması, kavrulması, öğütülmesi ve demlenmesi ile elde edilmektedir. Kahvenin bir yiyecek çeşidinden bir içeceğe ilk defa nasıl dönüştürüldüğü tam olarak bilinmemekle beraber konuyla ilgili bazı efsaneler mevcuttur. Bu efsanelerden birine göre kahve ilk defa Hacı Ömer isimli bir derviş tarafından içecek olarak tüketilmiştir. Düşmanları tarafından açlıktan öleceği düşünülerek Yemen dışındaki bir çöle sürülen Hacı Ömer farklı meyveleri bulunan küçük bir ağaçlık bulmuş ve bu meyveleri tatmıştır. Fakat meyveler çok acı olduğu için onları kavurmuştur. Bu sefer de çok sertleşen meyveleri yumuşatmak için su eklemiş ve suyun kahverengiye döndüğünü görmüştür. Böylece ilk defa günümüzdeki kahveye yakın bir içecek elde etmiştir (Bond 2012).

## 2.2. Kahve Üretimi ve Tüketimi

*Coffea* cinsi altmıştan fazla türe sahiptir. Bunlardan sadece *C. arabica*, *C. canephora* ve *C. liberica* türleri ekonomik açıdan değerlidir (Sánchez-González ve ark. 1999). *C. arabica* ve *C. canephora*'nın orijini Etiyopya, Fildişi Sahilleri ve Uganda iken, *C. liberica*'nınki Liberya'dır (Stalmach ve ark. 2012). Günümüzde kahve tüketicileri genellikle diğer türlerden daha yüksek kalitede olan *C. arabica* çekirdeklerini tercih etmektedir (González ve ark. 2001).

Dünyada su ve çaydan sonra en çok tüketilen içecek kahvedir. Yapılan araştırmalar sonucu düzenli olarak tüketilen alkolsüz içeceklerin %75'ini kahvenin oluşturduğu belirlenmiştir (Rojo Camargo ve ark. 1999). Bu sebeple kahve çekirdekleri sadece 2009 yılında dünya çapında 7,2 milyon ton ihracat ile ekonomik açıdan oldukça önemli bir tarım ürünüdür. Elliye yakın kahve üreten ülke bulunmaktadır ve bunların en önemlileri Brezilya, Vietnam, Kolombiya, Endonezya ve Uganda'dır (ICO 2010).

Kahve ilk defa Mısır'ın fethinden sonra Müslüman tüccarlar tarafından İstanbul'a getirilmiş, Kanuni Sultan Süleyman döneminde (1520-1566) gündelik hayata taşınmış ve yaygınlaşmıştır. Ardından Türk askerlerinin konuşlandığı yerlere taşınan kahve, Anadolu, Balkanlar ve Macaristan'a kadar yayılmıştır. Kahvenin Avrupa'ya yayılması da Türkler tarafından sağlanmıştır. İlk olarak Türk elçileri tarafından Paris ve Viyana'da tanıtılmış, daha sonra bütün orta Avrupa'da yayılmıştır. Kahvenin Avrupa'ya taşınmasındaki diğer etken kişiler ise, kahve üzerinde bilimsel incelemeler yapmak veya kahve ticareti yapmak isteyen seyyahlar olmuştur (Durukan 2013).

Kahvenin Türk kültüründe oldukça önemli bir yeri vardır. Türkler tarafından bulunan bir pişirme metodu ile hazırlanan Türk kahvesi, kendine has tadı, köpüğü, kokusu ve sunuluş biçimiyle özgün bir kimliğe ve geleneğe sahiptir. Türk kahvesi telvesi ile ikram edilen tek kahve türüdür. Türk Edebiyatı'nda kahveyle ilgili pek çok deyim, atasözü, mani ve şiir bulunmaktadır (Durukan 2013).

Türkiye kahve tüketiminde Avrupa'ya göre geride kalmaktadır. Avrupa'da kişi başına yıllık kahve tüketimi 5-6 kilogram olup bu değer İskandinav Ülkelerinde 11-12 kilografa kadar yükselmektedir. Türkiye'de ise tüketim kişi başına yılda 250 gramdır. Kahve ülkemizde Türk kahvesi, hazır kahve ve filtre kahve olmak üzere üç ayrı şekilde tüketicilere sunulmaktadır. Toplam tüketimin %75'i Türk kahvesinden, %25'i hazır, çekirdek ve filtre kahve çeşitlerinden oluşmaktadır (İTO 2004).

### 2.3. Sekonder Metabolitler

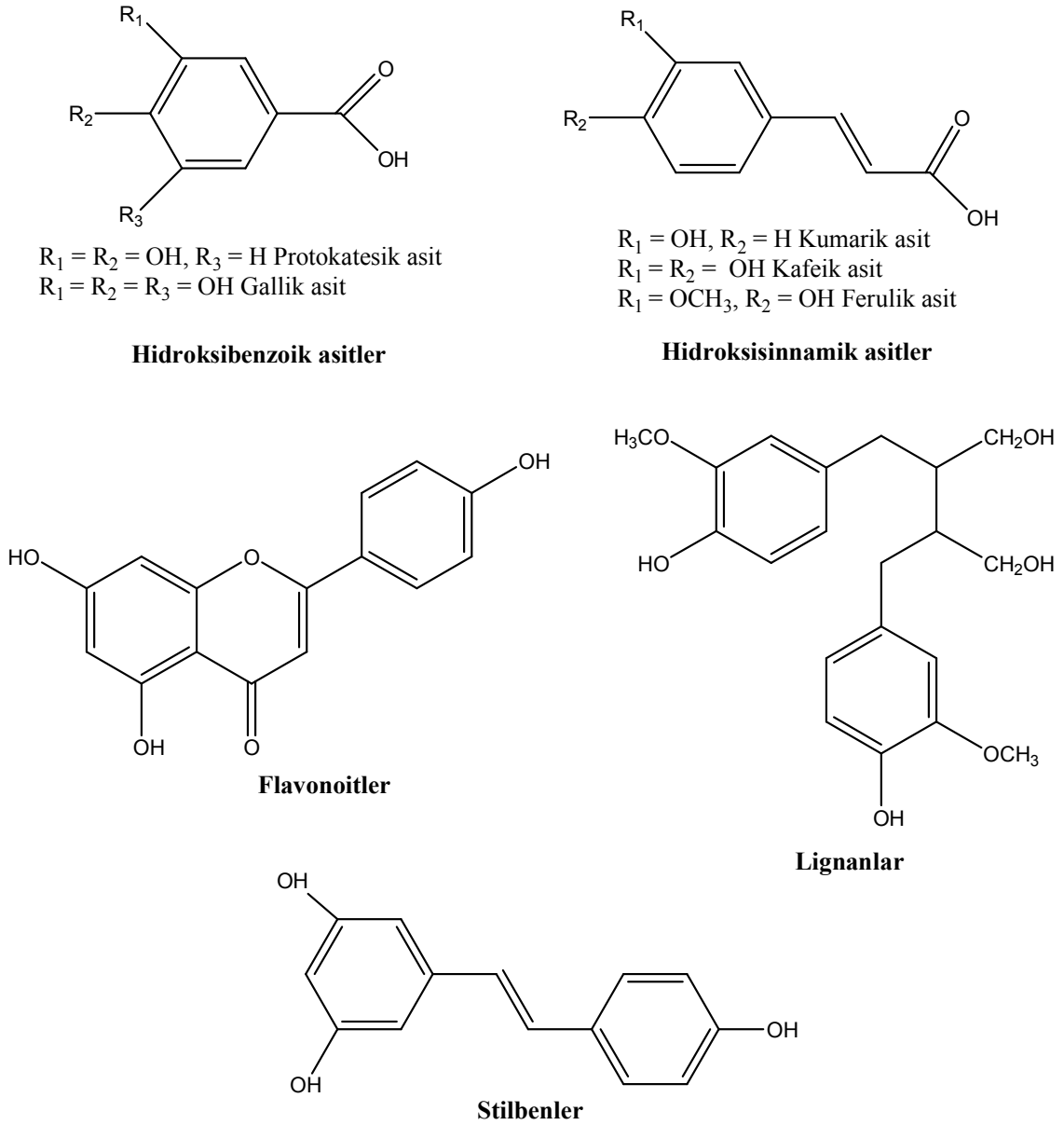
Bitkiler, sekonder metabolitler olarak adlandırılan farklı yapılardaki organik molekülleri sentezlemektedirler. Sekonder metabolit sentezi fotosentez ile başlamaktadır. Sekonder metabolitler genellikle biyosentez mekanizmalarına göre sınıflandırılmaktadır. Fenolik bileşikler, terpenler ve steroidler, ve alkaloidler olmak üzere üç ana başlık altında incelenmektedirler. Lignin sentezine dahil olan fenolik bileşikler çoğu bitkide bulunurken alkaloidler belirli cinslerde bulunmaktadır (Bourgaud ve ark. 2001). Bitkiyi dış etkenlerden koruyan sekonder metabolitler bitki için fizyolojik açıdan önem taşımazken biyolojik açıdan oldukça önemlidirler.

Halk arasında bitkiler, yüzyıllardan beri tedavi edici özelliklerinden dolayı yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Bitkilerin sahip oldukları aktivitelerden sorumlu olan sekonder metabolitler günümüzde farmasötik, kozmetik ve özellikle nutrasötik ürünlerin bileşimlerinde yer almaktadırlar. İlaç endüstrisinde kullanılan moleküllerin %25'ini bitki kökenli maddeler oluşturmaktadır (Bourgaud ve ark. 2001).

#### 2.3.1. Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler yapılarında bir ya da daha fazla fenol grubu içeren moleküllerdir. Kendi içlerinde fenolik asitler, flavonoidler, stilbenler ve lignanlar olarak sınıflandırılmaktadırlar. Fenolik bileşiklerin iskelet yapıları Şekil 2-1'de verildi.

Fenolik bileşik gruplarından biri olan fenolik asitler, karboksilik asit grubu içeren fenollerdir. Fenolik asitler, hidrosibenzoik ve hidrosisinnamik asit türevleri olmak üzere iki farklı iskelete sahiptirler (Şekil 2-1). Temel iskelet yapısı aynı olmakla beraber hidroksil gruplarının sayısı ve aromatik halkadaki pozisyonu fenolik asitlerde çeşitlilik sağlamaktadır. Protokateşik asit, gallik asit, p-hidrosibenzoik asit gibi türler hidrosibenzoik asit iskeletine sahiptirler. Kafeik asit, kumarik asit, ferulik asit, sinapik asit gibi fenolikler ise hidrosisinnamik asit yapısındadırlar (Brandšteterová ve Žiaková-Čaniová 2002, Robbins 2013).



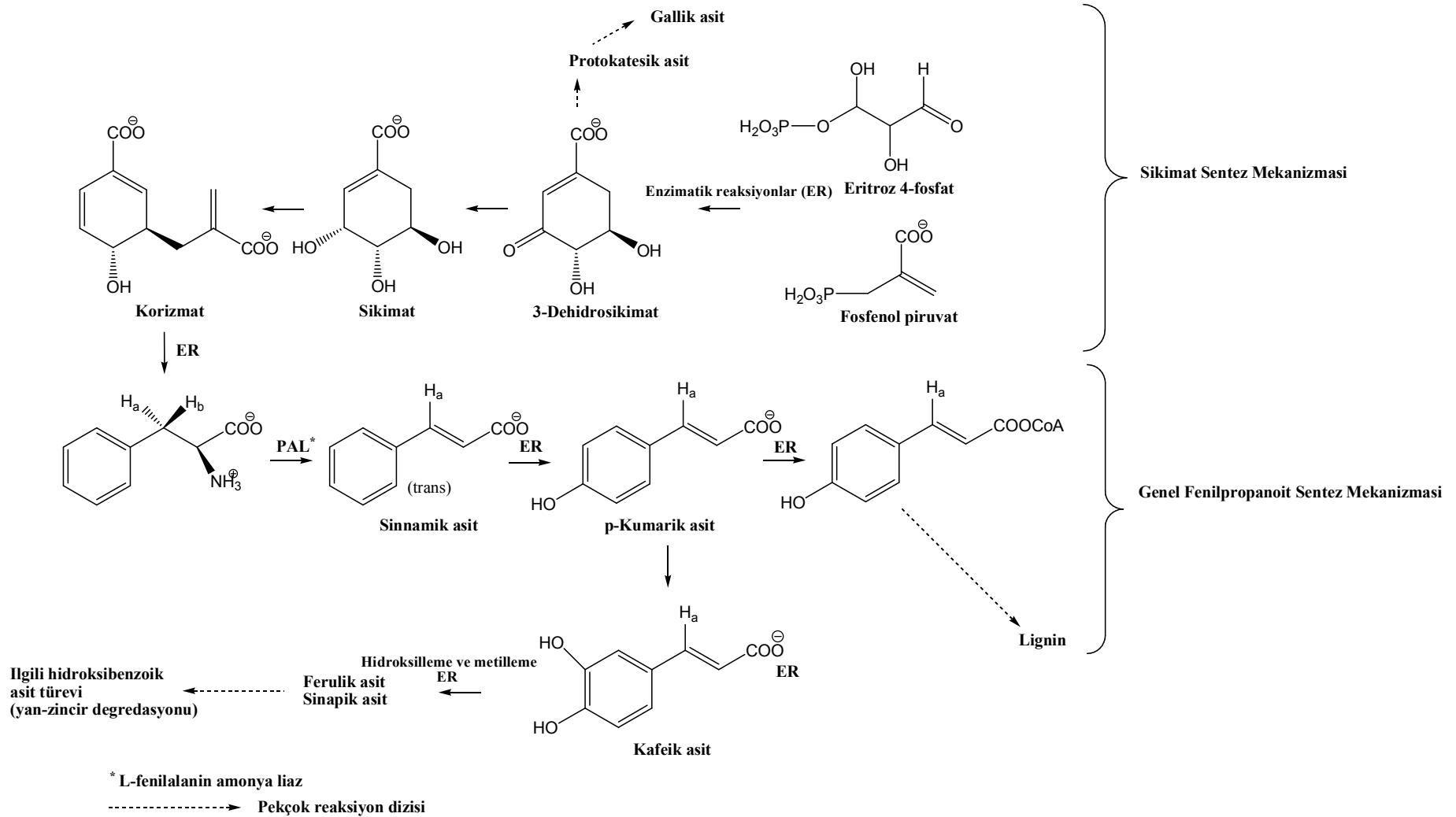
**Şekil 2-1: Fenolik bileşikler**

Hidroksibenzoik ve hidroksisinnamik asit türevlerinin biyosentezi aromatik bir amino asit olan L-fenilalanin'e dayanmaktadır. L-Fenilalanin şikimat sentezinin son ürünü olan korizmattan sentezlenmektedir. L-Fenilalaninin hidroksisinnamik asit türlerine dönüşmesi genel fenilpropanoit metabolizması olarak adlandırılan üç basamaklı bir mekanizma ile gerçekleşmektedir. İlk basamakta L-fenilalaninin spesifik deaminasyonu ile sinnamik iskeletinde bir *trans*-çift bağ meydana gelmektedir. Aromatik halkanın 4 pozisyonunda hidroksillenmesi p-kumaratı oluşturmaktadır.

Enzimatik reaksiyon ile CoA esteri (esterin aktif bir formu) meydana gelmektedir. p-Kumarat oluşumundan sonra ve CoA ligaz reaksiyonundan önce meydana gelen diğer basamaklar aromatik halkanın tekrar hidrosillenmesi ve metilleme reaksiyonlarını içermektedir. Bunların sonucunda kafeat, ferulat ve sinapat türevleri oluşmaktadır. Benzoik asit türevlerinin oluşumu için önerilen iki farklı yol bulunmaktadır. Bunlar hidrosisinnamik asit türevlerinin yan zincir degradasyonu (asetat çıkışı) ve 3-dehidrosikimatın enzimatik reaksiyonlar ile benzoik asit türevlerine dönüştürülmesidir (Şekil 2-2).

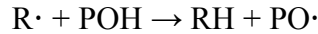
Bitkilerde fenolik asitlerin çoğunluğu ester, eter veya asetal bağlar ile bitkinin diğer bileşenlerine (selüloz, proteinler, lignin, v.b.), daha büyük polifenollere (flavonoitler, v.b.), daha küçük organik moleküllere (glukoz, kinik asit, maleik asit, tartarik asit, v.b.) veya diğer doğal bileşiklere (terpenler, v.b.) bağlı halde bulunurken sadece az miktarı serbest asit halindedir. Bu durum fenolik asit analizlerini daha karmaşık hale getirmektedir (Robbins 2013).

Bitkilerde fenolik asitlerin protein sentezi, enzim aktiviteleri, fotosentez gibi farklı görevleri olduğu bilinmektedir. Hidrosibenzoik ve hidrosisinnamik asit türevleri meyve, sebze ve tahılların tohum, yaprak, kök ve gövde kısımlarında bulunabilmektedir. Fenolik asitler bitkilerde homojen olarak dağılmamıştır. Bitkinin yetiştirme koşullarının fenolik asit içeriği üzerinde etkisi vardır (Robbins 2013).

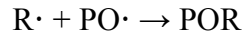


Şekil 2-2: Fenolik asitlerin ve türevlerinin biyosentezi

Bitki kökenli yiyecekler (meyve, sebze, baharat, çay, kahve, v.b.) zengin fenolik asit içeriğine sahiptirler. Beslenme tarzına göre günlük 25 mg – 1,0 g arasında fenolik asit alımı gerçekleşmektedir. Yapılan literatür araştırması sonucu, bu tip gıdaların tüketiminin koroner kalp hastalığı, inme ve kanser gibi pek çok hastalığın inhibisyonunda etkili olduğu belirlenmiştir. Fenolik asitler yapılarındaki aromatik halkada bulunan hidroksil grubunun aktifliği sebebiyle antioksidan özelliğe sahiptirler. Lipitlerin ve diğer moleküllerin oksidasyonunu serbest radikallere hidrojen atomu vererek engellemektedirler.



Fenoksi radikali ara ürünleri ( $PO\cdot$ ) rezonans sebebiyle kısmen kararlıdır ve bu nedenle yeni bir zincir reaksiyonu oluşmamaktadır. Ayrıca fenoksi radikalleri ortamda bulunan diğer serbest radikaller ile tepkimeye girerek yayılma tepkimelerini durdurmaktadırlar.



Fenolik asitler ve esterlerinin indirgeme aktiviteleri molekülde bulunan serbest hidroksil gruplarının sayısına ve sterik etkiye bağlıdır. Rezonans ile fenil halkasına bağlı olan  $-CH=CH-COOH$  grubunun ariloksi radikallerini stabilize etme etkisi sebebiyle hidroksisinnamik asitler hidroksibenzoik asitlerden daha aktiftir (Dai ve Mumper 2010).

Fenolik asitler antioksidan aktivitelerinin yanı sıra antiviral ve antibakteriyal etki de göstermektedirler (Jacob ve Burri 1996, Huang ve Ferraro 1992, Powless ve Ness 1996). Kafeik asit immünoregülasyon hastalıkları, astım ve alerjik reaksiyonlara sebep olan lökotrienlerin biyosentezini engellemektedir (Koshihara ve ark. 1984). Ayrıca kafeik asit ve esterlerinin kolon kanserine karşı tümör oluşumunu engelledikleri belirtilmiştir (Rao ve ark. 1993, Olthof ve ark. 2001). Bazı fenolik asitlerin AP-1 transkripsiyon aktivitesinin inhibisyonu ile ilgili oldukları belirlenmiştir. AP-1 proteini inflamasyon, hücre farklılaşması ve proliferasyonunu kontrol eden prosesleri olumsuz etkileyen bir aktivatör proteindir (Maggi-Capeyron ve ark. 2001). Kafeoilkinik asit ve dikafeoilkinik asit gibi kafeik asit türevleri HIV-1 (Human immunodeficiency virus type 1) virüsünün integrasına karşı kuvvetli ve seçici bir inhibisyon aktivitesi göstermektedir (King ve ark. 1999).

### 2.3.2. Yeşil Kahve Çekirdeğinin Kimyasal İçeriği

Yeşil (kavrulmamış) kahve çekirdeklerinin kimyasal içeriği kahve ağacının türü ve orijini ile çeşitlilik göstermektedir (Brezová ve ark. 2009). Yeşil kahve çekirdekleri polisakkaritler, monosakkaritler, lipitler, steroller, yağ asitleri, fenolik asitler ve esterleri, alkaloidler, terpenler gibi pek çok madde içermektedir (Tablo 2-1) (Parras ve ark. 2007, Stalmach ve ark. 2012). Bu bileşiklerin yanısıra yeşil kahve çekirdeklerinde potasyum, magnezyum, kalsiyum, fosfor, kükürt, kurşun, krom, çinko, bakır, nikel ve demir gibi çeşitli elementler de bulunmaktadır (Jaganyi ve Madlala 2000). Bu sebeple kahve günlük krom alımının % 8'ini karşılayabilmekte (Santos ve ark. 2004) ve önemli bir magnezyum kaynağı olarak sayılabilmektedir (Hečimović ve ark. 2011).

**Tablo 2-1: Yeşil kahve çekirdeğinin kimyasal içeriği**

Polisakkaritler	Glukomannan, selüloz
Monosakkaritler	Glukoz, galaktoz, arabinoz, fruktoz, mannoz, mannitol, ksiloz, riboz
Lipitler	Trigliseritler (%75)
Steroller	Stigmasterol, sitosterol
Yağ Asitleri	Linoleik asit, linolenik asit, oleik asit, palmitik asit, stearik asit, araşidik asit, lignoserik asit, behenik asit
Fenolik Asitler	Kafeik asit, ferulik asit, p-kumarik asit, sinapik asit, sirinjik asit, gallik asit, vanilik asit
Fenolik Asit Esterleri	3-CQA, 4-CQA, 5-CQA, 3-FQA, 4-FQA, 5-FQA, 3,4-diCQA, 3,5-diCQA, 4,5-diCQA, 4-CoQA, 5-CoQA
Alkaloidler	Kafein, teobromin, teofilin
Terpenler	Kahveol, kafestol, metil kafestol

Yeşil kahve çekirdekleri fenolik bileşikler, özellikle de klorojenik asitler açısından oldukça zengindir. Klorojenik asitler, bazı hidroksisinnamik asitler ve kinik asitler arasındaki reaksiyon sonucu oluşan esterler grubudur (Farah ve Donangelo 2006). Yeşil kahve çekirdekleri en önemli klorojenik asit kaynaklarından biridir ve kuru

ağırlıklarının % 6-10'unu klorojenik asitler oluşturmaktadır. Klorojenik asit terimi ilk defa 1846 yılında kahve çekirdeğinden izole edilen fraksiyon için kullanılmıştır. Kahvenin toplam klorojenik asit içeriğinin %50'sini IUPAC sistemine göre 3-*O*-kafeoilkinik asit olarak adlandırılan türev oluşturmaktadır. Bunun yanısıra yeşil kahve çekirdeklerinde önemli miktarda 4-*O*-kafeoilkinik asit, 5-*O*-kafeoilkinik asit ve feruloilkinik asit analogları olan 3,4-*O*-, 3,5-*O*- ve 4,5-*O*-dikafeoilkinik asit ve daha düşük oranlarda 4-*O*-*p*-kumaroilkinik asit ile 5-*O*-*p*-kumaroilkinik asit bulunmaktadır. Ayrıca yeşil kahve çekirdekleri klorojenik asit türevlerinden daha düşük miktarda olmak üzere sirinjik asit, *p*-kumarik asit, gallik asit, sinapik asit, kafeik asit, *p*-hidroksibenzoik asit, protokateşik asit, vanilik asit ve ferulik asit de içermektedir (Somporn ve ark. 2011, Stalmach ve ark. 2012). Farklı kahve türlerinin içerdikleri klorojenik asit miktarları Tablo 2-2'de verildi (Farah ve Donangelo 2006). Yapılan araştırmalar sonucu *C. canephora* türünün en yüksek miktarda klorojenik asit içerdiği belirlenmiştir.

**Tablo 2-2: Yeşil kahvede bulunan klorojenik asit miktarları**

Örnekler	CQA	FQA	diCQA	Toplam CGA
<i>C. arabica</i>	5,76 <sup>a</sup>	0,25	0,87	6,88
<i>C. arabica</i> var. <i>caturra</i>	4,63	0,33	0,66	5,62
<i>C. arabica</i> var. <i>bourbon</i>	4,77	0,34	0,56	5,67
Wild <i>C. arabica</i>	3,26	0,19	0,60	4,10
<i>C. arabica</i> (Angola)	4,30	0,57	1,23	6,10
<i>C. arabica</i> (Angola)	4,84	0,28	0,53	5,65
<i>C. arabica</i> (Angola)	5,67	0,79	1,39	7,85
<i>C. arabica</i> var. <i>bourbon</i> (Brezilya)	4,20	0,28	0,77	5,25
<i>C. arabica</i> cv. Longberry (Etiyopya)	4,60	0,29	0,84	5,73
<i>C. canephora</i> cv. Robusta	6,82	0,60	1,37	8,80
<i>C. canephora</i> cv. Robusta	5,33	0,79	1,05	7,17
<i>C. canephora</i> cv. Robusta (Angola)	3,43	0,54	1,20	6,08
<i>C. canephora</i> cv. Robusta (Angola)	4,97	0,75	1,46	7,18
<i>C. canephora</i> cv. Conillon (Brezilya)	7,42	0,95	1,09	9,47
Wild <i>C. canephora</i> (average)	7,66	1,43	2,31	11,3
<i>C. canephora</i> var. <i>robusta</i> (Uganda)	5,77	0,47	1,34	7,58
Timor hybrid ( <i>C. arabica</i> × <i>C. canephora</i> )	4,71	0,33	0,58	5,62
Catimor (Timor hybrid × <i>C. arabica</i> )	5,51	0,35	0,45	6,31
<i>C. liberica</i> cv. Dewevrei	5,39	0,48	1,10	6,97

<sup>a</sup>% g (kuru ağırlık)

### 2.3.3. Kavurma İşlemi ve Kimyasal İçerik Üzerindeki Etkileri

Kahve hazırlanırken kavrulmuş çekirdekler kullanılmaktadır (Bond 2012). Kavrulmuş kahvenin kimyasal içeriği, yeşil kahve çekirdeğinin içeriğine bağlı olmakla beraber kurutma, saklama, kavurma ve öğütme gibi işlemlerle de yakından ilişkilidir (Andriot ve ark. 2004). Kavurma işlemi kahvenin kimyasal içeriğini değiştirmekte ve dolayısıyla da biyolojik aktivitelerini etkilemektedir. Kavurma sırasında fenolik bileşikler kısmen parçalanmakta ve/veya polimer yapılar meydana gelmektedir. Bazı bileşikler parçalanırken Maillard reaksiyonları, karbonhidrat karamelizasyonu ve organik bileşiklerin pirolizi ile melanoidinleri de içeren bazı yeni makromoleküller oluşmaktadır (López-Galilea ve ark. 2007). Melanoidinler indirgen şekerler ile serbest amino grubu içeren bileşikler (amino asitler, peptitlerin amino grupları) arasında meydana gelen Maillard reaksiyonları'nın son ürünleridir (Andriot ve ark. 2004). Ayrıca kavrulmuş kahve eşsiz bir aromaya sahiptir. Kompleks yapıdaki kahve aroması, bilinen 800 adet madde içermektedir. Bu bileşenlerin çoğu heterosiklik yapılardır ve günlük beslenmede kahve dışında herhangi başka bir kaynaktan alınamamaktadır (Stalmach ve ark. 2012).

Kavurma işlemi kahve çekirdeklerinde bulunan fenolik asit miktarının değişmesine sebep olmaktadır. Kavurma sonrası bazı fenolik maddeler parçalanmakta ve yeni bileşikler meydana gelmektedir. Literatürdeki pek çok araştırma bu işlemin fenolik içerik üzerindeki etkisini göstermektedir. Somporn ve ark. (2011) *C. arabica* cv. Catimor türü ile gerçekleştirdiği çalışmada farklı derecelerde kavurulmuş çekirdeklerin fenolik asit içeriklerini karşılaştırmıştır (Tablo 2-3).

**Tablo 2-3: Kavurma derecesinin kahvede bulunan fenolik asitlerin miktarları üzerindeki etkisi**

<b>Fenolik asit türü</b>	<b>Yeşil kahve çekirdeği</b>	<b>Az kavrulmuş kahve</b>	<b>Orta kavrulmuş kahve</b>	<b>Çok kavrulmuş kahve</b>
Klorojenik	125,39 <sup>a</sup>	67,44	22,29	37,94
Sirinjik	2,46	2,64	2,61	2,62
p-Kumarik	-	15,46	7,36	4,53
Gallik	2,75	10,96	3,58	4,04
Sinapik	10,34	10,89	2,88	5,27
Kafeik	6,34	3,19	9,50	6,84
p-Hidroksibenzoik	5,77	8,58	42,23	30,18
Protokateşik	2,56	3,86	13,00	13,29
Vanilik	6,90	6,39	14,42	11,38
Ferulik	-	3,63	4,10	11,09

<sup>a</sup>mg/100 g taze örnek

#### 2.4. Kahvenin Biyolojik Aktiviteleri

Yapılan çalışmalar sonucu kahvenin, içeriğinde bulunan fenolik asit ve türevleri, kafein ve melanoidinler gibi doğal antioksidan bileşikler sebebiyle önemli ölçüde antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Vignoli ve ark. 2011). Kavrulma sırasında klorojenik asitlerin bir kısmı parçalanabilmektedir. Bunun sonucunda fenolik bileşik miktarında azalma meydana gelmektedir. Ayrıca süblimasyon ile kafein içeriğinde de kayıp olmaktadır, fakat bu miktar gözardı edilebilecek kadar azdır (Stalmach ve ark. 2012). Kavrulma sonucu meydana gelen fenolik içerik miktarındaki düşüşe rağmen Maillard reaksiyonları sonucu oluşan ve oldukça yüksek antioksidan aktivite gösteren melanoidinler ile kahvenin antioksidan kapasitesi aynı kalabilmekte ve hatta yükselebilmektedir. Fenilindanlar gibi bazı polifenol türevlerinin yüksek antioksidan potansiyele sahip olduğu belirlenmiştir (Guillot ve ark. 1996).

Yeşil ve kavrulmuş kahvenin antioksidan kapasiteleri pek çok araştırmacı tarafından 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) katyon radikali giderim, 1,1-difenil-2-pikril hidrazil (DPPH) serbest radikali giderim, demir indirgeme ve elektron paramanyetik rezonans yöntemleri ile belirlenmiştir (Hečimović ve ark. 2011, Vignoli ve ark. 2011, Brezová ve ark. 2009). Bu çalışmaların bazılarında

kavrulma derecesi (az, orta, çok) ile antioksidan potansiyel arasındaki ilişki incelenmiştir. Hećimović ve ark. (2011) ABTS katyon radikali giderim yöntemi ile değişken sonuçlar elde edilirken demir (III) indirgeme antioksidan gücü (FRAP) yöntemi ile az kavrulmuş kahve örneklerinde daha yüksek etkinlik saptamıştır. Başka bir çalışmada ABTS katyon radikali giderim, DPPH serbest radikali giderim ve bakır (II) indirgeme antioksidan kapasitesi (CUPRAC) yöntemleri ile kavrulmanın etkisi incelenmiş fakat kavrulma derecesiyle paralel olarak antioksidan aktivitede artış veya azalma saptanmamıştır (Yılmaz ve ark. 2014). Vignoli ve ark. (2011) farklı derecelerde kavrulmuş kahve örneklerinin antioksidan kapasitelerinde anlamlı bir farklılık tespit etmemiş ve bu durumu parçalanmış ve yeni oluşan antioksidan özelliğe sahip bileşiklerin dengesi ile açıklamışlardır. Ayrıca kahve örneklerinin antioksidan aktiviteleri farklı pişirme tekniklerinin kullanılması veya içlerine süt eklenmesi ile de değişebilmektedir (Parras ve ark. 2007, Niseteo ve ark. 2012).

Kahve çekirdeklerinde bulunan terpenoitlerden kahveol ve kafestol Türk kahvesi ve espresso gibi filtre edilmeden hazırlanan kahvelerin içeriklerinde bulunmaktadır. Hayvanlar üzerinde yapılan *in vivo* deneylerde bu iki terpenoidin mutajenik ve kanserojen etkileri olan 2-amino-1-metil-fenilimidazol[4i5-b]piridin, aflatoksin B1 ve kolon kanserine yol açan 7,12-dimetilbenz[a]antrasin gibi maddelere karşı koruyucu oldukları tespit edilmiştir (Huber ve ark. 2003). Porta ve ark. (2003) kahvenin tümör oluşumunu inhibe ettiğini belirtmiştir.

Kahvede bulunan birincil alkaloid olan kafein farmakolojik açıdan aktif bir bileşiktir. Kafein ve metabolitleri, teobromin, teofilin ve paraksantin benzer etkilere ve mekanizmalara sahiptirler ve genellikle birarada bulunmaktadır. Diğer pek çok biyoaktif madde için de geçerli olduğu gibi kafein tüketimi tüketicinin sağlık durumu, yaşı ve tüketim miktarına göre olumlu ya da olumsuz etkiler göstermektedir. Kafein genellikle beyindeki dopamin konsantrasyonunu yükselterek uyanıklığı ve uyanık kalma süresini arttırmaktadır. Ayrıca bu durum kafeinin merkezi sinir sistemini uyarıcı ve bağımlılık yapıcı özelliklerinin sebebi olarak açıklanmaktadır. Kafein tüketimi gastrik asit sekresyonu, sindirim güçlüğü, poliüre ve bunun sonucu olarak sıvı kaybı, çarpıntı ve aritmiye sebep olabilmektedir. Bunların yanısıra kafein ve türevlerinin solunum ve kalp fonksiyonları üzerine yararlı etkileri bulunmaktadır. Sentetik teofilin astım ve kalp yetmezliği tedavisinde kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucu

kafeinin sağlıklı hastalarda insülin hassasiyetini ve glukoz toleransını yükselterek tip 2 diyabet riskini azalttığı belirlenmiştir (Lean ve ark. 2012).

Literatürdeki epidemiyolojik çalışmalar kafeinin yaşlı insanlar için oldukça önemli bir sorun olan Alzheimer hastalığına karşı etkili bir terapötik ajan olabileceğini ve tüketiminin risk faktörlerini azaltacağını göstermektedir. Arendash ve Cao (2010) yaptıkları *in vivo* çalışmada kafeinin Alzheimer hastalığının oluşum sebebi olabileceği düşünülen beyindeki  $\beta$ -amiloid seviyesini düşürdüğünü belirlemişlerdir. Lindsay ve ark. (2002) Alzheimer hastalığının risk faktörleri üzerine gerçekleştirdikleri ulusal araştırmada kafein tüketiminin risk azaltıcı parametrelerden biri olduğunu belirlemişlerdir. Yapılan *in vitro* bir çalışmada kafeinin Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan etken madde olan galantamine yakın antikolinesteraz etki gösterdiği tespit edilmiştir (Yılmaz ve ark. 2014). Ayrıca kafeinin Parkinson hastalığı riskini de azalttığı belirtilmiştir (Ascherio ve ark. 2001).

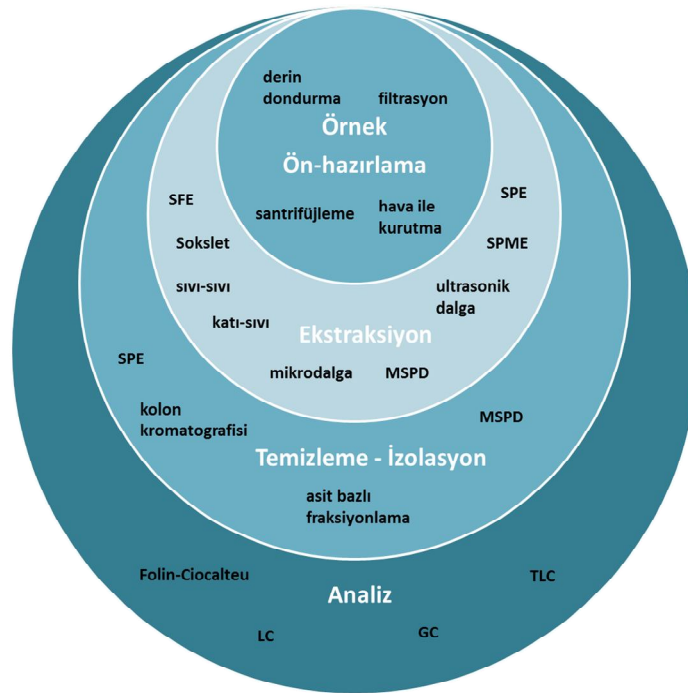
Literatürde kahve çekirdeklerinde bulunan fenolik asitlerin biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiş pek çok *in vivo* ve *in vitro* çalışma mevcuttur. Tablo 2-4'te bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar verilmiştir.

**Tablo 2-4: Yeşil ve kavrulmuş kahve çekirdeklerinde bulunan fenolik asitlerin biyolojik aktiviteleri**

<b>Fenolik asit</b>	<b>Biyolojik aktivite</b>	<b>Kaynak</b>
Klorojenik asit ve türevleri	Antioksidan, nöroprotektif, kalp ve damar hastalıklarına karşı koruyucu, $\alpha$ -glukozidaz inhibitörü, plazma ve karaciğerdeki kolesterol, triaçilgliserol ve mineral konsantrasyonlarını düzenleyici	Upadhyay ve Rao 2013
p-Hidroksibenzoik asit	Antibakteriyal, antimikrobiyal, antifungal, antimitojenik, antiyalgal, antioksidan	Manuja ve ark. 2013
Vanilik asit	Antisickling, antihelmintik, hepatoprotektif	Szopa ve ark. 2013
Kafeik asit	Antioksidan, antikanser, antienflamatuar, nöroprotektif	Szopa ve ark. 2013, Búfalo ve ark 2013, Vauzour ve ark. 2010
Ferulik asit	Antioksidan, antikanser, nöroprotektif, kardiyoprotektif	Yan ve ark. 2001, Ogiwara ve ark. 2002, Mancuso ve Santangelo 2014
Sinapik asit	Antioksidan, anksiyolitik, antienflamatuar, kardiyoprotektif	Niwa ve ark. 1999, Zou ve ark. 2002, Yoon ve ark. 2007, Yun ve ark. 2008, Roy ve Prince 2013
Protokateşik asit	Antioksidan, antikanser, antiviral, kardiyoprotektif	Masella ve ark. 2012, Tsao ve ark. 2014, Ou ve ark. 2014, Tang ve ark. 2014.

## 2.5. Fenolik Bileşiklerin Tayini için Kullanılan Yöntemler

Bitkiler, içecekler ve gıdalardan fenolik asitlerin ekstraksiyonu ve tayini için izlenecek yöntemler matriksin yapısına göre değişkenlik göstermektedir. Bazı içeceklerin analizinde hiçbir ekstraksiyon metodu kullanılmaksızın sadece filtrasyon yeterliyken, kompleks örneklerin analiz öncesinde birkaç basamaklı örnek hazırlama aşamasından geçmesi gerekmektedir. Fenolik asitlerin polarite ve kimyasal yapılarındaki farklılıkları, örneklerdeki farklı miktarları ve karmaşık örnek matriksleri sebebiyle ekstraksiyon öncesi her örneğe uygulanabilecek standart bir prosedür bulunmamaktadır. Şekil 2-3'te bitki, içecek ve gıda örneklerinde fenolik bileşiklerin analizi için kullanılan genel stratejiler şematize edilmiştir (Herrero ve ark. 2012).



Şekil 2-3: Bitki, içecek ve gıda örneklerinde fenolik bileşiklerin analizi için kullanılan genel stratejiler

### 2.5.1. Örnek Ön-Hazırlama Yöntemleri

Şarap, bazı meyve suları gibi örneklerde fenolik asit tayini için örnek hazırlama basamağında sadece filtrasyon yeterli olabilmektedir. Üzüm, böğürtlen gibi yumuşak ve sulu meyveler ekstraksiyon öncesinde parçalanır, ezilir veya derin dondurucuda dondurulur ve ardından belirli bir tanecik boyutunda öğütülür. Elma, avokado, zeytin

gibi daha sert meyve ve sebzeler bir öğütücü yardımıyla alkollü bir çözültide homojenize edilir veya derin dondurucuda dondurulup öğütülür. Tahıllar ise ekstraksiyon öncesinde un haline getirilir (Robbins 2003).

## **2.5.2. Ekstraksiyon Yöntemleri**

### **2.5.2.1. Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu**

Sıvı-sıvı ekstraksiyonu yöntemi fenolik bileşiklerin sıvı örneklerden ekstraksiyonu için sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem fenolik bileşiklerin karışmayan iki sıvıdaki çözünürlüklerine dayanmaktadır. Daha çok lipofilik bir çözücü ile metanol veya metanol/su karışımı gibi polar bir çözücüden oluşan sistemler kullanılmaktadır. Apolar çözücü olarak genelde heksan, petrol eteri, kloroform gibi çözücüler kullanılırken polar çözücü olarak metanol, metanol/su, tetrahidrofur/su veya N,N-dimetilformamid gibi çözücüler kullanılmaktadır. Bu yöntem zeytinyağı örneklerinin fenolik fraksiyonunun ekstraksiyonu için sıklıkla kullanılmaktadır. Sıvı-sıvı ekstraksiyonunun uygulanması kolay ve tekrarlanabilir sonuçlar veren bir yöntem olmasına rağmen işlem süresinin uzun olması ve zararlı organik çözücülerin kullanılması gibi dezavantajları bulunmaktadır (Herrero ve ark. 2012).

### **2.5.2.2. Katı-Sıvı Ekstraksiyonu**

Katı-sıvı ekstraksiyonu katı örnekler için kullanılmaktadır. Bu yöntemde katı örnekler homojenize edilir ve bir çözücü ya da çözücü karışımı ile ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilir. Tam bir ekstraksiyon için bazı parametreler optimize edilmelidir. Bunların arasında homojenize edilen örneğin tanecik boyutu, nem miktarı, ekstraksiyon çözücüsü, sıcaklık, ekstraksiyon süresi bulunmaktadır. Ekstraksiyon sonrasında santrifüjleme veya filtrasyon işlemi uygulanır ve çözücü uçurulur. Kalıntı analiz yöntemine uygun bir çözücüde çözülür. Fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda örneğin ve analizi yapılacak fenolik asidin kimyasal yapısına göre etanol, metanol veya bu iki çözücünün su ile belirli oranlardaki karışımları en çok tercih edilen ekstraksiyon çözücüsü sistemleridir. Yüksek miktarda yağ içeren örneklere ekstraksiyon işleminden önce heksan gibi lipofilik bir çözücü ile muamele edilebilir. Böylece yağların fenolik

bileşiklerin ekstraksiyonundaki olumsuz etkileri ortadan kaldırılmış olur (Herrero ve ark. 2012).

### **2.5.2.3. Soxhlet Ekstraksiyonu**

Soxhlet ekstraksiyonu Soxhlet ekstraktörü kullanılarak gerçekleştirilir. Katı veya yarı-katı numuneler için uygundur. Bu teknik en eski ekstraksiyon yöntemlerinden biridir ve günümüzde de sıkça kullanılmaktadır. Soxhlet ekstraktörü, çözücü şişesi, orta çemberde sıvı akış borusu (sifon), geri soğutucu ve ısıtma sisteminden meydana gelmiştir. Katı örnek, orta çemberin içindeki ekstraksiyon bölmesinin içine yerleştirilir. Çözücü alttaki çözücü şişesinin içine koyulur. Çözücü kaynama sıcaklığının üzerine ısıtılır ve kaynayan çözücünden gelen buharlar geri soğutucuya doğru hareket edip yoğunlaşır, örneğe doğru damlar. Çözücü örnek ile karışır ve daha sonra çözücü seviyesi sifonun tepesine ulaşır ulaşmaz örnek bölmesini boşaltarak çözücü şişesine geri damlamaya başlar. Böylece sıcak çözücü örnek içerisinde sirküle olur ve her dolaşımında taze çözücü kullanılır. Ekstre edilen analitler çözücü şişesinin içinde kalır. Çevrim sayısını ve ekstraksiyon zamanını rapor etmek daha iyi bir karşılaştırma için önemlidir. Ekstraksiyon süresi örnek türüne göre 6 saatten 24 saate kadar olabilir. Ekstraksiyon çözücülerini genellikle saf organik çözücüler veya bunların karışımlarıdır. Soxhlet ekstraksiyonunda ekstre edilen bileşikler, çözücünün kaynama sıcaklığında termal açıdan kararlı olmalıdır. Yöntemin kullanılması esnasında karşılaşılan problemler örnek bölmesinin temizliğinden kaynaklı olabilir. Soxhlet ekstraktörü kullanılmadan önce, temiz bir çözücü ile temizlenmelidir (Herrero ve ark. 2012, Büyüktuncel 2012).

### **2.5.2.4. Matriks Katı-Faz Dispersiyonu (MSPD)**

Matriks katı-faz dispersiyonu tekniğinde katı örnek uygun bir bağlı-faz veya oktadesilsilil ile türevlendirilmiş silika (C<sub>18</sub>) gibi uygun bir katı destek maddesi içeren bir havana koyulur. Katı destek maddesi ve örnek karıştırılır. Karıştırma işleminden önce iç standart ya da standart eklenebilir. Karışım farklı çözücüler ile örnekteki bileşenlerin ayırımı için uygun olan bir kolona aktarılır ve analiz amacına göre tek bir çözücü veya sıra ile farklı çözücüler kullanılarak ayırma gerçekleştirilir. Analitin

izolasyonu ya da temizlenmesi amacıyla sisteme farklı tipte kolonlar eklenebilir (Barker 2006).

#### **2.5.2.5. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu**

Süperkritik akışkan ekstraksiyonu ekstraksiyon çözücülerinin kritik sıcaklık ve basınç değerlerinin üzerinde kullanılmasıyla gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemidir. Kritik sıcaklık ve basınç değerlerinin üzerinde çözücü süperkritik akışkan gibi davranmaktadır. Süperkritik akışkanların difüzyon özellikleri gazlara, yoğunlukları sıvılara benzemektedir. Bu yöntemde en çok kullanılan süperkritik çözücü CO<sub>2</sub>'dir. Fakat fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda düşük polaritesinden ötürü CO<sub>2</sub> tek başına kullanılamamaktadır. Bu sebeple polar bileşiklerin ekstraksiyonu için CO<sub>2</sub>'ye düşük miktarda polar çözücü (genellikle etanol) eklenmektedir. Bu modifikasyon ile polifenollerin dahi ekstraksiyonu gerçekleştirilebilmektedir. Etanol ve CO<sub>2</sub> kullanılarak 60°C sıcaklık ve 100 bar basınçta guava çekirdeklerinin fenolik bileşikleri ekstre edilebilmiştir (Castro-Vargas ve ark. 2010).

#### **2.5.2.6. Ultrasonik Dalga Destekli Ekstraksiyon**

Ultrasonik dalga destekli ekstraksiyon yöntemi uygulaması kolay ve basit cihazlar gerektiren bir yöntemdir. Bu teknik ile analiz edilecek bileşiklerin katı örneklerden ekstraksiyonu yüksek frekanslı ultrasonik dalgalar ve düşük hacimdeki ekstraksiyon çözücülerini ile gerçekleştirilebilmektedir. Frekansı 100 kHz'in üstünde olan ultrasonik dalgalar analitlerin kütle transfer hızı ve çözünürlüğünü arttırmaktadır. Bu yöntemde optimize edilmesi gereken en önemli parametreler ekstraksiyon süresi, ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon çözücüsünün tipi ile hacmi ve örnek miktarıdır (Herrero ve ark. 2012).

#### **2.5.2.7. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon**

Mikrodalga destekli ekstraksiyon tekniğinde örnek ile temas halindeki çözücüyü ısıtarak analitlerin çözünürlüğünü arttırmak için mikrodalga enerjisi kullanılmaktadır. Belirli bir alana yönlendirilmiş sıcaklık ve basınç hedef bileşiklerin örnek matriksinden

çözücü fazına göçünü yüksek geri kazanım ile hızlandırmaktadır. Bu yöntemin en önemli avantajları ekstraksiyon süresinin kısa olması ve az hacimde ekstraksiyon çözücüsü gereksinimidir. Etkin bir ekstraksiyon işlemi için çözücü bileşimi ve hacmi, ekstraksiyon sıcaklığı, mikrodalga gücü, ekstraksiyon süresi, örneğin tanecik boyutu, miktarı ve su içeriği gibi parametreler optimize edilmelidir. Fenolik bileşiklerin bu teknik ile ekstraksiyonunda genellikle etanol, metanol, su ve bu çözücülerin karışımları kullanılmaktadır. Etanol/su (50:50) karışımı çay örneğinde polifenollerin ekstraksiyonu için kullanılmıştır. Diğer parametreler yapılacak uygulamaya göre değişebilmektedir. Genel olarak yaklaşık 2 dk süren bir işlem fenolik bileşiklerin örneklerden yüksek geri kazanım ve tekrarlanabilirlik değerleri ile ekstraksiyonu için yeterlidir (Herrero ve ark. 2012, Hayat ve ark. 2009).

#### **2.5.2.8. Katı Faz Ekstraksiyonu**

Fenolik bileşiklerin katı faz ekstraksiyonu yöntemi ile ekstraksiyonları iki farklı uygulama ile gerçekleştirilmektedir: sıvı örneklere direkt uygulama ve başka bir ekstraksiyon prosedürü ardından uygulama (Herrero ve ark. 2012).

Fenolik bileşikler için en çok kullanılan katı sabit fazlardan biri C<sub>18</sub> katı fazıdır. Bu türdeki kartuşlar fenolik asitler, flavonoidler, kateşin ve prosiyanidinler gibi pek çok çeşitte fenolik bileşiğin ekstraksiyonu için kullanılmıştır. Bu teknik ile ekstre edilen bileşikler analiz öncesinde polariteleri birbirine benzeyen gruplar halinde birbirlerinden ayrılabilir (Herrero ve ark. 2012). C<sub>18</sub> Sep-Pak kartuş kullanılarak tek bir ekstraksiyon prosedürü ile kırmızı şarap örneklerinde bulunan fenolik asitlerin, flavonoidlerin, antosiyaninlerin, monomerlerin ve polimerlerin, prosiyanidinlerin ve kateşinlerin fraksiyonlandırılması gerçekleştirilebilmiştir (Oszmianski ve ark. 1988).

Fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için kullanılan bir başka sabit faz çeşidi ise hidrofilik-lipofilik denge (HLB) kartuşlarıdır. Bu katı faz, divinilbenzen ve N-vinilpirolidon monomerlerinden elde edilen bir kopolimerdir. Yapılan bir çalışmada kırmızı şarapta bulunan fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için HLB ve C<sub>18</sub> kartuşları kullanılmıştır. HLB kartuşlarının kullanımı ile su ile yıkama sonucu analit kaybı olmadan interferans bileşiklerin ortamdan uzaklaştırılabildiği belirlenmiştir. Ayrıca bu kartuşların daha yüksek duyarlılık, tekrarlanabilirlik ve geri kazanım değerleri sağladıkları belirlenmiştir (Pérez-Magariño ve ark. 2008).

### 2.5.3. Temizleme ve İzolasyon Yöntemleri

Kolon kromatografisi ekstraksiyon adımının ardından analiti temizlemek/izole etmek için kullanılan en eski yöntemlerden biridir. Bu metotta kolon içine doldurulmuş silika jel veya alümina gibi katı adsorban maddeler kullanılmaktadır. Adsorban madde kolon içine kuru ve ıslak olmak üzere iki farklı teknik ile doldurulmaktadır. Örnek kolona yüklendikten sonra apolar bir çözücü ile elüsyona başlanmakta ve çözücü polaritesi giderek arttırılmaktadır. Örnekteki bileşenler polaritelerine göre kolonu terk etmektedirler (Herrero ve ark. 2012).

Temizleme ve izolasyon amacıyla kullanılan bir diğer yöntem olan asit-baz ekstraksiyonu bir tür sıvı-sıvı ekstraksiyonu yöntemidir. Bir sulu ve bir organik faz kullanılmaktadır. Organik faz olarak genellikle su ile karışmayan eter, etil asetat, diklorometan gibi bir çözücü tercih edilmektedir. Asit-baz ekstraksiyonu karışım halindeki organik bileşenleri asidik ya da bazik özelliklerine göre birbirlerinden ayırmak için kullanılmaktadır. Yöntem çoğu organik bileşenin organik çözücülerdeki çözünürlüklerinin sudaki çözünürlüklerinden daha yüksek olması ve asidik ya da bazik organik bileşiklerin uygun pH'larda iyonik halde bulunmaları esaslarına dayanmaktadır. Bu bileşiklerin sudaki çözünürlükleri iyonik haldeyken daha yüksektir. Bir bazik ve bir nötral özellikte iki madde içeren bir eter çözeltisinde bu maddeleri birbirinden ayırmak için ortama hidroklorik asit gibi bir mineral asit eklenirse bazik madde iyonlaşır sulu faza geçecek, nötral madde ise organik fazda kalacaktır (Herrero ve ark. 2012).

Bölüm 2.5.2.4.'te ve 2.5.2.8.'de açıklanan matriks katı-faz dispersiyonu ve katı faz ekstraksiyonu metotları da bir ekstraksiyon prosedürü ardından istenmeyen bileşenlerin uzaklaştırılması veya analitin izolasyonu için kullanılmaktadır.

### 2.5.4. Tayin Yöntemleri

#### 2.5.4.1. Kağıt Kromatografisi ve İnce Tabaka Kromatografisi

Kağıt kromatografisi ve ince tabaka kromatografisi fenolik bileşik analizleri için kullanılan ilk yöntemlerdendir. Kağıt kromatografisinde sabit faz olarak Whatman filtre kağıdı kullanılmaktadır. İnce tabaka kromatografisinde silika jel, selüloz ve poliamit gibi sabit fazlar kullanılmaktadır. İnce tabaka kromatografisi aynı anda pek çok örneğin

analizi için uygun, ucuz ve hızlı bir yöntemdir. Fakat kantitatif analizlerde geri kazanım değerleri oldukça düşüktür (Robbins 2003).

#### **2.5.4.2. Folin-Ciocalteu Yöntemi**

Folin-Ciocalteu yöntemi eski zamanlarda fenolik asitlerin miktar tayini için en çok kullanılan kolorimetrik yöntemdi. Bu yöntem fosfomolibdik-fosfotungstik asidin alkali çözeltilerde fenolik asitler tarafından mavi renkli bir kompleks oluşturarak indirgenmesine dayanmaktadır. Çözeltide oluşan fosfomolibdik-fosfotungstik-fenol kompleksi 760 nm'de kolaylıkla tayin edilebilen bir absorbans vermektedir. Fakat bu yöntemin en büyük dezavantajı örnekteki diğer bileşenlerin de indirgen ajan olarak davranabilmeleridir. Bu yöntem ile fenolik bileşiklerin tek tek belirlenebilmeleri mümkün değildir (Robbins 2003).

#### **2.5.4.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)**

Yaklaşık son otuz yıldır fenolik bileşiklerin ayrılması ve karakterizasyonunda en çok tercih edilen yöntem ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisidir. Fenolik bileşiklerin bu yöntem ile tayininde sabit faz olarak genellikle farklı çap, uzunluk ve tanecik boyutuna sahip C<sub>18</sub> kolonlar kullanılmaktadır. İzokratik sistemler yerine bir sulu ve bir organik faz içeren gradient elüsyon sistemleri ile çalışmak tercih edilmektedir. Hareketli fazlarda genellikle sulu faza bir asit eklenmektedir. Bu amaçla en çok kullanılan asitler asetik asit, sülfürik asit, perklorik asit, fosforik asit, trifloroasetik asit, hidroklorik asit ve formik asittir. Organik faz olarak metanol, asetonitril, propanol, bütanol, tetrahidrofuran ve etilasetat tercih edilmektedir. Analiz süreleri 30 ile 150 dk arasında değişmektedir. Akış hızı 0,15 ile 1,8 mL/dk arasında değişmekte ve genellikle 1,0 mL/dk olarak ayarlanmaktadır. Tekrarlanabilir sonuçlar ve düzgün pik şekilleri elde etmek için kolon sıcaklığı sabit tutulmaktadır. Yapılan çalışmalarda sıcaklık 20°C ile 40°C arasında sabitlenmektedir (Xu 2012).

Fenolik asitlerin dedeksiyonu için en yaygın olarak kullanılan dedektörler UV-görünür bölge ve diyot serili (DAD) dedektörlerdir. Hidroksibenzoik asit iskeletine sahip olan fenolik asitler 200-290 nm arasında, hidroksisinnamik asit iskeletine sahip

olanlar ise 270-360 nm arasında maksimum absorbans değerlerini vermektedirler (Xu 2012).

Fluoresans dedektörü de fenolik asit tayininde kullanılmaktadır. Bu dedektörün en önemli avantajı seçiciliğinin daha yüksek olmasıdır. Böylece örnek içindeki interferans maddelerin etkileri minimuma indirilebilmektedir. Örneğin; bitkilerdeki pek çok flavanon UV bölgede fenolik asitler kadar kuvvetli absorpsiyon yaparken fluoresans özellikleri yoktur. Fluoresans dedektörleri ile fenolik asit tayini için en çok kullanılan uyarma (excitation) dalga boyları 310-350 nm arasındayken yayım (emission) dalga boyları 420-500 nm arasındadır (Xu 2012).

Kütle (MS) dedektörü fenolik bileşiklerin analizinde yüksek spesiflik ve duyarlılık gibi pek çok avantaj sağlamaktadır. Seçiciliği yüksek kütle dedektörü sayesinde her zaman tam bir kromatografik ayırım gerekmemektedir (Robbins 2003).

Fenolik bileşiklerin tayininde bu dedektörlerin dışında daha az yaygın olarak elektrokimyasal dedektörler de kullanılmaktadır (Robbins 2003).

#### **2.5.4.4. Gaz Kromatografisi (GC)**

Fenolik bileşiklerin tayininde kullanılan önemli yöntemlerden biri de gaz kromatografisidir. Bu yöntemin en önemli dezavantajı fenolik asitlerin uçuculuklarının düşük olmasıdır. Bu sebeple analiz öncesi türevlendirme işlemi gerekmektedir. Türevlendirme reaksiyonları ile fenolik bileşiklerdeki hidroksil grupları eter veya esterlerine dönüştürülmektedir. Uçucu türevleri oluşturmak için kullanılan farklı reaktifler bulunmaktadır. Diazometan genellikle metil esterleri oluşturmak için kullanılmaktadır. Başka bir metilleme mekanizması ise alkali ortamda dimetil sülfoksit ve metil iyodür ile gerçekleştirilmektedir. Fakat en çok kullanılan türev trialkilsilil grubudur. Bu türev hidroksil grubunun oksijen atomuna alkil süstitüeli silisyum atomunu kovalent bağ ile bağlayarak elde edilmektedir. En yaygın alkil süstitüesi metil grubudur ve bu reaktifler trimetilsilil türevleri oluşturmaktadır. Literatürde fenolik asitlerin türevlendirilmesi için en çok kullanılan reaktifler *N,O*-bis-(trimetilsilil)asetamid, *N*-metil-*N*-(trimetilsilil)trifluoroasetamid ve *N,O*-bis-(trimetilsilil)trifluoroasetamittir (Robbins 2013).

Günümüzde gaz kromatografisi ile fenolik bileşiklerin analizinde yaygın olarak eritilmiş silis (fused silica) kapiler kolonlar (kaplama maddesi DB 5, %5 fenil silikon ve %95 metil silikon) kullanılmaktadır. İzotermal metotlar yerine sıcaklık programlaması tercih edilmektedir. Dedektör olarak alev iyonlaşmalı dedektör ve kütle dedektörleri kullanılmaktadır (Robbins 2013).

## **2.6. Kahve Örneklerinde Fenolik Asitlerin Tayini için Kullanılan Yöntemler**

Yapılan literatür çalışması sonucu kahve örneklerinin fenolik asit içeriklerinin belirlenmesi için farklı dedeksiyon yöntemleri içeren HPLC yöntemlerinin geliştirildiği belirlenmiştir. Tablo 2-5'te bu yöntemlerin bazıları ayrıntılı şekilde verilmiştir.

**Tablo 2-5: Kahve örneklerinde fenolik asitlerin tayini için geliştirilen HPLC yöntemleri**

<b>Kahve türü</b>	<b>Analitler</b>	<b>Ekstraksiyon Metodu</b>	<b>Analiz Metodu</b>	<b>Kaynak</b>
7 Adet kafeinli ve 5 adet kafeinsiz kahve örneği	3-CQA, 4-CQA, 5-CQA, 3-FQA, 4-FAQ, 5-CFA, 3,4-diCQA, 3,5-diCQA, 4,5-diCQA	Filtre kahve makinesi	HPLC-DAD, XDB C <sub>18</sub> (150 × 4,6 mm, 5µm) Gradient elüsyon, λ: 325 nm Hareketli faz A: 10mM sitrik asit Hareketli faz B: metanol	Fujioka ve Shibamoto 2008
Çiğ ve kavrulmuş <i>C. arabica</i> cv. Mundo Novo, <i>C. arabica</i> cv. Catuaí Vermelho, <i>C. canephora</i> , cv. Conillon çekirdekleri	3-CQA, 4-CQA, 5-CQA, 3-FQA, 4-FQA, 5-FQA, 3-p-CoQA, 4-p-CoQA, 5-p-CoQA, 3,4-diCQA, 3,5-diCQA, 4,5-diCQA, 3,4-diFQA	Kat-sıvı ekstraksiyonu Çözücü: Metanol (%60) Yüksek molekül ağırlıklı moleküller Carrez çözeltileri ile çöktürülmüştür	LC-MS (Elektro-sprey iyon kaynağı) Magic C30 HPLC kolonu (150 × 2 mm, 5 µm) Gradient elüsyon Hareketli faz A: %0,3 formik asit Hareketli faz B: metanol	Perrone ve ark. 2008
17 Adet kültür ve hibrit <i>C. arabica</i> çekirdekleri (Brezilya)	3-CQA, 4-CQA, 5-CQA, 3-FQA, 4-FQA, 5-FQA, 3,4-diCQA, 3,5-diCQA, 4,5-diCQA	Kat-sıvı ekstraksiyonu Çözücü: Metanol (%40) Yüksek molekül ağırlıklı moleküller Carrez çözeltileri ile çöktürülmüştür	HPLC-UV, ODS-C <sub>18</sub> column (250 × 4,6 mm, 5 µm) Gradient elüsyon, λ: 325 nm Hareketli faz A: 10mM sitrik asit Hareketli faz B: metanol	Duarte ve ark. 2010

**Tablo 2-5 (Devam)**

Dört farklı <i>C. arabica</i> çekirdekleri (cv. Mundo Novo, cv. Bourbon, cv. Yellow Catuai, cv. Red Catuai)	3-CQA, 4-CQA, 5-CQA, 4-FQA, 5-FQA, 3,4-diCQA, 3,5-diCQA, 4,5-diCQA	Kat-sıvı ekstraksiyonu Çözücü: Metanol (%40) Yüksek molekül ağırlıklı moleküller Carrez çözeltileri ile çöktürülmüştür	HPLC-UV, ODS-C <sub>18</sub> column (250 × 4,6 mm, 5µm) Gradient elüsyon, λ: 325 nm Hareketli faz A: 10mM sitrik asit Hareketli faz B: metanol	Monteiro ve Farah 2012
Güneşte ve gölgede yetiştirilen <i>C. arabica</i> L. cv. Catimor çekirdekleri	Gallik asit, protokateşik asit, p-hidroksibenzoik asit, klorojenik asit, vanilik asit, kafeik asit, sirinjik asit, p-kumarik asit, ferulik asit, sinapik asit	Kat-sıvı ekstraksiyonu Çözücü: Su (80°C) Yüksek molekül ağırlıklı moleküller Carrez çözeltileri ile çöktürülmüştür	HPLC-DAD, LUNA C <sub>18</sub> column (250 × 4,6 mm, 5µm) Gradient elüsyon, λ: 280 nm Hareketli faz A: Ultra saf su (pH 2,74, asetik asit ile) Hareketli faz B: asetonitril	Somporn ve ark. 2012
Çiğ ve kavrulmuş <i>C. arabica</i> cv. Catimor çekirdekleri	Klorojenik asit, sirinjik asit, p-kumarik asit, gallik asit, sinapik asit, kafeik asit, p-hidroksibenzoik asit, protokateşik asit, vanilik asit, ferulik asit	Kat-sıvı ekstraksiyonu Çözücü: Su (80°C) Yüksek molekül ağırlıklı moleküller Carrez çözeltileri ile çöktürülmüştür	HPLC-DAD, LUNA C <sub>18</sub> column (250 × 4,6 mm, 5 µm) Gradient elüsyon, λ: 280 nm Hareketli faz A: Ultra saf su (pH 2,74, asetik asit ile) Hareketli faz B: asetonitril	Somporn ve ark. 2011

**Tablo 2-5 (Devam)**

Yeşil kahve çekirdekleri	3-CQA, 4-CQA, 5CQA, ferulik asit, kafeik asit	Kat-sıvı ekstraksiyonu Çözücü: Metanol/su (4:6)	Micellar electrokinetic chromatography-DAD Fused-silica capillary (75 µm ID) Etkin ve toplam uzunluk: 22,5 cm ve 30 cm	Risso ve ark. 2007
Meksika, Hindistan ve Çin'den alınmış <i>C. arabica</i> ve <i>C. canephora</i> türlerinin meyveleri, çekirdekleri ve kabukları	3-CQA, 4-CQA, 5-CQA, , 4-FQA, 5-FQA, 3,4-diCQA, 3,5-diCQA, 4,5-diCQA, 3-F-4-CQA, 3-C-5-FQA, 4-C-5-FQA	Kat-sıvı ekstraksiyonu Çözücü: Etanol/su (50:50)	HPLC-MS, Thermo C <sub>18</sub> (150 × 3,0 mm, 5 µm) Gradient elüsyon Hareketli faz A: %1 formik asit Hareketli faz B: asetonitril Negatif iyonlaşma modu, 150-1200 amu, rezolüsyon 60,000	Mullen ve ark. 2013
Yeşil <i>C. arabica</i> (Honduras) ve <i>C. canephora</i> (Uganda) çekirdekleri	Kafeik asit, p-kumarik asit, ferulik asit, o-kumarik asit, 3,4-diMCA, 3,4,5-triMCA, 4-MCA	Katı-sıvı ekstraksiyonu Çözücü: Metanol/su (40:60) Hidroliz: 2 N NaOH ile pH 7: 2 N HCl ile Sıvı-sıvı ekstraksiyonu Çözücü: etil asetat	HPLC-DAD, ODS2 C <sub>18</sub> column (250 × 4,6 mm, 5µm) Gradient elüsyon, λ: 320 nm Hareketli faz A: su/formik asit (19:1) Hareketli faz B: metanol	Andrade ve ark. 1997

**Tablo 2-5 (Devam)**

Yeşil kahve çekirdeklerinin suda çözünen fraksiyonu	Klorojenik asit, kafeik asit, ferulik asit	Dışarıdan temin edilen yeşil kahve çekirdeklerinin suda çözünen fraksiyonu Metanol/su (50:50) ile çözülmüştür.	1.HPTLC, 10 × 10 cm cam plak Kieselgel 60 F 254 Hareketli faz: etilasetat/diklorometan/formik asit/asetik asit/su (100:25:10:10:11, v/v/v/v/v) λ: 190 - 700 nm 2. HPLC-UV, LUNA C <sub>18</sub> column (150 × 4,6 mm, 5 μm) Gradient elüsyoni, λ: 330 nm Hareketli faz A: %0,03 tetrahidrofuran çözeltisinde %10 asetonitril Hareketli faz B: asetonitril	Urakova ve ark. 2008
Yeşil kahve çekirdekleri (Arabica ve Robusta)	Klorojenik asit, kafeik asit, ferulik asit	Sokslet apereyi ile ekstraksiyon Çözücü: hegzan Cam kolonda ekstraksiyon Çözücü: izopropanol/su karışımı (sırasıyla 80:20, 70:30, 60:40)	HPLC-UV, Hypersil C <sub>18</sub> column (250 × 4,6 mm, 5 μm) Gradient elüsyon, λ: 325 nm Hareketli faz A: %0,035 trifloroasetik asit çözeltisinde %5 asetonitril Hareketli faz B: %0,025 trifloroasetik asit çözeltisinde %80 asetonitril	Naidu ve ark. 2008

**Tablo 2-5 (Devam)**

<i>C. canephora</i> var. <i>robusta</i> yeşil kahve çekirdekleri	Kafeik asit, p-kumarik asit, ferulik asit, sinapik asit, o-kumarik asit, 3,4-dimetoksisinnamik asit, 3,4,5-trimetoksisinnamik asit, 4-metoksisinnamik asit	Katı-sıvı ekstraksiyonu Çözücü: Metanol/su (40:60) Hidroliz: 2 N NaOH ile pH 7: 2 N HCl ile Sıvı-sıvı ekstraksiyonu Çözücü: etil asetat	1. CZE-DAD, Fused silika kolon (50 cm × 75 mm) Hareketli faz: 0.1 M borat tamponu (pH 9,5) 20 KV, 28 µA, λ: 280 nm 2. HPLC-DAD, ODS2 C <sub>18</sub> column (250 × 4,6 mm, 5µm) Gradient elüsyon, λ: 320 nm Hareketli faz A: su/formik asit (19:1) Hareketli faz B: metanol	Casal ve ark. 1999
<i>C. arabica</i> çekirdeklerinin kabuk kısmı (silverskin) (Santos, Brezilya)	3-CQA, 4-CQA, 5-CQA, 3-CoQA, 5-CoQA, 3-FQA, 4-FQA, 5-FQA, CQA lakton	Katı-sıvı ekstraksiyonu Çözücü: %1 formik asit ile kabuklar ayrılmıştır. Ayrılan kabuklardan fenolikler tekrar %1 formik asit ile ekstre edilmiştir.	UHPLC-LITMS, C <sub>18</sub> BlueOrchid column (50 × 2 mm, 1,8 µm) Gradient elüsyon Hareketli faz A: % 0,1 formik asit Hareketli faz B: % 0,1 formik asitte asetonitril	Bresciani ve ark. 2014

## **2.7. Analitik Yöntem Geliştirme ve Validasyon Parametreleri**

Yeni bir analitik yöntem geliştirilirken cihaz ve metodun çeşidi, yöntemin amacı göz önünde bulundurularak belirlenmelidir. Yöntem geliştirme aşamasında saptanabilecek parametreler gözlenebilme sınırı, tayin sınırı, aralık, doğruluk ve kesinliktir. Validasyon çalışmalarının yapılma amacı geliştirilen analitik yöntemin amaca uygunluğunun test edilmesidir. Bütün validasyon parametreleri her tür teste uygulanamasa da genellikle incelenen parametreler seçicilik, doğrusalılık, doğruluk, kesinlik, aralık, gözlenebilme sınırı ve tayin sınırıdır (FDA 2014, ICH 2005).

### **2.7.1. Seçicilik (Selectivity)**

Seçicilik, bir analitik yöntemin örnekteki diğer bileşenler yanında analiti tayin edebilme yeteneğidir. Bu amaçla boş örnekler ile denemeler yapılmakta ve interferans madde varlığı kontrol edilmektedir (ICH 2005).

### **2.7.2. Doğrusallık (Linearity)**

Bir analitik yöntemin doğrusallığı, belirli bir aralıkta örnekteki analit konsantrasyonu ile doğru orantılı yanıt verme yeteneğidir. Doğrusallık belirlenirken korelasyon katsayısı, y ekseninin kesim noktası ve regresyon eğrisinin eğimi verileri incelenmelidir (ICH 2005).

### **2.7.3. Doğruluk (Accuracy)**

Bir analitik yöntemin doğruluğu, doğru kabul edilmiş sonuç ile bulunan sonucun birbirine yakınlığı olarak ifade edilmektedir. Doğruluk en az 3 farklı konsantrasyonun (doğrusal aralık içinde) en az 3 tekrarlı analizi yapılarak belirlenmeli ve % geri kazanım veya % bağıl ortalama hata olarak verilmelidir (ICH 2005).

### **2.7.4. Kesinlik (Precision)**

Bir analitik yöntemin kesinliği, aynı homojen örneğin belirlenen koşullar altında birden fazla örneklenip analiz edildiği zaman elde edilen sonuçların birbirine yakınlığı

olarak tanımlanmaktadır. Kesinlik varyans, standart sapma ya da bir seri ölçümün varyasyon katsayısı olarak verilebilmektedir. Tekrarlanabilirlik, ara kesinlik ve tekrar üretilebilirlik olmak üzere 3 farklı seviyede incelenmektedir. Tekrarlanabilirlik kısa süre içinde ve aynı koşullar altında elde edilen kesinliktir. Tekrarlanabilirlik en az 3 farklı konsantrasyonun en az 3 tekrarlı analizi yapılarak belirlenmelidir. Ara kesinlik aynı laboratuvarda farklı günler, farklı analistler ya da farklı cihazlar gibi değişimlerin sonuçlar üzerindeki etkisini göstermektedir. Tekrar üretilebilirlik laboratuvarlar arası kesinliği ifade etmektedir (ICH 2005).

#### **2.7.5. Aralık (Range)**

Bir analitik yöntemin aralığı, uygun kesinlik, doğruluk ve doğrusallığa sahip olduğu tespit edilmiş en düşük ve en yüksek konsantrasyon değerlerinin arasında kalan değerleri kapsamaktadır (ICH 2005).

#### **2.7.6. Gözlenebilme Sınırı (Limit of Detection, LOD)**

Bir analitik yöntemin gözlenebilme sınırı, analitin örnek içinde kabul edilebilir doğruluk ve kesinlik ile tespit edilebildiği en düşük miktardır. Üç farklı şekilde belirlenmektedir (ICH 2005).

##### **2.7.6.1. Gözlenebilme Sınırının Görsel Değerlendirme ile Belirlenmesi**

Gözlenebilme sınırı, tespit edilebilen en küçük konsantrasyon olarak kabul edilmektedir (ICH 2005).

##### **2.7.6.2. Gözlenebilme Sınırının Sinyal/Gürültü Oranı ile Belirlenmesi**

Düşük konsantrasyondaki analitin sinyali ile boş örneğin sinyali karşılaştırılmaktadır. Sinyal/gürültü oranı 3 olan konsantrasyon, gözlenebilme sınırı olarak kabul edilmektedir (ICH 2005).

### 2.7.6.3. Gözlenebilme Sınırının, Yanıtın Standart Sapması ve Eğim ile Belirlenmesi

Gözlenebilme sınırı:

$$LOD = \frac{3,3 \sigma}{S}$$

eşitliği ile hesaplanmaktadır ( $\sigma$  = yanıtın standart sapması,  $S$  = ölçü eğrisinin eğimi) (ICH 2005).

### 2.7.7. Tayin Sınırı (Limit of Quantification, LOQ)

Bir analitik yöntemin tayin sınırı, analitin örnek içinde kabul edilebilir doğruluk ve kesinlik ile kantitatif tayininin yapılabildiği en küçük konsantrasyondur. Üç farklı şekilde belirlenmektedir (ICH 2005).

#### 2.7.7.1. Tayin Sınırının Görsel Değerlendirme ile Belirlenmesi

Tayin sınırı, kantitatif tayini yapılabilen en küçük konsantrasyon olarak kabul edilmektedir (ICH 2005).

#### 2.7.7.2. Tayin Sınırının Sinyal/Gürültü Oranı ile Belirlenmesi

Düşük konsantrasyondaki analitin sinyali ile boş örneğin sinyali karşılaştırılmaktadır. Sinyal/gürültü oranı 10 olan konsantrasyon tayin sınırı olarak kabul edilmektedir (ICH 2005).

#### 2.7.7.3. Tayin Sınırının, Yanıtın Standart Sapması ve Eğim ile Belirlenmesi

Tayin sınırı:

$$LOQ = \frac{10 \sigma}{S}$$

eşitliği ile hesaplanmaktadır ( $\sigma$  = yanıtın standart sapması,  $S$  = ölçü eğrisinin eğimi) (ICH 2005).

## 2.8. Ağırlıklı (Weighted) Regresyon Analizi

En küçük kareler yöntemi, regresyon çözümlemesinde en yaygın olarak kullanılan tekniktir. Bu teknikte regresyon eğrisinde gözlemlenen y değerleri ile bu eğri arasındaki uzaklık hata terimlerini vermektedir. En küçük kareler yöntemi bu hata terimlerinin karelerinin toplamını en küçük yapacak katsayı değerlerini hesaplar. Bu tekniğinin en önemli varsayımlarından birisi sabit varyans varsayımdır. Bağımsız değişkenlerin birim değerleri değişirken bağımlı değişkenin birim değerlerine ait varyansın sabit kalacağı varsayılmakta ve bu varsayıma sabit varyans (homoscedasticity) adı verilmektedir. Yani hata terimlerinin varyansı, bağımsız değişkenlerdeki değişimlerden etkilenmeyip aynı kalmaktadır. Hata terimlerinin varyansının sabit olmaması durumuna değişen varyans (heteroscedasticity) adı verilmektedir. Bu durumda regresyon modelinin varyansı sabit kalmayıp artan, azalan veya hem artan hem de azalan bir dağılım göstererek değişebilmektedir. Hatalarda gözlenen değişen varyans problemi, en küçük kareler tekniğinin en önemli varsayımlarından biri olan sabit varyans varsayımının sağlanamadığını göstermektedir (Albayrak 2008).

F-testi ile bir ölçü eğrisindeki en yüksek ve en düşük konsantrasyonların varyansları arasında anlamlı bir fark olup olmadığı belirlenebilir (Almeida ve ark. 2002). Değişen varyans saptandığında daha güvenilir ve durağan sonuçlar elde edebilmek için ağırlıklı regresyon analizinin kullanılması gerekmektedir. Değişkenlerin dönüştürülmesi yaklaşımı yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Değişkenlere dönüşüm uygulamanın temel amacı doğrusallaştırmak, normalleştirmek ve sabit varyans elde etmektir. Logaritmik dönüşüm, karekök dönüşüm, hiberbolik dönüşüm, kare dönüşümü, arcsin dönüşümü yaygın olarak kullanılan dönüşümlerdir (Albayrak 2008).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Analizin Yapıldığı Yer

Bu doktora tez çalışması İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda yapıldı.

#### 3.2. Materyal

Altı adet farklı menşeli kavrulmuş kahve çekirdekleri ve 1 adet yeşil (kavrulmamış) kahve çekirdeği analiz edildi. Örnekler kendi ambalajlarında tutularak laboratuvara getirildi, +4°C'de ve karanlıkta muhafaza edildi. Örneklerin menşeleri ve kodları Tablo 3-1'de verildi.

**Tablo 3-1: Analiz örneklerinin menşeleri ve kodları**

Menşe		Örnek Kodu
<b>Brezilya</b>	Kavrulmamış	K-1
<b>Brezilya</b>	Kavrulmuş	K-2
<b>Etiyopya</b>	Kavrulmuş	K-3
<b>Kilimanjaro</b>	Kavrulmuş	K-4
<b>Kolombiya</b>	Kavrulmuş	K-5
<b>Kosta Rika</b>	Kavrulmuş	K-6
<b>Uganda</b>	Kavrulmuş	K-7

#### 3.3. Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler

Asetonitril (HPLC saflığında) ve o-fosforik asit Merck firmasından (Darmstadt, Almanya), metanol (HPLC saflığında), sodyum hidrojen fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), sodyum dihidrojen fosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), formik asit ( $\text{HCOOH}$ ), protokateşik asit (PrCA), p-

hidroksibenzoik asit (PHBA), kafeik asit (CA), vanilik asit (VA), ferulik asit (FA), sinapik asit (SNA), 3-*O*-kafeoilkinik asit (3CQA), 4-*O*-kafeoilkinik asit (4CQA) ve 5-*O*-kafeoilkinik asit (5CQA) Sigma-Aldrich firmasından (Darmstadt, Almanya) temin edildi. C<sub>18</sub> Katı faz ekstraksiyonu kartuşu (Chromabond octadecyl-modified silica, endcapped, 500 mg/3 mL) Macherey-Nagel (Düren, Almanya), kuvvetli anyon değiştirici kat faz ekstraksiyonu kartuşu (SAX) (Supel-Select SAX SPE, 200 mg/6 mL) ve hidrofilik-lipofilik denge (hydrophilic-lipophilic balance, HLB) katı faz ekstraksiyonu kartuşu (Supel-Select SPE, HLB 200 mg/6 mL) Sigma-Aldrich firmasından (Darmstadt, Almanya) satın alındı.

Hareketli faz olarak, A (% 0,08'lik o-fosforik asit çözeltisi, suda) ve B (metanol/su/asetonitril, 85:10:5) çözeltileri kullanıldı.

Kahve örnekleri içinde miktar tayini yapılacak olan fenolik asitlerden CA, 3CQA, FA, SNA, PrCA, PHBA ve VA'dan 50,00 mg tartıldı ve ayrı ayrı 10 mL'lik balon jodelerde metanol (HPLC saflığında) ile çözümlenerek hacmine tamamlanarak 5,00 g/L'lik stok çözeltiler hazırlandı. 5CQA ve 4CQA'nın 5,00 mg'ı 1,00 mL metanol ile çözümlenerek stok çözeltiler hazırlandı. Stok çözeltilerin herbirinden 0,50'şer mL 5 mL'lik bir balon jodeye aktarıldı ve hacmine metanol ile tamamlandı. Ölçü eğrilerinin hazırlanması için kullanılan çözeltiler 500,00 mg/L'lik karışım halindeki stok çözeltinin seyreltilmesi ile hazırlandı.

SPE denemelerinde kullanılan çözeltilerin hazırlanışı:

Metanol/su (40:60, h/h) çözeltisi: 60 mL ultra saf suya 40 mL metanol katıldı.

% 0,1'lik o-Fosforik asit çözeltisi: 100 mL'lik bir balon jodeye 0,1 mL o-fosforik asit koyuldu, ultra saf su ile hacmine tamamlandı.

Fosfat tamponu (pH 10): 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> çözeltisinin 1 mL'sine 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> çözeltisinden 63 mL katılarak hazırlandı.

% 2,0'lik Formik asit çözeltisi (metanolde): 100 mL'lik bir balon jodeye 0,2 mL formik asit koyuldu, metanol ile hacmine tamamlandı.

% 10'luk metanol çözeltisi (pH 2): 100 mL'lik bir balon jodeye 10 mL metanol koyuldu, ultra saf su ile hacmine tamamlandı. o-Fosforik asit ile pH'ı 2'ye ayarlandı.

Metanol/asetonitril (50:50, h/h) çözeltisi: 50 mL metanole 50 mL asetonitril katıldı.

### 3.4. Cihaz ve Gereçler

1. HPLC cihazı (Shimadzu LC-20A)

SPD-20A dedektör

LC-20AT Pompa ünitesi (2 adet)

DGU-2015 Gaz giderici ünite

CTO-10ASVP Kolon firmı

SIL-20AHT Otomatik numune örnekleyici

C<sub>18</sub> Analitik kolon (Intersil ODS-3, 4,6 × 250 mm, 5 µm ID)

C<sub>18</sub> Analitik kolon (Intersil ODS-3, 2,1 × 50 mm, 3 µm ID)

C<sub>18</sub> Koruyucu kolon (Intersil ODS-3, 2,1 × 10 mm, 3 µm ID)

2. Katı faz ekstraksiyonu vakum manifoldu (Macherey-Nagel, Chromabond)

Pompa (Buchi, V-850)

3. Hassas terazi (SCALTEC SBA 31)

4. Vorteks (LMS, Harmony VTX-3000L)

5. pH metre (Thermo, Orion 3 Star)

6. Ultrasonik banyo (WiseClean, Wisd)

7. Ultra saf su cihazı (ELGA-VEOLIA, PureLab Option-Q DV 25)

8. Otomatik pipetler (Eppendorf, 1-20 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL, 500-5000 µL)

9. Döner buharlaştırıcı (rotary evaporator) (Buchi, Rotavapor R-200)

10. Öğütücü (Waring)

11. Kahve makinesi (Delonghi)

12. Şırınga ucu filtre (Macherey-Nagel, Chromafil Xtra PTFE-20/25 ve GF/PET-45/25)

13. Enjektör (Set Inject, 20 mL)

14. Balon joje (5 ve 10 mL), cam vial, kapak, septum (Isolab)

### 3.5. Fenolik Asit Miktar Tayini için Yöntem Koşullarının Belirlenmesi

#### 3.5.1. Kolon, Hareketli Faz ve Dedektör Dalga Boylarının Seçimi

Literatür çalışmaları sonucu HPLC kullanılarak yapılan fenolik asit analizlerinde çoğunlukla C<sub>18</sub> kolonların kullanıldığı saptanmıştır. Hareketli faz olarak izokratik sistemler yerine gradient programlama tercih edilmektedir. Bir sulu ve bir organik fazdan oluşan hareketli faz sistemlerinde genellikle sulu faza asetik asit, fosforik asit, trifloroasetik asit gibi bir organik asit eklenmektedir. Fenolik asitlerin tayini için spektrofotometrik dedektörler sıklıkla kullanılmaktadır. Benzoik asit iskeletine sahip olan fenolik asitler 200-290 nm dalga boyları arasında maksimum absorbans değerini verirken, sinnamik asit türevleri ek olarak 270-360 nm arasında geniş absorbans bandı vermektedir (Xu 2012).

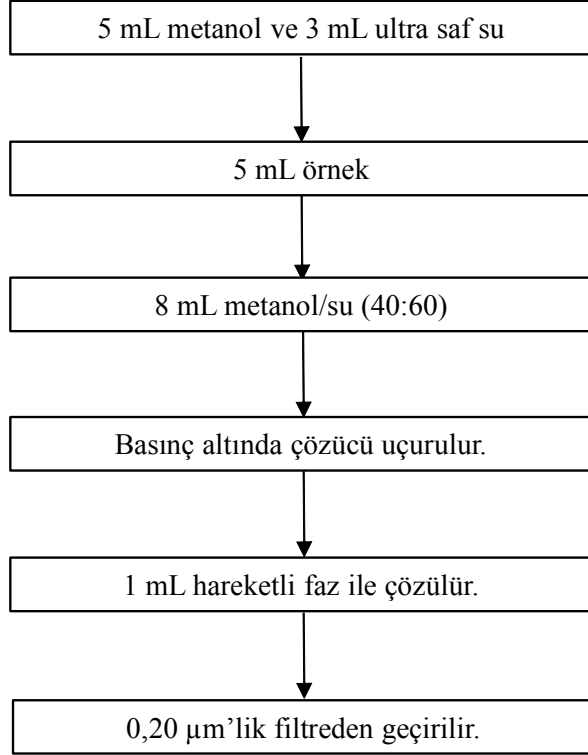
Literatür çalışmaları göz önünde bulundurularak kolon seçimi amacı ile ebatları 4,6 × 250 mm, tanecik boyutu 5,0 µm ve ebatları 2,1 × 50 mm, tanecik boyutu 3,0 µm olan 2 farklı C<sub>18</sub> kolon kullanılarak 40°C'de denemeler gerçekleştirildi. Hareketli faz olarak 0,5 mL/dk ve 1,0 mL/dk akış hızlarında, farklı oranlardaki su, metanol, asetonitril, o-fosforik asit ve formik asit karışımları ile çeşitli gradient programlama sistemleri denendi. Dedektör dalga boyunu belirlemek için 215, 235, 254, 280 ve 325 nm'de çalışmalar yapıldı.

#### 3.5.2. Ölçü Eğrilerinin Hazırlanması

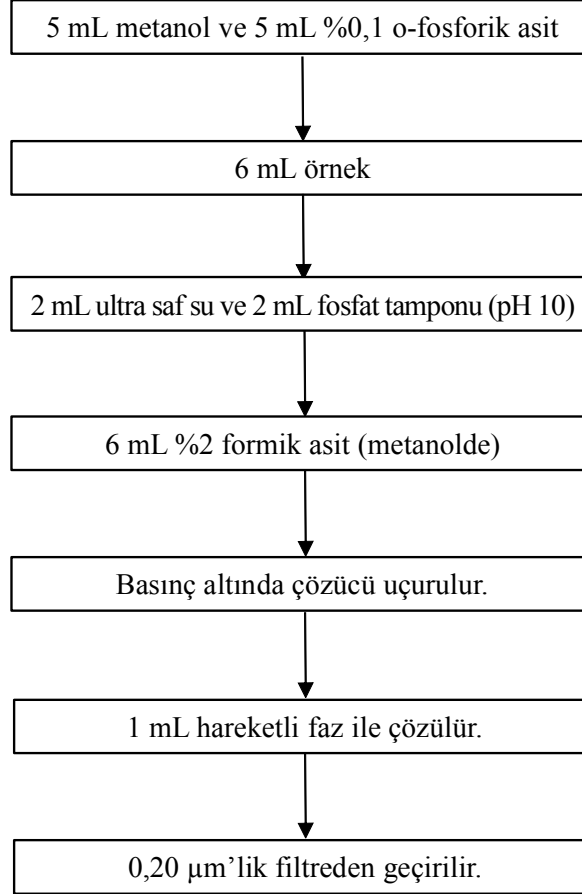
5CQA, CA, FA, SNA, PrCA, PHBA ve VA için 0,50-75,00 mg/L, 4CQA için 0,50-250,00 mg/L ve 3CQA için 0,50-1000,00 mg/L konsantrasyon aralıklarında standartlar hazırlandı. Her konsantrasyon 6 tekrarlı analiz edildi. F-testi ile sabit varyans varsayımının geçerli olup olmadığı incelendi. En yüksek konsantrasyona ait alan değerlerinin varyansı, en düşük konsantrasyona ait alan değerlerinin varyansına oranlandı ve F<sub>exp</sub> hesaplandı. F<sub>exp</sub> değeri tablo değerinden büyük olan ölçü eğrileri için Null hipotezi ve sabit varyans varsayımı reddedildi. SPSS (versiyon 21) programı ile ağırlıklı (weighted) regresyon analizi yapılarak değişkenlere en düşük hata değerini veren katsayılar bulundu ve dönüşümler uygulandı.

### 3.5.3. Fenolik Asitlerin Ekstraksiyonu

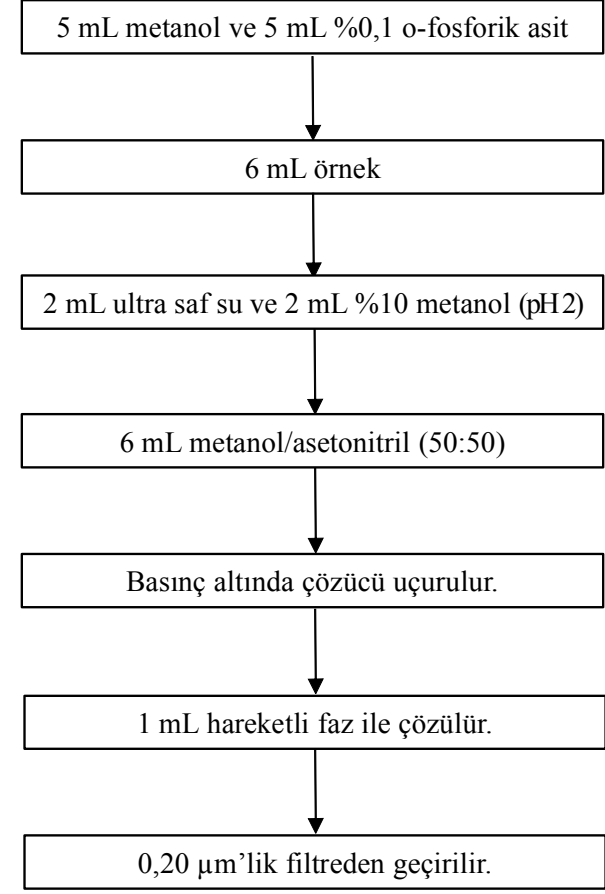
Fenolik asitlerin ekstraksiyonu için farklı ekstraksiyon yöntemleri denendi. Yeşil ve kavrulmuş kahve çekirdekleri öğütücü kullanılarak toz haline getirildi. Katı-sıvı ekstraksiyonu yöntemiyle farklı çözücü karışımları (metanol/su, metanol/su/asetonitril), farklı sıcaklıklar ve ultrasonik banyo kullanılarak yapılan denemeler ile elde edilen kromatogramlarda fenolik asit pikleri izlenmedi. Sonraki denemede girişimlerin uzaklaştırılması ve fenolik asitlerin deriştirilmesi için katı faz ekstraksiyonu (SPE) metodu kullanıldı. SPE metodunda C<sub>18</sub>, SAX ve HLB olmak üzere 3 farklı tipte katı faz ile 25 mg/L'lik standart çözelti (kahve örneklerinde miktar tayini yapılacak olan 9 fenolik asidin karışımı) kullanılarak 3 tekrarlı denemeler gerçekleştirildi. Kahve örnekleri, kahve makinesi ile 10 g öğütülmüş kahve çekirdeği ve 300 mL ultra saf su kullanılarak hazırlandı. SPE işleminden önce tüm örnekler 0,45 µm'lik şırınga ucu filtreden geçirildi ve %0,1'lik o-fosforik asit çözeltisi (suda) ile seyreltildi (50:50, h/h). C<sub>18</sub>, SAX ve HLB ile yapılan SPE çalışmalarının prosedürleri Şekil 3-1, 3-2 ve 3-3'te verildi.



Şekil 3-1: C<sub>18</sub> kartuş prosedürü



Şekil 3-2: SAX kartuş prosedürü



Şekil 3-3: HLB kartuş prosedürü

### 3.6. Geliştirilen Yöntemin Validasyon Parametreleri

Geliştirilen yöntemin validasyonu ICH (The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) parametrelerine göre gerçekleştirildi (ICH, 2005)

#### 3.6.1. Doğrusallık

Yöntemin doğrusallığını belirlemek için korelasyon katsayısı, y ekseninin kesim noktası ve regresyon eğrisinin eğimi verileri incelenmelidir (ICH, 2005). Geliştirilen yöntemin doğrusallığını belirlemek için PrCA, PHBA, 5CQA, VA, CA, FA ve SNA için 7, 4CQA için 9 ve 3CQA için 11 farklı konsantrasyonda çözeltiler ile çalışıldı. Elde edilen veriler ile ölçü eğrileri hazırlandı. Veriler Bölüm 4.2.1.'de verildi.

#### 3.6.2. Uygunluk Parametreleri

Uygunluk parametreleri; alıkonma süresi ( $t_R$ ), kuyruklanma faktörü (T), ayırma gücü ( $R_s$ ), alıkonma faktörü (k'), teorik plaka sayısı (N) ve teorik plaka eşdeğer yüksekliği (HETP) değerlendirildi. Sonuçlar Bölüm 4.2.2.'de verildi.

#### 3.6.3. Doğruluk

Doğruluk çalışması, 2 farklı konsantrasyondaki (1,00 ve 25,00 mg/L) standart çözeltiler ve 2 farklı konsantrasyonda (1,00 ve 25,00 mg/L) standart çözelti karışımı katılmış Brezilya menşeli kavrulmuş kahve örneği (K-2) ile HLB katı faz ekstraksiyonu kartuşu kullanılarak gerçekleştirildi. Yüzde geri kazanım değerleri hesaplandı. Sonuçlar, yüzde geri kazanım ve yüzde bağıl ortalama hata (RME) olarak verildi (Bölüm 4.2.3.).

#### 3.6.4. Kesinlik

Yöntemin kesinliği, tekrarlanabilirlik ve ara tekrarlanabilirlik olmak üzere 2 kategoride incelendi. Tekrarlanabilirlik çalışmasında 2 farklı konsantrasyonda (1,00 ve 25,00 mg/L) karışım halindeki standart çözeltiler ve 2 farklı konsantrasyonda fenolik asit standardı katılmış K-2 örneği ile 3 tekrarlı analizler gerçekleştirildi. Ara

tekrarlanabilirliğin belirlenmesi için 3 farklı günde 2 farklı konsantrasyondaki (1,00 ve 25,00 mg/L) standart çözeltiler ve 2 farklı konsantrasyondaki fenolik asit standardı eklenmiş K-2 örneği analiz edildi. Sonuçlar, yüzde bağıl standart sapma (RSD) olarak Bölüm 4.2.4'te verildi.

### **3.6.5. Geri Kazanım**

HLB katı faz ekstraksiyonu kartuşu ile analizi yapılan fenolik asitlerin ekstraksiyon etkinliğini belirlemek için ilk aşamada 2 farklı konsantrasyondaki (1,00 ve 25,00 mg/L) standart çözeltiler ile çalışıldı. Daha sonra K-2 örneğine son fenolik asit konsantrasyonları 1,00 ve 25,00 mg/L olacak şekilde standart çözelti karışımı katıldı ve ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi. Diğer tüm örneklere son fenolik asit konsantrasyonu 25 mg/L olacak şekilde standart çözelti katıldı. Geri kazanım sonuçları yüzde olarak, ölçülen konsantrasyonların teorik konsantrasyonlara oranları ile hesaplandı. Elde edilen veriler Bölüm 4.2.3'te verildi.

### **3.6.6. Gözlenebilme Sınırı**

Gözlenebilme sınırı, ölçü eğrisinin eğimi ve y eksenini kestiği noktanın standart sapması kullanılarak Bölüm 2.7.6.3'te verilen eşitlik ile hesaplandı. Sonuçlar Bölüm 4.2.6.'da verildi.

### **3.6.7. Tayin Sınırı**

Tayin sınırı, ölçü eğrisinin eğimi ve y eksenini kestiği noktanın standart sapması kullanılarak Bölüm 2.7.7.3'te verilen eşitlik ile hesaplandı. Sonuçlar Bölüm 4.2.7.'de verildi.

## 4. BULGULAR

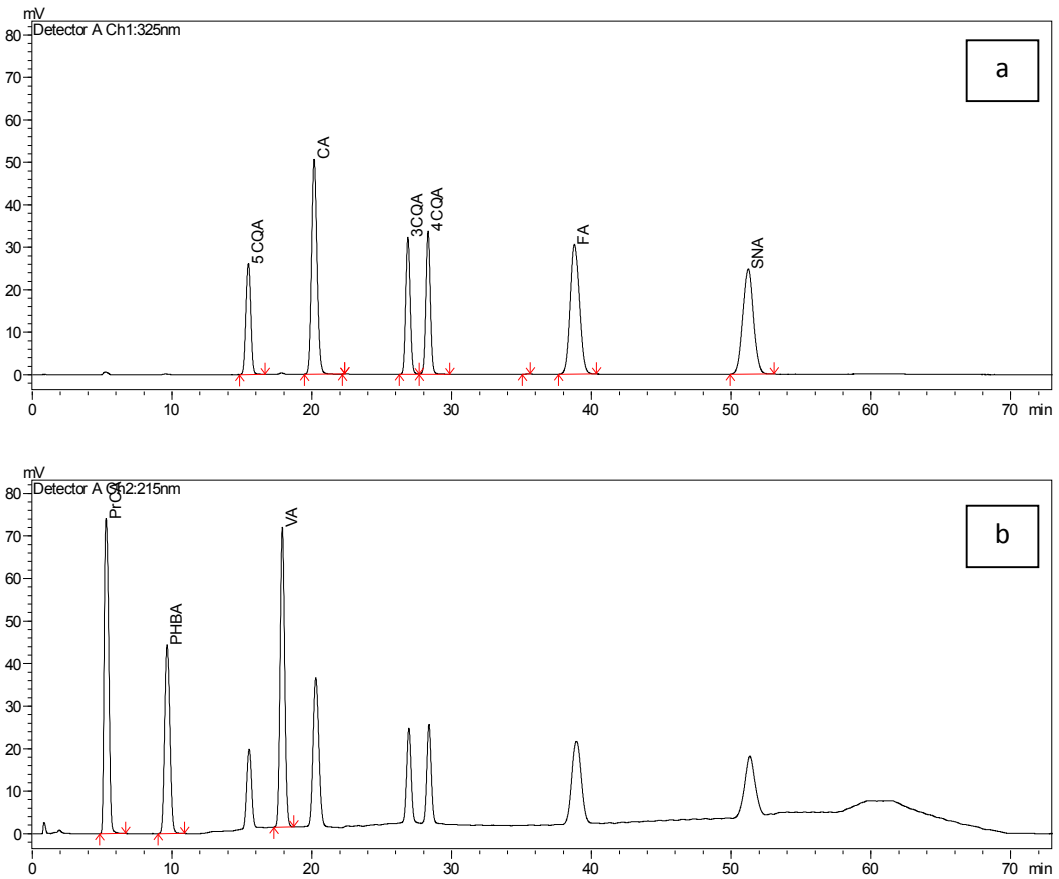
### 4.1. Kahve Örneklerinde Fenolik Asit Miktar Tayini için Geliştirilen Yöntemin Koşulları

#### 4.1.1. Kolon, Hareketli Faz ve Dedektör Dalga Boyu

2,1 x 50 mm ebatlarında ve tanecik boyutu 3,0 µm olan bir C<sub>18</sub> kolon kullanılarak uygun ayırma gücü ( $R_s \geq 2$ ) ile fenolik asitler birbirinden başarılı bir şekilde ayrıldı. Koruyucu kolon olarak ebatları 2,1 x 10 mm ve tanecik boyutu 3,0 µm olan bir C<sub>18</sub> kolon kullanıldı. Validasyon parametreleri göz önünde bulundurularak A (% 0,08'lik o-fosforik asit çözeltisi, suda) ve B (metanol/su/asetonitril, 85:10:5) olmak üzere iki bileşenden oluşan bir hareketli faz seçildi ve Tablo 4-1'de verilen gradient programlama kullanıldı. Geliştirilen yöntem ile fenolik asitlerin tayininde en uygun dalga boyları, 5CQA, CA, 3CQA, 4CQA, FA ve SNA için 325 nm, PrCA, PHBA ve VA için 215 nm olarak belirlendi. Kolon sıcaklığı 40°C'ye, enjeksiyon hacmi 5,0 µL'ye ayarlandı. Akış hızı 0,5 mL/dk olarak belirlendi. Herbir fenolik asitten 25,00 mg/L içeren standart çözeltinin geliştirilen yöntem ile elde edilen kromatogramı Şekil 4-1'de verildi.

**Tablo 4-1: Hareketli fazın gradient programlaması**

Zaman (dk.)	% B	Zaman (dk.)	% B
0	0	56	15
10	0	58	20
15	5	60	20
20	5	62	15
25	10	64	10
40	10	66	5
45	11	68	0
50	12	73	0
52	15		



**Şekil 4-1: Standart çözeltinin kromatogramı, a) 325 nm b) 215 nm**

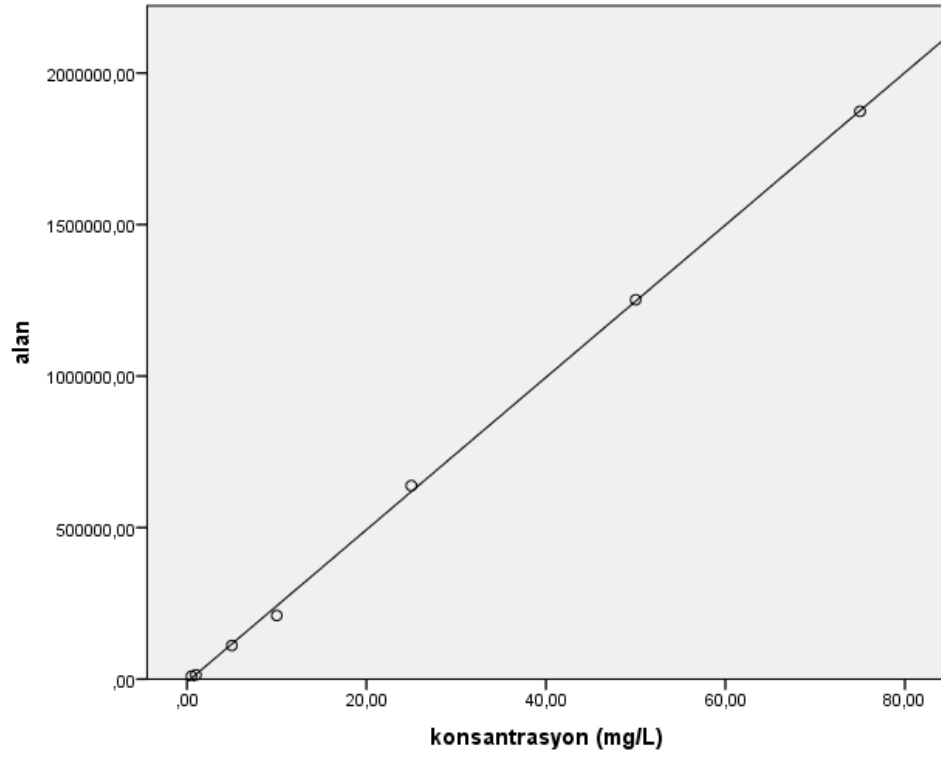
#### 4.1.2. Ölçü Eğrilerinin Hazırlanması

Geliştirilen metotta dış standart yöntemi ile çalışıldı. Ağırlıklı regresyon analizi ile çalışılması gerekip gerekmediğini belirlemek amacıyla F-testi uygulandı (Tablo 4-2) ve sabit varyans varsayımının geçerli olmadığı belirlendi. Tablo 4-2'de kullanılan dönüşüm katsayıları verildi. Ölçü eğrileri, 5CQA (Şekil 4-2), CA (Şekil 4-3), FA (Şekil 4-6), SNA (Şekil 4-7), PrCA (Şekil 4-8), PHBA (Şekil 4-9) ve VA (Şekil 4-10) için 0,50-75,00 mg/L, 4CQA (Şekil 4-5) için 0,50-250,00 mg/L ve 3CQA (Şekil 4-4) için 0,50-1000,00 mg/L konsantrasyon aralıklarındaki standart çözeltiler ile Bölüm 3.5.2.'de açıklandığı gibi çizildi. Tablo 4-3, 4-4, 4-5, 4-6, 4-7, 4-8, 4-9, 4-10 ve 4-11'de sırasıyla 5CQA, CA, 3CQA, 4CQA, FA, SNA, PrCA, PHBA ve VA'nın ölçü eğrilerine ait veriler verildi. Tablo 4-12'de fenolik asitlerin ortalama pik alanları kullanılarak elde edilen regresyon analizi sonuçları verildi.

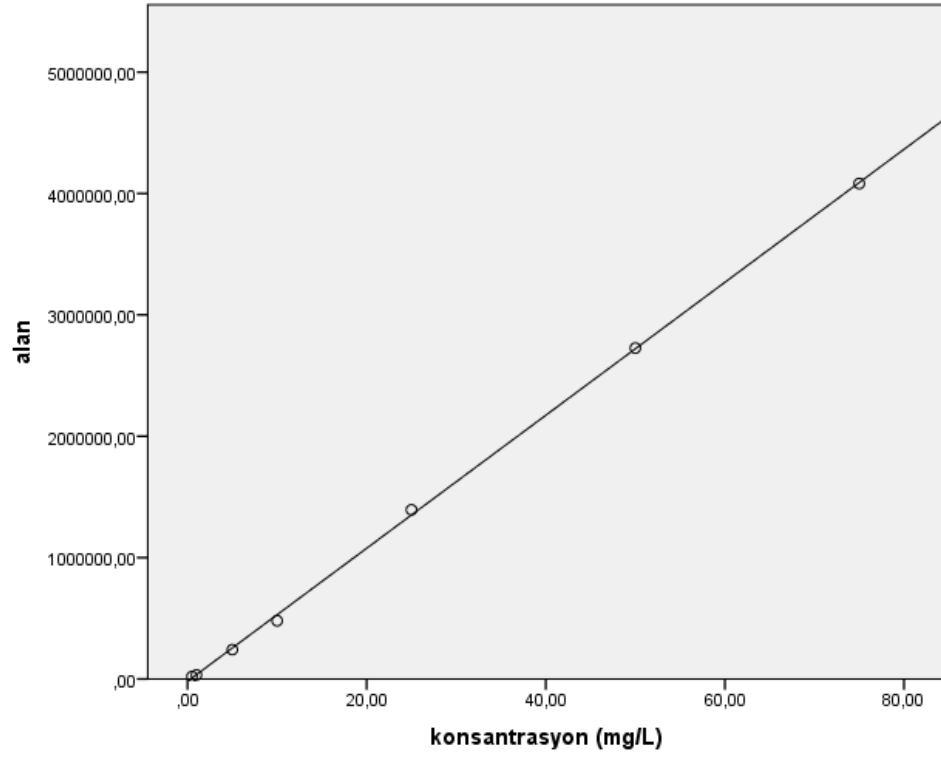
**Tablo 4-2: F-testinin sonuçları ve ağırlıklı regresyon analizinde kullanılan dönüşüm katsayıları**

<b>Fenolik asit</b>	<b>Konsantrasyon (mg/L)</b>	<b>Varyans (<math>s^2</math>)</b>	<b><math>F_{exp}^a</math></b>	<b>Dönüşüm katsayısı</b>
5CQA	0,50	144637,6	1161,5	$1/x^{0,5}$
	75,00	167996482,7		
CA	0,50	208646,67	1303,4	$1/x^{0,5}$
	75,00	271948268,97		
3CQA	0.50	94716,3	75468,7	$1/x$
	1000.00	7148117535,1		
4CQA	0.50	163824,5667	8334,6	$1/x$
	250,00	1365415250,3		
FA	0,50	446587,6	877,9	$1/x^{0,5}$
	75,00	392079953,5		
SNA	0,50	351853,1	812,5	$1/x^{0,5}$
	75,00	285869647,1		
PrCA	0,50	10762,3	42179,6	$1/x^{0,5}$
	75,00	453948167,9		
PHBA	0,50	64791,0	3404,8	$1/x^{0,5}$
	75,00	220599496,6		
VA	0,50	108542,6667	6874,7	$1/x^{0,5}$
	75,00	746194997,9		

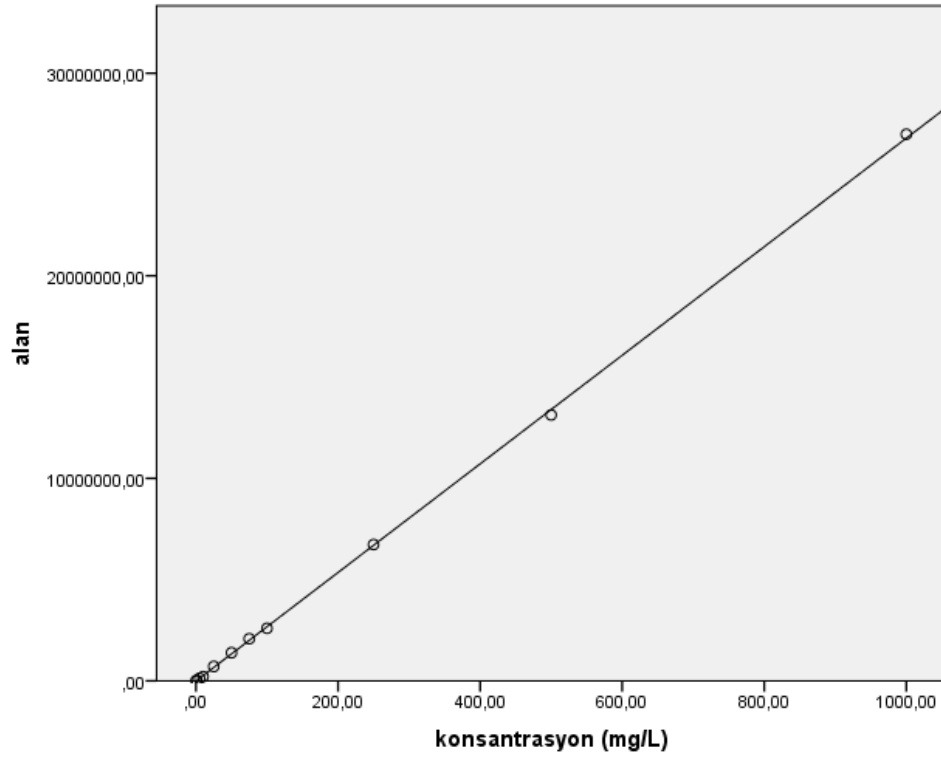
<sup>a</sup> $F_{exp} = s^2_{yüksek} / s^2_{düşük}$ ,  $F_{tablo}(5, 5, 0,99) = 10,97$



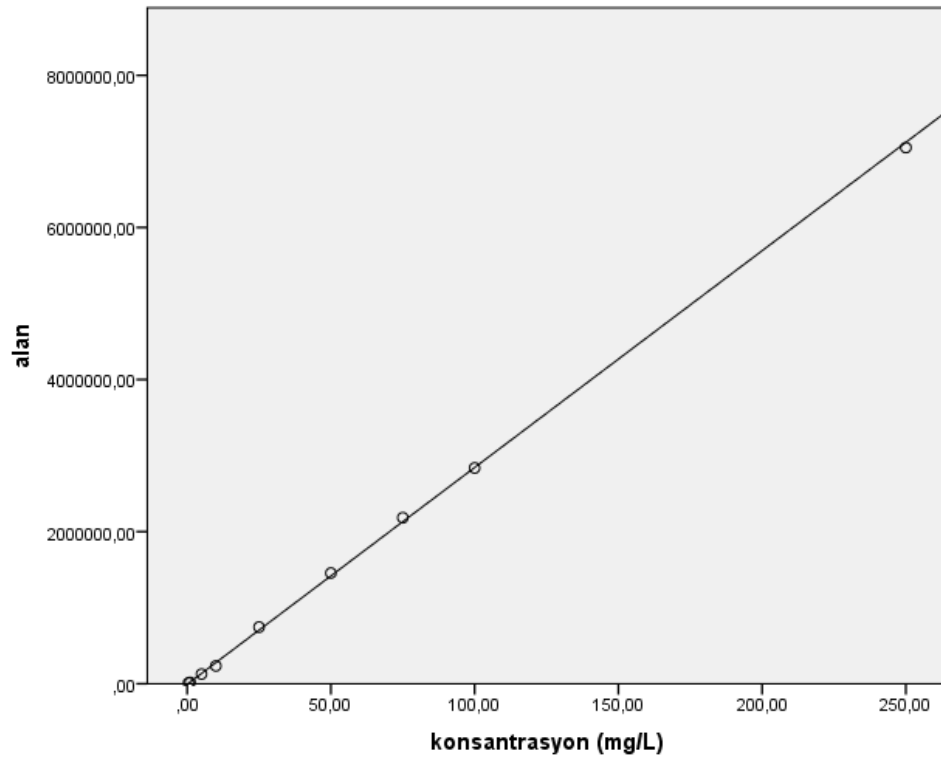
Şekil 4-2: 5CQA'ya ait ölçü eğrisi ( $y = 25142,124x - 9715,787$ )



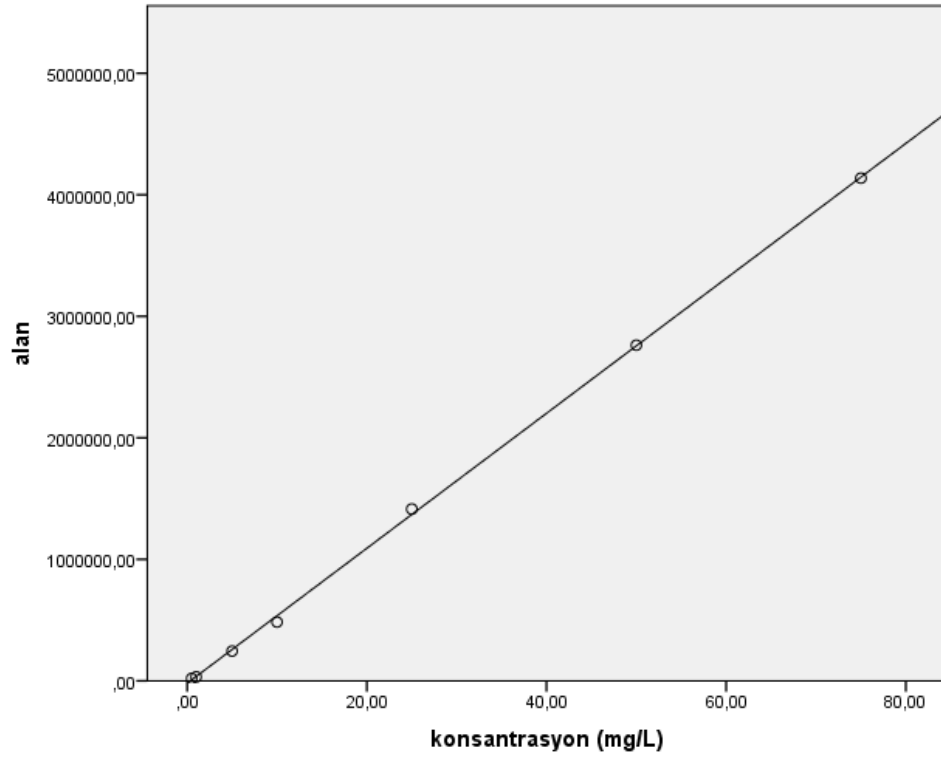
Şekil 4-3: CA'ya ait ölçü eğrisi ( $y = 54784,900x - 18278,156$ )



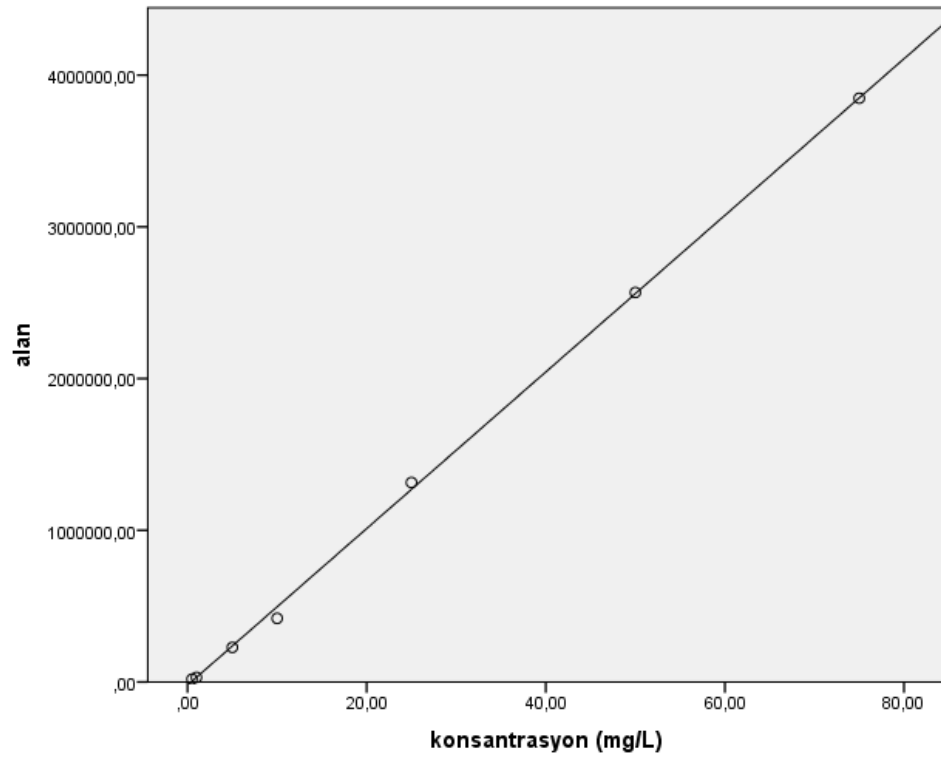
Şekil 4-4: 3CQA'ya ait ölçü eğrisi ( $y = 26802,756x - 6289,579$ )



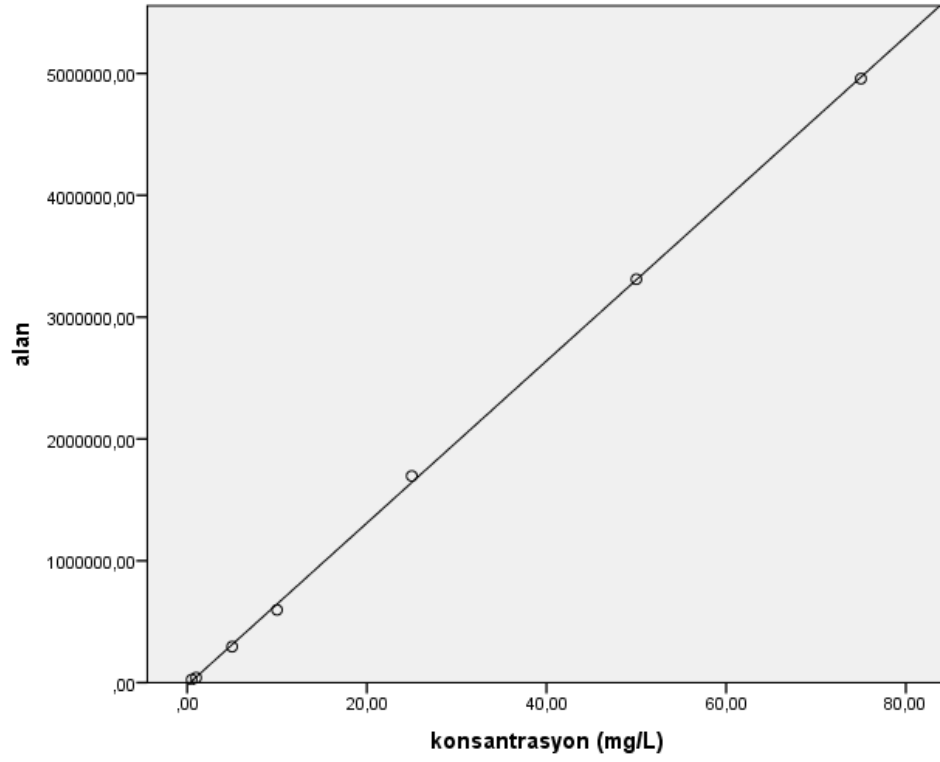
Şekil 4-5: 4CQA'ya ait ölçü eğrisi ( $y = 28503,942x - 6584,385$ )



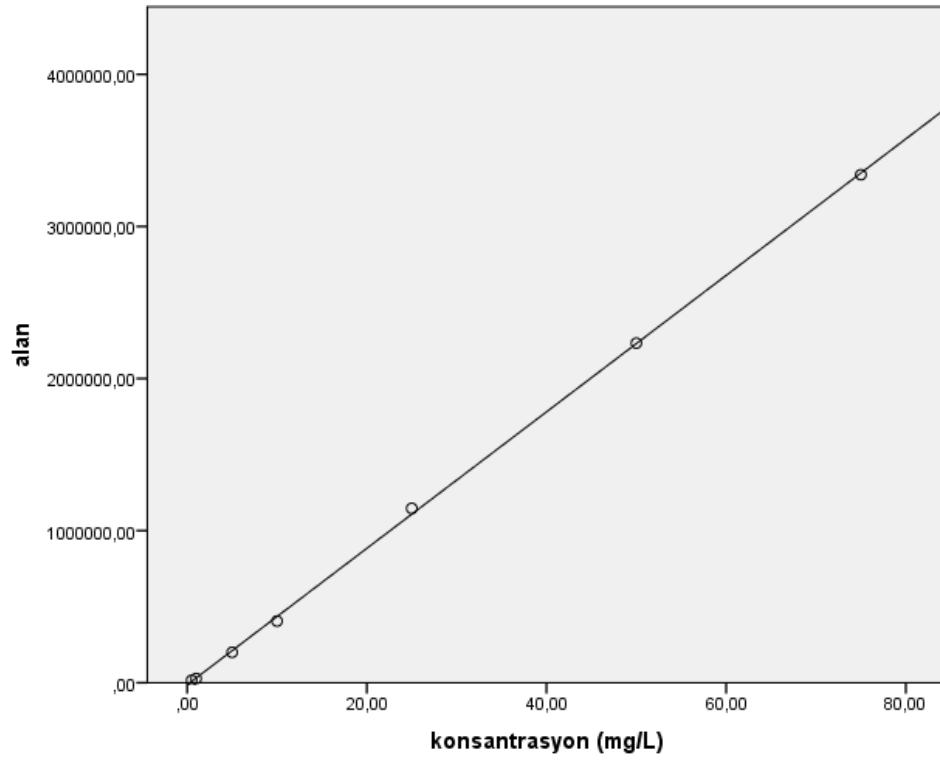
Şekil 4-6: FA'ya ait ölçü eğrisi ( $y = 55529,062x - 19292,406$ )



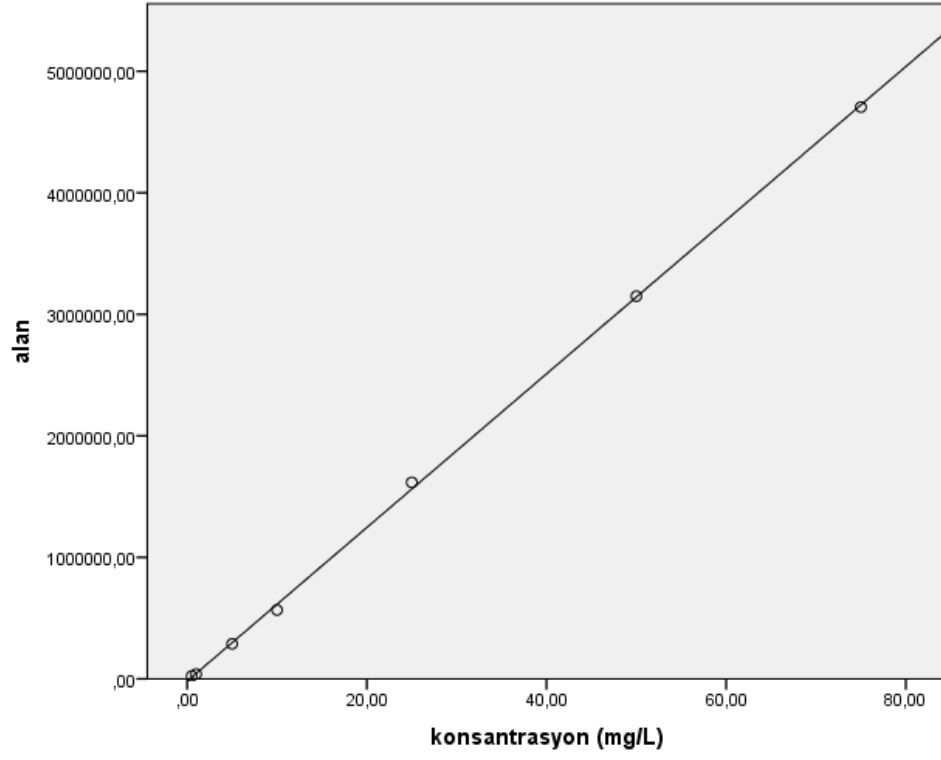
Şekil 4-7: SNA'ya ait ölçü eğrisi ( $y = 51609,255x - 20405,394$ )



Şekil 4-8: PrCA'ya ait ölçü eğrisi ( $y = 66544,934x - 20722,503$ )



Şekil 4-9: PHBA'ya ait ölçü eğrisi ( $y = 44866,145x - 13411,303$ )



**Şekil 4-10: VA'ya ait ölçü eğrisi ( $y = 63218,102x - 18349,719$ )**

**Tablo 4-3: 5CQA'nın ölçü eğrisine ait pik alanları (A), ortalama pik alanları ve yüzde bağıl standart sapma değerleri (% RSD)**

	<b>Konsantrasyon (mg/L)</b>						
	<b>0,50</b>	<b>1,00</b>	<b>5,00</b>	<b>10,00</b>	<b>25,00</b>	<b>50,00</b>	<b>75,00</b>
<b>A-1<sup>a</sup></b>	9841	14228	110313	207043	636068	1253706	1889574
<b>A-2</b>	9178	14664	110542	203519	642049	1255517	1878082
<b>A-3</b>	9487	13839	111064	204391	636240	1249283	1868745
<b>A-4</b>	9137	13868	111175	200677	635045	1248265	1881206
<b>A-5</b>	9951	13660	110900	202369	639951	1257932	1872743
<b>A-6</b>	9970	13729	110956	201301	639891	1246282	1851632
<b>Ortalama pik alanı</b>	9594	13998	110825	203217	638207	1251831	1873664
<b>RSD (%)</b>	3,96	2,72	0,30	1,14	0,44	0,36	0,69

<sup>a</sup>Tekrar sayısı

**Tablo 4-4: CA'nın ölçü eğrisine ait pik alanları (A), ortalama pik alanları ve yüzde bağıl standart sapma değerleri (% RSD)**

	<b>Konsantrasyon (mg/L)</b>						
	<b>0,50</b>	<b>1,00</b>	<b>5,00</b>	<b>10,00</b>	<b>25,00</b>	<b>50,00</b>	<b>75,00</b>
<b>A-1<sup>a</sup></b>	20524	33295	243351	476972	1400268	2725279	4082736
<b>A-2</b>	21236	33091	238853	479323	1393918	2723237	4107039
<b>A-3</b>	20456	33724	241625	484600	1398308	2739115	4087864
<b>A-4</b>	20495	33304	242517	474581	1399742	2727588	4075160
<b>A-5</b>	20911	34065	241391	481080	1389705	2724611	4084514
<b>A-6</b>	21560	32623	243375	483095	1382505	2720438	4056596
<b>Ortalama pik alanı</b>	20864	33350	241852	479942	1394074	2726711	4082318
<b>RSD (%)</b>	2,19	1,50	0,70	0,78	0,50	0,24	0,40

<sup>a</sup>Tekrar sayısı

**Tablo 4-5: 3CQA'nın ölçü eğrisine ait pik alanları (A), ortalama pik alanları ve yüzde bağıl standart sapma değerleri (% RSD)**

	Konsantrasyon (mg/L)										
	0,50	1,00	5,00	10,00	25,00	50,00	75,00	100,00	250,00	500,00	1000,00
<b>A-1<sup>a</sup></b>	10061	16764	123078	212594	711348	1388559	2082973	2601203	6744275	13138641	27093582
<b>A-2</b>	9964	17144	122394	212283	709768	1388034	2085861	2596852	6727736	13113408	27046033
<b>A-3</b>	10573	16560	121006	208907	711239	1394072	2084544	2589805	6727199	13111286	26853152
<b>A-4</b>	10538	17642	122326	210354	709552	1390294	2076181	2593317	6735964	13113885	27009200
<b>A-5</b>	10563	17421	123567	211923	708634	1389093	2078696	2598771	6720134	13131996	26937672
<b>A-6</b>	10705	17150	122782	209174	708953	1381316	2066772	2587618	6721288	13167528	26979521
<b>Ortalama pik alanı</b>	10401	17114	122526	210873	709916	1388561	2079171	2594594	6729433	13129457	26986527
<b>RSD (%)</b>	2,96	2,34	0,71	0,77	0,16	0,30	0,34	0,20	0,14	0,17	0,31

<sup>a</sup>Tekrar sayısı

**Tablo 4-6: 4CQA'nın ölçü eğrisine ait pik alanları (A), ortalama pik alanları ve yüzde bağıl standart sapma değerleri (% RSD)**

	<b>Konsantrasyon (mg/L)</b>								
	<b>0,50</b>	<b>1,00</b>	<b>5,00</b>	<b>10,00</b>	<b>25,00</b>	<b>50,00</b>	<b>75,00</b>	<b>100,00</b>	<b>250,00</b>
<b>A-1<sup>a</sup></b>	10351	18426	127743	234108	743162	1460322	2193990	2865476	7011124
<b>A-2</b>	10898	18257	128168	234778	745503	1457480	2180445	2859978	7018512
<b>A-3</b>	11425	18498	127754	242331	745773	1456107	2191548	2811187	7097131
<b>A-4</b>	11434	19189	129136	231074	741998	1460134	2185610	2846518	7073451
<b>A-5</b>	11190	18834	128923	232876	745417	1457824	2179744	2812935	7022390
<b>A-6</b>	11075	17589	127067	230835	745443	1443129	2168828	2826918	7078120
<b>Ortalama pik alanı</b>	11062	18466	128132	234334	744549	1455833	2183361	2837169	7050121
<b>RSD (%)</b>	3,66	2,94	0,61	1,80	0,21	0,44	0,42	0,83	0,52

<sup>a</sup>Tekrar sayısı

**Tablo 4-7: FA'nın ölçü eğrisine ait pik alanları (A), ortalama pik alanları ve yüzde bağıl standart sapma değerleri (% RSD)**

	Konsantrasyon (mg/L)						
	0,50	1,00	5,00	10,00	25,00	50,00	75,00
<b>A-1<sup>a</sup></b>	19670	33414	243155	483360	1422155	2766357	4138668
<b>A-2</b>	20818	32575	245690	480184	1416308	2763538	4150847
<b>A-3</b>	21211	31982	245740	487774	1415186	2770881	4150028
<b>A-4</b>	21148	32055	246817	483868	1410155	2763021	4146416
<b>A-5</b>	20241	33070	243485	484877	1409611	2765160	4137461
<b>A-6</b>	19828	34254	245712	483615	1408518	2746844	4098176
<b>Ortalama pik alanı</b>	20486	32892	245100	483946	1413656	2762634	4136933
<b>RSD (%)</b>	3,26	2,65	0,59	0,51	0,37	0,30	0,48

<sup>a</sup>Tekrar sayısı

**Tablo 4-8: SNA'nın ölçü eğrisine ait pik alanları (A), ortalama pik alanları ve yüzde bağıl standart sapma değerleri (% RSD)**

	Konsantrasyon (mg/L)						
	0,50	1,00	5,00	10,00	25,00	50,00	75,00
<b>A-1<sup>a</sup></b>	19406	30339	228619	424176	1316642	2568988	3859600
<b>A-2</b>	18837	30742	227735	421333	1318683	2564133	3854485
<b>A-3</b>	18258	30246	226848	414546	1314791	2568533	3852176
<b>A-4</b>	19865	29209	227674	411346	1314120	2572989	3854510
<b>A-5</b>	19615	31191	228569	420309	1313429	2575001	3852489
<b>A-6</b>	18880	31014	228821	425149	1310681	2553330	3813752
<b>Ortalama pik alanı</b>	19286	30457	228044	419477	1314724	2567162	3847835
<b>RSD (%)</b>	3,10	2,34	0,33	1,30	0,21	0,30	0,44

<sup>a</sup>Tekrar sayısı

**Tablo 4-9: PrCA'nın ölçü eğrisine ait pik alanları (A), ortalama pik alanları ve yüzde bağıl standart sapma değerleri (% RSD)**

	<b>Konsantrasyon (mg/L)</b>						
	<b>0,50</b>	<b>1,00</b>	<b>5,00</b>	<b>10,00</b>	<b>25,00</b>	<b>50,00</b>	<b>75,00</b>
<b>A-1<sup>a</sup></b>	25389	40972	294822	593512	1700575	3316119	4970398
<b>A-2</b>	25356	40451	295112	598090	1699143	3311219	4965431
<b>A-3</b>	25220	40212	293260	599110	1698216	3311254	4967275
<b>A-4</b>	25275	40414	295737	597270	1695561	3313870	4966041
<b>A-5</b>	25289	40912	295967	598412	1692729	3315652	4959140
<b>A-6</b>	25513	40654	294909	596512	1691955	3296900	4914253
<b>Ortalama pik alanı</b>	25340	40603	294968	597151	1696363	3310836	4957090
<b>RSD (%)</b>	0,41	0,74	0,32	0,33	0,21	0,22	0,43

<sup>a</sup>Tekrar sayısı

**Tablo 4-10: PHBA'nın ölçü eğrisine ait pik alanları (A), ortalama pik alanları ve yüzde bağıl standart sapma değerleri (% RSD)**

	Konsantrasyon (mg/L)						
	0,50	1,00	5,00	10,00	25,00	50,00	75,00
<b>A-1<sup>a</sup></b>	17085	27752	199976	401570	1148861	2234860	3349846
<b>A-2</b>	16465	27728	200258	402380	1148271	2234818	3346428
<b>A-3</b>	16942	28133	198649	409976	1148032	2232943	3348113
<b>A-4</b>	17014	27683	200410	402314	1146195	2235586	3344288
<b>A-5</b>	17045	27963	199882	408950	1144609	2237682	3343691
<b>A-6</b>	17190	28073	198758	407573	1142456	2222472	3310533
<b>Ortalama pik alanı</b>	16957	27889	199656	405461	1146404	2233060	3340483
<b>RSD (%)</b>	1,50	0,69	0,38	0,93	0,22	0,24	0,44

<sup>a</sup>Tekrar sayısı

**Tablo 4-11: VA'nın ölçü eğrisine ait pik alanları (A), ortalama pik alanları ve yüzde bağıl standart sapma değerleri (% RSD)**

	Konsantrasyon (mg/L)						
	0,50	1,00	5,00	10,00	25,00	50,00	75,00
<b>A-1<sup>a</sup></b>	23389	40851	283871	566262	1622885	3167561	4723281
<b>A-2</b>	23122	39397	283196	564540	1629156	3144590	4698578
<b>A-3</b>	23723	40365	286190	568620	1605779	3130965	4725796
<b>A-4</b>	23161	39593	283300	569696	1608899	3173015	4730691
<b>A-5</b>	23391	39253	297614	568639	1622486	3156955	4696990
<b>A-6</b>	23970	39281	294773	561941	1612886	3120476	4658087
<b>Ortalama pik alanı</b>	23459	39790	288157	566616	1617015	3148927	4705571
<b>RSD (%)</b>	1,40	1,67	2,21	0,52	0,57	0,66	0,58

<sup>a</sup>Tekrar sayısı

**Tablo 4-12: Ortalama pik alanları kullanılarak elde edilen regresyon analizi sonuçları**

<b>Fenolik asit</b>	<b>Eğim</b>	<b>Kesim noktası</b>	<b>r<sup>2</sup></b>
<b>5CQA</b>	25142,124	-9715,787	0,9992
<b>CA</b>	54784,900	-18278,156	0,9995
<b>3CQA</b>	26802,756	-6289,579	0,9994
<b>4CQA</b>	28503,942	-6584,385	0,9990
<b>FA</b>	55529,062	-19292,406	0,9995
<b>SNA</b>	51609,255	-20405,394	0,9990
<b>PrCA</b>	66544,934	-20722,503	0,9996
<b>PHBA</b>	44866,145	-13411,303	0,9996
<b>VA</b>	63218,102	-18349,719	0,9996

#### **4.1.3. Fenolik Asitlerin Ekstraksiyonu**

Bölüm 3.5.3.'te belirtildiği üzere, fenolik asitlerin ekstraksiyonu için 3 farklı tipte katı faz (C<sub>18</sub>, SAX ve HLB) kullanılarak 25,00 mg/L'lik fenolik asit standart çözeltisi ile yapılan analizler sonucunda en yüksek geri kazanım (%) değerleri HLB kartuş ile elde edildi (Tablo 4-13). Bu sebeple kahve örneklerinden fenolik asitlerin ekstraksiyonunda HLB kartuş kullanıldı.

**Tablo 4-13: SPE kartuşları ile geri kazanım (%) sonuçları**

Fenolik asit	C <sub>18</sub>		SAX		HLB	
	Konsantrasyon (mg/L)	Geri kazanım (%)	Konsantrasyon (mg/L)	Geri kazanım (%)	Konsantrasyon (mg/L)	Geri kazanım (%)
5CQA	7,87	31,50	16,49	65,96	24,92	99,70
CA	3,51	14,05	7,30	29,20	24,68	98,70
3CQA	2,94	11,75	6,06	24,23	25,85	103,41
4CQA	5,70	22,80	12,07	48,28	25,32	101,27
FA	3,59	14,37	7,43	29,72	24,73	98,94
SNA	3,46	13,82	7,10	28,39	24,48	97,93
PrCA	2,35	9,40	5,35	21,41	24,76	99,05
PHBA	3,56	14,24	7,35	29,40	24,70	98,80
VA	3,62	14,49	7,17	28,69	25,32	101,27

## 4.2. Fenolik Asitlerin Miktar Tayini için Geliştirilen Yöntemin Validasyon Sonuçları

### 4.2.1. Doğrusallık

Geliştirilen yöntemin, 5CQA, CA, FA, SNA, PrCA, PHBA ve VA için 0,5-75,00 mg/L arasında, 4CQA için 0,5-250,00 mg/L arasında ve 3CQA için 0,5-1000,00 mg/L arasında doğrusal olduğu tespit edildi. Sonuçlar Bölüm 4.1.2.'de verildi.

### 4.2.2. Uygunluk Parametreleri

Uygunluk parametreleri sonuçları Tablo 4-14'te verildi.

**Tablo 4-14: Uygunluk parametreleri**

<b>Fenolik asit</b>	<b>Alıkonma süresi (t<sub>R</sub>) (dk)</b>	<b>Kuyruklanma faktörü (t)</b>	<b>Ayırma gücü (R<sub>s</sub>)</b>	<b>Alıkonma faktörü (k')</b>	<b>Teorik plaka sayısı (N)</b>	<b>Teorik plaka eşdeğer yüksekliği (HETP)</b>
5CQA	15,460	1,015	9,493	19,021	9252,132	16,212
CA	20,159	1,136	6,875	25,107	12394,192	12,102
3CQA	26,865	1,097	10,264	33,791	34055,915	4,405
4CQA	28,307	1,075	2,481	35,659	38048,619	3,942
FA	38,780	1,111	11,566	49,221	15894,042	9,437
SNA	51,219	1,029	9,412	65,330	21027,285	7,134
PrCA	5,241	1,247	6,440	5,389	1306,882	114,777
PHBA	9,550	1,117	6,832	10,641	3142,161	47,738
VA	17,833	1,073	12,924	20,739	14115,416	10,627

### 4.2.3. Doğruluk

Standart çözeltiler ve standart çözelti katılmış K-2 örneği ile 1,00 ve 25,00 mg/L'lik konsantrasyonlarda gerçekleştirilen doğruluk çalışmasının sonuçları sırasıyla Tablo 4-15 ve 4-16'da verildi. Her deneme 3 tekrarlı gerçekleştirildi ve sonuçlar ortalama olarak verildi.

**Tablo 4-15: Standart çözelti ile yapılan doğruluk çalışmasının sonuçları**

	Standart çözelti konsantrasyonu (mg/L)					
	1,00			25,00		
Fenolik asit	Konsantrasyon (mg/L) <sup>a</sup>	Geri kazanım (%)	RME (%)	Konsantrasyon (mg/L)	Geri kazanım (%)	RME (%)
5CQA	1,01	100,64	0,64	24,87	99,48	-0,52
CA	0,93	92,83	-7,17	24,76	99,03	-0,97
3CQA	0,87	86,89	-13,11	25,74	102,98	2,98
4CQA	0,85	85,22	-14,78	25,19	100,76	0,76
FA	0,94	94,30	-5,70	24,75	99,01	-0,99
SNA	0,98	97,74	-2,26	24,75	98,99	-1,01
PrCA	0,94	93,54	-6,46	24,78	99,10	-0,90
PHBA	0,91	91,36	-8,64	24,72	98,88	-1,12
VA	0,98	98,28	-1,72	24,76	99,05	-0,95

<sup>a</sup>3 analiz sonucunun ortalaması

**Tablo 4-16: K-2 örneği ile yapılan doğruluk çalışmasının sonuçları**

Fenolik asit	Konsantrasyon (mg/L) <sup>a</sup>	Katılan standart miktarı (mg/L)					
		1,00			25,00		
		Konsantrasyon (standart katılmış) (mg/L)	Geri kazanım (%)	RME (%)	Konsantrasyon (standart katılmış) (mg/L)	Geri kazanım (%)	RME (%)
<b>5CQA</b>	149,64	150,55	99,94	-0,06	174,20	99,75	-0,25
<b>CA</b>	2,73	3,64	97,56	-2,44	23,75	85,65	-14,35
<b>3CQA</b>	334,34	335,15	99,94	-0,06	359,32	99,99	-0,01
<b>4CQA</b>	169,33	170,14	99,89	-0,11	193,45	99,54	-0,46
<b>FA</b>	0,00	0,96	96,27	-3,73	20,79	83,16	-16,84
<b>SNA</b>	0,00	1,11	110,57	10,57	22,46	89,84	-10,16
<b>PrCA</b>	1,74	2,57	93,86	-6,14	20,46	76,52	-23,48
<b>PHBA</b>	4,55	5,34	96,15	-3,85	26,10	88,31	-11,69
<b>VA</b>	0,00	1,08	108,36	8,36	21,45	85,79	-14,21

<sup>a</sup>3 analiz sonucunun ortalaması

#### **4.2.4. Kesinlik**

Geliştirilen yöntemin kesinliği Bölüm 3.6.4.'te açıklandığı şekilde belirlendi. Tekrarlanabilirlik çalışmasında 2 farklı konsantrasyondaki standart çözeltiler ve standart katılmış K-2 örneği kullanılarak elde edilen sonuçlar sırasıyla Tablo 4-17 ve 4-18'de verildi. Ara tekrarlanabilirlik verileri standart çözeltilerin (Tablo 4-19) ve K-2 örneğinin (Tablo 4-20) 3 farklı günde analiz edilmesi ile elde edildi. Sonuçlar, yüzde bağıl standart sapma olarak verildi.

**Tablo 4-17: Standart çözeltiler ile gerçekleştirilen tekrarlanabilirlik çalışmasının sonuçları**

Fenolik asit	Standart çözelti konsantrasyonu (mg/L)							
	1,00				25,00			
	Konsantrasyon (mg/L) <sup>a</sup>			RSD (%)	Konsantrasyon (mg/L)			RSD (%)
<b>5CQA</b>	1,02	1,00	1,00	0,86	24,92	24,92	24,76	0,37
<b>CA</b>	0,95	0,92	0,92	1,82	24,68	24,73	24,87	0,40
<b>3CQA</b>	0,86	0,88	0,87	0,92	25,85	25,74	25,64	0,42
<b>4CQA</b>	0,87	0,84	0,85	1,96	25,32	25,24	25,02	0,62
<b>FA</b>	0,95	0,94	0,94	0,88	24,73	24,78	24,74	0,10
<b>SNA</b>	0,96	0,98	0,99	1,51	24,48	24,93	24,83	0,94
<b>PrCA</b>	0,93	0,94	0,94	0,11	24,76	24,82	24,75	0,15
<b>PHBA</b>	0,91	0,92	0,91	0,31	24,70	24,75	24,71	0,09
<b>VA</b>	0,99	0,98	0,98	0,35	24,89	24,81	24,58	0,67

<sup>a</sup>Aynı gün içinde 3 tekrarlı yapılan analiz sonuçları

**Tablo 4-18: K-2 örneği ile gerçekleştirilen tekrarlanabilirlik çalışmasının sonuçları**

Fenolik asit	Katılan standart miktarı (mg/L)							
	1,00				25,00			
	Konsantrasyon (mg/L) <sup>a</sup>			RSD (%)	Konsantrasyon (mg/L)			RSD (%)
<b>5CQA</b>	150,08	150,49	151,10	0,34	175,55	171,13	175,92	1,53
<b>CA</b>	3,62	3,66	3,62	0,60	23,97	23,33	23,95	1,54
<b>3CQA</b>	335,28	334,94	335,24	0,05	361,52	359,35	357,10	0,62
<b>4CQA</b>	170,61	169,95	169,87	0,24	194,41	193,36	192,57	0,48
<b>FA</b>	0,95	0,99	0,95	2,20	20,71	20,45	21,21	1,85
<b>SNA</b>	1,11	1,10	1,11	0,26	22,51	22,65	22,22	0,99
<b>PrCA</b>	2,57	2,58	2,57	0,23	20,42	20,48	20,49	0,19
<b>PHBA</b>	5,36	5,30	5,35	0,54	26,12	26,09	26,08	0,08
<b>VA</b>	1,08	1,08	1,09	0,22	22,00	21,30	21,05	2,30

<sup>a</sup>Aynı gün içinde 3 tekrarlı yapılan analiz sonuçları

**Tablo 4-19: Standart çözeltiler ile gerçekleştirilen ara tekrarlanabilirlik çalışmasının sonuçları**

Fenolik asit	Standart çözelti konsantrasyonu (mg/L)							
	1,00				25,00			
	Konsantrasyon (mg/L) <sup>a</sup>			RSD (%)	Konsantrasyon (mg/L)			RSD (%)
<b>5CQA</b>	1,02	0,99	0,99	1,53	24,92	25,49	25,61	1,45
<b>CA</b>	0,95	0,94	0,93	0,77	24,68	25,57	25,50	1,97
<b>3CQA</b>	0,86	0,85	0,86	0,68	25,85	26,43	26,38	1,23
<b>4CQA</b>	0,87	0,89	0,87	1,05	25,32	25,91	26,02	1,46
<b>FA</b>	0,95	0,94	0,93	0,98	24,73	25,47	24,80	1,63
<b>SNA</b>	0,96	0,98	0,98	1,09	24,48	24,87	24,77	0,81
<b>PrCA</b>	0,93	0,93	0,92	0,88	24,76	25,42	25,29	1,38
<b>PHBA</b>	0,91	0,92	0,92	0,32	24,70	25,24	25,13	1,14
<b>VA</b>	0,99	0,96	0,98	1,16	24,89	25,31	25,33	0,98

<sup>a</sup>Üç farklı günde yapılan analiz sonuçları

**Tablo 4-20: K-2 örneği ile gerçekleştirilen ara tekrarlanabilirlik çalışmasının sonuçları**

Fenolik asit	Katılan standart miktarı (mg/L)							
	1,00				25,00			
	Konsantrasyon (mg/L) <sup>a</sup>			RSD (%)	Konsantrasyon (mg/L)			RSD (%)
<b>5CQA</b>	150,08	150,38	149,96	0,15	175,55	179,65	176,69	1,20
<b>CA</b>	3,62	3,67	3,73	1,43	23,97	24,18	24,27	0,64
<b>3CQA</b>	335,28	332,68	335,89	0,51	351,61	351,03	350,74	0,13
<b>4CQA</b>	170,61	166,75	167,23	1,25	170,61	166,75	167,23	1,25
<b>FA</b>	0,95	0,96	0,96	0,55	20,71	20,13	19,96	1,93
<b>SNA</b>	1,11	1,09	1,09	0,61	22,51	22,66	22,48	0,42
<b>PrCA</b>	2,57	2,68	2,67	2,41	20,42	19,93	19,98	1,33
<b>PHBA</b>	5,36	5,43	5,33	0,92	26,12	26,35	26,15	0,48
<b>VA</b>	1,10	1,10	1,09	0,26	22,00	22,22	22,12	0,51

<sup>a</sup>Üç farklı günde yapılan analiz sonuçları

#### 4.2.5. Geri Kazanım

Geliştirilen yöntemin geri kazanım değerini saptamak için 1,00 mg/L ve 25,00 mg/L konsantrasyondaki standart çözeltiler ve K-2 örneği ile Bölüm 3.6.5'te anlatıldığı gibi çalışıldı. Sonuçlar Bölüm 4.2.3'te verildi.

#### 4.2.6. Gözlenebilme Sınırı (LOD)

LOD değerleri Bölüm 2.7.6.3.'te verilen eşitlik ile hesaplandı (Tablo 4-21).

#### 4.2.7. Tayin Sınırı (LOQ)

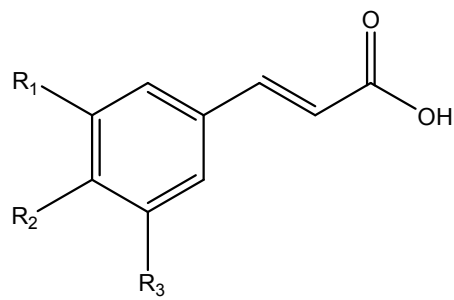
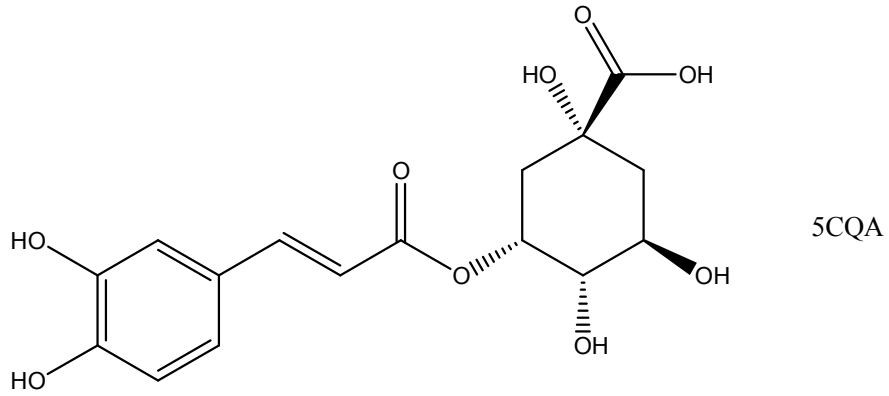
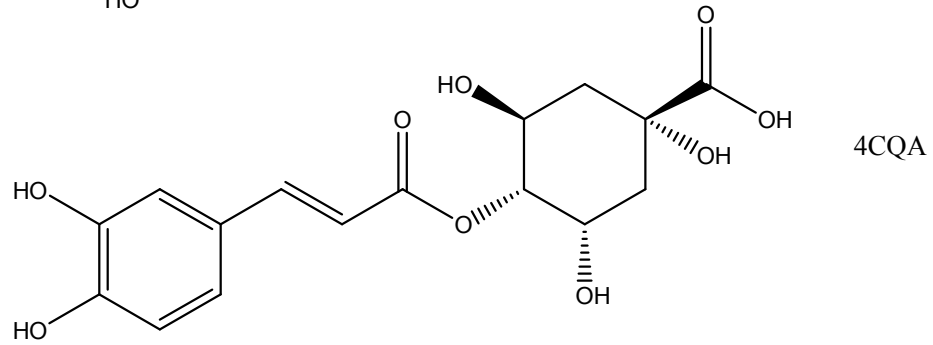
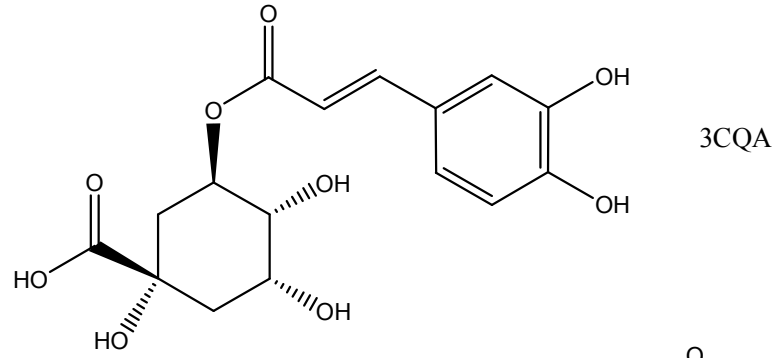
LOQ değerleri Bölüm 2.7.7.3.'te verilen eşitlik ile hesaplandı (Tablo 4-21).

**Tablo 4-21: LOD ve LOQ değerleri**

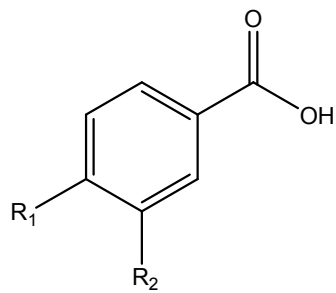
Fenolik asit	Ölçü eğrisinin y eksenini kestiği noktanın standart sapması	Ölçü eğrisinin eğimi	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
5CQA	5650,316	25142,124	0,74	2,25
CA	9865,088	54784,900	0,59	1,80
3CQA	5045,533	26802,756	0,62	1,88
4CQA	4125,203	28503,942	0,48	1,45
FA	10253,647	55529,062	0,61	1,85
SNA	13113,160	51609,255	0,84	2,54
PrCA	10687,155	66544,934	0,53	1,61
PHBA	7083,302	44866,145	0,52	1,58
VA	10252,829	63218,102	0,54	1,62

### **4.3. Geliştirilen ve Valide Edilen Yöntem ile Kahve Örneklerinde Fenolik Asit Miktar Tayini Sonuçları**

Farklı menşeli 7 adet kahve örneğinde 9 adet fenolik asidin (Şekil 4-11) miktarları tayin edildi. Örneklerin hazırlanması ve fenolik asitlerin ekstraksiyonu Bölüm 3.5.3.'te anlatıldığı gibi yapıldı. K-1, K-2, K-3, K-4, K-5, K-6 ve K-7 örneklerine ait kromatogramlar sırasıyla Şekil 4-12, 4-13, 4-14, 4-15, 4-16, 4-17 ve 4-18'de, fenolik asit miktar tayini sonuçları sırasıyla Tablo 4-22, 4-23, 4-24, 4-25, 4-26, 4-27 ve 4-28'de verildi. Örneklerin hiçbirinde SNA ve VA tespit edilmedi. FA sadece K-1 örneğinde tayin edildi. K-1 örneği dışındaki tüm örneklerde farklı miktarlarda 5CQA, CA, 3CQA, 4CQA, PrCA ve PHBA bulundu.

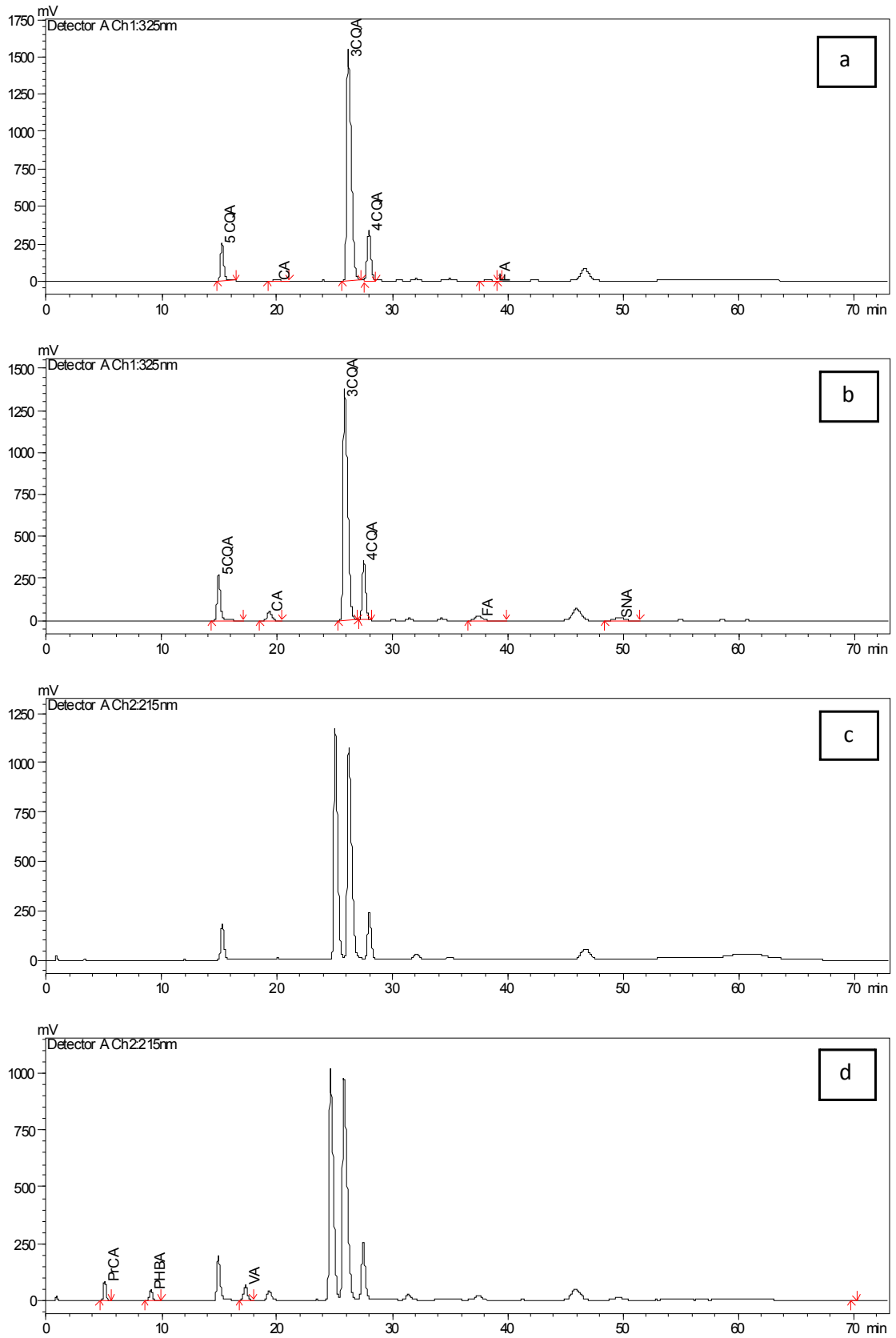


$R_1 = H, R_2 = R_3 = OH$  CA  
 $R_1 = H, R_2 = OH, R_3 = OCH_3$  FA  
 $R_1 = R_3 = OCH_3, R_2 = OH$  SNA

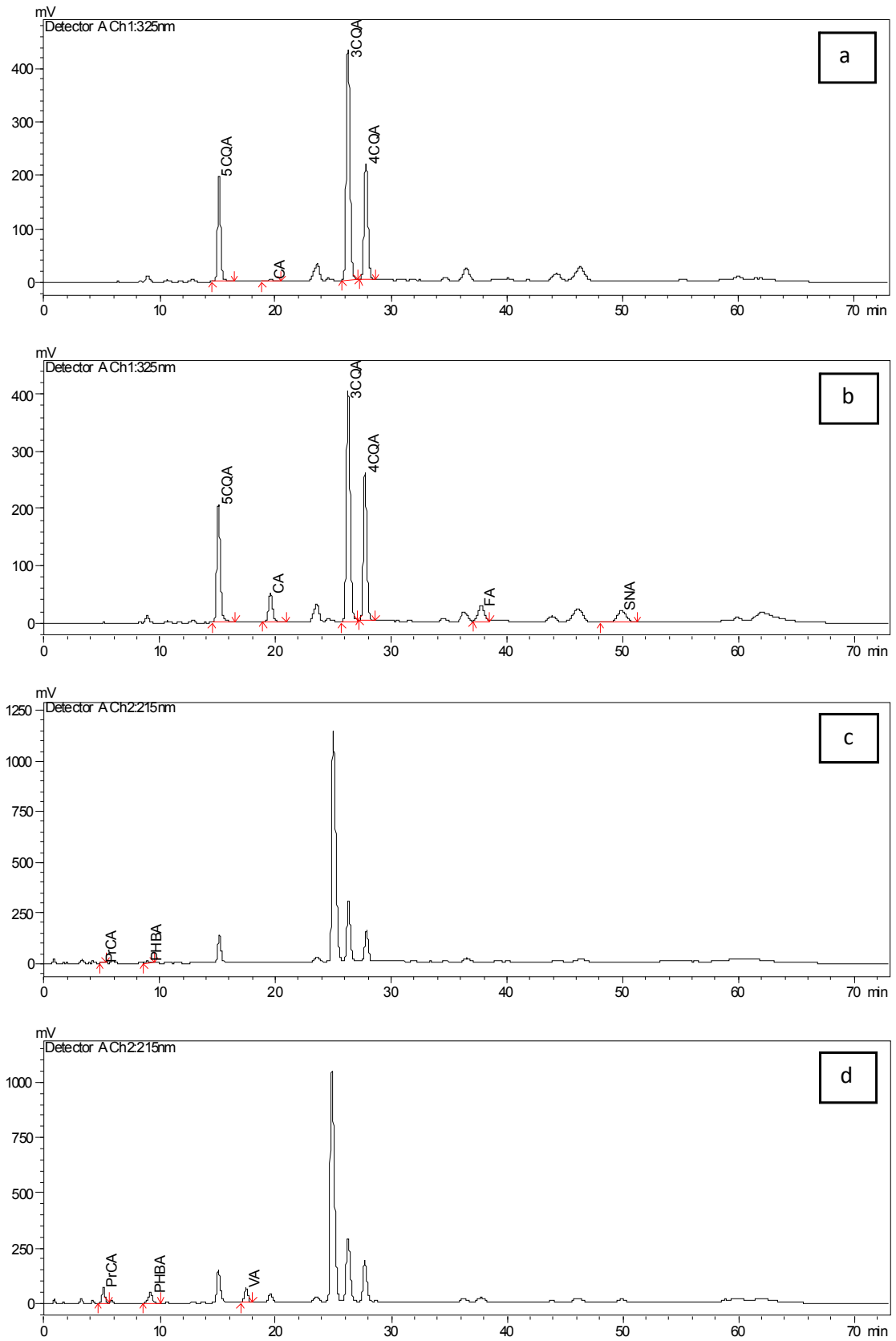


$R_1 = R_2 = OH$  PrCA  
 $R_1 = OH, R_2 = H$  PHBA  
 $R_1 = OH, R_2 = OCH_3$  VA

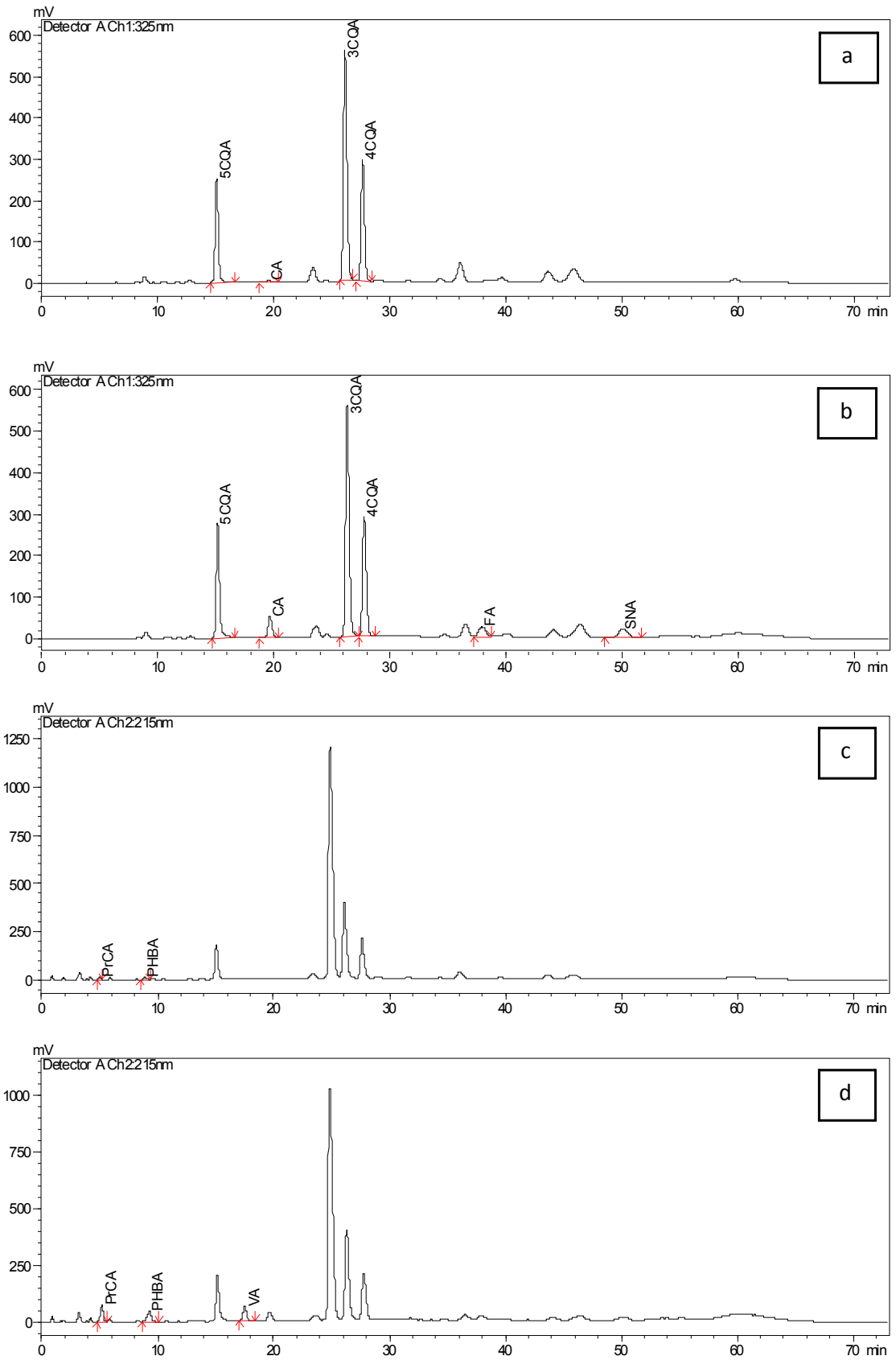
Şekil 4-11: Kahve örneklerinde miktar tayini yapılan fenolik asitler



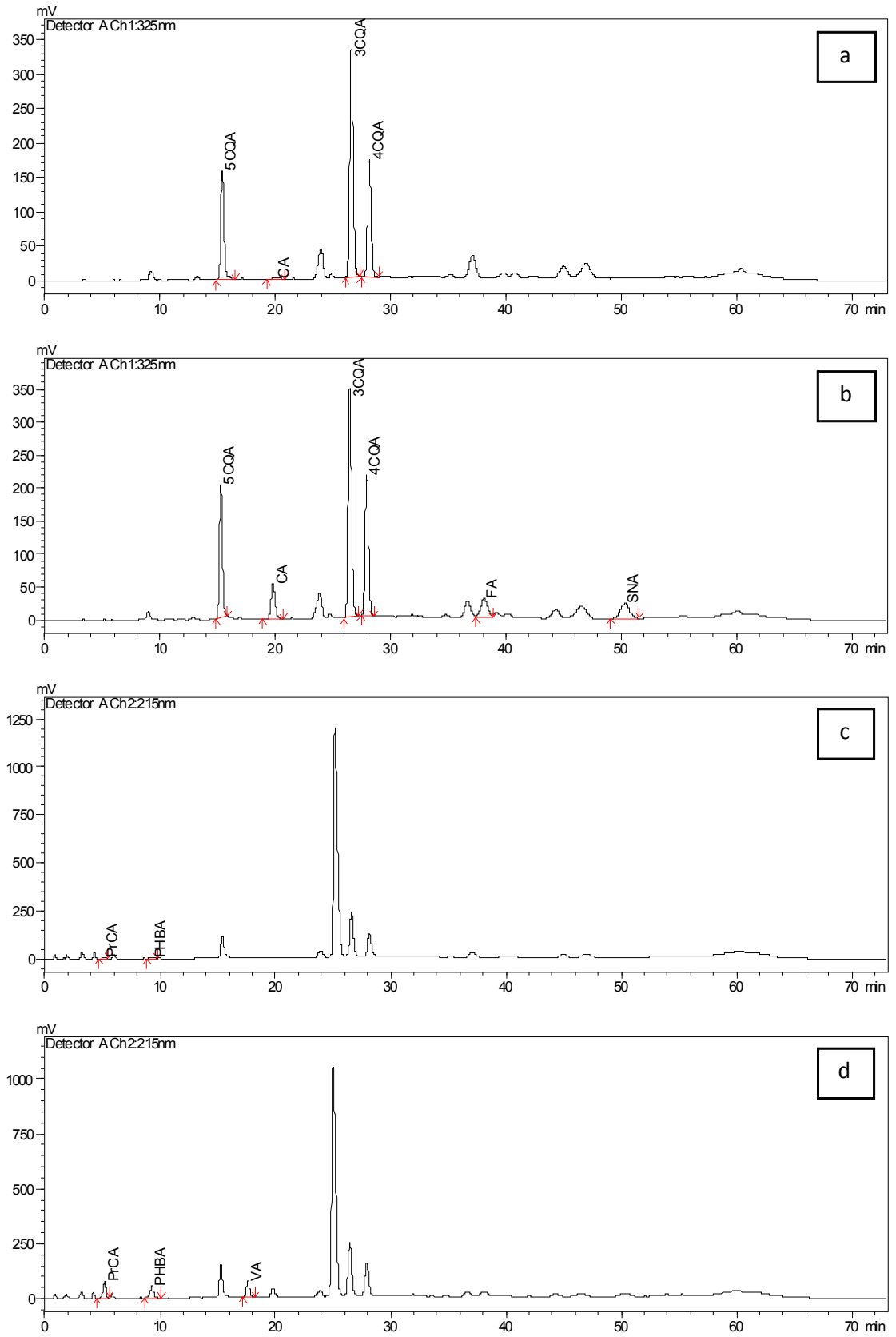
Şekil 4-12: K-1 örneğine ait kromatogramlar, a: 325 nm c: 215 nm; Standart katılmış K-1 örneğine ait kromatogramlar, b: 325 nm d: 215 nm



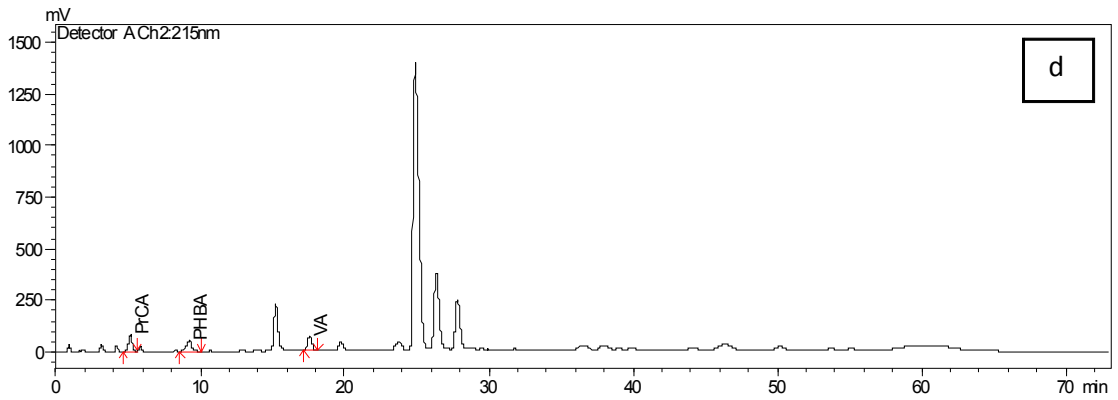
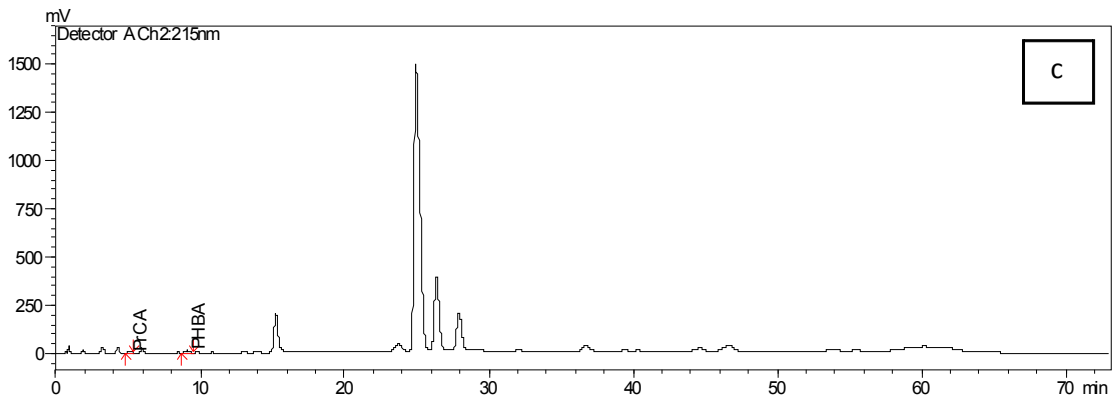
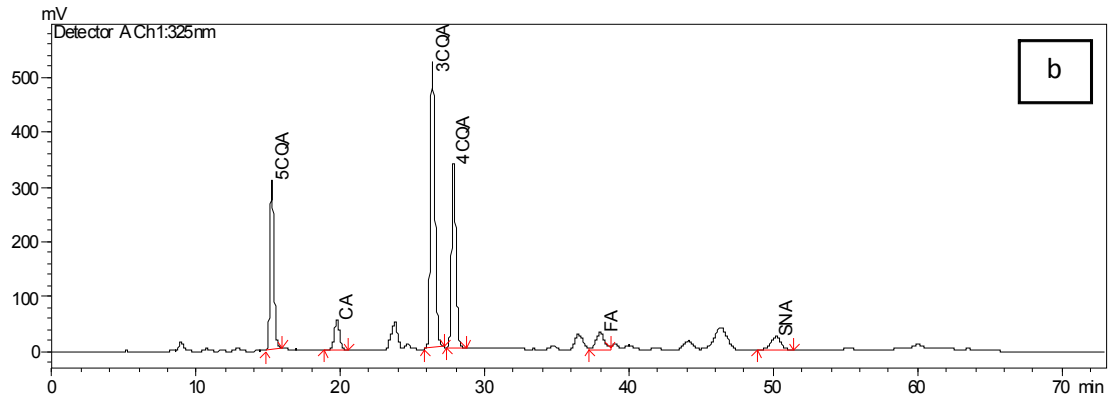
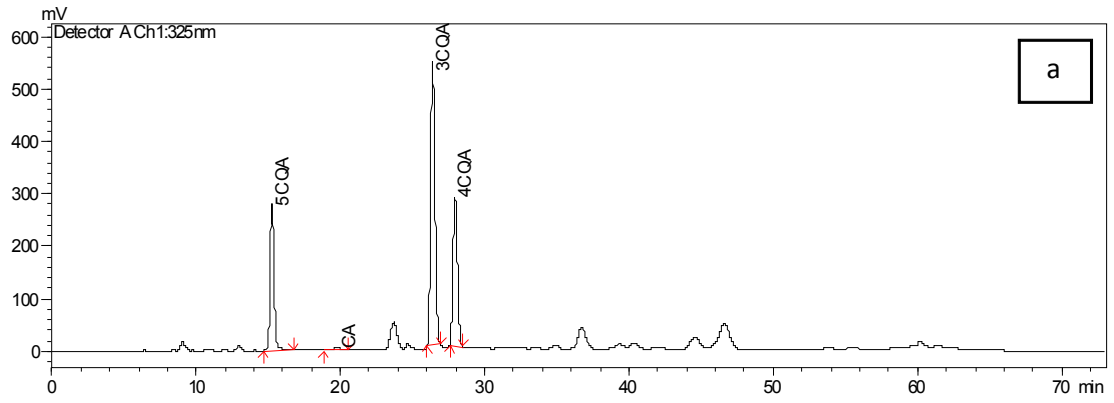
Şekil 4-13: K-2 örneğine ait kromatogramlar, a: 325 nm c: 215 nm; Standart katılmış K-2 örneğine ait kromatogramlar, b: 325 nm d: 215 nm



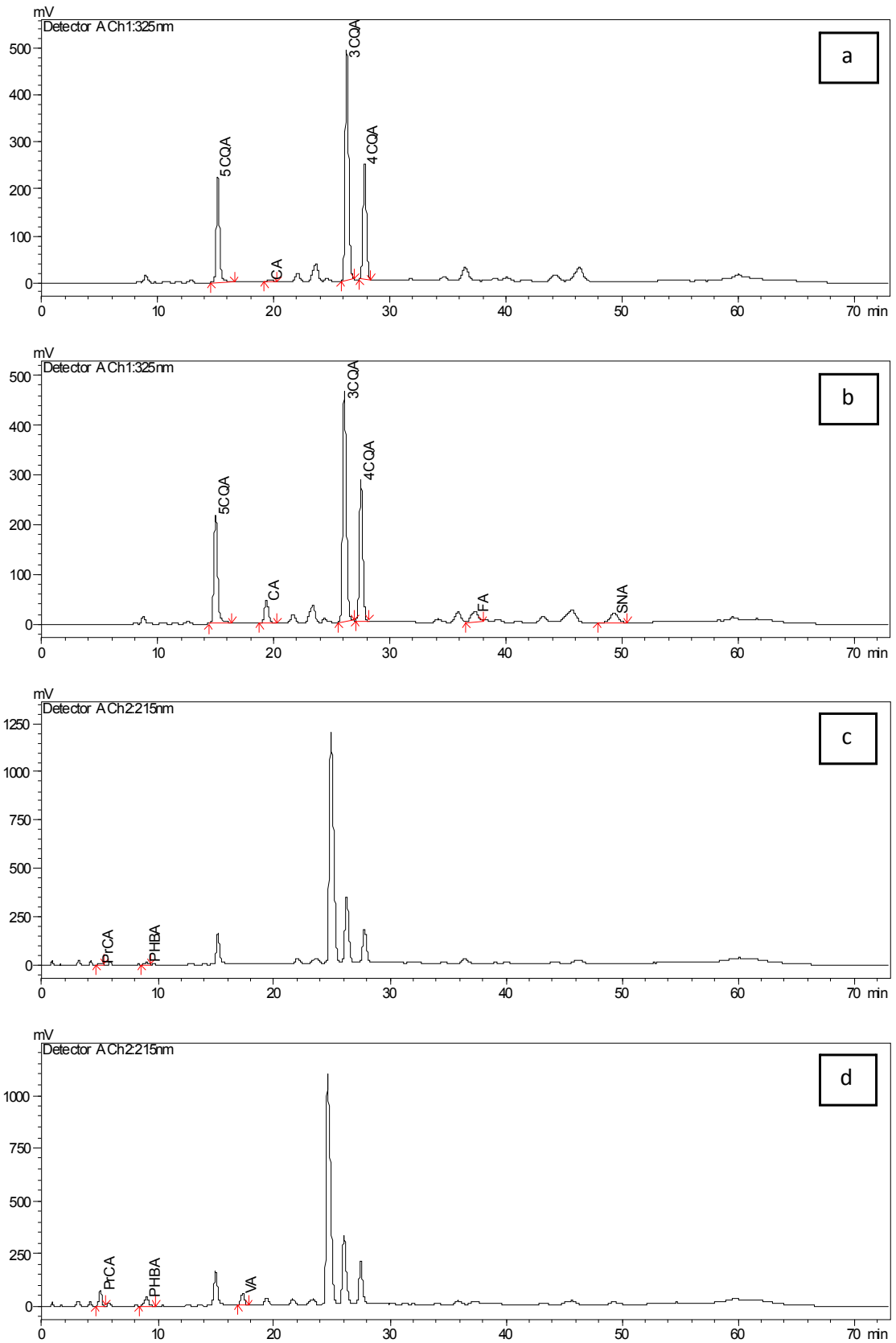
**Şekil 4-14: K-3 örneğine ait kromatogramlar, a: 325 nm c: 215 nm; Standart katılmış K-3 örneğine ait kromatogramlar, b: 325 nm d: 215 nm**



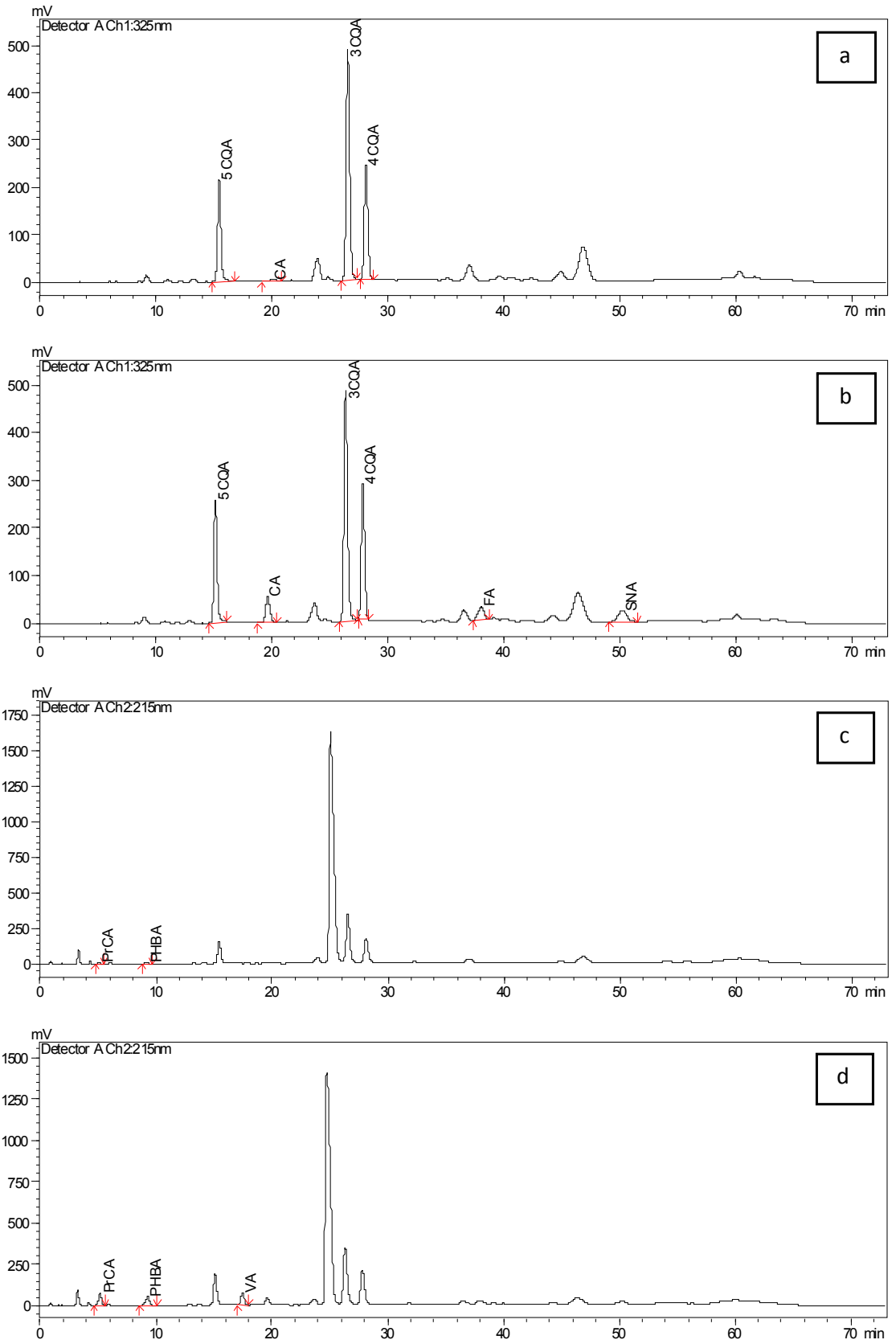
**Şekil 4-15: K-4 örneğine ait kromatogramlar, a: 325 nm c: 215 nm; Standart katılmış K-4 örneğine ait kromatogramlar, b: 325 nm d: 215 nm**



**Şekil 4-16: K-5 örneğine ait kromatogramlar, a: 325 nm c: 215 nm; Standart katılmış K-5 örneğine ait kromatogramlar, b: 325 nm d: 215 nm**



**Şekil 4-17: K-6 örneğine ait kromatogramlar, a: 325 nm c: 215 nm; Standart katılmış K-6 örneğine ait kromatogramlar, b: 325 nm d: 215 nm**



**Şekil 4-18: K-7 örneğine ait kromatogramlar, a: 325 nm c: 215 nm; Standart katılmış K-7 örneğine ait kromatogramlar, b: 325 nm d: 215 nm**

**Tablo 4-22: K-1 örneğinde fenolik asit miktar tayini analiz sonuçları<sup>a</sup>**

<b>Fenolik asit</b>	<b>Örnekteki miktar (mg/g)<sup>b</sup></b>			<b>RSD (%)</b>	<b>Standart katılmış örnekteki miktar (mg/g)</b>			<b>RSD (%)</b>	<b>Geri kazanım (%)</b>
<b>5CQA</b>	17,99	18,17	18,11	0,50	20,44	20,32	20,41	0,30	100,25
<b>CA</b>	0,54	0,54	0,54	0,56	2,37	2,38	2,38	0,12	85,18
<b>3CQA</b>	132,35	132,56	132,75	0,15	134,85	134,96	135,19	0,13	100,15
<b>4CQA</b>	23,10	24,21	24,32	2,84	25,72	25,87	25,81	0,30	98,75
<b>FA</b>	0,13	0,13	0,13	0,00	2,00	1,99	1,99	0,31	83,82
<b>SNA</b>	- <sup>c</sup>	-	-	-	1,87	1,88	1,90	0,79	83,63
<b>PrCA</b>	-	-	-	-	1,63	1,63	1,63	0,15	72,49
<b>PHBA</b>	-	-	-	-	1,82	1,82	1,81	0,15	80,61
<b>VA</b>	-	-	-	-	1,91	1,87	1,89	1,10	84,07

<sup>a</sup> 3 tekrarlı analiz sonuçları

<sup>b</sup> mg fenolik asit/g öğütülmüş kahve örneği

<sup>c</sup> Tespit edilmedi

**Tablo 4-23: K-2 örneğinde fenolik asit miktar tayini analiz sonuçları<sup>a</sup>**

<b>Fenolik asit</b>	<b>Örnekteki miktar (mg/g)<sup>b</sup></b>			<b>RSD (%)</b>	<b>Standart katılmış örnekteki miktar(mg/g)</b>			<b>RSD (%)</b>	<b>Geri kazanım (%)</b>
<b>5CQA</b>	13,42	13,49	13,49	0,29	15,80	15,40	15,83	1,53	99,75
<b>CA</b>	0,24	0,24	0,25	1,69	2,16	2,10	2,16	1,54	85,65
<b>3CQA</b>	30,84	29,75	29,69	2,15	32,54	32,34	32,14	0,62	99,99
<b>4CQA</b>	15,35	15,17	15,20	0,63	17,50	17,40	17,33	0,48	99,54
<b>FA</b>	- <sup>c</sup>	-	-	-	1,86	1,84	1,91	1,85	83,16
<b>SNA</b>	-	-	-	-	2,03	2,04	2,00	0,99	89,84
<b>PrCA</b>	0,16	0,16	0,16	1,73	1,84	1,84	1,84	0,19	76,52
<b>PHBA</b>	0,41	0,41	0,41	0,45	2,35	2,35	2,35	0,08	88,31
<b>VA</b>	-	-	-	-	1,98	1,92	1,89	2,30	85,79

<sup>a</sup> 3 tekrarlı analiz sonuçları

<sup>b</sup> mg fenolik asit/g öğütülmüş kahve örneği

<sup>c</sup> Tespit edilmedi

**Tablo 4-24: K-3 örneğinde fenolik asit miktar tayini analiz sonuçları<sup>a</sup>**

<b>Fenolik asit</b>	<b>Örnekteki miktar (mg/g)<sup>b</sup></b>			<b>RSD (%)</b>	<b>Standart katılmış örnekteki miktar(mg/g)</b>			<b>RSD (%)</b>	<b>Geri kazanım (%)</b>
<b>5CQA</b>	17,37	17,51	17,35	0,51	19,76	19,58	19,76	0,53	100,21
<b>CA</b>	0,32	0,31	0,31	1,02	2,15	2,14	2,16	0,57	83,94
<b>3CQA</b>	39,58	39,40	39,44	0,24	41,41	41,23	41,40	0,24	99,11
<b>4CQA</b>	19,28	19,26	19,24	0,12	21,51	21,43	21,49	0,19	99,85
<b>FA</b>	- <sup>c</sup>	-	-	-	1,79	1,79	1,76	1,18	79,15
<b>SNA</b>	-	-	-	-	1,95	2,04	2,02	2,33	89,09
<b>PrCA</b>	0,20	0,21	0,20	2,54	1,80	1,81	1,78	0,95	73,31
<b>PHBA</b>	0,49	0,48	0,49	1,28	2,50	2,50	2,51	0,10	91,37
<b>VA</b>	-	-	-	-	1,91	1,86	1,92	1,84	84,25

<sup>a</sup> 3 tekrarlı analiz sonuçları

<sup>b</sup> mg fenolik asit/g öğütülmüş kahve örneği

<sup>c</sup> Tespit edilmedi

**Tablo 4-25: K-4 örneğinde fenolik asit miktar tayini analiz sonuçları<sup>a</sup>**

<b>Fenolik asit</b>	<b>Örnekteki miktar (mg/g)<sup>b</sup></b>			<b>RSD (%)</b>	<b>Standart katılmış örnekteki miktar(mg/g)</b>			<b>RSD (%)</b>	<b>Geri kazanım (%)</b>
<b>5CQA</b>	11,39	11,25	11,26	0,70	13,15	12,88	13,48	2,28	97,16
<b>CA</b>	0,26	0,25	0,25	1,99	2,28	2,34	2,28	1,43	91,83
<b>3CQA</b>	23,27	23,49	23,12	0,80	25,71	25,79	25,69	0,20	100,73
<b>4CQA</b>	12,35	12,08	12,10	1,23	14,24	14,07	14,13	0,63	98,06
<b>FA</b>	- <sup>c</sup>	-	-	-	2,01	2,06	2,08	1,84	91,27
<b>SNA</b>	-	-	-	-	2,18	2,17	2,17	0,32	96,67
<b>PrCA</b>	0,21	0,22	0,22	1,62	1,60	1,60	1,60	0,02	64,92
<b>PHBA</b>	0,46	0,45	0,45	0,91	2,65	2,65	2,65	0,05	98,02
<b>VA</b>	-	-	-	-	2,07	2,12	2,12	1,43	93,51

<sup>a</sup> 3 tekrarlı analiz sonuçları

<sup>b</sup> mg fenolik asit/g öğütülmüş kahve örneği

<sup>c</sup> Tespit edilmedi

**Tablo 4-26: K-5 örneğinde fenolik asit miktar tayini analiz sonuçları<sup>a</sup>**

<b>Fenolik asit</b>	<b>Örnekteki miktar (mg/g)<sup>b</sup></b>			<b>RSD (%)</b>	<b>Standart katılmış örnekteki miktar(mg/g)</b>			<b>RSD (%)</b>	<b>Geri kazanım (%)</b>
<b>5CQA</b>	18,93	18,86	19,11	0,67	20,82	20,76	20,82	0,17	98,06
<b>CA</b>	0,33	0,32	0,32	1,95	2,39	2,41	2,41	0,35	93,48
<b>3CQA</b>	38,39	38,85	38,37	0,70	40,90	40,72	40,89	0,24	100,13
<b>4CQA</b>	20,67	19,96	19,87	2,18	22,37	22,53	22,55	0,42	100,30
<b>FA</b>	- <sup>c</sup>	-	-	-	2,08	2,07	2,07	0,23	92,08
<b>SNA</b>	-	-	-	-	2,26	2,32	2,25	1,61	101,17
<b>PrCA</b>	0,28	0,27	0,28	0,81	1,73	1,73	1,74	0,15	68,60
<b>PHBA</b>	0,59	0,59	0,59	0,35	2,85	2,85	2,85	0,06	100,42
<b>VA</b>	-	-	-	-	2,14	2,17	2,11	1,44	95,02

<sup>a</sup> 3 tekrarlı analiz sonuçları

<sup>b</sup> mg fenolik asit/g öğütülmüş kahve örneği

<sup>c</sup> Tespit edilmedi

**Tablo 4-27: K-6 örneğinde fenolik asit miktar tayini analiz sonuçları<sup>a</sup>**

<b>Fenolik asit</b>	<b>Örnekteki miktar (mg/g)<sup>b</sup></b>			<b>RSD (%)</b>	<b>Standart katılmış örnekteki miktar(mg/g)</b>			<b>RSD (%)</b>	<b>Geri kazanım (%)</b>
<b>5CQA</b>	15,69	15,75	15,67	0,27	17,89	17,66	17,83	0,68	99,09
<b>CA</b>	0,27	0,28	0,27	0,49	1,96	1,94	1,95	0,55	77,35
<b>3CQA</b>	33,79	34,25	34,23	0,77	36,31	35,61	36,12	1,01	99,10
<b>4CQA</b>	16,85	16,39	16,49	1,45	18,39	18,29	18,49	0,54	97,64
<b>FA</b>	- <sup>c</sup>	-	-	-	1,76	1,75	1,75	0,57	77,88
<b>SNA</b>	-	-	-	-	1,75	1,73	1,75	0,83	77,52
<b>PrCA</b>	0,23	0,23	0,23	1,70	1,48	1,48	1,50	0,74	60,00
<b>PHBA</b>	0,51	0,51	0,51	0,42	2,30	2,28	2,31	0,69	83,27
<b>VA</b>	-	-	-	-	1,74	1,69	1,72	1,40	76,44

<sup>a</sup> 3 tekrarlı analiz sonuçları

<sup>b</sup> mg fenolik asit/g öğütülmüş kahve örneği

<sup>c</sup> Tespit edilmedi

**Tablo 4-28: K-7 örneğinde fenolik asit miktar tayini analiz sonuçları<sup>a</sup>**

<b>Fenolik asit</b>	<b>Örnekteki miktar (mg/g)<sup>b</sup></b>			<b>RSD (%)</b>	<b>Standart katılmış örnekteki miktar(mg/g)</b>			<b>RSD (%)</b>	<b>Geri kazanım (%)</b>
<b>5CQA</b>	15,88	15,68	15,77	0,64	17,99	18,10	18,08	0,31	100,19
<b>CA</b>	0,29	0,29	0,30	1,26	2,35	2,28	2,35	1,86	91,51
<b>3CQA</b>	34,05	33,97	33,69	0,55	35,77	35,77	35,83	0,09	98,99
<b>4CQA</b>	17,43	17,48	17,43	0,16	19,48	19,14	19,14	1,01	97,74
<b>FA</b>	- <sup>c</sup>	-	-	-	1,74	1,75	1,73	0,44	77,36
<b>SNA</b>	-	-	-	-	2,20	2,24	2,22	0,89	98,82
<b>PrCA</b>	0,18	0,17	0,18	1,72	1,63	1,63	1,69	2,17	68,11
<b>PHBA</b>	0,47	0,48	0,48	0,48	2,63	2,63	2,70	1,62	97,32
<b>VA</b>	-	-	-	-	2,09	2,17	2,17	2,07	95,23

<sup>a</sup> 3 tekrarlı analiz sonuçları

<sup>b</sup> mg fenolik asit/g öğütülmüş kahve örneği

<sup>c</sup> Tespit edilmedi

## 5. TARTIŞMA

Antioksidan, antiviral, antibakteriyal, antiinflamatuvar, nöroprotektif, antimutajenik, antikanser, kardiyoprotektif gibi özellikler gösteren fenolik asitlerce zengin olan gıdaların tüketiminin birçok hastalığın inhibisyonunda etkili olduğu belirlenmiştir. Dünyada en çok tüketilen içeceklerden biri olan kahve yüksek miktarda fenolik asit içeren *Coffea* cinsinin çekirdekleri ile hazırlanmaktadır. Bu doktora tez çalışmasında kahve örneklerinde 5CQA, CA, 3CQA, 4CQA, FA, SNA, PrCA, PHBA ve VA'nın aynı anda miktar tayini için yeni bir HPLC yöntemi geliştirildi ve valide edildi. Bu yöntem ile farklı menşeli kahve örneklerinde kantitatif fenolik asit tayini yapıldı.

Yöntemin geliştirilmesi aşamasında fenolik asitlerin ayrılması için literatür çalışmaları göz önüne alınarak C<sub>18</sub> kolon tercih edildi. Öncelikle ebatları 4,6 × 250 mm, tanecik boyutu 5,0 µm olan bir C<sub>18</sub> kolon kullanılarak farklı oranlarda su, metanol, asetonitril, o-fosforik asit ve formik asit karışımları ile çeşitli gradient programlama sistemleri denendi. Bu denemelerde 5CQA, CA, 3CQA, 4CQA, FA, SNA, PrCA, PHBA ve VA piklerinin hepsi uygun ayırma gücü ile birbirinden ayıramadı. Bu sebeple ebatları 2,1 × 50 mm, tanecik boyutu 3,0 µm olan bir C<sub>18</sub> kolon ile çalışıldı. Analiz süresinin kısa olması için daha kısa ve verimin artması için daha düşük tanecik boyutuna sahip bir kolon seçildi. Seçilen kolon ile tüm piklerin ayrılması sağlandı. Ayrıca kahve örnekleri ile çalışılırken analitik kolonun zarar görmemesi için bir C<sub>18</sub> koruyucu kolon (2,1 × 10 mm, 3 µm ID) kullanıldı. Hareketli faz olarak A (% 0,08'lik o-fosforik asit çözeltisi, suda) ve B (metanol/su/asetonitril, 85:10:5) olmak üzere 2 bileşenden oluşan bir sistem seçildi ve Tablo 4-1'de verilen gradient program uygulandı. Akış hızı 0,5 mL/dk, kolon sıcaklığı 40°C ve enjeksiyon hacmi 5,0 µL olarak belirlendi. Sinyal şiddeti ve anahat (baseline) kayması dikkate alınarak 5CQA, CA, 3CQA, 4CQA, FA ve SNA ile 325 nm, PrCA, PHBA ve VA ile 215 nm'de çalışıldı. Tayin edilen fenolik asit piklerinin kuyruklanma faktörleri, ayırma güçleri, alıkonma faktörleri, teorik plaka sayıları ve teorik plaka eşdeğer yükseklikleri belirlendi. Tüm ayırma gücü değerleri 2'den yüksek bulundu. Genellikle 2 – 20 aralığında olması istenen alıkonma faktörü, CA, 3CQA, 4CQA, FA ve SNA için 20'den yüksek bulundu. Standart çözeltiler ile gerçekleştirilen gradient elüsyon çalışmalarında hareketli fazın B

bileşenin (organik faz) yüzdesi daha hızlı arttırılarak daha kısa analiz süresi ile 2 – 20 aralığında alıkonma faktörleri elde edilebildi. Fakat kahve örnekleri ile çalışılırken, örnekte bulunan diğer maddelerin piklerini, analitlerin piklerinden ayırmak için hareketli fazın B bileşenin yüzdesi daha yavaş arttırıldı ve bu durum analiz süresinin artmasına sebep oldu (73 dk). Analiz süresinin artması ile alıkonma zamanları ve dolayısıyla da alıkonma faktörleri de yükseldi.

Yapılan literatür çalışması sonucu, fenolik asitlerin kahve örneklerinden ekstraksiyonunun çoğunlukla farklı çözücü veya çözücü karışımları kullanılarak katı-sıvı ekstraksiyonu yöntemi ile gerçekleştirildiği belirlendi (Perrone ve ark. 2008, Somporn ve ark. 2011, Monteiro ve Farah 2012, Somporn ve ark. 2012). Bu sebeple fenolik asitlerin ekstraksiyonunda öncelikle farklı çözücü karışımları (metanol/su, metanol/su/asetonitril), farklı sıcaklıklar ve ultrasonik banyo kullanılarak katı-sıvı ekstraksiyonu yöntemi ile denemeler yapıldı. Fakat elde edilen kromatogramlarda tayini yapılacak olan fenolik asitlerin pikleri izlenmedi. Fujioka ve Shibamoto (2008) filtre kahve makinesi kullanarak hazırladıkları farklı kahve örneklerinin klorojenik asit ve kafein içeriklerini HPLC-UV ile belirlemişlerdir. Bu tez çalışmasında da örnekler filtre kahve makinesi ile hazırlandı. Sonrasında hem girişimleri azaltmak hem de analitleri deriştirmek için 3 farklı SPE kartuşu (C<sub>18</sub>, SAX ve HLB) ile denemeler yapıldı. Fenolik asitlerin C<sub>18</sub> adsorban tarafından alıkonmaları Van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağı ve dipol-dipol etkileşimlerine dayanmaktadır. Polimerik adsorbanların avantajı ise aromatik halka içeren analitlere seçici olan  $\pi$ - $\pi$  etkileşimlerinin de söz konusu olmasıdır (Irakli ve ark. 2012). Yapılan denemelerde en yüksek geri kazanım (% 97,93-103,41), divinilbenzen ve N-vinilpirolidon monomerlerinden meydana gelen bir kopolimerden oluşan HLB kartuş ile elde edildi. Bu sebeple kahve örneklerinin ekstraksiyonu için HLB kartuş seçildi.

Fenolik asit miktar tayini için geliştirilen yöntemin validasyonu doğrusallık, doğruluk, kesinlik, geri kazanım, gözlenebilme sınırı ve tayin sınırı parametreleri incelenerek gerçekleştirildi.

Ölçü eğrileri oluşturulurken her bir konsantrasyon 6 tekrarla analiz edildi. Doğrusal aralıklar tespit edildi ve ölçü eğrileri 5CQA, CA, FA, SNA, PrCA, PHBA, ve VA için 0,50-75,00 mg/L, 4CQA için 0,50-250,00 mg/L ve 3CQA için 0,50-1000,00 mg/L arasında çizildi. En küçük kareler yönteminin varsayımlarından biri olan sabit

varyans varsayımının geçerliliği F-testi ile kontrol edildi. Tüm  $F_{exp}$  değerleri  $F_{tablo}$  değerlerinden yüksek çıktığı için sabit varyans varsayımı reddedildi ve ağırlıklı regresyon analizi yapıldı. Her bir fenolik asidin korelasyon katsayısı ( $r^2$ ) 0,999'dan büyük bulundu.

Geliştirilen yöntemin doğruluğu 2 farklı konsantrasyondaki standart çözeltilerin (1,00 ve 25,00 mg/L) ve 2 farklı konsantrasyonda standart katılmış (1,00 ve 25,00 mg/L) K-2 örneğinin analiz sonuçları ile belirlendi. Sonuçlar RME (%) ve geri kazanım (%) olarak verildi. RME (%) değerleri -23,48-10,54 aralığında bulundu. Geri kazanım (%) değerleri 76,52-110,57 arasında bulundu.

Geliştirilen yöntemin kesinliği, tekrarlanabilirlik ve ara tekrarlanabilirlik olarak belirlendi. Tekrarlanabilirlik ve ara tekrarlanabilirlik çalışmaları için, sırasıyla, aynı gün ve farklı 3 gün içinde 2 farklı konsantrasyondaki standart çözeltiler (1,00 ve 25,00 mg/L) ve 2 farklı konsantrasyonda standart katılmış (1,00 ve 25,00 mg/L) K-2 örneği 3 tekrarlar analiz edildi. RSD (%) değerleri 0,05-2,41 arasında bulundu.

Geliştirilen yöntemin LOD ve LOQ değerleri, ölçü eğrisinin y eksenini kestiği noktanın standart sapmasının eğime oranının ( $\sigma/S$ ) sırasıyla 3,3 ve 10 katı alınarak hesaplandı. LOD değerleri 0,48-0,84 mg/L arasında, LOQ değerleri 1,45-2,54 mg/L arasında bulundu.

Geliştirilen ve valide edilen yöntem ile farklı menşeli 7 adet kahve örneği ile çalışıldı. Kahve örneklerinin ve standart katılmış (25,00 mg/L) kahve örneklerinin fenolik asit miktar tayinleri gerçekleştirildi. Örneklerin hiçbirinde SNA ve VA tespit edilmezken, FA sadece K-1 örneğinde tayin edildi.

Sonuç olarak ilk defa 5CQA, CA, 3CQA, 4CQA, FA, SNA, PrCA, PHBA ve VA isimli fenolik asitlerin yanyana miktar tayini için bir HPLC-UV yöntemi geliştirildi ve valide edildi. Bu yöntemle farklı menşeli 7 adet kahve örneğinde 9 fenolik asit yüksek doğruluk ve tekrarlanabilirlik ile tayin edildi.

## KAYNAKLAR

- Albayrak A.S. (2008). Değişen Varyans Durumunda En Küçük Kareler Tekniğinin Alternatifi Ağırlıklı Regresyon Analizi ve Bir Uygulama. *Afyon Kocatepe Üniversitesi, İ.İ.B.F. Dergisi*, **10**, 111-134.
- Almeida A.M., Castel-Branco M.M. ve Falcao A.C. (2002). Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. *Journal of Chromatography B*, **774**, 215-222.
- Andrade P.B., Leitao R., Seabra R.M., Oliveira M.B. ve Ferreira M.A. (1997). Development of an HPLC/diode array detector method for simultaneous determination of seven hydroxy-cinnamic acids in green coffee. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **20**, 2023-2030.
- Andriot I., Le Quere J.L. ve Guichard E. (2004). Interactions between coffee melanoidins and flavour compounds: Impact of freeze-drying (method and time) and roasting degree of coffee on melanoidins retention capacity. *Food Chemistry*, **85**, 289-294.
- Arendash G.W. ve Cao C. (2010). Caffeine and coffee as therapeutics against Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, **20**, 117-126.
- Ascherio A., Zhang S.M., Hernan M.A., Kawachi I., Colditz G.A., Speizer F.E. ve Willett W.C. (2001). Prospective study of caffeine consumption and risk of Parkinson's disease in men and women. *Annals of Neurology*, **50**, 56-63.
- Barker S.A. (2007). Matrix solid phase dispersion (MSPD). *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **70**, 151-162.
- Baytop A. *Farmasötik Botanik*. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Yayınları; 1977.
- Baytop T. *Türkiye'de Bitkilerle Tedavi*. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Yayınları; 1984.
- Bond T.J. (2012). The origins of tea, coffee and cocoa as beverages. İçinde Crozier A., Ashihara H. ve Tomás-Barbéran F. (Ed), *Teas, cocoa and coffee: Plant secondary*

*metabolites and health*. Chichester: Wiley-Blackwell; 1-22.

Bourgaud F., Gravot A., Milesi S. ve Gontier E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, **161**, 839-851.

Brandšteterová E. ve Žiaková-Čaniová A. (2002). Phenolic acids in natural plants: Analysis by HPLC. İçinde Cazes J. (Ed), *Encyclopedia of Chromatography, Volume 2*. Boca Raton: Taylor & Francis; 1250-1258.

Bresciani L., Calani L., Bruni R., Brighenti F. ve Del Rio D. (2014). Phenolic composition, caffeine content and antioxidant capacity of coffee silverskin. *Food Research International*, **61**, 196-201.

Brezová V., Šlebodová A. ve Staško A. (2009). Coffee as a source of antioxidants: An EPR study. *Food Chemistry*, **114**, 859-868.

Búfalo M.C, Ferreira I., Costa G., Francisco V., Liberal J., Cruz M.T., Lopes M.C., Batista M.T. ve Sforcin J.M. (2013). Propolis and its constituent caffeic acid suppress LPS-stimulated pro-inflammatory response by blocking NF- $\kappa$ B and MAPK activation in macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, **149**, 84-92.

Büyüktuncel E. (2012). Gelişmiş Ekstraksiyon Teknikleri I. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, **32**, 209-242.

Casal S., Andrade P.B., Oliveira M.B., Ferreres F., Garcia-Viguera C. ve Ferreira M.A. (1999). Analysis of hydroxycinnamic acids of coffee: a comparison of high performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **22**, 513-521.

Castro-Vargas H.I., Rodríguez-Varela L.I., Ferreira S.R.S. ve Parada-Alfonso F. (2010). Extraction of phenolic fraction from guava seeds (*Psidium guajava* L.) using supercritical carbon dioxide and co-solvents. *The Journal of Supercritical Fluids*, **51**, 319-324.

Dai J. ve Mumper R.J. (2010). Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, **15**, 7313-7352.

Duarte G.S., Pereira A.A. ve Farah A. (2010). Chlorogenic acids and other relevant compounds in Brazilian coffees processed by semi-dry and wet post-harvesting methods. *Food Chemistry*, **118**, 851-855.

Durukan L. (2013). Çekirdek'ten Kültür'e: Türk Kültüründe Kahve ve Kahvehane. *Science and Culture (Bilim ve Kültür)*, **02**, 127-138.

Farah A. ve Donangelo C.M. (2006). Phenolic compounds in coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, **18**, 23-36.

FDA (2014, Şubat). *Guidance for Industry Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics*. Food and Drug Administration. Erişim 23.03.2015, <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm386366.pdf>.

Fujioka K. ve Shibamoto T. (2008). Chlorogenic acid and caffeine contents in various commercial brewed coffees. *Food Chemistry*, **106**, 217-221.

González A.G., Pablos F., Martín M.J., León-Camacho, M. ve Valdenebro, M.S. (2001). HPLC analysis of tocopherols and triglycerides in coffee and their use as authentication parameters. *Food Chemistry*, **73**, 93-101.

Guillot F.L., Malno A. ve Stadler R.J. (1996). Antioxidant properties of novel tetraoxygenated phenylindan isomers formed during thermal decomposition of caffeic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**, 2503-2510.

Hayat K., Hussain S., Abbas S., Farooq U., Ding B., Xia S., Jia C., Zhang X. ve Xia W. (2009). Optimized microwave-assisted extraction of phenolic acids from citrus mandarin peels and evaluation of antioxidant activity *in vitro*. *Separation and Purification Technology*, **70**, 63-70.

Hečimović I., Belščak-Cvitanović A., Horžić D. ve Komes D. (2011). Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting. *Food Chemistry*, **129**, 991-1000.

Herrero M., Plaza M., Cifuentes A. ve Ibáñez E. (2012). Extraction techniques for the

determination of phenolic compounds in food. *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, **4**, 159-180.

Huang M.T. ve Ferraro T. (1992). Phenolic compounds in food and cancer prevention. İçinde Huang M.T., C.T. Ho ve C.Y. Lee (Ed), *Phenolic compounds in food and their effects on health. II.: Antioxidants and cancer prevention*. Washington: American Chemical Society; 8-34.

Huber W.W., Scharf G., Nagel G., Prustomersky S., Schulte-Hermann R. ve Kaina B. (2003). Coffee and its chemopreventive components Kahweol and Cafestol increase the activity of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in rat liver - comparison with phase II xenobiotic metabolism. *Mutation Research*, **522**, 57-68.

ICH (2005, Kasım). *Validation Of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Erişim 23.03.2015, [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf).

ICO (2010). *World Coffee Trade*. International Coffee Organization. Erişim 23.03.2015, [http://www.ico.org/trade\\_e.asp?section=About\\_Coffee](http://www.ico.org/trade_e.asp?section=About_Coffee).

Irakli M.N., Samanidou V.F., Biliaderis C.G. ve Papadoyannis I.N. (2012). Development and validation of an HPLC-method for determination of free and bound phenolic acids in cereals after solid-phase extraction. *Food Chemistry*, **134**, 1624-1632.

İTO (2004, Mart). *Kahve Etüdü*. İstanbul: İstanbul Ticaret Odası. Erişim 23.03.2015, <http://www.ito.org.tr/Dokuman/Sektor/1-48.pdf>.

Jacob R.A. ve Burri B.J. (1996). Oxidative damage and defense. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **63**, 9855-9905.

Jaganyi D. ve Madlala S.P. (2000). Kinetics of coffee infusion: A comparative study on the extraction kinetics of mineral ions and caffeine from several types of medium roasted coffees. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80**, 85-90.

King P.J., Ma G., Miao W., Jia Q., McDoughall B.R., Reinecke M.G., Cornell C., Kuan

J., Kim T.R. ve Robinson Jr. W.E. (1999). Structure-activity relationships: analogues of the dicaffeoylquinic and dicaffeoyltartaric acids as potent inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 integrase and replication. *Journal of Medicinal Chemistry*, **42**, 497-509.

Koshihara Y., Neichi T., Murota S.I., Lao A.N., Fujimoto Y. ve Tatsuno T. (1984). Caffeic acid is a selective inhibitor for leukotriene biosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, **792**, 92-97.

Lean M.E.J., Ashihara H., Clifford M.N. ve Crozier A. (2012). Purine alkaloids: A focus on caffeine and related compounds in beverages. İçinde Crozier A., Ashihara H. ve Tomás-Barbéran F. (Ed), *Teas, cocoa and coffee: Plant secondary metabolites and health*. Chichester: Wiley-Blackwell; 25-44.

Lindsay J., Laurin D., Verreault R., Hebert R., Helliwell B., Hill G.B. ve McDowell I. (2002). Risk factors for Alzheimer's disease: A prospective analysis from the Canadian study of health and aging. *American Journal of Epidemiology*, **156**, 445-453.

López-Galilea I., Paz de Peña M. ve Cid C. (2007). Correlation of selected constituents with the total antioxidant capacity of coffee beverages: Influence of the brewing procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 6110-6117.

Maggi-Capeyron M.F., Ceballos P., Cristol J.P., Delbosc S., Le Doucen C., Pons M., Leger C.L. ve Descomps B. (2001). Wine phenolic antioxidants inhibit ap-1 transcriptional activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 5646-5652.

Mancuso C. ve Santangelo R. (2014). Ferulic acid: Pharmacological and toxicological aspects. *Food and Chemical Toxicology*, **65**, 185-195.

Manuja R., Sachdeva S., Jain A. ve Chaudhary J. (2013). A comprehensive review on biological activities of p-hydroxy benzoic acid and its derivatives. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, **22**, 109-115.

Masella R., Santangelo C., D'Archivio M., LiVolti G., Giovannini C. ve Galvano F. (2012). Protocatechuic acid and human disease prevention: Biological activities and molecular mechanisms. *Current Medicinal Chemistry*, **19**, 2901-2917.

Monteiro M.C. ve Farah A. (2012). Chlorogenic acids in Brazilian *Coffea arabica* cultivars from various consecutive crops. *Food Chemistry*, **134**, 611-614.

Mullen W., Nemzer B., Stalmach A., Ali S. Ve Combet E. (2013). Polyphenolic and hydroxycinnamate contents of whole coffee fruits from China, India and Mexico. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **61**, 5298-5309.

Naidu M.M., Sulochanamma G., Sampathu S.R. ve Srinivas P. (2008). Studies on extraction and antioxidant potential of green coffee. *Food Chemistry*, **107**, 377-384.

Niseteo T., Komes D., Belščak-Cvitanović A., Horžič D. ve Budeč M. (2012). Bioactive composition and antioxidant potential of different commonly consumed coffee brews affected by their preparation technique and milk addition. *Food Chemistry*, **134**, 1870-1877.

Niwa T., Doi U., Kato Y. ve Osawa T. (1999). Inhibitory mechanism of sinapinic acid against peroxynitrite-mediated tyrosine nitration of protein in vitro. *FEBS Letters*, **459**, 43-46.

Ogiwara T., Satoh K., Kadoma Y., Murakami Y., Unten S., Atsumi T., Sakagami, H. ve Fujisawa S. (2002). Radical scavenging activity and cytotoxicity of ferulic acid. *Anticancer Research*, **22**, 2711-2717.

Olthof M.R., Hollman P.C.H. ve Katan M. (2001). Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *The Journal of Nutrition: Human Nutrition and Metabolism*, **131**, 66-71.

Oszmianski J., Ramos T. ve Bourzeix M. (1988). Fractionation of phenolic compounds in red wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, **39**, 256-262.

Ou C., Shi N., Yang Q., Zhang Y., Wu Z., Wang B., Compans R.W. ve He C. (2014). Protocatechuic acid, a novel active substance against Avian influenza virus H9N2 infection. *PLOS ONE*, **9**, 1-8.

Parras P., Martínez-Tomé M., Jiménez A.M. ve Murcia M.A. (2007). Antioxidant capacity of coffees of several origins brewed following three different procedures.

*Food Chemistry*, **102**, 582-592.

Pérez-Magariño S., Ortega-Heras M. ve Cano-Mozo E. (2008). Optimization of a solid-phase extraction method using copolymer sorbents for isolation of phenolic compounds in red wines and quantification by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 11560-11570.

Perrone D., Farah A., Donangelo C.M., Paulis T. ve R. Martin P.R. (2008). Comprehensive analysis of major and minor chlorogenic acids and lactones in economically relevant Brazilian coffee cultivars. *Food Chemistry*, **106**, 859-867.

Porta, M., Vioque, J., Ayude, D., Alguacil, J., Jarrod, M., Ruiz, L. ve Murillol, J.A. (2003). Coffee drinking: the rationale for treating it as a potential effect modifier of carcinogenic exposures. *European Journal of Epidemiology*, **18**, 289-298.

Powles J.W. ve Ness A.R. (1996). Fruit and vegetables and cardiovascular disease: A review. *International Journal of Epidemiology*, **26**, 1-13.

Rao C.V., Desai D., Simi B., Kulharni N., Amin S. ve Reddy B.S. (1993). Inhibitory effect of caffeic acid esters on azoxymethane-induced biochemical changes and aberrant crypt foci formation in rat colon. *Cancer Research*, **53**, 4182-4188.

Risso É.M., Péres R.G. ve Amaya-Farfan J. (2007). Determination of phenolic acids in coffee by micellar electrokinetic chromatography. *Food Chemistry*, **105**, 1578-1582.

Robbins R. (2003). Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 2866-2887.

Rojo Camargo M., Toledo C.F. ve Farah G. (1999). Caffeine daily intake from dietary sources in Brazil. *Food Additives & Contaminants*, **16**, 79-87.

Roy S.J. ve Prince P.S.M. (2013). Protective effects of sinapic acid on cardiac hypertrophy, dyslipidaemia and altered electrocardiogram in isoproterenol-induced myocardial infarcted rats. *European Journal of Pharmacology*, **699**, 213-218.

Sánchez-González I., Jiménez-Escrig A. ve Saura-Calixto F. (2005). In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and

filter). *Food Chemistry*, **90**, 133-139.

Santos E.E., Lauria D.C. ve Porto da Silveira C.L. (2004). Assessment of daily intake of trace elements due to consumption of foodstuffs by adult inhabitants of Rio de Janeiro city. *Science of the Total Environment*, **327**, 69-79.

Somporn C., Kamtuo A., Theerakulpisut P. ve Siriamornpun S. (2011). Effects of roasting degree on radical scavenging activity, phenolics and volatile compounds of Arabica coffee beans (*Coffea arabica* L.cv. Catimor). *International Journal of Food Science and Technology*, **46**, 2287-2296.

Somporn C., Kamtuo A., Theerakulpisut P. ve Siriamornpun S. (2012). Effect of shading on yield, sugar content, phenolic acids and antioxidant property of coffee beans (*Coffea Arabica* L. cv. Catimor) harvested from north-eastern Thailand. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **92**, 1956-1963.

Stalmach A., Clifford M.N., Williamson G. ve Crozier A. (2012). Phytochemicals in coffee and the bioavailability of chlorogenic acids. İçinde Crozier A., Ashihara H. ve Tomás-Barbéran F. (Ed), *Teas, cocoa and coffee: Plant secondary metabolites and health*. Chichester: Wiley-Blackwell; 143-168.

Szopa A., Ekiert H. ve Muszyńska B. (2013). Accumulation of hydroxybenzoic acids and other biologically active phenolic acids in shoot and callus cultures of *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott (black chokeberry). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **113**, 323-329.

Tang X.L., Liu J.X., Dong W., Li P., Li L., Lin C.R., Zheng Y.Q., Cong W.H. ve Hou J.C. (2014). The cardioprotective effect of protocatechuic acid on myocardial ischemia/reperfusion injury. *Journal of Pharmacological Sciences*, **125**, 176-183.

Tsao S.M., Hsia T.C. ve Yin M.C. (2014). Protocatechuic acid inhibits lung cancer cells by modulating FAK, MAPK, and NF- $\kappa$ B pathways. *Nutrition and Cancer*, **66**, 1331-1341.

Upadhyay R. ve Rao L.J.M. (2013). An outlook on chlorogenic acids: Occurrence, chemistry, technology, and biological activities. *Critical Reviews in Food Science and*

*Nutrition*, **53**, 968-984.

Urakova I.N., Pozharitskaya O.N., Shikov A.N., Kosman V.M. ve Makarov V.G. (2008). Comparison of high performance TLC and HPLC for separation and quantification of chlorogenic acid in green coffee bean extracts. *Journal of Separation Science*, **31**, 237-241.

Vauzour D., Corona G. ve Spencer J.P.E. (2010). Caffeic acid, tyrosol and p-coumaric acid are potent inhibitors of 5-S-cysteinyl-dopamine induced neurotoxicity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **501**, 106-111.

Vignoli J.A., Bassoli D.G. ve Benassi M.T. (2011). Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. *Food Chemistry*, **124**, 863-868.

Xu Z. (2012). Analysis methods of phenolic acids. İçinde Xu Z. ve Howard L.R. (Ed), *Analysis of antioxidant-rich phytochemicals*. Chichester: Wiley-Blackwell; 69-104.

Yan J.J., Cho J.Y., Kim H.S, Kim K.L., Jung J.S., Huh S.O., Suh H.W., Kim Y.H. ve Song D.K. (2001). Protection against  $\beta$ -amyloid peptide toxicity *in vivo* with long-term administration of ferulic acid. *British Journal of Pharmacology*, **133**, 89-96.

Yilmaz P.K., Hacibekiroğlu I. ve Kolak U. (2014). Effect of roasting on antioxidant and anticholinesterase capacities of coffee. *Journal of Food and Nutrition Research*, **53**, 232-239.

Yoon B.H., Jung J.W., Lee J.J., Cho Y.W., Jang C.G., Jin C., Oh T.H. ve Ryu J.H. (2007). Anxiolytic-like effects of sinapic acid in mice. *Life Sciences*, **81**, 234-240.

Yun K.J., Koh D.J., Kim S.H., Park S.J., Ryu J.H., Kim D.G., Lee J.Y. ve Lee K.T. (2008). Anti-inflammatory effects of sinapic acid through the suppression of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, and proinflammatory cytokines expressions via nuclear factor- $\kappa$ B inactivation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 10265-10272.

Zou Y., Kim A.R., Kim J.E., Choi J.S. ve Chung H.Y. (2002). Peroxynitrite scavenging

activity of sinapic acid (3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid) isolated from *Brassica juncea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 5884-5890.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Pelin	<b>Soyadı</b>	Köseoğlu Yılmaz
<b>Doğ. Yeri</b>	İzmir	<b>Doğ. Tar.</b>	16.09.1985
<b>Uyruğu</b>	T.C.	<b>TC Kim No</b>	57694006894
<b>Email</b>	koseoglupeлин@gmail.com	<b>Tel</b>	0536 764 12 61

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
<b>Doktora</b>	İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	Devam
<b>Yük.Lis.</b>	Ege Üniversitesi Kimya Bölümü	2010
<b>Lisans</b>	Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü	2007
<b>Lise</b>	Milli Piyango Anadolu Lisesi	2003

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma Görevlisi	İstanbul Üniversitesi	2010-devam

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	ÜDS Puanı	KPDS Puanı
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	91,25	87

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
<b>LES Puanı</b>	85,480	85,203	84,099

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS Windows	İyi
MS Office (Word, Excel, Power Point)	İyi
Lab Solutions	İyi
Chem Draw	İyi

## Yayımları

- 1) Samatya Saba, Köseoğlu Pelin, Kabay Nalan, Tuncel Ali, Yüksel Mithat (2015). Utilization of geothermal water as irrigation water after boron removal by monodisperse nanoporous polymers containing NMDG in sorption-ultrafiltration hybrid process. *Desalination*, 364, 62-67.
- 2) Hacıbekiroğlu Işıl, Yılmaz Pelin Köseoğlu, Haşimi Nesrin, Kılınç Ersin, Tolan Veysel, Kolak Ufuk (2015). In vitro biological activities and fatty acid profiles of *Pistacia terebinthus* fruits and *Pistacia khinjuk* seeds. *Natural Product Research* 29(5), 444-446.
- 3) Boğa Mehmet, Yılmaz Pelin Köseoğlu, Cebe Deniz Barış, Fatima Mashhad, Siddiqui Bina S., Kolak Ufuk (2014). Chemical constituents and biological activities of *Cirsium leucopsis*, *C. siphyleum*, and *C. eriophorum*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 69, 381-390.
- 4) Yılmaz Pelin Köseoğlu, Hacıbekiroğlu Işıl, Kolak Ufuk (2014). Effect of roasting on antioxidant and anticholinesterase capacities of coffee. *Journal of Food and Nutrition Research*, 53(3), 232-239.
- 5) Yılmaz Pelin Köseoğlu, Ertaş Abdulsalam, Kolak Ufuk (2014). Simultaneous determination of seven phthalic acid esters in beverages using ultrasound and vortex-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography. *Journal of Separation Science*, 37(16), 2111-2117.
- 6) Kabay Nalan, Köseoğlu Pelin, Yavuz Emre, Yüksel Ümran, Yüksel Mithat (2013). An innovative integrated system for boron removal from geothermal water using RO process and ion exchange-ultrafiltration hybrid method. *Desalination*, 316, 1-7.
- 7) Kabay Nalan, Köseoğlu Pelin, Yapıcı Duygu, Yüksel Ümran, Yüksel Mithat (2013). Coupling ion exchange with ultrafiltration for boron removal from geothermal water-investigation of process parameters and recycle tests. *Desalination*, 316, 17-22.
- 8) Köseoğlu Pelin, Kolak Ufuk (2011). Determination of Boron in 18 Bottled Mineral Waters in Turkey. *Journal of Faculty of Pharmacy of Istanbul University*, 41, 28-32.
- 9) Koseoglu Pelin, Yoshizuka Kazuharu, Nishihama Syouhei, Yuksel Umran, Kabay Nalan (2011). Removal of boron and arsenic from geothermal water in Kyushu Island, Japan, by using selective ion exchange resins. *Solvent Extraction and Ion Exchange*, 29(3), 440-457.
- 10) Yılmaz-Ipek Idil, Koseoglu Pelin, Yuksel Umran, Yasar Nazlı, Yolseven Gözde, Yuksel Mithat, Kabay Nalan (2010). Separation of boron from geothermal water using a Boron selective macroporous weak base anion exchange resin. *Separation Science and Technology*, 45(6), 809-813.

## Bildirileri

- 1) Pelin Köseoğlu Yılmaz, Ufuk Kolak (2014). A new HPLC method for determination of phthalates in juice samples. 20<sup>th</sup> International Symposium on Separation Sciences, Prag, Çek Cumhuriyeti (Poster).
- 2) Pelin Köseoğlu, Ufuk Kolak (2013). Determination of boron in bottled mineral water samples in Turkey. Euroanalysis, Varşova, Polonya (Poster).
- 3) Pelin Köseoğlu, Mehmet Boğa, Ufuk Kolak (2013). Constituents of *Cirsium eriophorum* with antioxidant and anticholinesterase activities. 44<sup>th</sup> World Chemistry Congress, IUPAC, İstanbul (Poster).
- 4) Pelin Köseoğlu, Işıl Hacıbekiroğlu, Ufuk Kolak (2013). Antioxidant and anticholinesterase activities of *Atriplex hortensis*. 44<sup>th</sup> World Chemistry Congress, IUPAC, İstanbul (Poster).
- 5) Işıl Hacıbekiroğlu, Pelin Köseoğlu, Ufuk Kolak (2013). Antioxidant and anticholinesterase activities of *Pistacia terebinthus* and *Pistacia khinjuk* with mycotoxin levels. 44<sup>th</sup> World Chemistry Congress, IUPAC, İstanbul (Poster).
- 6) Pelin Köseoğlu, Işıl Hacıbekiroğlu, Ufuk Kolak (2012). Türk kahvesinin antioksidan ve antikolinesteraz aktivitelerinin belirlenmesi. 6. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, Hatay (Poster).
- 7) Pelin Köseoğlu, Mehmet Boğa, Ufuk Kolak (2011). *Cirsium creticum*, *C. eriophorum* ve *C. hypoleucum* bitkilerinin antioksidan ve antikolinesteraz aktivitelerinin tayini. XII. Ulusal Spektroskopik Kongresi, Antalya (Poster).
- 8) Pelin Köseoğlu, Kazuharu Yoshizuka, Müşerref Arda, Ümran Yüksel, Nalan Kabay (2010). Removal of boron and arsenic from geothermal water by ion exchange resins. The 4<sup>th</sup> International Student Congress on Advanced Science and Technology: ICAST, İzmir (Sözlü Bildiri).
- 9) Pelin Köseoğlu, Enver Güler, İdil Yılmaz İpek, Ümran Yüksel, Mithat Yüksel, Nalan Kabay (2010). An innovative hybrid process combining sorption and ultrafiltration for boron removal from geothermal water. 6<sup>th</sup> Chemical Engineering Conference for Collaborative Research in Eastern Mediterranean Countries, EMCC-6, Antalya (Poster).
- 10) Pelin Köseoğlu, Enver Güler, İdil Yılmaz İpek, Ümran Yüksel, Mithat Yüksel, Nevzat Yiğit, Mehmet Kitiş, Nalan Kabay (2009). Jeotermal sulardan bor giderimi için yeni entegre sistem: sorpsiyon-membran filtrasyon hibrit yöntemi. Membran Teknolojileri ve Uygulamaları Sempozyumu, İstanbul (Poster).
- 11) Pelin Köseoğlu, Müşerref Arda, Ümran Yüksel, Mithat Yüksel, Nalan Kabay (2009). Removal of arsenic from geothermal water by weakly basic ion exchange resin. International Congress on Production of Safe Water, İzmir (Poster).
- 12) İdil Yılmaz İpek, Pelin Köseoğlu, Nazlı Yaşar, Gözde Yölseven, Ümran Yüksel, Mithat Yüksel, Nalan Kabay (2009). Removal of boron from geothermal water

using a boron selective weak base anion exchange resin. International Congress on Production of Safe Water, İzmir (Poster).

**Özel İlgi Alanları (Hobileri):**

Seyahat etmek, Sinema, Tiyatro.