

A"ADI SOYADI"

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

İ U N S E L N
DOKTORA TEZİ

LİSANS

← Adınızı soyadınızı giriniz

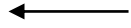
Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak

Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya

(sol yandaki gibi) olacak .



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;



Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

GIDA TAKVİYELERİNDE SİNARİN ANALİZLERİ

CAVİD MEMMEDZADE

DANIŞMAN
PROF. DR. DURİŞEHVAR ÖZER ÜNAL

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
ANALİTİK KİMYA PROGRAMI

İSTANBUL-2023

İTHAF

Aileme ve hocama ithaf ediyorum .



TEŞEKKÜR

Araştırma ve tüm çalışmalarım zamanı bana hep yol gösteren, bilgi veren, laboratuvar çalışmalarım zamanı destek veren değerli danışman hocam Prof. Dr. Durişehvar Özer Ünal'a

Bu çalışmalar sırasında bana yardımcı olan, değerli İlaç Araştırma ve Uygulama Merkezi ekibine, her zaman bana manevi destek olan aileme teşekkür ederim.



Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 36954

İÇİNDEKİLER

<u>İTHAF</u>	ii
<u>TEŞEKKÜR</u>	iii
<u>İÇİNDEKİLER</u>	iv
<u>TABLolar LİSTESİ</u>	vii
<u>ŞEKİLLER LİSTESİ</u>	ix
<u>SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ</u>	x
<u>ÖZET</u>	xii
<u>ABSTRACT</u>	xiv
<u>ZUSAMMENFASSUNG / RESUME</u>	xvi
<u>1. GİRİŞ VE AMAC</u>	1
<u>2. GENEL BİLGİLER</u>	4
2.1. Etken Maddeler	4
2.1.1. Sinarinin Farmakokinetik ve Kimyasal Özellikleri	4
2.1.2. Sinarinin Miktar Analiziyle İlgili Literatür Çalışması	5
2.1.3. Kafeik Asidin Miktar Analiziyle İlgili Literatür Çalışması	8
2.1.4. Klorojenik Asidin Miktar Analiziyle İlgili Literatür Çalışması.....	12
2.1.5. Ferulik Asidin Miktar Analiziyle İlgili Literatür Çalışması	17
2.1.6. P-kumarik Asidin Miktar Analiziyle İlgili Literatür Çalışması	21
2.2. Kromatografi	25
2.2.1. KROMOTOGRAFİDE BİLİNMEŞİ GEREKEN TERİMLER.....	25
2.2.2. YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOGRAFİSİ (HPLC).....	26
2.2.2.1. HPLC Cihazı Hakkında bilgiler.....	27
2.2.2.1.1. Mobil faz (çözücü) şişeleri.....	27
2.2.2.1.2. Degasser.....	27
2.2.2.1.3. Pompa.....	27

2.2.2.1.4. Enjektör.....	27
2.2.2.1.5. Kolon Fırını.....	27
2.2.2.1.6. Kolon.....	28
2.2.2.1.7. Dedektör.....	28
2.3. Sistem Uygunluk Testi.....	28
2.4. Validasyon.....	31
<u>3. GEREK VE YÖNTEM</u>	33
3.1. Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler	33
3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler	33
3.1.2. Çözeltiler	34
3.1.2.1. Mobil Faz Çözeltisi	34
3.1.2.2. Standart karışım hazırlanması.....	34
3.2. Aletler ve Gereçler	35
3.3. Analizin Gerçekleştirilmesi	36
3.4. Analitlerin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC-UV) ile Yöntem Geliştirme.....	36
3.4.1. Dedektör Dalga Boyu Seçimi	36
3.4.2. Mobil Faz Seçimi	36
3.4.3. Kolon Seçimi	37
3.4.4. Kalibrasyon Eğrisinin Seçimi	37
3.5. Sistem Uygunluk Testi	37
3.6. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu	37
3.6.1. Spesifiklik ve Seçicilik	37
3.6.2. Doğrusallık	37
3.6.3. Doğruluk	37
3.6.4. Kesinlik	37
3.6.5. Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)	38
3.7. Kapsüllerde ve Enginar tozu ekstresinde Sinarinin Analizi.....	38

3.7.1. Kapsüllerin ve Kapsül Çözeltilerinin Hazırlanması.....	38
<u>4. BULGULAR</u>	39
4.1. Kromatografik Koşullar	39
4.2. Yöntem Validasyonu.....	40
4.2.1. Seçicilik	40
4.2.2. Doğrusallık	40
4.2.3. Doğruluk ve Kesinlik	43
4.2.4. SİSTEM UYGUNLUĞU.....	46
4.2.5. Teşhis (LOD) ve Tayin (LOQ) Sınırları.....	46
4.3. Tabletlerde Sinarinin Analizi.....	47
<u>5. TARTIŞMA</u>	49
<u>KAYNAKLAR</u>	51

TABLolar LİSTESİ

Tablo 3-1:Referans standart.....	33
Tablo 3-2: Kimyasallar.....	33
Tablo 3-3: STMİX için kalibrasyon standartlarının hazırlanışı.....	34
Tablo 3-4:STMİX kalite kontrol örneklerinin hazırlanışı.....	35
Tablo 3-5:Ekipmanlar.....	35
Tablo 3-6:Destek ekipmanlar.....	35
Tablo 4-1: Kalite Kontrol Örneklerinde Sinarinin Gün İçi Doğruluk ve Kesinlik Hesaplamaları.....	43
Tablo 4-2: Kalite Kontrol Örneklerinde Klorojenik Asit Gün İçi Doğruluk ve Kesinlik Hesaplamaları.....	44
Tablo 4-3: Kalite Kontrol Örneklerinde Kafeik Asit Gün İçi Doğruluk ve Kesinlik Hesaplamaları.....	44
Tablo 4-4: Kalite Kontrol Örneklerinde P-kumarik Asit Gün İçi Doğruluk ve Kesinlik Hesaplamaları.....	44
Tablo 4-5: Kalite Kontrol Örneklerinde Ferulik Asit Gün İçi Doğruluk ve Kesinlik Hesaplamaları.....	44
Tablo 4-6: Kalite Kontrol Örneklerinde Sinarinin Günler Arası Doğruluk ve Kesinlik Hesaplamaları.....	45
Tablo 4-7: Kalite Kontrol Örneklerinde Klorojenik Asit Günler Arası Doğruluk ve Kesinlik Hesaplamaları.....	45
Tablo 4-8: Kalite Kontrol Örneklerinde Kafeik Asit Günler Arası Doğruluk ve Kesinlik Hesaplamaları.....	45
Tablo 4-9: Kalite Kontrol Örneklerinde P-kumarik Asit Günler Arası Doğruluk ve Kesinlik Hesaplamaları.....	45
Tablo 4-10: Kalite Kontrol Örneklerinde Ferulik Asit Günler Arası Doğruluk ve Kesinlik Hesaplamaları.....	46

Tablo 4-11: Sistem uygunluğu parametreleri.....	46
Tablo 4-12: Maddelerin LOD Değerleri.....	46



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Sinarinin Molekül Şekli.....	4
Şekil 2-2: Kafeik Asidin Molekül Şekli	9
Şekil 2-3: Klorojenik Asidin Molekül Şekli	13
Şekil 2-4: Ferulik Asidin Molekül Şekli.....	17
Şekil 2-5: P-kumarik Asidin Molekül Şekli.....	21
Şekil 2-6: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Sistemi (HPLC).....	26
Şekil 2-7: Kromatogram üzerinden sistem uygunluk terimlerinin gösterimi.....	29
Şekil 3-1: Standart karışım enjeksiyonuna ait örnek kromatogramı.....	39
Şekil 3-2: Boş enjeksiyona ait örnek kromatogramı.....	40
Şekil 3-3: Sinarinin 0,5-10,00 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan kalibrasyon eğrisi.....	41
Şekil 3-4: Klorojenik asidin 0,5-10,00 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan kalibrasyon eğrisi.....	41
Şekil 3-5: Kafeik asidin 0,5-10,00 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan kalibrasyon eğrisi.....	42
Şekil 3-6: P-kumarik asidin 0,5-10,00 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan kalibrasyon eğrisi.....	42
Şekil 3-7: Ferulik asidin 0,5-10,00 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan kalibrasyon eğrisi.....	43
Şekil 3-8: Kapsüldeki analizlere ait örnek kromatogramı.....	47
Şekil 3-9: Enginar tozu ekstresi analizlere ait örnek kromatogramı.....	48

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

HPLC : Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography)

MS : Kütle spektrometrisi

HPLC/MS/MS : Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi –Tandem Kütle Spektrometrisi (High Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry)

UPLC/MS-MS : Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi –Tandem Kütle Spektrometrisi (Ultra Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry)

LC–MS: Kütle Spektrumlu Sıvı Kromatografisi

LC–MS/MS: Sıralı Kütle spektrumlu Sıvı Kromatografisi

LC-ESI-MS/MS: Elektrosprey İyonizasyon Sıralı Kütle Spektrumlu Sıvı Kromatografisi

ICH: Uluslararası Harmonizasyon Konferansı

UV : Ultraviole

ACN : Asetonitril

MeOH : Metanol

mM : miliMolar

v : hacim

g : gram

mg : miligram

µg : mikrogram

ng : nanogram

mL : mililitre

µL : mikrolitre

nm : nanometre

C : konsantrasyon

SD : Standart sapma

RSD : Bağıl standart sapma

%CV: Varyasyon katsayısı (Coefficient of variation)

LOD : Teşhis sınırı

LOQ : Tayin sınırı

σ : İnterseptin standart sapması

S: Eğim

CYN : Sinarin

CA : Kafeik Asit

CLA: Klorojenik Asit

FA: Ferulik Asit

PCA: P-kumarik Asit

KK : Kalite kontrol

ÖZET

Memmedzade, C. (2022). Gıda Takviyelerinde Sinarin Analizleri. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul

Gıda takviyeleri, bir insanın diyetinde desteklemek üzere kullanılan ve vitaminler, mineraller, amino asitler, bitkiler ya da bitkisel diyet bileşenleri gibi besin ögelerini içeren ürünler olarak tanımlanmaktadır. Gıda takviyelerinin üretiminde meyve ve sebzeler, bitkiler, mikroorganizmalar ve hayvansal kaynaklı hammaddeler kullanılmaktadır. Gıdaların insan sağlığı üzerine faydalı özellikleri (antioksidan, besinsel lif vb.) bilindiğinden dolayı günümüzde gıda takviyelerinin tüketimi artmaktadır.

Bitkiler ve bitkilerden elde edilen ürünlerden, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kayıtlarına göre; dünya nüfusunun büyük bir kısmının (% 70-80), hastalık tedavisinde ve hastalıktan korunmada “geleneksel tıp” adı altında yararlandığı belirtilmektedir. Tıbbi bitki türünün 70.000 civarında olduğu ileri sürülmekle birlikte; Dünya Sağlık Örgütü tarafından 21.000 bitki türünün ilaç hazırlamak için uygun bulunduğu bildirilmektedir. Fonksiyonel gıda bileşenleri genellikle hastalığın önlenmesi ile ilgilidir. Tez konumuz olan sinarin (CYN) biyolojik olarak aktif fonksiyonel besin bileşenleri olan dicaffeoylquinic asit türevlerinden biridir. Sinarin, choloretic üzerinde potansiyel etkileri olan biyolojik olarak aktif fonksiyonel gıda bileşenlerinden biridir ve kolesterol düşürücü, hepatoprotektif, anti-aterosklerotik, anti-HIV, antioksidatif, anti-diyabetik, antikarsinojenik ve bağışıklık modülatör aktivitesidir. Özetle, sinarin daha moleküler, klinik ve epidemiyolojik çalışmalar için bir hastalık önleyici ajan olarak kullanabilmek için gereklidir.

Sinarin ve diğer bileşenleri ayırmak için kromatografik koşullar belirlenerek analize uygulanmıştır. 5 µm partikül çaplı 4,6x250 mm boyutunda Sepax BR C18 kolonda, mobil faz olarak ACN:Fosfat tamponu (pH:3.50) (20:80) (v/v), 25°C’de; 0,8 mL/dak akış hızında elde edilmiştir. Çalışma UV dedeksiyonla, üç dalga boyunda 310; 325; 330 nm dalgaboyu kullanılarak yapılmıştır. Maddelerin doğrusallık aralıkları 0,5-10,0 µg/mL olarak bulunmuştur. Teşhis (LOD) sırası ile sinarin için 0,08 µg/mL; klorojenik asit için 0,31 µg/mL; kafeik asit için 0,28 µg/mL; p-kumarik asit için 0,017 µg/mL;

ferulik asit için 0,18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'dir. Tayin sınırı (LOQ) ise kalibrasyon eğrisinin en düşük standart konsantrasyonu olan 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 'dir. Geliştirilen yöntem valide edilip, bu beş ilaç etken maddesinin kapsüllerdeki analizine uygulanmıştır. Bu yöntem kolay ve tekrarlanabilir olup kapsül analizlerinde güvenle kullanılabilir niteliktedir.



ABSTRACT

Memmedzade, C. (2022). Cynarin analysis in food supplements. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Analytical Chemistry. Master Thesis. Istanbul.

Food supplements are defined as products that are used to supplement a person's diet and that contain nutrients such as vitamins, minerals, amino acids, herbs or herbal dietary components. In the production of food supplements, fruits and vegetables, plants, microorganisms and raw materials of animal origin are used. Since the beneficial properties of foods on human health (antioxidant, dietary fiber, etc.) are known, the consumption of food supplements is increasing today.

According to the records of the World Health Organization (WHO), plants and products obtained from plants; It is stated that a large part of the world population (70-80%) benefits under the name of "traditional medicine" in the treatment and prevention of disease. Although it is claimed that there are around 70,000 medicinal plant species; It is reported by the World Health Organization that 21,000 plant species are found suitable for drug preparation. Functional food ingredients are often related to disease prevention. Cynarin (CYN), which is the subject of our thesis, is one of the dicaffeoylquinic acid derivatives that are biologically active functional nutritional components. Cynarin is one of the biologically active functional food ingredients with potential effects on choleric and cholesterol-lowering, hepatoprotective, anti-atherosclerotic, anti-HIV, antioxidative, anti-diabetic, anticarcinogenic and immune modulatory activity. In summary, cynarin is required for further molecular, clinical and epidemiological studies to be able to use it as a disease preventative agent.

In order to separate cynarin and other components, chromatographic conditions were determined and applied to the analysis. ACN:Phosphate buffer (pH:3.50) (20:80) (v/v) as mobile phase in Sepax BR C18 column 4.6x250 mm in size with 5 μ m particle diameter, at 25°C; Obtained at a flow rate of 0.8 mL/min. Operation with UV detection, 310 at three wavelengths; 325; It was made using a wavelength of 330 nm. Linearity ranges of the items were found as 0.5-10.0 μ g/mL. Diagnostic (LOD) 0.08 μ g/mL for cynarin, respectively; 0.31 μ g/mL for chlorogenic acid; 0.28 μ g/mL for caffeic acid;

0.017 $\mu\text{g/mL}$ for p-coumaric acid; 0.18 $\mu\text{g/mL}$ for ferulic acid. The limit of detection (LOQ) is 0.5 $\mu\text{g/ml}$, which is the lowest standard concentration of the calibration curve. The developed method was validated and applied to the analysis of these five active ingredients in capsules. This method is easy and reproducible and can be used safely in capsule analysis.



ZUSAMMENFASSUNG / RESUME

Dikkat bu satırı ve aşağıdaki paragrafı daha sonra siliniz!

Bu sayfayı koyacaksanız "ÖZET" ve "ABSTRACT" sayfalarındaki ilkeler uygun olarak hazırlayın. Bu sayfayı koymayacaksanız başlığı tamamen bloklayarak siliniz.



1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnsanların beslenmesine yardımcı olmak amaçlı kabul edilen ve amino asitler, bitkiler, vitaminler, mineraller gibi besin öğelerini içeren ürünler gıda takviyeleri olarak tanımlanmaktadır. Gıdaların insan sağlığına yararlı özellikleri (besinsel lif, antioksidan vb.) bilindiği için günümüzde gıda takviyelerinin kullanımı artmaktadır. Gıda takviyelerinde en çok görülen sorunlar katkı maddeleri, kontaminasyon, yanlış doz, toksisite ve hatalı etiketlemedir. Son zamanlarda ülkemizde ve dünyada ilaç etkileşimlerinden kaynaklı yan etkilerin yanı sıra söz konusu ürünlerle ilgili zehirlenmeler görülmektedir. Gıda takviyeleri ilaç olarak değerlendirilmemelidir. Doğru şekilde tüketildiğinde insanların sağlığını pozitif yönde etkilediği bilinmektedir [1].

Tıbbi bitkiler genellikle Uzakdoğu ülkelerindeki toplumlarda yaygınken; son yıllarda batı toplumlarında da kullanımı giderek artmaktadır. Bu bitkiler çoğunlukla “tamamlayıcı tıp” ya da “alternatif tıp” olarak kullanılmaktadır. Sağlığın geliştirilmesi ve sağlığa faydalı olabilmesi yönü ile bitkisel tıbbi ürün ticaretinde sürekli yükselen bir pazar oluşmasına yol açmaktadır [2].

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kayıtlarında bitkiler ve bitkisel ürünlerden; dünya nüfusunun büyük bir kısmında (% 70-80) hastalıktan korunmada ve hastalık tedavisinde “geleneksel tıp” adı altında faydalandığı görülmektedir. 70.000 civarında tıbbi bitki türünün varlığı öne sürülmekle birlikte Dünya Sağlık Örgütü 21.000 bitki türünün ilaç hazırlamak için uygun olduğunu bildirmektedir [3].

“Türk Gıda Kodeksi Takviye Edici Gıdalar Tebliği” ne göre gıda takviyelerinin tanımı; normal beslenmeyi takviye etmek amacıyla; mineral, vitamin, karbonhidrat, protein, amino asit, yağ asidi, lif gibi besin öğelerinin ya da bunların dışında fizyolojik ya da besleyici etkileri bulunan bitki, bitkisel ve hayvansal kaynaklı maddeler, biyoaktif maddeler ve benzeri maddelerin ekstrat ya da konsantrelerinin tek başına ya da karışımlarının pastil, kapsül, tablet, tek kullanımlık sıvı ampül, toz paket, damlalık şişe ve diğer benzeri sıvı ya da toz formlarda hazırlanarak günlük alım dozu belirlenmiş ürünler şeklindedir [1].

Gıda takviyeleri ilaç olarak değerlendirilmemeli fakat doğru şekilde tüketildiğinde ve doğru kişi tarafından yönlendirildiğinde bireyin sağlığını pozitif yönde etkilediği

bilinmelidir. Gıdaların ve bileşenlerinin işlevsel özellikleri gıda takviyelerini kullanmaya yönelim sağlamış ve günümüzde sağlığın korunması açısından önemli hale gelmiştir. Günümüzde yetersiz ve hatalı beslenme veya tüketilen üründen beklenen etkinin sağlanamaması gibi sorunlar gıdaların dozunda ve doğru tüketilmemesinden kaynaklanmaktadır. Bireylerin sağlıklı olabilmesi için gerekli içerikler (mineral, vitamin vb.) farklı nedenlerden ötürü artık gıdalardan elde edilememekte ve bunun neticesinde takviye edici gıdalara yönelim artmaktadır. Günümüzde, gıdaların işlevsel özellikleri (besinsel lif, antioksidan, aminoasit vb.) gıda takviyeleri sektöründe yeni ürünlerin gelişimine olanak sağlamakta ve bu takviyelere gereksinim duyan bireylerin ihtiyaçlarını gidermektedir [1].

Bu amaçla gıda takviyelerindeki etkili maddelerin analizi önem kazanmaktadır. Çalışmamızda enginar özütlerinde bulunan sinarin ve diğer hidroksosinnamik asit sınıflarının analizleri için HPLC-UV sistemi ile uygun yöntem geliştirilerek valide edilecek ve gıda takviyesi üzerinde uygulanacaktır .

Enginar (*Cynara scolymus* L.) Asterecea familyasına ait otsu ve çok yıllık bir bitkidir [4]. Enginar yetiştiriciliği ve tarımsal ekonomi açısından önemli bir yere sahip olup, başta İspanya ve İtalya olmak üzere Akdeniz ülkelerinde oldukça yaygındır [5].

Enginarın belirli işlemlerden geçirilmesi sonucu ortaya çıkan yan ürün ya da atıklar lif, inülin ve biyoaktif fenolikler ile antioksidan açısından oldukça zengindir [4]. Bu sebeple enginar üretimi ile açığa çıkan atık maddenin işlevsel gıda imalatında değerlendirilmesi ya da biyoaktif bileşen kaynağı olarak kullanılması ekonomik bakımdan fonksiyonel bir çözüm olacaktır. Enginarın, romatizma, ödem, hiperlipidemi, koroner kalp rahatsızlığı ve kolesterol problemlerini çözmesi ile aterojenik risklerini azalttığı düşünülmektedir [6].

Enginar, yağ oranını azaltıcı özelliği ve yüksek antioksidan içeriği bakımından kardiyovasküler sistem açısından yararlı bir bitkidir. Bu ürünlerin tanınırlığı zamanla artmaktadır. Enginar içerisinde tıbbi ve besleyici fayda sağlayıcı, mineral, lif, inülin ve fenolik maddeler gibi bileşenler barındırmaktadır. Enginardaki inülin ve başta flavonoidler ve kafeoilkuinik asitler olmak üzere fenolik bileşenler sağlığı destekleyici etkilerin büyük bir çoğunluğunu oluşturmaktadır [4].

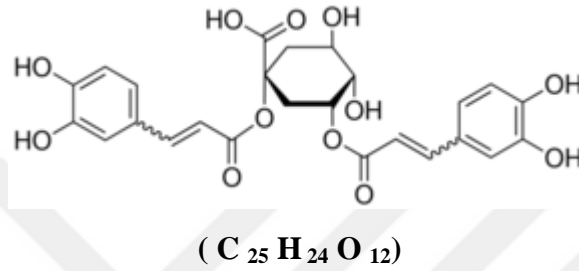
Enginarın içerdiği fenolik madde ile ilgili bir çok araştırma yapılmıştır; fakat bitkinin hangi kısmında hangi fenolik maddenin yoğun olarak yer aldığı konusunda net bir bilgi elde edilememektedir [7] . Çünkü, fenolik madde profili olgunluk seviyesi, tür, üretim ve saklama şartlarına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Etken Maddeler

2.1.1. Sinarinin Farmakokinetik ve Kimyasal Özellikleri



Şekil 2-1:Sinarinin Molekül Şekli

Sinarin (CYN) , bir hidroksisinnamik asit türevi olup aynı zamanda enginarın (Cynara cardunculus) biyolojik, aktif kimyasal bileşenidir (şekil 2-1). Kimyasal olarak iki birim kafeik asit ve kinik asitten oluşan bir esterdir [8].

Vücut için oldukça faydalı olan, çok az gıdada bulunan sinarin enginar da bolca bulunmaktadır [9].

Sinarin karaciğerde bulunan dokuları stimüle ederek safra salgısının artmasına yardımcı olmaktadır. Karaciğerde beslenme bozuklukları ve başka nedenlerden dolayı fazla kolesterol üretimini önleyen sinarin, karaciğerdeki fazla miktardaki kolesterolün vücuttan uzaklaştırılmasına da yardımcı olmaktadır [10].

Bu nitelikleri sayesinde vücut sağlığını pozitif yönde etkileyen sinarinin yeterli miktarda vücuda alınması gerekmektedir ve bunun için de en iyi yöntem enginar tüketmektir.

Sinarin maddesinin yararlarından bazıları şunlardır:

- Sindirim sisteminin sağlıklı ve daha düzenli çalışmasına yardımcı olur.
- Kötü kolesterolün düşmesini sağlayarak kalp ve damar sağlığını korur.
- Vücuda alınan yağların sindirilmesine yardımcı olur.

- Safra üretimini uyarır.
- İdrar yolları sağlığını korur.
- Safra sağlığı ve karaciğerin korunması için yeterli miktarda mutlaka alınması gerekir.
- Karaciğerin düzenli çalışmasına yardımcı olduğundan dolayı gaz, bulantı ve şişkinlik gibi durumların meydana gelmesini önler.

2.1.2. Sinarinin Miktar Analiziyle İlgili Literatür Çalışması

HPLV-UV Kromotografik Çalışmalar

Mornar ve ark, HPLC-DAD-MS-MS tekniği kullanarak enginar yaprağı ekstraktında sinarinin miktar tayinini yapmışlardır. Boyutları 150 mm x 4,6 mm ve partikül boyutu 3,5 µm olan C18 kolon kullanılmıştır. Mobil faz sistemi: formik asidin %0,1-lik çözeltisi (A) ve asetonitrilden (B) oluşan bir gradyan yöntemi ile sinarin analizi yapılmıştır. Enjeksiyon hacmi 5 µL, mobil fazın akış hızı 0,4 mL /dakika ve kolonun sıcaklık derecesi 25 °C'de çalışılmıştır. Sinarinin ax dalga boyu 326 nm olarak ayarlanmıştır. Geliştirilen yöntem farmakokinetik çalışmaya uygulanmıştır [11].

Aboutabl ve ark, HPLC-DAD tekniği kullanarak Mısırdaki yetiştirilen dulavratotu köklerinden, yapraklarından ve tohumlarından 13 fenolik bileşik (sinarin dahil) varlığını tespit etmişler ve miktar tayinini yapmışlardır. HPLC analizi, bir PDA detektörü ve bir Intersil ODS-2 C18 kolonu, 2.1x50 mm, partikül boyutu 3 µm olan C18 kolon, mobil faz sistemi formik asidin %0,2-lik çözeltisi (A) ve asetonitril/metanol (60:40) (v/v) (B) oluşan bir gradyan yöntemi ile sinarin analizi yapılmıştır. Mobil fazın akış hızı 0,2 mL /dakika, enjeksiyon hacmi 20 µL, ve kolonun sıcaklık derecesi 25 °C'de çalışılmıştır [12].

Sun Zheng ve ark, HPLC-DAD tekniği kullanarak ayçiçeği (Helianthus annuus) filizlerinde sinarinin miktar tayinini yapmışlardır. C18 kolonu, boyutları 150 mm x 2,1 mm ve partikül boyutu 5 µm olan, mobil faz sistemi formik asidin %0.1-lik çözeltisi (A) ve asetonitrilden (B) oluşan bir gradyan yöntemi ile sinarin analizi yapılmıştır.

Mobil fazın akış hızı 0,2 mL /dakikaya ayarlandı ve kolonun sıcaklık derecesi 25 °C'de çalışılmıştır [13].

Topal ve ark, İliya devedikeninde (*Onopordum illyricum L.*) saflaştırılan sinarinin antioksidan, antiradikal ve antikolinergic özelliklerini belirlemek için LC-MS/MS analizi gerçekleştirmişlerdir. C18 kolonunda (5.0 µm, 19 mm × 50 mm kolon) yaklaşık 42 mg sinarin izole edilmiştir [14].

Pandino ve ark, Küre enginar, Yabani enginar ve Ekili enginarın olgunlaşmamış çiçeklerinde ana flavonoidleri ve fenolik asitleri (kafeoilkinik asitler, apigenin ve luteolin türevleri) araştırmak için HPLC / kütle spektrometrisi ile çalışmalar yapmışlardır. LC-MS/MS ile yapılan analizi Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 x 50mm; 1.8 µm partikül boyutu) kolonlu, mobil fazı formik asidin %0.1 çözeltisi (A) ve asetonitrilden (B) oluşan, mobil fazın akış hızı 0,2 mL /dakika, enjeksiyon hacmi 20 µL ve kolonun sıcaklık derecesi 25 °C'de olan bir gradyan yöntem kullanılmıştır. Sinarinin LC-MS/MS ile yapılan analiz sonuçlarına göre: LOQ=1 (mg/L), LOD=0.20 (mg/L). Geliştirilen yöntem farmakokinetik çalışmaya uygulanmıştır [15].

Ben Salem ve ark, enginar yaprağı ekstraktının yüksek yağlı diyet (HFD) ile indüklenen sıçanlara karşı hepatoprotektif etkisini araştırmak için LC-MS/MS ile enginarın yapraklarından HPLC kromatogramından on fenolik bileşen analizini yapmışlar. Kromatografik ayırma için bir Zorbax 300 A° Extend-C-18 Sütunu (2.1 x 150 mm; Phenomenex UK, Macclesfield, UK) kullanıldı. Mobil faz, %95 solvent A (su içinde %0.1 formik asit) ve %5 solvent B (asetonitril içinde %0.1 formik asit)-den oluşturuldu. Akış hızı 200 ml/dk ve hacim 5 ml'de enjekte edilmiştir [16].

Im Do Youn ve ark, HPLC-DAD tekniği kullanarak dulavratotu köklerinde olan fenolik bileşiklerin analizini gerçekleştirmişlerdir. Mobil faz, çözücü A (su içinde %0.1 formik asit) ve çözücü B (asetonitril içinde %0.1 formik asit)-den oluşturulmuştur. Akış hızı 0.5 ml/dk'ya ayarlandı. LC-MS/MS kullanılarak yapılan analizler sonucunda dulavratotu kökünde bulunan ana etken maddelerin sinarin ve klorojenik asit olduğu teyit edilmiştir [17].

Alonso ve ark, biyolojik örneklerde sinarinin tayini için HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri yöntemde A Ib-Sil ODS (250 mm x4,6 mm x 5 µm) ters fazlı kolon (Phenomenex ABD) kullanmışlardır. Kolon su / metanol / asetik asit ile (78.5:20:2.5, v/v/v) yıkandı. Mobil fazı 1,3 ml/dk akış hızında kullanmışlardır. Dalga boyunu 316 nm'ye ayarladılar. Kromatografik prosedür, oda sıcaklığında (18-25 °C) gerçekleştirilmiştir [18].

Kabganian ve ark, HPLC ile üç yaşındaki dar yapraklı kirpi otu (*Echinacea Angustifolia*) bitkilerinin kısımlarındaki alkamitler, ekinakozit ve sinarin miktarlarını belirlemek için gradiyent yöntem kullanmışlardır. Geliştirdikleri yöntemde HP Zorbax C18 ODS hypersil (boyutları 125 mm x 4 mm, partikül boyutu 5 µm,) kolon kullanılmıştır. Mobil faz (0.12% H₃PO₄ : asetonitrile, v:v)-den oluşturuldu. Hacim 5 ml'de enjekte edilmiştir ve 1 ml/dak akış hızı ayarlanmıştır. Dalga boyu 316 nm'ye ayarlandı [19].

Wang ve ark, enginar (*Cynara scolymus L.*) antioksidatif fenolik bileşiklerin analizi için HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri yöntemde ODS3 (150 × 3.2 mm, 5 µm) kolon kullanıldı. Mobil faz solvent A (su içinde %0.2 formik asit) ve solvent B (asetonitril)-den oluşturulmuştur. Akış hızı 1,2 ml/dk'ya ayarlandı. Sinarin için kalibrasyon eğrisi 1.24-248 µg/ml aralığında bulunmuştur [20].

Kulza ve ark, enginar (*Cynara scolymus L.*) yaprağı ekstraktının ana bileşenleri olan sinarin ve luteolinin siçan plazmasında tayin yöntemini geliştirmişlerdir. Bileşikler, diyot dizisi algılamalı (HPLC-DAD) yüksek performanslı sıvı kromatografi tekniği kullanılarak ayrılmıştır. HPLC ayırımı, su ve metanol içinde bir mobil faz - %0.05 trifloroasetik asit kullanılarak gradyan koşulları altında C18 kolonu üzerinde gerçekleştirilmiştir. Dedektör lambda=330 nm'ye ayarlandı. Sinarin için LOQ değerini 2.25 µg/ml ve LOD değerini 0.75 µg/ml bulmuşlardır [21].

Pellati ve ark, ekinezya cinsinin çeşitli türlerinde hızlı ve güvenilir bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntem kafeik asit ve onun türevlerinin tespiti için önemliydi. Geliştirdikleri yöntemde RP-18 (boyutları 125 x 4 mm, partikül boyutu 5 µm) kolon, mobil faz sistemi %0.1 fosforik asit çözeltisi (çözücü A) ve asetonitrilden

(çözücü B) oluşan bir gradyan yöntem ile sinarin analizi yapılmıştır. Hacim 5 µL enjektörde edildi ve akış hızı 1.5 ml/dk'ya ayarlandı. Dalga boyu 330 nm'ye ayarlandı. Sinarin için LOQ değerini 15.99 µg/ml ve LOD değerini 5.28 µg/ml bulmuşlardır [22].

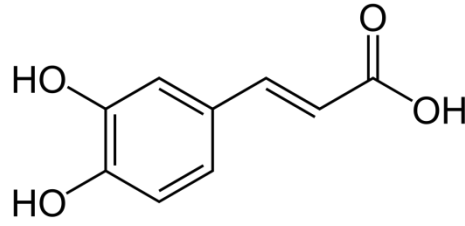
Hammouda ve ark., enginar (*Cynara scolymus* L.) yapraklarındaki aktif bileşenlerin (flavonoidler ve kafeik polifenoller) kantitatif bir spektrofotometrik tayini ve HPLC analizi ile tek tek bileşiklerin nispi yüzdelerini hesaplamışlardır. Çalışma, olgun yaprakları, farklı hasatları, ana bitkiyi ve iki evlat neslini ve ayrıca Rumen ve Mısır türleri için karşılaştırmalı bir çalışmayı kapsar. Flavonoidler ve polifenollerin karşılaştırmalı çalışması göstermiştir ki, Rumen türü, Mısır türünden daha yüksek yüzdeler içerir. Enginarın (*C. scolymus*'un) Rumen türlerinin yaprakları, Mısır türlerinin yapraklarına tercih edilir. Bileşiklerin nispi yüzdeleri sırasıyla 0,53, 1,22 ve 0,31,0,47 olarak bulunmuştur [23].

Jun ve ark., enginarın antioksidan aktivitesinin toplam flavonoid içeriği ile yakın bir ilişkisi olduğunu göstermişlerdir. Antioksidan aktivite gösteren bileşik, tekrarlanan kolon kromatografisi ve yeniden kristalleştirme ile enginardan izole edilmiştir. Spektrometrik çalışmalara dayanarak, bileşiğin sinarin olarak bilinen 1,3-dikaffeoilkinik asit olduğu sonucuna varılmıştır. Enginarın baş ve yapraklarından elde edilen sinarin içeriği, C18 fotodiyot dizi dedektörü ile birleştirilmiş ters fazlı HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografisi) sırasıyla 10.15 ve 0.67 mg/g idi [24].

2.1.3. Kafeik Asidin Miktar Analiziyle İlgili Literatür Çalışması

Kafeik asit (CA), hidroksisünamik asit sınıfından olan organik bir bileşiktir. Kafeik asit, fenolik aynı zamanda akrilik fonksiyonel gruplardan oluşur (şekil 2-2). Lignin biyosentezinde bir ara madde olduğu için tüm bitkilerde bulunur [25].

Serbest kafeik asit, demlenmiş kahve, çeşitli içeceklerde kırmızı şarap dahil olmak üzere bulunabilir. Kekik, adaçayı, nane bitkilerinde yüksek seviyelerde bulunur. Kuru erik, kayısı, elma sosu, ayçekirdeğinde orta seviyelerde bulunur.



Şekil 2-2:Kafeik Asidin Molekül Şekli

HPLV-UV Kromotoqrafik Çalışmalar

Wang ve ark , kafeik asit (CA) ve aktif metabolitlerinin eş zamanlı tayini ve farmakokinetik çalışmasından dolayı (LC-MS/MS) yöntemini geliştirmişlerdir. HPLC-DAD tekniği kullanarak kafeik asitin miktar tayinini yapmışlardır. Boyutları 150 mm x 4,6 mm ve partikül boyutu 3,5 µm olan C18 kolon ve kafeik asiti tanımlamak için mobil faz sistemi: 0.2 mL/dk'lık bir akış hızında metanol ve sudan (%0.1 formik asit içeren) oluşan bir mobil faz ile analizi yapmışlardır. Yöntem, tüm korelasyon katsayıları 0.9931 ile araştırılan aralıktaki tüm analitler için doğrusaldı. Alt miktar tayini limitleri analitler için 5.0 ng/mL idi. Gün içi ve günler arası kesinlik (göreceli standart sapma) <5.86 ve <6.52 ve doğruluk (göreceli hata) -5.95 ile %0.35 ($n = 6$) arasındaydı. Yöntemin LOQ değeri 5 ng/ml olup kalibrasyon aralığı 5-10 ng/ml'dir. Geliştirilen yöntem, CA'nın oral ve intravenöz uygulamasından sonra sıçan plazmasındaki CA'nın farmakokinetiğini ve ana aktif metabolitlerini incelemek için uygulanmıştır [26].

Dai ve ark, sıçan plazmasında HPLC-DAD tekniği kullanarak kafeik asitin miktar tayinini yapmışlardır. Altı Sprague-Dawley sıçanına sırasıyla 4 mL x kg(-1) Dengzhanxixin enjeksiyonu intravenöz olarak enjekte edilmiştir. İlaç plazma konsantrasyonları, dahili standart olarak tinidazol ile LC-MS/MS ile belirlendi. Metodolojik test, gereksinimlere uygunluğu gösterdi. Gün içi ve günler arası değişken katsayısı %10.0'dan azdı, bu da hem meşru kesinliğin hem de doğruluğun biyolojik numune analizinin gereklilikleriyle uyumlu olduğunu gösteriyordu. Bu çalışmada

oluşturulan LC-MS/MS analiz yönteminin kafeik asidin farmakokinetik çalışmasına uygulanabilecek kadar doğru ve hassas olduğu kanıtlanmıştır [27].

Bursal ve ark, HPLC-DAD tekniği kullanarak kiraz sapının (*Cerasus avium* L.) antioksidan aktivitesi ve polifenol içeriğini belirlemişlerdir. Kafeik asidin miktarı yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve tandem kütle spektrometrisi ile tespit edilmiştir. (LC-MS/MS). Boyutları 125 mm x 2 mm ve partikül boyutu 5 µm olan C18 kolon, mobil faz sistemi:Metanol (A, 0.5% formik asit) ve su (B, 0.5% formik asit), oluşan bir gradyan yöntemi ile analizi yapmışlardır. Mobil fazın akış hızı 0,3 mL /dakika ve kolon sıcaklığı 30 °C'de çalışılmıştır. Enjeksiyon hacmi 10 µL'dir.Yöntemin LOD'si 0.5 µg/L, LOQ'si 50 µg/L olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntem farmakokinetik çalışmaya uygulanmıştır [28].

Molina ve ark, HPLC-DAD tekniği kullanarak Stevia yapraklarının karakterizasyonu yapmışlardır. Seksen dokuz bileşik geçici olarak tanımlanmış ve farklı ailelere: (flavonoidler; kinik ve kafeik asitler ve türevleri) sınıflandırılmıştır. LC-MS/MS analizi için boyutları 15 sm x 0.4 sm ve partikül boyutu 5 µm olan C18 kolon, mobil faz sistemi: %0,1 formik asitli (A) su ve %0,1 formik asitli (B) metanol oluşan bir gradyan yöntemi ile kafeik asidin analizini yapmışlardır. Geliştirilen yöntem farmakokinetik çalışmaya uygulanmıştır [29].

Ferracane ve ark, HPLC-DAD tekniği kullanarak dulavratotu (*Arctium lappa*) yaprağı ekstraktında kafeik asidin miktar tayinini yapmışlardır. Dulavratotu ekstraktlarının ana bileşikleri; kafeoilkinik asit türevleri, lignanlar ve çeşitli flavonoidlerdir. Dulavratotu tohumlarında bazı fenolik asitlerin (kafeik asit, klorojenik asit ve sinarin) oluşumu kanıtlanmıştır. LC-MS/MS analizi için 280 nm'ye ayarlanmış dedektör ve bir Prodigy ODS3 100 Å kolon (250 mm × 4,6 mm, partikül boyutu 5 µm) kullanılmıştır. Mobil faz sistemi formik asidin 0,2 %-lik çözeltisi (A) su ve (B) asetonitril/metanol (60:40),(v/v) oluşan bir gradyan yöntem ile analiz yapılmıştır.. Enjeksiyon hacmi 20 µL, akış hızı 0,2 mL /dakika ayarlarında çalışılmıştır. Geliştirilen yöntem farmakokinetik çalışmaya uygulanmıştır [30].

Yılmaz ve ark, HPLC-DAD tekniği kullanarak bitkilerde 8 fitokimyasal bileşiğin (sinarin, kafeik asit, sirinjik asit, p-kumarik asit, o-kumarik asit, vanilik asit, ferulik asit, klorojenik asit) miktarsal tayinini yapmışlardır. LC-MS/MS analizi için boyutları 150 mm x 4.6 mm ve partikül boyutu 5 µm olan C18 kolon, mobil faz sistemi: A (su, 5 mM amonyum format ve %0.1 formik asit) ve mobil faz B (metanol, 5 mM amonyum format ve %0,1 formik asit) oluşan bir gradyan yöntemi ile kafeik asidin analizi yapılmıştır. Kolon sıcaklığı 30 °C'de çalışılmıştır. Yöntemin LOD'si 2.58 µg/L , LOQ'si 3.61 µg/L olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntem farmakokinetik çalışmaya uygulanmıştır [31].

Wang ve ark, aromatik bitkilerde rosmarinik ve kafeik asitlerin belirlenmesi için bir HPLC yöntemi geliştirmişler. Geliştirdikleri yöntemde Kingsorb (150 mm x4,6 mm x 5 µm) C18 ters fazlı kolon kullanılmıştır. Kolon ortofosforik asit içeren metanol/su gradyanlı elüsyon sistemi ve bir fotodiyot dizi detektöründen oluşuyordu. Mobil fazı 1 ml/dk akış hızında kullanmışlardır. Enjeksiyon hacmi 10 µL olarak ayarlandı Dalga boyu 316 nm'ye ayarlandı. Kromatografik prosedür, 30 °C gerçekleştirilmiştir. Kafeik asit için için LOD ve LOQ sırasıyla 0.150 µg/ml ve 1.345 µg/ml olarak bulunmuştur [32].

Spagnol ve ark, emülsiyonlarda kafeik asit (CA) tayini için doğru, hassas, hızlı ve HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. En iyi ayırma, 0.7 ml/dak bir akış hızında, asetik asit ile pH 2.5 olan etanol ve saf sudan (40:60 v/v) ibaret mobil faz, 250 x 4.6 mm, 5.0 µm partikül boyutunda bir RP18 XDB Waters kolonunda elde edilmiştir. Ultraviyole algılama, ortam kolon sıcaklığında (25°C) 325 nm'de gerçekleştirilmiştir. LOD 1,44 µg/mL ve LOQ 4.38 µg/mL olarak bulunmuştur [33].

Iransahi ve ark, İran'da yetiştirilen ekinezya (*Echinacea purpurea*) 'dan kafeik asit türevlerinin hızlı izokratik HPLC analizini yapmışlardır. Geliştirdikleri yöntemde RP-18 Nucleosil C18 (250 mm x4,6 mm x 5 µm) kolon kullanıldı. Mobil faz sistemi fosforik asidin %0,1-lik oranında asetonitril ve sudan (70:30) oluşuyordu Mobil fazın akış hızı, 1.5 mL/dak; dalga uzunluğu 330 nm; çalışma süresi 5 dakika; enjeksiyon hacmi, 50 µL olarak belirlenmiştir [34].

Kosinska ve ark, etanol-dioksan kullanılarak yağı alınmış keten tohumlarından fenolik bileşikler ekstre etdiler. Elde edilen ham özüt, hareketli fazlar olarak su ve metanol ile Amberlite XAD-16 kolon kromatografisi kullanılarak saflaştırılmıştır. HPLC kullanılarak incelenen keten tohumunun LM'sinde, bir kafeik asit molekülü, beş molekül p -kumarik asit ve iki molekül ferulik asit bulunmuştur. Geliştirdikleri yöntemde (Shimadzu Co., Kyoto, Japonya) C18 (250 mm x4,6 mm x 5 µm) kolon kullanıldı. 1 ml/dk akış hızı ve asetonitril-su-asetik asit (5:93:2, v/v/v) [çözücü A] ve asetonitril-su-asetik asidin (40:58:2) gradyan yöntemi ile kafeik asidin analizini yapmışlardır. Enjeksiyon hacmi 5 µL olarak belirlendi. Bileşiklerin ayrılması 280 nm'de izlendi. Kromatogramlar 320 nm'de kaydedildi [35].

Spagnol ve ark, basit, hızlı ve tekrarlanabilir bir UV Spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. UV-Spektrofotometrik yöntem kullanarak emülsiyondaki kafeik asitin validasyonu yapıldı. Kromatogramlar 325 nm'de kaydedildi. Kalibrasyon eğrisi 2 ila 8 µg/mL, LOD 0.43 µg/mL ve LOQ 1.32 µg/mL olarak bulunmuştur [36].

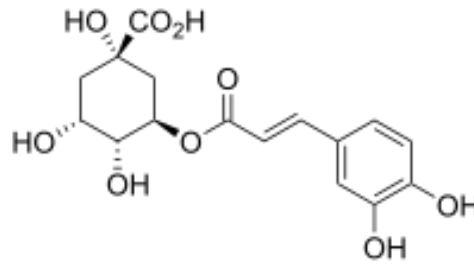
Masek ve ark, spektrofotometrik yöntemle Kafeik asidin antioksidan aktivitesini araştırmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre kafeik asit doğrusal olarak artan gelişmiş antioksidan özellikler sergilemiştir [37].

Stratil ve ark, sebzelerde fenolik bileşiklerin toplam içeriğinin ve antioksidan aktivitesinin belirlenmesi için spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemle kullanılan standartlar için korrelasyonları ve çeşitli türlerden ekstraktlar, yaygın olarak tüketilen sebzeler, ayrıntılı olarak incelenmiştir. Sebzelerde fenolik madde içeriği ve toplam antioksidan aktivitesi değerleri, kullanılan tüm yöntemler için çok iyi korrelasyon göstermiştir [38].

2.1.4. Klorojenik Asidin Miktar Analiziyle İlgili Literatür Çalışması

Klorojenik asit (CGA), kafeik asit ve kinik asidin esteridir (şekil 2-3) [25]. "Klorojenik asitler" terim olarak, kinik asitde dahil olmak üzere hidroksisinnamik asitlerle (kafeik asit, ferulik asit ve p -kumarik asit) birlikte esterlerin ilgili bir polifenol ailesini ifade eder [39].

Klorojenik asit kahve çekirdeklerinde, kuru erik, şeftali ve patlıcanda bulunur.



Şekil 2-3:Klorojenik Asidin Molekül Şekli

HPLC-UV Kromotografik Çalışmalar

Souilah ve ark, HPLC-DAD tekniği kullanarak *Oenante fistulosa* L.'de (Kazyak) 9 fenolik bileşik varlığını tespit etmişler ve miktar tayinini yapmışlardır. Mevcut çalışmanın amacı, *fistulosa*'nın diklorometan (DCM), Etil Asetat (EA) ve n-bütanol (BuOH) fraksiyonlarının kimyasal profilini 37 fitokimyasalın LC-MS/MS ile analizi yoluyla araştırmak ve antioksidan, antikolinesteraz ve antitirozinaz gibi biyolojik aktivitelerini ilk kez değerlendirmektedir. Test edilen bitki fraksiyonları kayda değer ve güçlü bir antioksidan etki göstermiştir. Bunların arasında 9 fenolik asit tespit edildi ve klorojenik, ferulik ve p-kumarik asitler en bol olanlardı [40].

Ye, Jun Xiao ve ark, HPLC-DAD tekniği kullanarak sıçan plazmasında klorojenik asitin miktar tayinini yapmışlardır. Metanol / etilasetat / trifloroasetik asit (49:49:2, v/v/v) ile ekstraksiyonun ardından, ekstrakte edilen analitler, %0.1 formik asit içeren asetonitril-sudan oluşan bir gradyan mobil faz sistemi kullanılarak bir ters faz C12 kolonunda ayrılmıştır. Ölçüm limitleri 1 ng/mL ile 2.1 ng/mL arasında kesinlik <7 ve doğruluk %94 ile %107 arasındaydı. Klorojenik asit için LOQ değerini 10 ng/mL ve LOD değerini 3 ng/mL buldular. Doğrulanmış yöntem, intravenöz, peroral ve ya intratrakeal yollarla *Shuang-huang-lian* solüsyonlarının uygulanmasından sonra sıçanlarda karşılaştırmalı bir farmakokinetik çalışmaya uygulandı. Sonuçlar, üç kimyasal belirtecin, peroral uygulamaya kıyasla pulmoner uygulamayı takiben daha hızlı ve tamamen emildiğini göstermiştir [41].

Yang ve ark, insan plazmasındaki Klorojenik asidin kantitatif analizi için bir LC-MS/MS yöntemi geliştirmiş ve bunun ilerlemiş katı tümörü olan Çinli hastalarda bir farmakokinetik çalışmaya uygulamışlardır. Plazma numuneleri metanol ile çökteldi ve %0,1-lik formik asit içeren metanol-su gradyan yöntemi kullanılarak 0,4 mL/dk akış hızında bir Zorbax C18 kolonunda (50 x 2,1 mm, id 1,8 µm) ayrıldı. Yöntem, 10–2000 ng/mL konsantrasyon aralığında tamamen doğrulanmıştır. Günler arası ve gün içi kesinlik (%RSD) göstergelerinin tümü %10,7 içindeydi ve doğruluk (%RE) -%3,0 ile %10,6 arasında değişiyordu. Bu yöntem, enjeksiyon için Klorojenik asidin intramüsküler enjeksiyon uygulamasından sonra ilerlemiş katı tümörü olan Çinli hastalarda farmakokinetik çalışmaya başarıyla uygulanmıştır [42].

Fang ve ark, kurutulmuş eriklerde fenolik bileşenlerin HPLC-DAD tekniği kullanarak miktar tayinini yapmışlardır. Kuru erik, Batı'da sağlıklı bir besin olarak bilinir ve Hindistan'da ilaç olarak kullanılır. Bunlar, yaşa bağlı çeşitli hastalıklara karşı korumada çok önemli bir rol oynadığına inanılan yüksek konsantrasyonlarda fenolik bileşiklerle karakterize edilmiştir. Ana bileşenler neoklorojenik asit ve kriptoklorojenik asitti. Mobil faz olarak %0,1-lik formik asit içeren metanol-su kullanıldı. Geliştirilen yöntem farmokokinetik çalışmaya uygulanmıştır [43].

Zhao ve ark, sıçan plazmasında klorojenik asit ve dört flavonoidin eş zamanlı miktar tayinini yapmışlardır. Plazma numuneleri metanol ile çökteldi ve bir ters faz Agilent Poroshell 120 EC-C18 ile ayrıldı. %0,1-lik formik asit içeren metanol-su gradyan yöntem kullanıldı. Klorojenik asit için LOQ değerini 5.55 ng/mL ve LOD değerini 0.36 ng/mL buldular. Gün içi ve günler arası kesinlik %15 içindeydi ve ortalama ekstraksiyon geri kazanımları her bir analit için %85 ila 115 arasında değişiyordu. Geliştirilen yöntem farmokokinetik çalışmaya uygulanmıştır [44].

Zhang ve ark, insan plazmasında klorojenik asit ve sinamik asidin eş zamanlı tayini için hızlı ve yüksek hassasiyetli bir sıvı kromatografisi/tandem kütle spektrometrisi (LC/MS/MS) yöntemi geliştirmişlerdir. Analitler, insan plazmasından eter-etil asetat (1:1, v/v) ile sıvı/sıvı ekstraksiyonu yoluyla ekstrakte edildi ve bir

Agilent Zorbax SB C18 kolonunda 5 dakika içinde ayrıldı. Akış hızı 0.5 ml/dk'ya ayarlandı ve hacim 5 µL enjekte edildi. Klorojenik asit için LOQ değerini 800 ng/mL ve LOD değerini 1 ng/mL buldular. Gün içi ve günler arası kesinlik (%RSD) her bir analit için %9,05 aralığındaydı. Absolüsyon geri kazanımları, klorojenik asit için %74.62'den fazlaydı. Yöntem, 10 sağlıklı gönüllüde Mailuoning enjeksiyonunun farmakokinetik çalışmasına başarıyla uygulanmıştır [45].

Duckstein ve ark HPLC-DAD tekniği kullanarak hamamelis virginiana yapraklarındaki fenolik bileşenlerin miktar tayinini yapmışlardır. Analizler bir Sun Fire C18 (150×2,1 mm 5 µm) ters fazlı analitik kolon üzerinde gerçekleştirilmiştir. Gradyan yöntem ile klorojenik asidin analizini yapmışlardır. UV-dedektör 280, 360 nm, kolonun sıcaklık derecesi 25 °C'de çalışılmıştır. Klorojenik asit için LOQ 140.3 µg/ml ve LOD değerini 46.4 µg/ml bulundu. Geliştirilen yöntem farmokokinetik çalışmaya uygulanmıştır [46].

Bennat ve ark, kavrulmuş kahvede klorojenik asit laktonlarının HPLC analizini yapmışlardır. Geliştirdikleri yöntemde Hypersil C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm) kolon kullanıldı. Mobil faz için %2 asetik asit çözeltisi (çözücü A) ve metanol (çözücü B) oluşan bir gradyan yöntem ile analiz yapıldı. 1 ml/dk akış hızında, UV-dedektör 190-390 nm, kolon sıcaklığı 25 °C'de çalışılmıştır [47].

Pedrosa ve ark, farklı ayçiçeği tohumlarında klorojenik asit ve türevlerinin HPLC yöntemi kullanarak analizini yapmışlardır. Geliştirdikleri yöntemde A Zorbax SB-C18 (boyutları 150 x 4.6 mm, partikül boyutu 5 µm) kolon kullanıldı. Mobil faz sistemi metanol / asetonitril / su / formik asitten (5:5:85:5) oluşan bir gradyan yöntem ile analiz yapıldı. Akış hızı 1 ml/dk'ya ayarlandı ve hacim 10 µL enjekte edildi. Dalga boyu 325 nm'ye ayarlandı. Kolon sıcaklığı 30 °C'de çalışılmıştır [48].

Yang ve ark, oral doz Flos Lonicerae (Japon Hanımeli) ekstraktından sonra tavşan plazmasında klorojenik asidin HPLC tayinini yapmışlardır. Plazma örnekleri metanol ile ekstrakte edildi. Ekstrelerin HPLC analizi, mobil faz sistemi ACN - %0.2 fosfat tamponu (11:89) kullanılarak bir C18 ters fazlı kolon üzerinde gerçekleştirilmiştir. UV detektörü 327 nm'ye ayarlanmıştır. Standart eğriler 0,0500–1,00 µg/mL aralığında doğrusaldır. Klorojenik asit için %85.1'lik ortalama ekstraksiyon geri kazanımı elde edilmiştir. Günler arası kesinlik %5,0 ile %7,5 arasında değişir ve gün içi kesinlik

%9,0'dan daha iyidir. Kantitasyon limiti 0,0500 µg/mL'dir. Flos Lonicerae (Japon Hanımeli) özü uygulandıktan sonra tavşanlarda farmakokinetik çalışmasına uygulanmıştır [49].

Dreher ve ark, ay çekirdeğinde klorojenik asit tayini için Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografik yöntem geliştirmişlerdir. . Geliştirdikleri yöntemde Bondapak C18 kolonu kullanıldı. Mobil faz için %35 metanol (çözücü A) ve %65 asetik asit (çözücü B) oluşan bir gradyan yöntem ile klorojenik asit analizini yapmışlardır. 1 ml/dk akış hızında, UV-dedektör 313nm' de analiz yapılmıştır. Kolon sıcaklığı 25 °C'de çalışılmıştır [50].

Vinson ve ark, ticari yeşil kahve ekstraktlarında toplam klorojenik asit tayini için HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri yöntemde Agilent Zorbax RX C-18 (boyutları 250 x 4.6 mm, partikül boyutu 5 µm) kolonu kullanıldı. Mobil faz için suda %0.1 formik asit; (çözücü A) ve asetonitril içinde %0.1 formik asit; (çözücü B) oluşan bir gradyan yöntem ile analiz yapılmıştır. Kolonun sıcaklık dereces 25 °C'de çalışılmıştır [51].

Zhang ve ark, Flos Chrysanthemi Indici fitilinde klorojenik asit kalite kontrolü için bir gradyan HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Ayırma mobil faz olarak asetonitril ve sulu %1.0 asetik asit karışımı kullanılarak bir gradyan elüsyonuyla bir Hypersil ODS kolonunda elde edilmiştir. Klorojenik asit için LOQ değerini 2 µg/ml ve LOD değerini 0.32 µg/ml buldular. Kalibrasyon aralığı 2-10 µg/ml- dir. Sonuçlar, geliştirilen HPLC yönteminin Çin tıbbi preparatları için bir kalite kontrol yöntemi olarak kolaylıkla kullanılabileceğini göstermektedir [52].

Wang ve ark, fermantasyon suyu, meyvelerde klorojenik asidin spektrofotometrik tayininin validasyonunu yapmışlardır. Maksimum UV-vis absorpsiyon dalga boyu, optimum koşullar altında (25 °C ve pH 7.0'da) 790 nm'de meydana gelmiştir. Kalibrasyon eğrisi 10 ila 800 µg/mL aralığındadır. Önerilen doğru, hızlı, hassas, düşük maliyetli ve yüksek verimli yöntem, fermantasyon suyu ve meyvelerinde (Mango) CGA'yı (Sıkıştırılmış Gaz Derneği) ölçmek için başarıyla kullanılmıştır [53].

Siddiqi ve ark, ultraviyole spektrofotometri tekniği ile klorojenik asidi hint fasulyesi posasının ve portakal posasının bir bileşeni olarak tanımlamışlar. Bitki materyallerinde az miktarda klorojenik asidin tanımlanmasını kolaylaştıran yeni bir

ekstraksiyon ve konsantrasyon prosedürü açıklanmıştır. Sonuçların önemi, klorojenik asidin bilinen alerjenik aktivitesi ile bağlantılı olarak tartışılmıştır [54].

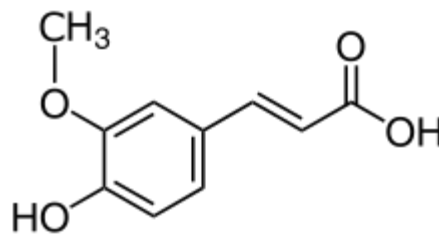
Chun ve ark, klorojenik asit açısından zengin eriklerin spektrofotometrik yöntemle toplam fenolik tahlilini yapmışlardır. Gallik asit ve (+)-kateşin, 20–100 mg/L aralığında en yüksek tepkiyi gösterdi, bunu tanik asit ve ardından nispeten çok düşük absorbans sergileyen klorojenik asit izledi. Klorojenik asit ve neoklorojenik asit, geniş bir absorbans aralığında hemen hemen aynı spektrumları sergiledi ve klorojenik asit, eriklerde önemli bir fenolik bileşik olduğu kanıtlanmış olan neoklorojenik asit yerine eşdeğer bir kimyasal için uygun olabilir. 13 erik çeşidinde klorojenik asit eşdeğeri ile ifade edilen ortalama toplam fenolikler 678,2 mg/100 g iken, gallik asit eşdeğeri olarak 368,7 mg/100 g olmuştur. Genel olarak, eşdeğer bir kimyasal olarak klorojenik asit, daha doğru toplam fenolik içeriği tahmin etmek için klorojenik asit açısından zengin eriklerin toplam fenolik içeriğini belirlemek için tavsiye edilmiştir [55].

Matic ve ark, toplam polifenol ve toplam flavonoid içeriğinin tayini için spektrofotometrik yöntemlerin validasyonunu yapmışlar. Klorojenik asit için LOQ değerini 6.19 µg/ml ve LOD değerini 2.04 µg/ml bulmuşlardır [56].

2.1.5. Ferulik Asidin Miktar Analiziyle İlgili Literatür Çalışması

Ferulik asit, (CH₃O)HOC₆H₃CH=CHCO₂H formülüne sahip bir hidroksisinnamik asittir (şekil 2-4). Ferula cinsinden türetilmiştir. Adı, dev rezene (Ferula communis) anlamına geliyor. Fenolik bir fitokimyasal olarak sınıflandırılıyor. Ferulik asit, amber renkli bir katıdır. Ferulik asit esterleri, hemiselüloza kovalent olarak bağlı olarak bitki hücre duvarlarında bulunur [57].

Ferulik asit arpa tanesinde, buğdayda, keten tohumunda bol miktarda bulunur.



Şekil 2-4: Ferulik Asidin Molekül Şekli

HPLC-UV Kromatografik Çalışmalar

Jong ve ark, çin tıbbi preparatları üzerinde HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Bu çalışmanın amacı çin tıbbi preparatlarında kalite kontrolü tayin etmektir. Shiau-feng-saan ve Dang-guei-nian-tong-tang preparatlarında beş işaretleyici bileşiği (matrin, oksimatrin, ferulik asit, mangiferin ve glisirizin) aynı anda tanımlamak ve ölçmek için LC/MS/MS yöntemi kullandılar. Geliştirdikleri yöntemde LUNA C 18 (150 x 2 mm, 5 µm) kolon kullanıldı. Mobil faz için %0,005 trifloroasetik asit tamponu (pH 3) ve asetonitrilden (çözücü B) oluşan bir gradyan yöntem ile ferulik asidin analizini yapmışlardır. Akış hızı 200 µL /dak , hacim 5 µL enjekte edildi. Beş işaretleyici bileşik için kalibrasyon eğrileri, 50–2500 ng/mL konsantrasyon aralığında doğrusaldı. Ferulik asit için LOD değerini 20 ng/ml buldular [58].

Waterstraat ve ark, sütte ferulik asit tayinini yapmak için LC-MS/MS yöntemini geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri yöntemde Phenomenex, Kinetex, (150 × 4,6 mm, 2,6 µm,) kolon kullanıldı. Mobil faz için suda %0.1 formik asit; (çözücü A) ve metanol içinde %0.1 formik asit; (çözücü B) asetonitril içinde %0.1 formik asit; (çözücü C) oluşan bir gradyan yöntem ile analiz yapılmıştır. Akış hızı 1 ml/dk'ya ayarlandı . . Ferulik asit için LOQ değerini 0.3 (µg/kg) ve LOD değerini 0.1 (µg/kg) buldular [59].

Zhang ve ark, sıçan plazmasındaki ferulik asit miktarının belirlenmesi için hızlı, hassas ve spesifik HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri yöntemde ACQUITY UPLC BEH C18 (50 × 2.1 mm, 1.7 µm,) kolon kullanıldı. Mobil faz olarak asetonitril-su kullanılarak 3,5 dakika içinde kromatografik ayırma sağlandı ve 0,2 ml/dak akış hızında çalışıldı. Enjeksiyon hacmi 5 µL, kolonun sıcaklık derecesi 35 °C'de çalışılmıştır. Ferulik asit için LOQ değerini 0.5 (ng/mL) ve LOD değerini 0.15 (ng/mL) buldular [60].

Lee ve ark, Palmul-tang'daki 11 ana bileşenin HPLC–DAD ve LC–MS-MS ile eşzamanlı tayinini yapmışlardır. Geleneksel bir bitkisel ilaç olan Palmul-tang, sekiz bitkiden oluşur. Ferulik asit 11 ana bileşen içerisinde önemli miktara sahiptir.

Geliştirdikleri yöntemde Atlantis C18 kolon kullanıldı. Mobil faz su ve asetonitrilden oluşuyordu. Enjeksiyon hacmi 20 µL olarak ayarlandı. Ferulik asit için LOQ değerini 0.16 (µg /mL) ve LOD değerini 0.05 (µg /mL) buldular [61].

Nichitoi ve ark, propolis ekstraktındaki polifenollerin tanımlanması için bir LC-MS/MS yöntemini geliştirmişlerdir. Bu çalışmanın amacı, Romanya propolisinde bulunan en yaygın polifenollerini belirlemek ve çeşitli hidroalkolik ekstraktlardaki seviyelerini ölçmektir. Metot geliştirirken 5 uL enjeksiyon hacmi ile bir Synergi C18 (50 x 2 mm, partikül boyutu 4 µm) kolon kullanılmıştır. Mobil faz (A) formik asit (%0.5) ve (B) metanoldan oluşuyordu. Tüm analitler için 0,08–5 µg/mL konsantrasyon aralığı için kalibrasyon eğrileri elde edildi. Ferulik asit için LOQ ve LOD sırasıyla 0,03 ve 0,01 µg /mL buldular [62].

Andreasen ve ark, Danimarka'da bir lokasyonda yetiştirilen 17 çavdar (*Secale graine L.*) çeşidinin çekirdeklerinde alkalın hidrolizden sonra HPLC analizi ile fenolik asitlerin ve ferulik asitin analizini yapmışlardır. Geliştirdikleri yöntemde Hypersil (boyutları 150 x 4.6 mm, partikül boyutu 5 µm) C18 kolon kullanıldı. Mobil faz için su ve metanoldan oluşan bir gradyan yöntem ile ferulik asit analizini yapmışlardır. Akış hızı 1 ml/dk'ya ayarlandı ve hacim 20 µL enjekte edildi. Dalga boyu 280 nm'ye ayarlandı. Ferulik asitin konsantrasyonu 900 ile 1170 µg /g - kuru madde arasında değişmekte idi [63].

Li ve ark, Tavşan plazmasında danshensu, ferulik asit, kriptomanshinon ve tanshinon IIA'nın eş zamanlı tayini için seçici ve hassas bir ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik ayırma, %0,5 (v/v) buzlu asetik asit içeren metanol-sudan (20:80 ila 80:20, v/v) oluşan bir mobil faz kullanılarak, bir Agilent HC-C 18 kolonunda başarıyla gerçekleştirilmiştir. Akış hızı 1 ml/dk'ya ayarlandı. Ferulik asit için 0.03–50g/ml konsantrasyon aralığı için kalibrasyon eğrileri elde edildi. Ferulik asit için LOQ değerini 0.03 (µg /mL) ve LOD değerini 0.01 (µg /mL) buldular [64].

Aarabi ve ark, şeker pancarı küspesinden alkalın hidroliz ve organik çözücü yöntemleri ile ferulik asit ekstraksiyonunu yapmışlardır. Ferulik asit HPLC yöntemi ile miktarı belirlendi. Geliştirdikleri yöntemde Zorbax C18 (boyutları 150 m x 4.6 mm, partikül boyutu 5 µm) kolon kullanıldı. (%1 Asetik asit) ve metanoldan oluşan mobil

fazlı bir gradyan yöntem ile analiz yapılmıştır. 1 ml/dk akış hızında , UV-dedektör 320 nm-de çalışılmıştır [65].

Proestos ve ark, bitki ekstraktlarının fenolik bileşiklerinin HPLC analizini yapmışlardır. En bol bulunan fenolik asit ferulik asit olmuştur. Geliştirdikleri yöntemde Waters Spherisorb ODS2 kolon kullanıldı. Su (%1 Asetik asit) (çözücü A) , su (%6 Asetik asit) (çözücü B) ve su/asetonitril (%5 Asetik asit) (çözücü C) oluşan mobil fazlı bir gradyan yöntem ile analizi yapmışlardır. 0, 5 ml/dk akış hızında ve hacim 20 µL enjekte edildi. Dalga boyu 280 nm'ye ayarlandı. Ekstraktların seçilen mikroplara karşı antimikrobiyal aktivitesi de bu çalışmada yapılmıştır [66].

Jankovska ve ark, ters fazlı yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile şeker pancarı küspesindeki ferulik asitin miktar tayinini yapmışlardır. Geliştirdikleri yöntemde Separon SGX C18 kolon kullanıldı. Mobil faz için sitrat tamponu ve metanol (88:12, V/V) kullanıldı. 1 ml/dk akış hızında 310 nm dalga boyunda çalışılmıştır [67].

Tian ve ark, UV-Vis spektrofotometri kullanılarak tam buğdayda toplam fenoliklerin ve ferulik asidin hızlı ölçümünü yapmışlardır. Amaç, tam buğdayda toplam fenolik içeriğin ve ferulik asit miktarının hızlı, basitleştirilmiş ve doğru bir şekilde belirlenmesi için ekstraktın UV-Vis spektrumlarına dayalı çok değişkenli bir regresyon modeli geliştirmektir. Bildiğimiz kadarıyla bu, ferulik asidi hızlı bir şekilde belirleyebilen bildirilen ilk regresyon modelidir. Yetiştirme veya tarama programlarında buğday fenoliklerine odaklanan tarama verimliliği, örneğin HEALTHGRAIN programında olduğu gibi bu tekniğin gerçekleştirilmesiyle önemli ölçüde artırılabacaktır [68].

Jadhav ve ark, ferula asafoetida (Şeytintersi) kaynaklı ferulik asidin kantitatif tahmini için Folin-ciocalteu'nun %15 sodyum karbonat içindeki reaktif aracılığıyla basit, hassas ve tekrarlanabilir bir spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir . Reaksiyondan sonra bu şekilde oluşan mavi renkli kromojen, kör reaktifte karşı ferulik asit için maksimum absorpsiyon 718 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Kromojen, 1 ug/ml-8 ug/ml aralığında doğrusallığa uydu. Yöntem, doğrusallık, kesinlik, doğruluk, tespit limiti ve ölçüm limiti gibi çeşitli parametreler incelenerek ICH yönergelerine göre daha da doğrulanmıştır [69].

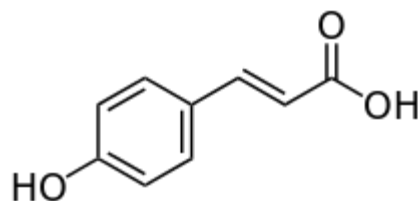
Divakaran ve ark, Spektrofotometri ve Yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile seçilen bitki materyallerinden ferulik asidin miktar tayinini yapmışlardır. Ferulik asit, bitki hücre duvarında bol miktarda bulunan bir fitofenolik bileşiktir. Ferulik asit antikanser, antioksidan ve yaşlanma karşıtı özelliklere sahiptir. Pirinç kepeği, buğday kepeği ve bambu filizi gibi seçilmiş bitki materyallerinden ferulik asidin kantitatif tahmini için basit, hassas ve tekrarlanabilir bir spektrofotometrik yöntem geliştirilmiştir. Reaksiyondan sonra elde edilen mavi renkli kromojen, kör reaktife karşı ferulik asit için 718 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Kromojen, 1 ug/ml – 8 ug/ml aralığında doğrusallığa uydu. Seçilen bitki materyallerinden ferulik asit tayini için bir HPLC yöntemi de geliştirilmiştir [70].

Özyurt ve ark, gıdaların toplam antioksidan kapasitesini (TAC) ölçmek için Spektroflorometrik Yöntem geliştirmişlerdir. Yöntem, asidik sülfat ortamında yapılmıştır. Floresan ürünü Ce(III), 256 nm'lik bir uyarma dalga boyu ile 360 nm'de güçlü floresan sergilemiştir. Çoğu antioksidan için doğrusal konsantrasyon aralığı oldukça geniştir. Geliştirilen prosedür trolox, quersetin, gallik asit, askorbik asit, kateşin, naringin, naringenin, kafeik asit, ferulik asit, glutatyon ve sistein gibi antioksidan bileşiklerin TAC tayinine başarıyla uygulanmıştır. Önerilen yöntem tekrarlanabilirdi, karmaşık karışımların bileşenlerinin TAC değerleri açısından katkılıydı [71].

2.1.6. P-kumarik Asidin Miktar Analiziyle İlgili Literatür Çalışması

P -Kumarik asit , $\text{HOOC-CH=CH-C}_6\text{H}_4\text{-OH}$ formülüne sahip bir hidroksisinnamik asittir (şekil 2-5). Hidroksisinnamik asidin üç izomerinden biridir. Suda çok az çözünüyor. Diethyl eterde ve etanolde çok çözünen beyaz renkli bir katıdır.

P -Kumarik asit sarımsak, fesleğen, havuç, domates, barbunya, yer fıstığı gibi çok çeşitli yenilebilir bitki ve mantarlarda bulunabilir .





Şekil 2-5:P-kumarik Asidin Molekül Şekli

HPLC-UV Kromotografik Çalışmalar

Kim ve ark, HPLC-DAD tekniği kullanarak, insan plazmasında p -kumarik asidin analizini yapmışlardır. Geliştirdikleri yöntemde HECTOR-A C18 (boyutları 2.1 x 50 mm, partikül boyutu 3 µm) kolon kullanıldı. Analiti endojen bileşenlerden ayırmak için bir gradyan oranında %0.1-lik formik asit (A) ve asetonitril (B) içeren mobil faz hazırlanmıştır. Akış hızı 250 uL/dak'ya ayarlandı ve hacim 5 µL enjekte edildi. Yönteme göre P-kumarik asit için LOQ değeri 0.2 ng/ml olarak belirlendi, kalibrasyon aralığı 0.2-16 ng/mL'dir [72].

Sharma ve ark, fare plazmasında doğal olarak oluşan para kumarik asidin bir türeviden IS01957'nin belirlenmesi için HPLC-DAD tekniği kullanarak miktar tayinini yapmışlardır. Geliştirdikleri yöntemde RP-18e (50×4.6 mm) kolon kullanıldı. Analiti endojen bileşenlerden ayırmak için bir gradyan oranında %0.1-lik formik asit (A) ve asetonitril (B) içeren mobil faz hazırlandı. Akışın hızı 0.3-0.5 mL/dak'ya ayarlandı. Yönteme göre P-kumarik asit için LOQ değerini 5 ng/ml ve LOD değerini 2 ng/ml buldular. Kalibrasyon aralığı 5-160 ng/ml aralığındaydı. Yöntem Gıda ve İlaç İdaresi kılavuzlarına göre doğrulanmıştır [73].

Ou ve ark, şeker kamışı küspesinden kumarik asit üretimi yapmak için LC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Şeker ve alkol endüstrilerinin bir atık yan ürünü olan şeker kamışı küspesi büyük miktarlarda üretilir ve dünya genelinde yılda yaklaşık 54 milyon ton küspe üretilir. Küспенin ana bileşenleri karbonhidratlar (%40–%45 selüloz ve %30–%35 hemiselüloz) ve lignindir. Küspe ayrıca kuru madde bazında sırasıyla %1.29 ve %1.76 oranında fenolik asitler, özellikle hemiselüloz ve lignine bağlı trans-ferulik asit ve kumarik asit içerir. Geliştirdikleri yöntemde Exsil ODS C18 (4.6×150mm, 5 µm) kolon kullanıldı. Mobil faz 1%asetik asit ve metanoldan oluşuyordu. Şeker kamışı küspesinin on hacim %1 NaOH (w/v) içinde 30 °C'de 4 saat süreyle süspanse edilmesiyle şeker kamışı küspesinin ıslatılması, bağlı fenolik asitler arasında temel olarak p -kumarik asidi açığa çıkardı. p - kumarik asit, anyon değiştirme kromatografisi

ile saflaştırılabildi ve saflaştırılan numune, standart p -kumarik asit ile aynı antioksidan aktiviteyi göstermiştir [74].

Neo ve ark, HPLC-DAD tekniği kullanarak palmye yağı (*E. guineensis*) meyve özlerinin fenolik asit analizini ve miktar tayinini yapmışlardır. Geliştirdikleri yöntemde Zorbax C18 (150 mm x 4.6 mm, 5 µm) kolon kullanıldı. Mobil faz su ve metanoldan (82:18 v/v) oluşuyordu. Akış hızı 1 ml/dk'ya ayarlandı ve hacim 5 µL enjekte edildi. Tüm analitler için (0.01, 0.03, 0.05, 0.1, 0.15, and 0.2 mg/mL) konsantrasyon aralığında kalibrasyon eğrileri elde edildi. P-kumarik asit için LOQ değerini 0.037 mg/mL ve LOD değerini 0.012 mg/mL buldular [75].

Cui ve ark, dondurularak kurutulmuş kırmızı şarabın ağızdan uygulanmasından sonra sıçan plazmasında p -kumarik asitin HPLC-DAD tekniği kullanarak tayinini yapmışlardır. 0.5 % asetik asitten ve metanoldan oluşan mobil fazla çalıştılar. 0,8 ml/dk akış hızı ve hacim 10 µL enjekte edildi. Kumarik asit için 0.01, 0.02, 0.04, 0.1, 0.2, 1, 5, and 15 µg/mL konsantrasyon aralığında olan kalibrasyon eğrileri elde edildi. P-kumarik asit için LOQ değerini 0.01 µg /mL ve LOD değerini 0.002 µg /mL buldular [76].

Karthikeyan ve ark, durva otu metanolik ekstraktından P-Kumarik Asidin HPLC yöntemile miktar tayinini yapmışlardır. Kromatografik ayrımlar için, RP-C 18 kolonu (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), Shimadzu LC-20AT Prominence sıvı kromatografisi ve su : metanol : buzlu asetik asitten (65 : 34 : 1 v/v) oluşan bir mobil faz kullanılmıştır. Akış hızı 1.0 mL/dk idi ve kolon atıklarının analizleri 310 nm'de UV-görünür detektör kullanılarak yapılmıştır. P-kumarik asidin alıkonma süresi 6.617 dakika olarak bulunmuştur. Bu yöntem, 2–10 µg/mL konsantrasyon aralığında doğrusallığa uydu. P-kumarik asit için LOQ değerini 0.99 µg /mL ve LOD değerini 0.302 µg /mL buldular. RP-HPLC yöntemi, ICH yönergelerine uygun olarak valide edilmiştir [77].

Saad ve ark, HPLC yöntemi kullanarak ananas (*Ananas comosus*) ekstraktlarında p-kumarik asitin miktarı tayinini yapmışlardır. P -Kumarik asit, antioksidan, antimikrobiyal, antimitojenik ve immün düzenleyici aktivitelere sahip olduğu bilinen bir hidroksisinnamik asittir. Bu çalışma, gradyan modlu HPLC ile meyve suyu ekstraktındaki ve olgunlaşmamış ve olgun ananasların metanol ekstraktındaki p -kumarik asidi ve miktarını belirlemeyi amaçlamaktadır. Kromatografiyle ayırma, 0,8

mL/dk akış hızında C 18 kolonu kullanılarak , tespit 280 nm dalga boyunda yapılmıştır. P -Kumarik asit, 16.16 dakikalık alıkonma süresinde belirlendi. P-kumarik asit için LOQ değerini 0.208 µg /mL ve LOD değerini 0.694 µg /mL buldular. Gradyan modlu RP-HPLC'nin, ananas ekstraktlarında p-kumarik asidin belirlenmesi ve miktarının belirlenmesinde etkili olduğu kanıtlanmıştır [78].

Hashizume ve ark, HPLC yöntemi kullanarak japon sake (pirinç ve tahıl tozundan yapılan ulusal içkidir) mayalama için pirinçte p -kumarik asitin miktar tayinini yapmışlardır. Geliştirdikleri yöntemde Capcell Pak C18 (150 × 4.6 mm, 5 µm) kolon kullanıldı. Mobil faz 0.1% fosforik asit /su ve asetonitrilden oluşuyordu. Akış hızı 1 ml/dk'ya ayarlandı ve hacim 20 µL enjekte edildi. Dalga boyu 320 nm'ye ayarlandı. Sonuçlar, sake'deki fenolik asit seviyelerinin, daha sonra sake'nin duyusal kalitesini etkileyebilecek olan pirinç tanelerinin içeriğindeki seviyelerden etkilendiğini göstermiştir [79].

Wen ve ark, bileşik bitkisel ilaçlarda fenolik asit tayini için HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Deneyde bir Agela XBP-C18 kolonu kullanıldı. 0.2% TFA içeren su ve 0.2 % TFA içeren metanoldan oluşan mobil faz kullanıldı. 0.5 ml/dk akış hızında ve hacim 10 µL enjekte edildi. . Dalga boyu 254, 275, 305, 320 nm'ye ayarlandı. P-kumarik asit için LOD değerini 0.006 mg /L buldular.Doğrusal aralık 0.048–48 mg/L aralığındaydı [80].

Dhamole ve ark, tarımsal kalıntılardan (mısır koçanı, şeker kamışı küspesi, sorgum sapı, inci darı sapı, yeşil gram kabuğu, yer fıstığı kabuğu, susam kabuğu) HPLC yöntemi kullanarak p-kumarik asidin miktar tayinini yapmışlardır. Geliştirdikleri yöntemde C18 (boyutları 250 × 4,6 mm, partikül boyutu 0,5 µm) kolon , mobil faz olarak 80 % su (1 % asetik asit) ve 20 % asetonitril kullanılmıştır. 1 ml/dk akış hızında ve 320 nm dalga boyunda çalışılmıştır [81].

Garcia ve ark, karışımlarda p-kumarik asidi kantitatif olarak belirlemek için bir türev spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. p-kumarik için sırasıyla 20 ng/ml'lik saptama limiti ve %0,63 'lük RSD bulundu. Dalga boyu 332 nm'ye ayarlandı. P-kumarik asit için LOQ değerini 0.05 µg /mL ve LOD değerini 0.02 µg /mL buldular [82].

Yu ve ark, yulaf kabuğunun karmaşık hücre duvarlarında bulunan p-kumarik asidi tayin etmek için spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Dalga boyu 332 nm'ye ayarlanmıştır [83].

2.2.KROMOTOGRAFI

Kromatografi 1906 yılında Mikhail Tswett isimli, aslen rus olan botanikçi tarafından klorofil (bitki pigmenti) ayrılmasında kullanılmıştır. O günden itibaren hala kullanılmaya devam edilmektedir [84].

Terim olarak yunancadan “renk yazımı” (“khamoma” renk ,“graphe” yazı) anlamına gelmektedir [84].

Ölçüm, ayırıştırma ve saflaştırma gibi değişik maksadlar için kullanılan kromatografi tıbbi laboratuvardan, gıdadan , veterinerlik, ilaç sanayisine, kimya, sanayi dallarının bir çok çeşitleri olmakla çok büyük bir alanı kaplıyor. Kromatografinin en geniş yayılmışları ise yüksek performanslı Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometri (LC-MS/MS) ve sıvı kromatografisi (HPLC) cihazlarıdır. Kromatografi maddeleri saflaştırmak ve karışımı oluşturan bileşikleri birbirinden ayırmak için kullanılmaktadır. Kromatografinin başlıca amacı numune ayrımı yapıldıktan sonra miktarının ölçülmesine dayanır [84].

2.2.1.KROMOTOGRAFI DE BİLİNMESİ GEREKEN TERİMLER

Mobil faz: Çeşitli kimyasal ve fiziksel özelliklere sahip olan, numuneyi, sabit faz (kolon) boyunca taşıyan, çözücü karışımlarıdır. Kullanılacak olan mobil fazı seçerken, kullanılacak sabit fazın özellikleri, dedektörün ,analizi yapılacak numunenin bileşenlerinin özellikleri çok dikkata alınmalıdır.

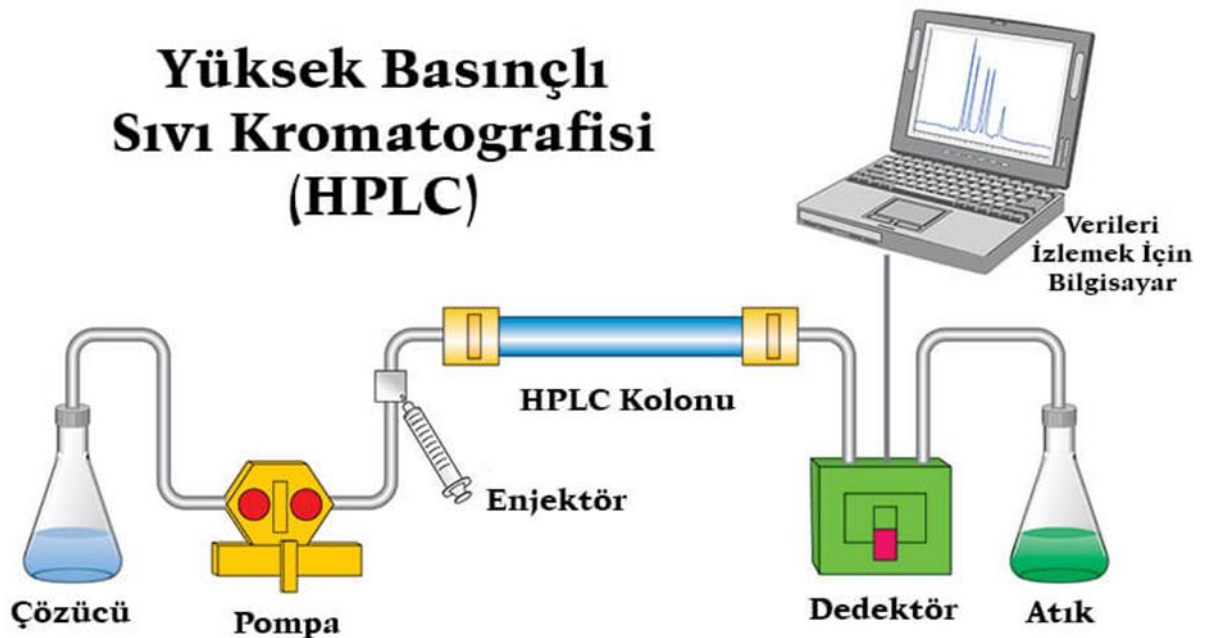
Sabit faz: Analizi yapılacak maddenin (mobil faz içerisinde hareket eden) alıkonuldukları ,etkileşime girdikleri fazdır. Kolon olarakda isimlendirilir.Günümüzde çok fazla kolon imalatı yapıyor, bunlarında hepsi farklı materyellerden hazırlanmış, farklı boyut ve markada oluyor.

Alıkonma: Mobil faz içerisinde hareket eden maddenin kolonda etkileşime girerek tutulması, yavaşlatılması ve kolondan daha geç çıkması olayıdır [84].

Kromatografinin çeşitli tipleri mevcuttur. Bunlar hareketli faza göre değerlendirilirse; Sıvı, gaz, süper kritik akışkan kromatografi olarak ayırt edilir [85].

2.2.2. YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC)

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), mobil faz olarak kullanılabilen bir sıvı içinde çözünürlüğe sahip herhangi bir bileşiğe uygulanabilen çok yönlülük ve analitik güce sahip kromatografik bir tekniktir. HPLC, küçük molekülleri ve iyonları ölçmek ve makromolekülleri ayırmak ve saflaştırmak için gıda analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu bölüm, HPLC sistem bileşenlerinin her biri için ayrıntıları ve çeşitli seçenekleri açıklar: pompa, enjektör, sütun, dedektör ve veri sistemi. Çok çeşitli kolon paketlenme malzemeleri, HPLC'nin yaygın kullanımına büyük ölçüde katkıda bulunmuştur. Bu bölüm, normal faz, ters faz, hidrofobik etkileşim, iyon değişimi, boyut dışlama ve afinite kromatografisi ile elde edilen ayırmalar için ayrıntıları ve örnek uygulamaları içerir [86].



Şekil 2-6: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Sistemi (HPLC)

2.2.2.1.HPLC Cihazı Hakkında bilgiler:

HPLC cihazı 8 bölümden oluşmaktadır; Mobil faz (çözücü) şişeleri, pompa ,degasser, kolon fırını,enjektör, dedektör,kolon,kaydedici.Bu bölümlerden bazıları çalışılacak cihazın model,markasına ve numuneye göre farklılık gösterebilir [84].

2.2.2.1.1.Mobil faz (çözücü) şişeleri:

Genellikle bir HPLC cihazında bir ve ya daha fazla olabilir.Bunların camdan ve ya paslanmaz çelikden olması ,kaliteli olması çalışmada kullanılabilmek için önemlidir. Çalışmada kullanılacak olan çözeltilerin de saf olması kolonu yanlış etkilemek açısından önemlidir [84].

2.2.2.1.2.Degasser:

Mobil faz içerisindeki gazların alınması maksadıyla kullanılan, hava kabarcıklarının olmasını önleyen bir sistemdir.Hava kabarcıkları olarsa kolon ve pompada sorunlara sebep olabilmektedir. Örnek olarak, kolonda kabarcık oluşması RT'nın kaymasına ya da pik genişlemesine sebep olabillir [84].

2.2.2.1.3.Pompa:

HPLC sisteminin en önemli bölümlerinden biridir. Sistemde;faz ve numunemizin, kolon,dedektör,enjektör boyunca devamlı sabit akışını sağlayan kısımdır. Pompa sıvının sistem içerisinde dolaşımını sağlamakla görevlidir. Bir pompa sisteminde bulunması gereken temel özellikler, basınç dalgalanmasının düşük olması,yüksek basınç altında çalışabilmesi,tekrarlanabilirliği ve akış doğruluğu kendi üzerinden kumanda edilebilme olanağıdır [84].

2.2.2.1.4.Enjektör:

HPLC sisteminin bir bölümü olup, numunenin kolon öncesinde mobil faza enjekte edilmesidir..Enjektörlerin 2 tipi mevcuttur,bunlardan biri bilgisayar kumandalı oto-enjektör diğeri ise elle kumanda edilen manuel enjektörlerdir.Günümüzde Oto-enjektör ünitelerinde ısıtma,soğutma,karıştırma ve seyreltme gibi özellikler de mevcuttur [84].

2.2.2.1.5.Kolon Fırını: Kolonun tutulduğu ortamın sabit bir ısıda olması çalışmanın kalitesi açısından gereklidir. Bu sebeple kolon fırını HPLC cihazları için oldukça

önemlidir. Kolon fırının blok ısıtıcılı ve hava sirkülasyonlu olmak üzere iki çeşidi vardır [84].

2.2.2.1.6.Kolon:

HPLC donanımının temel unsurlarından birisi olan kolon, kompleks örneklerde bileşenlerin birbirinden iyi çözünürlükle ayrılmasını sağlayan sabit fazdır. Kolon iç yüzeyinde kullanılan materyalin fiziksel ve kimyasal özellikleri çok çeşitlidir ve materyalin seçiminde , analizi yapılacak örneğin bilinen fiziksel ve kimyasal özellikleri ve kullanılacak mobil fazın ve uygulanacak HPLC metodunun özellikleri dikkate alınmalıdır [84].

2.2.2.1.7.Dedektör:

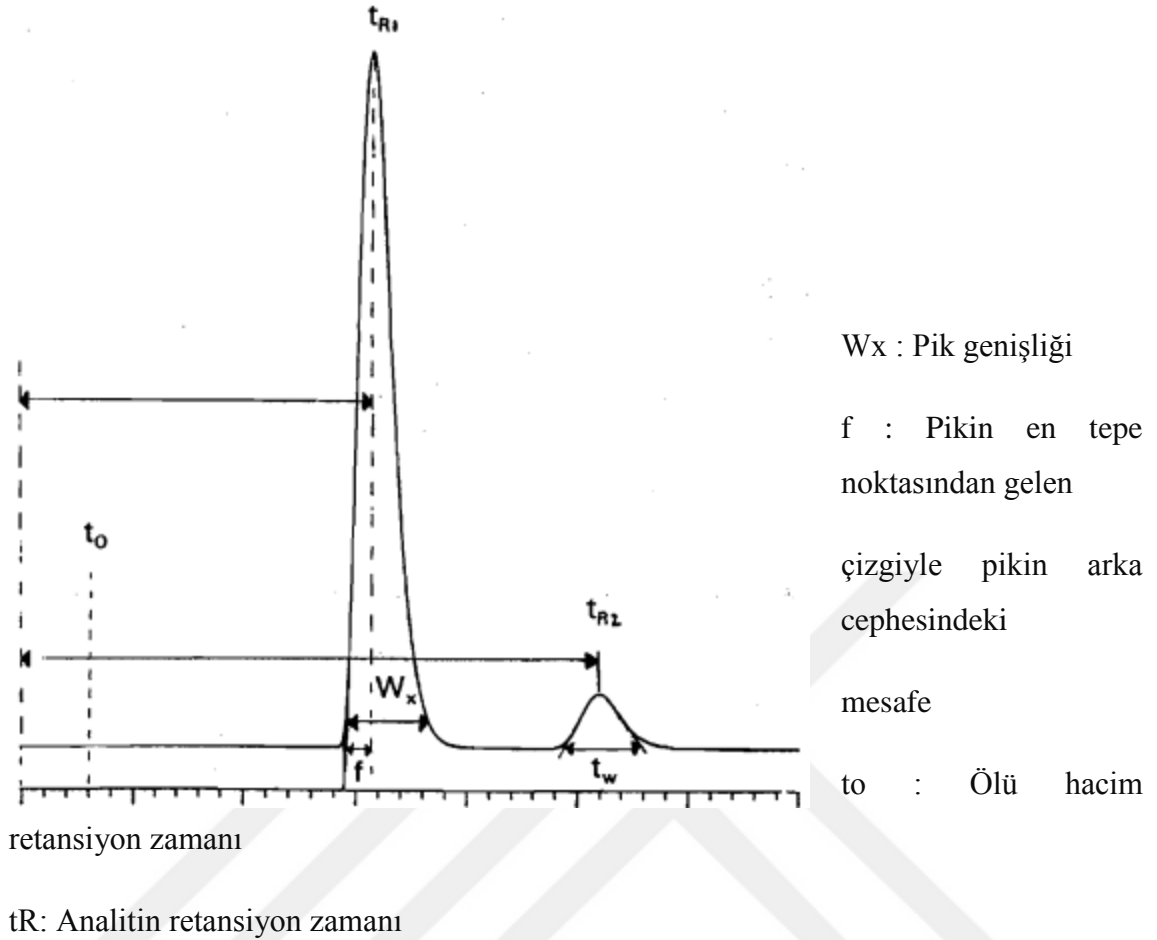
Kolondan çıkan bileşenlerin görülebilmesinde, bunların ayırım ve miktarlarının belirlenmesinde görev alır. Maddeler dedektörden geçiyi zaman kaydedici tarafından kaydedilip, zamana karşı dedektör yanıtına ait bir grafik oluştururlar ve oluşan bu grafiğe kromatogram deniliyor [84].

2.3.Sistem Uygunluk Testi

Düzenli geliştirilmiş bir kromatografik sistemle HPLC verilerinin doğruluğu ve kesinliği sağlanır. Bu amacı sonuca ulaştırmada sistem uygunluk testleri rehberlik edici ve analitik prosedürün olmazsa olmazıdır.

Sistem uygunluk testi laboratuvarlar tarafından genellikle tüm analitik sistemin (reaktif, cihaz, analist ve kolon dahil) istenilen uygulamaya uyum sağladığından emin olmak amacıyla kullanılır. Genel hedef , istikrarlı sistem performansı ve kromatografik uygunluktan emin olmak amacıyla kromatografik sonuçları gözlemlemektedir. Bu sebeple kuyruklanma faktörü, rezolüsyon ve kritik pik çiftlerinin kolon etkinliği test edilir; test standartlarının yeniden enjeksiyonu yapılır.

Sistem uygunluk testleri için elektronik, cihaz, analiz edilecek örnekler ve analitik işlemler ayrılmaz bir bütündür ve bu şekilde değerlendirilir [87].



Şekil 2-7: Kromatogram üzerinden sistem uygunluk terimlerinin gösterimi

Sistem uygunluk parametrelerinden aşağıda kısaca bilgi verilmektedir. [88];

Kapasite faktörü (k'); maddenin alıkonma zamanının kolonda tutunamayan maddelerin alıkonma zamanına oranıdır. Analitin kolonla olan etkileşiminin fazla olması kapasite faktörünün yüksek olması ile alakalıdır ve ya eksine.

$$k' = (t_R - t_0) / t_0$$

Seçicilik Faktörü (α); 1'den büyük olmalıdır. İki pikin bağlı lokasyonunun ölçümüdür. α değeri ne kadar yüksek olursa ayırma o kadar iyi olur.

$$\alpha = k'_1 / k'_2$$

Enjeksiyon Tekrarlanabilirliği; RSD (bağıl standart sapma) olarak gösterilir. Standartın analizi yapıldığı zaman kolonun, pompanın, ve çevresel şartların,pompanın,kolonun etkilediği Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi performansıdır.

Kuyruklanma (T); Kantifikasyon doğruluğu pik kuyruklanması ile orantılı olarak değişiyor.Kuyruklanma arttıkça kantifikasyon azalır. Çünkü integrator, pik altı alanının hesaplanmasında, pikin nerde bittiğini belirlemede zorluk yaşar.

$$T = W_x / 2f$$

Rezolüsyon (RS); İki pikin ne kadar iyi ayrıldığını gösterir. İyi ayrılmış pikler güvenilir bir kantitatif ölçüm için önemlidir.

$$R_s = (t_{R2} - t_{R1}) / (1/2) (t_{W1} + t_{W2})$$

Teorik Plaka Sayısı (N); HPLC kolonunda pik dağılımının ölçümüdür. Mobil fazın akış hızı, kolonun partikül boyutu, pik pozisyonu, kolon sıcaklığı, mobil fazın viskozitesi ve analitin moleküler ağırlığıdır.

$$N = 16 (t_R / t_W)^2 = L / H$$

Sistem uygunluk parametreleri için kabul kriterleri belirlenmiştir.

Kapasite faktörü- $k' > 2$; enjeksiyon kesinliği $RSD < \%1$, $n \geq 5$; kuyruklanma faktörü $T \leq 2$; rezolüsyon $R_s > 2$; teorik plaka sayısı $N > 2000$

2.4.Validasyon

Validasyon bir cihazın, bir yöntemin veya bir ürünün, tanımlanmış parametreler ve gerekliliklerini saptamak amacıyla elde edilen sonuçları değerlendirebilmek için oluşturan işlemler topluluğu olarak tanımlanabilir [89].

Kromatografi, immünoanaliz ve kütle spektrometrisi gibi çeşitli fiziko-kimyasal ve biyolojik tekniklere dayanan biyoanalitik yöntemler, üretilen sonuçlara güven sağlamak için kullanımdan önce ve kullanım sırasında doğrulanmalıdır. Bir biyoanalitik yöntemin güvenilirliğini ve genel performansını değerlendirmek için temel kriterler şunlardır: ilaç ve analit stabilitesinin değerlendirilmesi, seçicilik, kantifikasyon ve saptama limitleri, doğruluk, kesinlik, doğrusallık ve geri kazanım. Bir yöntemin valide edilme derecesi, ileriye yönelik kullanımına, test edilecek numune sayısına ve verilerin konulduğu kullanıma bağlıdır [90].

Aşağıda validasyon parametrelerinden kısaca bahsedilmektedir [91];

Spesifiklik ve Seçicilik; Yöntemin seçiciliği, analit ile girişim yapabilen, analiti örnekte varlığı tespit edilmiş diğer bileşenlerden farklı olarak ölçmeye dayanır. Analitik yöntemlerin seçiciliği maddelerin doğru ve özgün belirlenebilmesi için çok önemlidir.

DOĞRULUK; Analitik bir yöntemin doğruluğu, bu yöntemle elde edilen test sonuçlarının gerçek değere yakınlığıdır. Buna bazen doğruluk denir. Doğruluğun, belirtilen aralığı kapsayan en az üç konsantrasyon seviyesi üzerinden en az dokuz belirleme kullanılarak belirlenmesi önerilir (3 konsantrasyon / 3, toplam analitik prosedürlerin her birini tekrarlar).

Doğrusallık; yöntemin, belirli bir aralıktaki analit konsantrasyonu ile orantılı olarak doğrudan veya iyi tanımlanmış bir matematiksel dönüşümle test sonuçlarını ortaya çıkarma yeteneğidir. Doğrusallık sinyal grafiğinin görsel olarak incelenmesiyle oluşturulmalıdır. Doğrusal bir ilişki olduğu görülüyorsa, test sonuçları uygun istatistiksel yöntemlerle oluşturulmalıdır. Regresyon çizgisinden elde edilen veriler doğrusallık derecesinin matematiksel tahminlerini sağlar. Regresyon çizgisinin korelasyon katsayısı, y kesişimi ve eğimi sunulmalıdır.

KESİNLİK; Analitik yöntemin doğruluğu, tekrarlanan bireysel analit ölçümlerinin yakınlığını tanımlar. Standart sapma ve bağıl standart sapma kesiniğin önemli faktörleridirki kesinlik bunlardan alınan sonuçlarla hesaplanır..

Tekrarlanabilirlik ;analitik prosedürün aynı ekipmanla aynı analisti kullanarak kısa bir süre boyunca bir laboratuarda kullanılmasını ifade eder.[3] Tekrarlanabilirlik, prosedür için belirtilen aralığı kapsayan en az dokuz belirleme kullanılarak değerlendirilmelidir (yani, her konsantrasyonun üç konsantrasyonu ve üç kopyası veya test konsantrasyonunun% 100'ünde en az altı belirleme kullanılarak).

Teşhis Sınırı (LOD); bir numunedeki bir analitin ölçülebilen değil tespit edilebilen en düşük konsantrasyonu olarak tanımlanır. Sinyal / gürültü oranının 3:1 olduğu nokta en düşük dedeksiyon limiti olarak kabul edilebilir. Aşağıdaki formülünden hesaplanabilir;

$$LOD= 3 \sigma/S$$

(σ : İnterseptin standart sapması, S: Eğim).

Tayin Sınırı (LOQ); analitik prosedürlerin belirtilen çalışma koşulları altında kabul edilebilir hassasiyet ve doğrulukla belirlenebilen bir numunedeki bir analitin en düşük konsantrasyonudur. Sinyal / gürültü oranının 10:1 olduğu nokta en düşük tayin limiti olarak kabul edilebilir. Aşağıdaki formülünden hesaplanabilir

$$LOQ= 10 \sigma/S$$

(σ : İnterseptin standart sapması, S: Eğim).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması 2020-2023 yılları arasında İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda ve İstanbul Üniversitesi İlaç Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde yapılmıştır.

3.1. Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler

3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

Validasyon çalışmaları ve metod geliştirme sırasında referans standart kullanılmıştır (Tablo 3-1).

Tablo 3-1: Referans standart

STANDART	KULLANIM AMACI
Sinarin	Analit
Kafeik Asit	Analit
Klorojenik Asit	Analit
Ferulik asit	Analit
P-kumarik asit	Analit

Validasyon çalışmaları sırasında ve metod geliştirme zamanı kullanılan kimyasallar Tablo 3-2'de belirtilmiştir

Tablo 3-2: Kimyasallar

KİMYASALLAR	MARKA
Metanol	Merck
Asetonitril (HPLC saflığında)	Merck
O- fosforik asit	Merck
Di Sodyum Hidrojen Fosfat	Merck
Ultra saf su	Elga Purelab Option Q

3.1.2.Çözeltiler

3.1.2.1.Mobil Faz Çözeltisi

Metanol/Asetonitril/Fosfat tamponu (Na_2HPO_4 ph =3.50) mobil faz olarak seçildi. Mobil faz süzme sisteminden süzülüp ultrasonik banyoda degaze edilerek sisteme vermeye hazır hale getirildi.

3.1.2.2.Standart karışım hazırlanması

5mg (sinarin, klorojenik asit, kafeik asit, ferulik asit,p-kumarik asit) tartıldıktan sonra 5 ml'lik balon jodede metanolda çözülerek hacmine tamamlandı ve ana stok hazırlandı. (1 mg/ml, STMİX).Standart karışım elde edildi.

10 $\mu\text{g/ml}$ ara stok hazırlamak için ana stok çözeltisinden 50 μl alınarak (5 ml'lik balon jodede metanolda çözülerek hacmine tamamlandı) (STMİX). Daha sonra 0.5-10 $\mu\text{g/mL}$ aralığında standart çözeltiler metanol ile hazırlandı. Kalibrasyon standartlarının ve kalite kontrol örneklerinin hazırlanışı Tablo 3-3 ve 3-4'de verilmiştir.

Tablo 3-3: STMİX için kalibrasyon standartlarının hazırlanışı

Standart Mix	Analit	Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Final Hacim
STMİX 1	STMİX	0,5	5 mL
STMİX2	STMİX	1	5 mL
STMİX 3	STMİX	2	5 mL
STMİX 4	STMİX	6	5 mL
STMİX 5	STMİX	8	5 mL
STMİX 6	STMİX	10	5 mL

Kalite kontrol örnekleri düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlarda seçilen noktalarda hazırlanmıştır (Tablo 3-4).

Tablo 3-4:STMİX kalite kontrol örneklerinin hazırlanışı

Standart adı	Analit	Konsantrasyon (µg/mL)	Final Hacim
KK1	STMİX	0.5	5 mL
KK2	STMİX	5	5 mL
KK3	STMİX	10	5 mL

3.2.Aletler ve Gereçler

Tablo 3-5' deki Thermo HPLC-UV sistemi cihazının parçalarıdır.

Tablo 3-5:Ekipmanlar

HPLC-UV Sistemi	Marka-Model
Oto örnekleyici	Thermo
Pompa	Thermo
Kolon Fırını	Thermo
Dedektör	Thermo
Analitik Kolon	Sepax BR
Yazılım	Chromquest

Validasyon çalışması sırasında kullanılan destek ekipmanlar Tablo 3-6' de belirtilmiştir.

Tablo 3-6:Destek ekipmanlar

Marka-Model	Destek Ekipmanlar
Ph metre	Mettler Toledo
Ultra saf su cihazı	Elga Purelab Option Q
Spektrofotometre	Shimadzu UV-160A
Ultrasonik banyo	Elma Ultrasonics LC 30H
Pipet Uçları	Eppendorf 100 Ml ve 1000 Ml
Analitik Terazî	Ohaus Explorer
Vorteks	Tetra
Otomatik pipetler	Eppendorf 10-100 Ml ve 100-1000Ml

Cam Malzemeler

Isolab markasına ait 5, 10, 25, 200 ml-lik balon jöjeler ve agilent markasına ait oto örnekleyici vialler kullanıldı.

3.3. Analizin Gerçekleştirilmesi

1. İlk başda Thermo HPLC sistemi bilgisayarı açılır.
2. Daha sonra HPLC kısımları sırasıyla açılır.
3. UV dedektör açıldıktan sonra bağlantı sağlanana kadar 4-5 dakika beklenir.
4. Ardından bilgisayarda çalışmakta olduğumuz Chromquest yazılımı açılır.
5. Sistemin A hattına saf su B hattına ise metanol yerleştirilir.
6. Daha sonra hangi hatları kullanıyorsak onlara purge işlemi uygulanır.
7. Kolon bir müddet hangi çözeltiyle saklı kaldıysa, ACN:Fosfat tamponu(ph=3.50) (20:80) (v/v) oran purgten geçirilerek tubinglerin bu oranla şartlanması beklenir. Ardından gradiyent akış 0,8 mL/dak olarak ayarlanır, purge kapatılır.
8. Sıra 0,8 mL/dk akış hızında kolonun şartlanmasındadır.
9. Yapılan analizin süresi 20 dakikadır.
10. Kolon sıcaklığı 25oC' de çalışıldı.
11. Enjekte edilen hacm 20 µL'dir.
12. UV-Dedektör dalga boyu (310,325,330) nm'dir.
13. Son olarak geliştirdiyimiz metot seçilir ve analiz başlatılır.

3.4. Analitlerin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC-UV) ile Yöntem Geliştirme

3.4.1. Dedektör Dalga Boyu Seçimi

Spektrofotometri yöntemiyle CYN 330 nm CA 326 nm, CLA 328 nm, FA 323 nm, PCA 310 nm max. absorbans yaptığı görülmüştür. Bunların orta noktası olan 3 dalga boyu 310,325,330 nm çalışma dalga boyu olarak seçilmiştir.

3.4.2. Mobil Faz Seçimi

Metod geliştirme çalışmaları sırasında farklı mobil faz bileşimleri ve oranları denenmiştir. Farklı pH larda, gradient ve izokratik elüsyon akış hızı tiplerinde denenmeler yapılmıştır. Tampon sistemlerinde başta Na₂HPO₄ olmak üzere KH₂PO₄, o-

fosforik asit (pH:2.50) tampon çözeltileri metot geliştirme çalışmaların da kullanılmıştır. Bu çalışmalarda formik asit çözeltileri de kullanılmıştır.

En uygun ayırımın gradiyent akış hızında ACN : Na₂HPO₄ (pH=3,50) (v/v) – 0. dakikada (20:80); 1. dakikada (20:80); 14. dakikada (25:75); 15. dakikada (20:80); 17. dakikada (20:80) hareketli fazı ile sağlandığı görülmüş ve tüm analizler bu metot üzerinden yapılmıştır.

3.4.3.Kolon Seçimi

4,6 x 250 mm boyutunda,5 µm partikül çaplı Sepax BR C18 kolonu seçilmiştir.

3.4.4.Kalibrasyon Eğrisinin Seçimi

Kalibrasyon eğrisi analitlerin 0,5-10 µg/ml aralığında uygun bulunup hazırlanmıştır.

3.5 Sistem Uygunluk Testi

Yüzde bağıl standart sapması (%RSD) ve enjeksiyon tekrarlanabilirliği hesaplandı ve bu sonuçlara göre cihazın ne kadar doğru çalışıp ya da çalışmaması kontrol edildi. Sistem uygunluk parametreleri formüle uygun olarak hesaplandı ve sonuçlar kabul olunan kriterlerle karşılaştırıldı.

3.6.Geliştirilen Yöntemin Validasyonu

İlaç uygulamaları için Uluslararası Harmonizasyon Konferansı (ICH, International Conference Harmonization) Q2 kılavuza göre validasyon yapıldı.

3.6.1.Spesifiklik ve Seçicilik

Mobil faz enjeksiyonu yapılarak yöntemin seçiciliyi tayin edildi. Kapsüllerle ,toz ekstraktlarıyla ve standartlarla yapılan enjeksiyonlar karşılaştırıldı.Buradan girişimin olup olmamasına bakıldı. En sonda pik saflığına bakıldı.

3.6.2.Doğrusallık

STMİX için 0,5 (STMİX.-1) ; 1,00 (STMİX.-2) ; 2,00 (STMİX.-3) ; 6,00 (STMİX.-4) ; 8,00 (STMİX-5) ; 10,00 (STMİX.-6) µg/mL konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlandı,analize verildi ve elde edilen sonuçlarla kalibrasyon eğrisi oluşturuldu.. Tüm maddelerin kalibrasyon eğrisi aynı konsantrasyonlarda çizildi. Korelasyon katsayısı elde edilen verilerden hesaplandı. Bununla yanaşı eğri denklemi ve eğimi de bulundu.

3.6.3.Doğruluk

Kalite kontrol numuneleri hazırlamak için tüm maddeler sırasıyla 0,5 (KK-1); 5,00 (KK-2); 10,00 (KK-3) µg/mL konsantrasyonlarda analize verildi. Bu konsantrasyon aralığı analitin en düşük ve en yüksek konsantrasyonunu içeriyor.Doğruluk analizden

elde edilen sonuçların yüzde ortalaması alınarak hesaplanır..Hesaplamaların LOQ için $\% \pm 20$, diğer noktalar için $\% \pm 15$ aralığında seri kabul edildi.

3.6.4.Kesinlik

Kalite kontrol numuneleri hazırlamak için tüm maddeler sırasıyla 0,5 (KK-1); 5,00 (KK-2); 10,00 (KK-3) $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarda analize verildi. Bu konsantrasyon aralığı analitin en düşük ve en yüksek konsantrasyonunu içeriyor. Standart sapma ve ortalama elde olunan sonuçlara göre hesaplandı. Bulunan sonuçlar formülde yerine konularak %CV (varyasyon katsayısı) hesaplandı. Hesaplamaların LOQ için $\% \pm 20$, diğer noktalar için $\% \pm 15$ aralığında seri kabul edildi.

3.6.5.Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)

LOQ ve LOD çalışmaları 5 maddenin karışım numuneleriyle yapıldı. LOQ için en düşük konsantrasyon olan 0,5 $\mu\text{g/mL}$ götürüldü.LOD ise formülden hesaplandı.

3.7.Kapsüllerde ve Enginar tozu ekstresinde Sinarinin Analizi

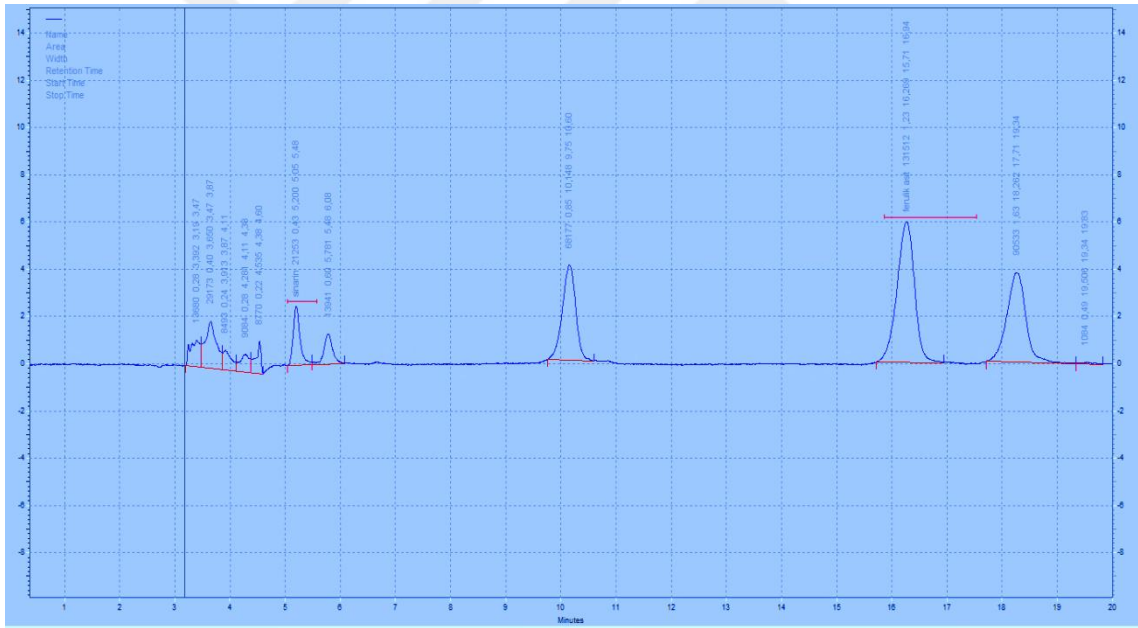
3.7.1. Kapsüllerin ve Kapsül Çözeltilerinin Hazırlanması

.İlk önce enginar ekstresi kapsülden 10 kapsül alındı.Kapsüller açılıp homojen karışım haline gelmesi için havanda dövüldü. Bu karışımdan 5 mg alınarak 5 ml'lik balon jodede metanol ile çözülerek hacme tamamlandı. Daha sonra 15 ml'lik tüplere konuldu ve vortekslendi. 15 dakika multirotorlarda çalkalandı. 10 dakika 3000 ppm ile santrifüjlendi. Dipte kalan çöküntünün üstündeki sıvı alınarak 5 ml'lik balon jodaye aktarıldı. Metanol ilave edilip vortekslendi. Daha sonra viallenerek analize verildi.Enginar ekstresi tozu içinde aynı işlemler yapıldı.

4.BULGULAR

4.1.Kromatografik Koşullar

Sinarin ve diğer bileşenleri ayırmak için kromatografik koşullar belirlenerek analize uygulanmıştır. 5 µm partikül çaplı 4,6x250 mm boyutunda Sepax BR C18 kolonda, mobil faz olarak ACN:Fosfat tamponu (pH:3.50) (20:80) (v/v), 25°C’de; 0,8 mL/dak akış hızında elde edilmektedir. Çalışma UV dedeksiyonla, üç dalga boyunda 310; 325; 330 nm dalgaboyu kullanılarak yapılmıştır. Bu kromatografik sistemde alıkonma zamanları klorojenik asit için 5,200; sinarin için 5,781; kafeik asit için 10,148; p-kumarik asit için 16,29; ferulik asit için 18,262 dakikadadır. Örnek kromatogram Şekil 3-1’de verilmiştir



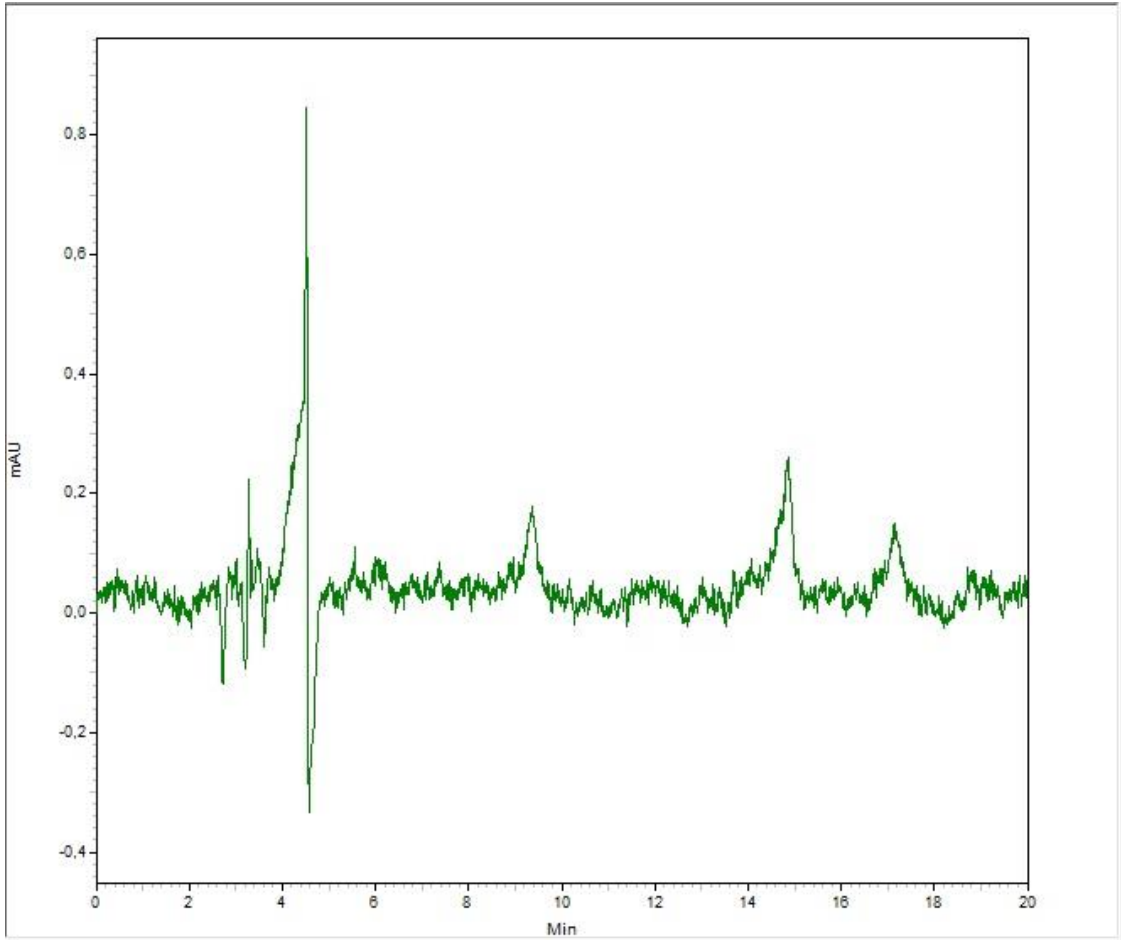
Şekil 3-1: Standart karışım enjeksiyonuna ait örnek kromatogramı;

Alıkonma zamanları: klorojenik asit - 5,200; sinarin - 5,781; kafeik asit - 10,148; p-kumarik asit - 16,29; ferulik asit - 18,262 dakika.

4.2.Yöntem Validasyonu

4.2.1. Seçicilik

Yöntemin seçiciliğini belirlemek için kullanılan çözücü (Metanol) ile girişim olup olmadığının kontrolü MeOH enjeksiyonu ile yapılmıştır. MeOH enjeksiyonuna ait kromatogram Şekil 3-2'deki gibidir.

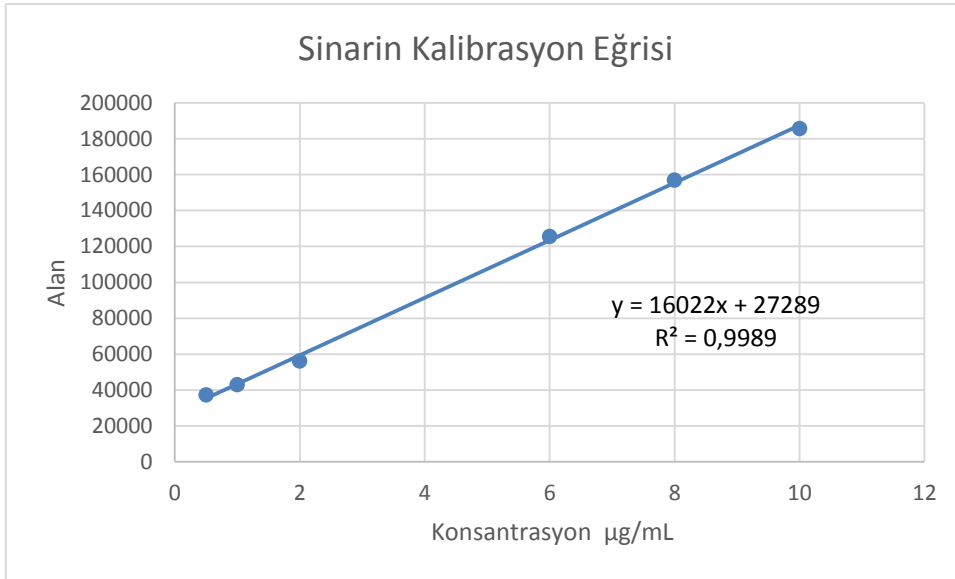


Şekil 3-2: Boş enjeksiyona ait örnek kromotogramı

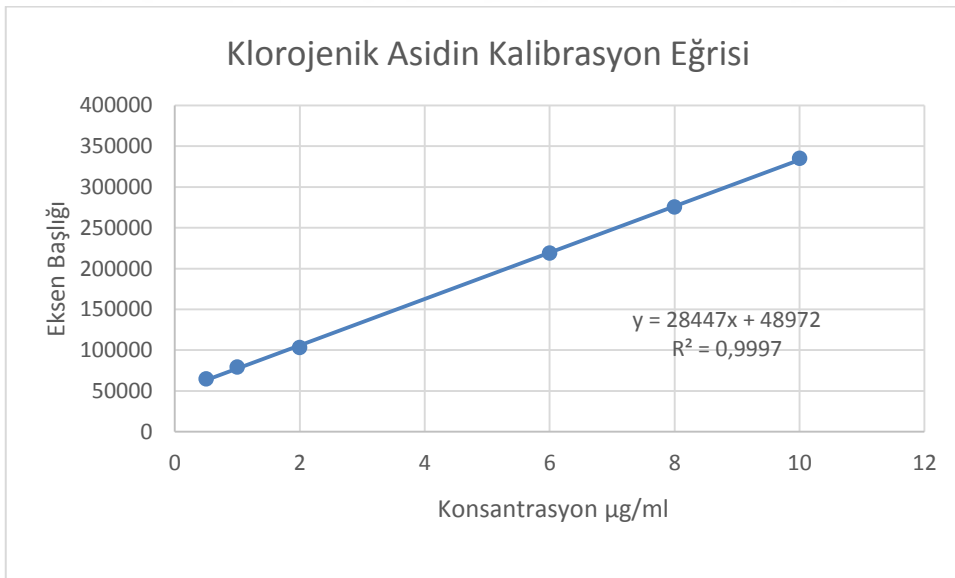
4.2.2.Doğrusallık

Hazırlanan kalibrasyon standartlarının analizi sonucunda elde edilen pik alanlarıyla konsantrasyon verileri grafiğe geçirildi ve kalibrasyon eğrisi çizildi. Kalibrasyon eğrileri korelasyon katsayıları sinarin için 0.9989 mertebesinde kabul edilebilir

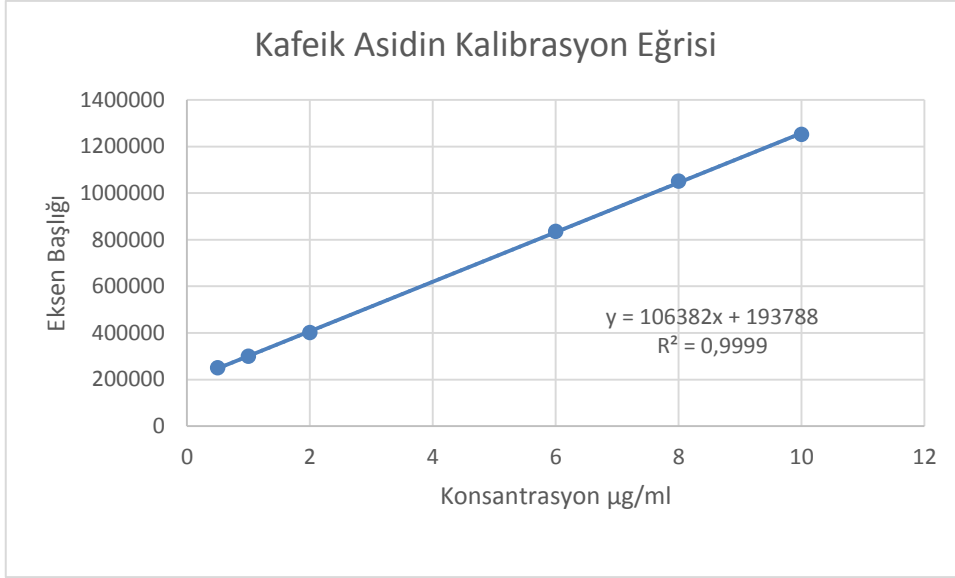
sınırlardadır. Tüm analitler için kalibrasyon eğrileri aşağıdaki şekillerde verildi (Şekil 3-3; 3-4; 3-5; 3-6; 3-7).



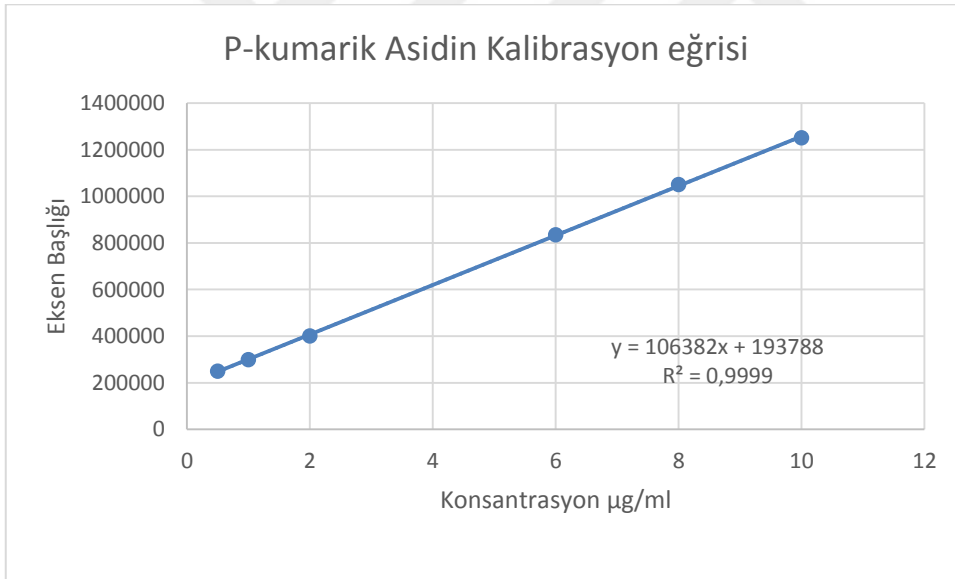
Şekil 3-3: Sinarinin 0,5-10,00 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan kalibrasyon eğrisi



Şekil 3-4: Klorojenik asidin 0,5-10,00 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan kalibrasyon eğrisi



Şekil 3-5: Kafeik asidin 0,5-10,00 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon aralığında hazırlanan kalibrasyon eğrisi



Şekil 3-6: P-kumarik asidin 0,5-10,00 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon aralığında hazırlanan kalibrasyon eğrisi



Şekil 3-7: Ferulik asidin 0,5-10,00 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan kalibrasyon eğrisi

4.2.3. Doğruluk ve Kesinlik

Düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlarda seçilen kalite kontrol örnekleri gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri hesaplandı (Tablo 4-1;-; 4-10). Yöntem ile elde edilen sonuçların gerçek değere yakınlığı kontrol edildi. Yöntemin kesinliği; herhangi bir değer için tekrarlanabilirliği veya bireysel test sonuçlarının belirlenen koşullar altında aynı örneklerin analiz sonuçlarının birbirine yakınlığı kontrol edildi. Bulunan değerlere göre yöntemin doğruluğu ve kesinliği uygun bulundu. Bu değerlerle yöntemin tekrarlanabilir olduğu da görülmektedir.

Tablo 4-1: Kalite Kontrol Örneklerinde Sinarinin Gün İçi Doğruluk ve Kesinlik Hesaplamaları

Numune	Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama	%Doğruluk	Sapma(SD)	%CV	n
KK1	0,5	0,58	116,01	0,52076	8,97	18
KK2	5	5,31	106,22	0,144624	2,72	18
KK3	10	10,08	100,83	0,32234	3,19	18

Tablo 4-2: Kalite Kontrol Örneklerinde Klorojenik Asit Gün İçi Doğruluk ve Kesinlik Hesaplamaları

Numune	Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama	%Doğruluk	Sapma(SD)	%CV	n
KK1	0,5	0,51	103,33	0,0711	13,76	18
KK2	5	5,21	104,20	0,1311	2,51	18
KK3	10	10,03	100,33	0,2123	2,11	18

Tablo 4-3: Kalite Kontrol Örneklerinde Kafeik Asit Gün İçi Doğruluk ve Kesinlik Hesaplamaları

Numune	Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama	%Doğruluk	Sapma(SD)	%CV	n
KK1	0,5	0,44	88,49	0,0453	10,24	18
KK2	5	5,06	101,22	0,0971	1,91	18
KK3	10	9,94	99,46	0,0838	0,84	18

Tablo 4-4: Kalite Kontrol Örneklerinde P-kumarik Asit Gün İçi Doğruluk ve Kesinlik Hesaplamaları

Numune	Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama	%Doğruluk	Sapma(SD)	%CV	n
KK1	0,5	0,41	82,57	0,0380	9,21	18
KK2	5	5,31	106,37	0,0628	1,18	18
KK3	10	10,09	100,97	0,2412	2,38	18

Tablo 4-5: Kalite Kontrol Örneklerinde Ferulik Asit Gün İçi Doğruluk ve Kesinlik Hesaplamaları

Numune	Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama	%Doğruluk	Sapma(SD)	%CV	n
KK1	0,5	0,52	105,37	0,0458	8,70	18
KK2	5	5,21	104,24	0,0851	1,63	18
KK3	10	9,98	99,84	0,1245	1,24	18

Tablo 4-6: Kalite Kontrol Örneklerinde Sinarinin Günler Arası Doğruluk ve Kesinlik Hesaplamaları

Numune	Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama	%Doğruluk	Sapma(SD)	%CV	n
KK1	0,5	0,58	116,01	0,0520	8,97	18
KK2	5	4,68	93,79	0,5338	11,38	18
KK3	10	10,42	104,22	0,4161	3,99	18

Tablo 4-7: Kalite Kontrol Örneklerinde Klorojenik Asit Günler Arası Doğruluk ve Kesinlik Hesaplamaları

Numune	Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama	%Doğruluk	Sapma(SD)	%CV	n
KK1	0,5	0,49	98,14	0,0356	7,26	18
KK2	5	4,84	98,84	0,4049	8,36	18
KK3	10	10,32	103,27	0,365	3,53	18

Tablo 4-8: Kalite Kontrol Örneklerinde Kafeik Asit Günler Arası Doğruluk ve Kesinlik Hesaplamaları

Numune	Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama	%Doğruluk	Sapma(SD)	%CV	n
KK1	0,5	0,45	90,45	0,0429	9,49	18
KK2	5	4,92	98,47	0,1707	3,46	18
KK3	10	10,28	102,82	0,4462	4,34	18

Tablo 4-9: Kalite Kontrol Örneklerinde P-kumarik Asit Günler Arası Doğruluk ve Kesinlik Hesaplamaları

Numune	Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama	%Doğruluk	Sapma(SD)	%CV	n
KK1	0,5	0,42	85,32	0,0198	4,65	18
KK2	5	5,09	101,86	0,2449	4,80	18
KK3	10	10,34	103,47	0,4231	4,08	18

Tablo 4-10: Kalite Kontrol Örneklerinde Ferulik Asit Günler Arası Doğruluk ve Kesinlik Hesaplamaları

Numune	Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama	%Doğruluk	Sapma(SD)	%CV	n
KK1	0,5	0,45	90,63	0,0229	5,05	18
KK2	5	5,12	102,43	0,1072	2,09	18
KK3	10	10,41	104,11	0,6375	6,12	18

4.2.4. SİSTEM UYGUNLUĞU

Tablo 4-11: Sistem uygunluğu parametreleri

Numune	Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama	%Doğruluk	Sapma(SD)	%CV	n
CYN	5	4,97	99,45	0,4574	9,19	6
CLA	5	5,09	101,96	0,1917	3,76	6
CA	5	5,18	103,68	0,1278	2,46	6
PCA	5	5,17	103,42	0,0638	1,23	6
FA	5	5,17	103,57	0,0638	1,23	6

4.2.5. Teşhis (LOD) ve Tayin (LOQ) Sınırları

Kalibrasyon eğrisinin ilk noktası LOQ değeri olarak alınır. Kalibrasyon eğrisinin en düşük standart konsantrasyonu olan 0,5 µg/ml LOQ değeridir. Bu değer gıda takviyesi örneklerinde analizler için yeterli en düşük değer olduğu ve bu değerden daha düşük konsantrasyonların gıda takviyesi özelliği olmayacağı için yeterli görülmüştür LOD değeri ise formülden hesaplanarak bulunmuştur. Teşhis (LOD) sırası ile sinarin için 0,08 µg/mL; klorojenik asit için 0,31 µg/mL; kafeik asit için 0,28 µg/mL; p-kumarik asit için 0,017 µg/mL; ferulik asit için 0,18 µg/mL'dir (Tablo 4-12).

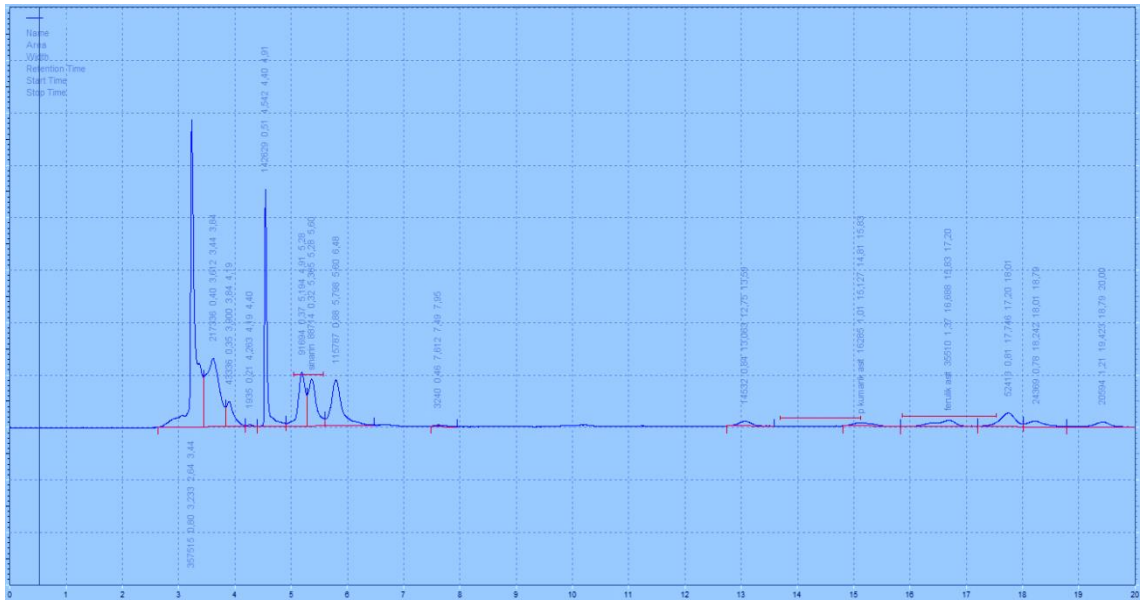
Tablo 4-12: Maddelerin LOD Değerleri

ANALİT	LOD değeri(µg/ml)
Sinarin	0,08
Klorojenik Asit	0,31
Kafeik Asit	0,28
P-kumarik Asit	0,017
Ferulik Asit	0,18

4.3. Tabletlerde Sinarinin Analizi

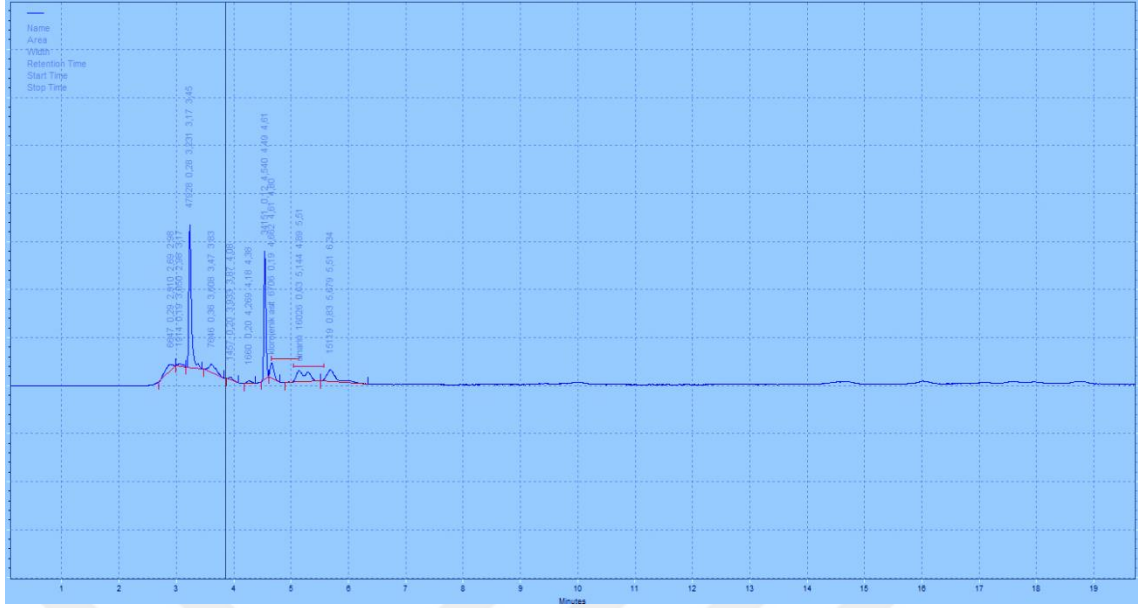
Piyasadan alınan enginar ekstresi içeren kapsül örneklerinde analizler yapıldı. 600 mg enginar ekstresi kapsülünün analizi yapıldığında 16,6 µg/ml sinarin ve 18,85 µg/ml klorojenik asit bulundu.

Gıda takviyesi ürünlerinin hazırlanmasında kullanılan Enginar ekstresi toz hammadde numunesi analizinde ise 2,17 µg/ml sinarin ve 1,51 µg/ml klorojenik asit bulundu. Kapsül ve enginar tozu ekstresi analiz sonuçlarına ait kromotogram Şekil 3-8'de ve 3-9'da gösterilmiştir.



Şekil 3-8: Kapsüldeki analizlere ait örnek kromotogramı;

Alıkonma zamanları: klorojenik asit – 5,365; sinarin – 5,798 dakika.



Şekil 3-9: Enginar tozu ekstresi analizlere ait örnek kromotogramı;

Alıkonma zamanları: klorojenik asit – 5,144; sinarin – 5,679 dakika.

5.TARTIŞMA

Bir insanın beslenmesini desteklemek üzere kullanılan ve amino asitler, mineraller, vitaminler, bitkiler gibi besin öğelerini içeren ürünler gıda takviyeleri olarak tanımlanmaktadır. Gıdaların insan sağlığına yararlı özellikleri (besinsel lif, antioksidan vb.) bilindiği için günümüzde gıda takviyelerinin kullanımı artmaktadır. Günümüzde, gıdaların işlevsel özellikleri (besinsel lif, antioksidan, aminoasit vb.) gıda takviyeleri sektöründe yeni ürünlerin gelişimine olanak sağlamakta ve bu takviyelere gereksinim duyan bireylerin ihtiyaçlarını gidermektedir. Gıda takviyelerinde en çok görülen sorunlar katkı maddeleri, kontaminasyon, yanlış doz, toksisite ve hatalı etiketlemedir. Son zamanlarda ülkemizde ve dünyada ilaç etkileşimlerinden kaynaklı yan etkilerin yanı sıra söz konusu ürünlerle ilgili zehirlenmeler görülmektedir. Gıda takviyeleri ilaç olarak değerlendirilmemeli fakat doğru şekilde tüketildiğinde ve doğru kişi tarafından yönlendirildiğinde bireyin sağlığını pozitif yönde etkilediği bilinmelidir [1]. Gıda takviyelerinde en önemli sorun ilgili etken maddelerin, takviye preparatlarda miktarlarının yetersiz olması veya stabilite çalışmalarının yapılmaması nedeniyle çabuk bozunmalarıdır. Bilindiği gibi Gıda takviyeleri Sağlık Bakanlığı kontrolünde değildir. Bu nedenle de ilaç olarak değerlendirilmezler. Gıda takviyeleri Tarım ve Orman Bakanlığı kontrolindedir.

Sinarin, bir hidrokşisinnamik asit türevi olup aynı zamanda enginarın (*Cynara cardunculus*) biyolojik, aktif kimyasal bileşenidir. Sinarin karaciğerde bulunan dokuları stimüle ederek safra salgısının artmasına yardımcı olmaktadır. Karaciğerde beslenme bozuklukları ve başka nedenlerden dolayı fazla kolesterol üretimini önleyen sinarin, karaciğerdeki fazla miktardaki kolesterolün vücuttan uzaklaştırılmasına da yardımcı olmaktadır [11]. Bu nedenle CYN analizleri önem kazanmaktadır. CYN, enginar yaprağı, dul avrat otu, ayçiçeği ve devedikeni gibi bitkilerde analizleri yapılmıştır [12-18]. CYN gıda takviyelerinde analizi ile ilgili literatür çalışmalarına rastlanmamıştır. Literatür araştırmalarında bitkiden analizlere rastlanmaktadır. Wang ve ark, Enginar (*Cynara scolymus* L.) antioksidatif fenolik bileşiklerin analizi için geliştirdikleri HPLC-UV yönteminde 1.24 µg/ml LOQ değeri saptanmıştır [21]. Geliştirdiğimiz yöntem ile CYN tayin miktarı 0.5 µg/ml dir.

Geliştirdiğimiz yöntemde sinarin ve diğer hidrokşisinnamik asitlerin en düşük tayin limiti 0.5 µg/ml kalibrasyon eğrisinin ilk noktası olarak alınmıştır. Bu LOQ değeri gıda takviyeleri ve bitkilerden analizler için yapılan literatür çalışmaları göz önüne alınarak yeterli olduğu anlaşılmaktadır.

Kafeik asit (CA), hidrokşisinnamik asit sınıfından olan organik bir bileşiktir. Klorojenik asit ise kafeik asit ve kinik asidin esteridir. Hidrokşisinnamik asit adı verilen bu grup, kafeik asit, ferulik asit ve p-kumarik asit, SYN analizleri yanı sıra analiz edilerek yöntem valide edilmiştir.

CYN ve hidroksisinnamik asitlerin analizi için Sepax C18 Kolon seçilmiştir. Yüksek saflıkta geliştirilmiş silika kolonlardır. Sulu fazlara dayanıklılık ve yüksek pH kararlılığına sahiptir. Yüksek oranda tampon kullanıldığında bu kolon tercih edilmektedir. CYN ve hidroksisinnamik asitlerin suda çözünürlüğü fazla olduğundan mobil fazda sulu faz oranının yüksek olması ayırıcılığı etkileyecektir. Bu nedenle bu kolon seçilmiştir. CYN ve hidroksisinnamik asitler, asidik özellikte olduğundan Asidik pH da Hareketli faz seçilmiştir. Bu şekilde iyonlaşma engellenerek UV absorpsiyonlarının ortam pH sına göre değişmesi engellenmiştir.

Gıda takviyesi olan ve yaygın olarak kullanılan enginar özütü tablet ve kapsüllerinde etken madde olan sinarin ve fenolik bileşenlerin analizlerine literatürde rastlanmamıştır.

Bu tez çalışmasında, geliştirilen yöntem ile piyasada bulunan enginar özütü içeren gıda takviyesinde ve bu amaçla kullanılan enginar özütü toz hammaddesinde sinarin analizleri uygulanmıştır.

Geliştirilen yöntem ile gıda takviyelerinde Sinarin ve benzer hidroksisinnamik asit düzeyleri de analiz edilmektedir. Bu amaçla, kolay ve hızlı bir yöntem geliştirilerek valide edilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Atalay, D. and H.S. Erge, *GIDA TAKVİYELERİ VE SAĞLIK ÜZERİNE ETKİLERİ*. Food and Health, 2018. **4**(2): p. 98-111.
2. Coppens, P., et al., *Use of botanicals in food supplements*. Annals of Nutrition and Metabolism, 2006. **50**(6): p. 538-554.
3. Lange, D., *Europe's medicinal and aromatic plants: their use, trade and conservation*. 1998: Traffic International.
4. Lattanzio, V., et al., *Globe artichoke: A functional food and source of nutraceutical ingredients*. Journal of functional foods, 2009. **1**(2): p. 131-144.
5. Abu-Reidah, I.M., et al., *Extensive characterisation of bioactive phenolic constituents from globe artichoke (Cynara scolymus L.) by HPLC–DAD–ESI–QTOF–MS*. Food chemistry, 2013. **141**(3): p. 2269-2277.
6. Gebhardt, R., *Antioxidative and protective properties of extracts from leaves of the artichoke (Cynara scolymus L.) against hydroperoxide-induced oxidative stress in cultured rat hepatocytes*. Toxicology and applied pharmacology, 1997. **144**(2): p. 279-286.
7. Lombardo, S., et al., *Variation of polyphenols in a germplasm collection of globe artichoke*. Food Research International, 2012. **46**(2): p. 544-551.
8. Panizzi, L. and M.L. Scarpati, *Constitution of cynarine, the active principle of the artichoke*. Nature, 1954. **174**(4440): p. 1062-1062.
9. Gezer, C., *Fonksiyonel Bir Besin Olarak Enginar: Olası Sağlık Etkileri*. Beslenme ve Diyet Dergisi, 2015. **43**(3): p. 264-269.
10. Nazni, P., et al., *Hypoglycemic and hypolipidemic effect of Cynara scolymus among selected type 2 diabetic individuals*. Pak. J. Nutr, 2006. **5**(2): p. 147-151.
11. Mornar, A. and B. Nigović, *Identifikacija cinarina u ekstraktu lista artiçoke primjenom LC/DAD/MS/MS tehnike*. Farmaceutski glasnik, 2012. **68**(9): p. 541-550.
12. Aboutabl, E.A., et al., *Bioactive lignans and other phenolics from the roots, leaves and seeds of Arctium lappa L. grown in Egypt*. Egyptian Pharmaceutical Journal, 2012. **11**(1): p. 59.
13. Sun, Z., et al., *Cynarin-rich sunflower (Helianthus annuus) sprouts possess both antiglycative and antioxidant activities*. Journal of agricultural and food chemistry, 2012. **60**(12): p. 3260-3265.
14. Topal, M., et al., *Antioxidant, antiradical, and anticholinergic properties of cynarin purified from the Illyrian thistle (Onopordum illyricum L.)*. Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry, 2016. **31**(2): p. 266-275.
15. Pandino, G., et al., *Caffeoylquinic acids and flavonoids in the immature inflorescence of globe artichoke, wild cardoon, and cultivated cardoon*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**(2): p. 1026-1031.
16. Ben Salem, M., et al., *LC-MS/MS analysis and hepatoprotective activity of artichoke (Cynara Scolymus L.) leaves extract against high fat diet-induced obesity in rats*. BioMed research international, 2019. **2019**.
17. Im, D.Y. and K.I. Lee, *Antioxidative activity and tyrosinase inhibitory activity of the extract and fractions from Arctium lappa roots and analysis of phenolic compounds*. Korean Journal of Pharmacognosy, 2014. **45**(2): p. 141-146.

18. Alonso, M.R., et al., *Validated HPLC method for cynarin determination in biological samples*. Acta Farmaceutica Bonaerense, 2006. **25**(2): p. 267.
19. Kabganian, R., et al., *Localization of alkamides, echinacoside and cynarin with Echinacea angustifolia*. Journal of herbs, spices & medicinal plants, 2003. **10**(2): p. 73-81.
20. Wang, M., et al., *Analysis of antioxidative phenolic compounds in artichoke (Cynara scolymus L.)*. Journal of agricultural and Food Chemistry, 2003. **51**(3): p. 601-608.
21. Kulza, M., et al., *Development and validation of method for the determination of cynarin, luteolin in plasma*. Przegląd Lekarski, 2012. **69**(10): p. 987-991.
22. Pellati, F., et al., *Variability in the composition of anti-oxidant compounds in Echinacea species by HPLC*. Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques, 2005. **16**(2): p. 77-85.
23. Hammouda, F., et al., *Quantitative determination of the active constituents in Egyptian cultivated Cynara scolymus*. International journal of pharmacognosy, 1993. **31**(4): p. 299-304.
24. Jun, N.-J., et al., *Radical scavenging activity and content of cynarin (1, 3-dicaffeoylquinic acid) in Artichoke (Cynara scolymus L.)*. Journal of Applied Biological Chemistry, 2007. **50**(4): p. 244-248.
25. Boerjan, W., J. Ralph, and M. Baucher, *Lignin biosynthesis*. 2003.
26. Wang, X., et al., *Simultaneous determination of caffeic acid and its major pharmacologically active metabolites in rat plasma by LC-MS/MS and its application in pharmacokinetic study*. Biomedical Chromatography, 2015. **29**(4): p. 552-559.
27. Dai, G.-L., et al., *Study on determination of caffeic acid, chlorogenic acid in rat plasma and their pharmacokinetics with LC-MS/MS*. Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo Zhongyao Zazhi= China Journal of Chinese Materia Medica, 2013. **38**(21): p. 3753-3757.
28. Bursal, E., et al., *Antioxidant activity and polyphenol content of cherry stem (Cerasus avium L.) determined by LC-MS/MS*. Food research international, 2013. **51**(1): p. 66-74.
29. Molina-Calle, M., F. Priego-Capote, and M.L. de Castro, *Characterization of Stevia leaves by LC-QTOF MS/MS analysis of polar and non-polar extracts*. Food Chemistry, 2017. **219**: p. 329-338.
30. Ferracane, R., et al., *Metabolic profile of the bioactive compounds of burdock (Arctium lappa) seeds, roots and leaves*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2010. **51**(2): p. 399-404.
31. Yilmaz, M.A., et al., *An LC-MS/MS method validation for the phytochemical quantification of four edible plants*. J Inst Sci Technol, 2018. **8**: p. 179-187.
32. Wang, H., G.J. Provan, and K. Helliwell, *Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC*. Food Chemistry, 2004. **87**(2): p. 307-311.
33. Spagnol, C.M., et al., *Validation of HPLC-UV assay of caffeic acid in emulsions*. Journal of chromatographic science, 2016. **54**(3): p. 305-311.
34. Iranshahi, M. and Y. Amanzadeh, *Rapid isocratic HPLC analysis of caffeic acid derivatives from Echinacea purpurea cultivated in Iran*. Chemistry of Natural Compounds, 2008. **44**(2): p. 190-193.
35. Kosińska, A., et al., *Presence of caffeic acid in flaxseed lignan macromolecule*. Plant foods for human nutrition, 2011. **66**(3): p. 270-274.

36. Spagnol, C.M., et al., *Validation of caffeic acid in emulsion by UV-Spectrophotometric method*. Phys. Chem, 2015. **5**: p. 16-22.
37. Masek, A., E. Chrzescijanska, and M. Latos, *Determination of antioxidant activity of caffeic acid and p-coumaric acid by using electrochemical and spectrophotometric assays*. Int J Electrochem Sci, 2016. **11**(12): p. 10644-10658.
38. Stratil, P., B. Klejdus, and V. Kubáň, *Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables evaluation of spectrophotometric methods*. Journal of agricultural and food chemistry, 2006. **54**(3): p. 607-616.
39. Clifford, M.N., et al., *Hierarchical scheme for LC-MS n identification of chlorogenic acids*. Journal of agricultural and food chemistry, 2003. **51**(10): p. 2900-2911.
40. Souilah, N., et al., *LC-MS/MS Profiling of 37 Fingerprint Phytochemicals in Oenanthe fistulosa L. and its Biological Activities*. The Natural Products Journal, 2021. **11**(1): p. 63-73.
41. Ye, J.-X., et al., *An LC-MS/MS method for the simultaneous determination of chlorogenic acid, forsythiaside A and baicalin in rat plasma and its application to pharmacokinetic study of Shuang-huang-lian in rats*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2010. **52**(4): p. 625-630.
42. Yang, F., et al., *Development of an LC-MS/MS method for quantitative analysis of chlorogenic acid in human plasma and its application to a pharmacokinetic study in Chinese patients with advanced solid tumor*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2020. **177**: p. 112809.
43. Fang, N., S. Yu, and R.L. Prior, *LC/MS/MS characterization of phenolic constituents in dried plums*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. **50**(12): p. 3579-3585.
44. Zhao, L., et al., *An LC-MS/MS method for the simultaneous determination and pharmacokinetic studies of bergenin, chlorogenic acid and four flavonoids in rat plasma after oral administration of a QingGanSanJie decoction extract*. Biomedical Chromatography, 2014. **28**(12): p. 1670-1678.
45. Zhang, J., et al., *Liquid chromatograph/tandem mass spectrometry assay for the simultaneous determination of chlorogenic acid and cinnamic acid in plasma and its application to a pharmacokinetic study*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2010. **51**(3): p. 685-690.
46. Duckstein, S.M. and F.C. Stintzing, *Investigation on the phenolic constituents in Hamamelis virginiana leaves by HPLC-DAD and LC-MS/MS*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2011. **401**(2): p. 677-688.
47. Bennat, C., et al., *HPLC analysis of chlorogenic acid lactones in roasted coffee*. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung, 1994. **199**(1): p. 17-21.
48. Pedrosa, M.M., et al., *Determination of caffeic and chlorogenic acids and their derivatives in different sunflower seeds*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2000. **80**(4): p. 459-464.
49. Yang, H., et al., *HPLC determination and pharmacokinetics of chlorogenic acid in rabbit plasma after an oral dose of Flos Lonicerae extract*. Journal of chromatographic science, 2004. **42**(4): p. 173-176.

50. Dreher, M. and E. Holm, *A high performance liquid chromatographic method for chlorogenic acid determination in sunflower seeds*. Journal of Food Science, 1983. **48**(1): p. 264-265.
51. Vinson, J.A., X. Chen, and D.D. Garver, *Determination of total chlorogenic acids in commercial green coffee extracts*. Journal of medicinal food, 2019. **22**(3): p. 314-320.
52. Zhang, Q., et al., *A gradient HPLC method for the quality control of chlorogenic acid, linarin and luteolin in Flos Chrysanthemi Indici suppository*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2007. **43**(2): p. 753-757.
53. Wang, X., et al., *Validation of spectrophotometric determination of chlorogenic acid in fermentation broth and fruits*. Food chemistry, 2019. **278**: p. 170-177.
54. Siddiqi, A.I. and S.O. Freedman, *Identification of chlorogenic acid in castor bean and oranges*. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 1963. **41**(4): p. 947-952.
55. Chun, O.K. and D.-O. Kim, *Consideration on equivalent chemicals in total phenolic assay of chlorogenic acid-rich plums*. Food Research International, 2004. **37**(4): p. 337-342.
56. Matic, P., M. Sabljic, and L. Jakobek, *Validation of spectrophotometric methods for the determination of total polyphenol and total flavonoid content*. Journal of AOAC International, 2017. **100**(6): p. 1795-1803.
57. de Oliveira, D.M., et al., *Ferulic acid: a key component in grass lignocellulose recalcitrance to hydrolysis*. Plant biotechnology journal, 2015. **13**(9): p. 1224-1232.
58. Jong, T.-T., et al., *Using LC/MS/MS to determine matrine, oxymatrine, ferulic acid, mangiferin, and glycyrrhizin in the Chinese medicinal preparations Shiaufeng-saan and Dang-guei-nian-tong-tang*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2006. **40**(2): p. 472-477.
59. Waterstraat, M., et al., *Development of a QuEChERS-based stable-isotope dilution LC-MS/MS method to quantitate ferulic acid and its main microbial and hepatic metabolites in milk*. Journal of agricultural and food chemistry, 2016. **64**(45): p. 8667-8677.
60. Zhang, T., et al., *Determination of Ferulic Acid in Rat Plasma by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Method: Application to a Pharmacokinetic Study*. Analytical letters, 2009. **42**(14): p. 2157-2169.
61. Lee, B., et al., *Simultaneous Determination of 11 Major Components in Palmultang by HPLC–DAD and LC–MS–MS*. Journal of Chromatographic Science, 2014. **52**(6): p. 482-492.
62. Nichitoi, M.M., et al., *Development and Application of an LC-MS/MS Method for Identification of Polyphenols in Propolis Extract*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute Proceedings, 2020. **55**(1): p. 10.
63. Andreasen, M.F., et al., *Content of phenolic acids and ferulic acid dehydrodimers in 17 Rye (Secale cereale L.) Varieties*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. **48**(7): p. 2837-2842.
64. Li, X., et al., *Simultaneous determination of danshensu, ferulic acid, cryptotanshinone and tanshinone IIA in rabbit plasma by HPLC and their pharmacokinetic application in danxiongfang*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2007. **44**(5): p. 1106-1112.

65. Aarabi, A., et al., *Extraction of ferulic acid from sugar beet pulp by alkaline hydrolysis and organic solvent methods*. Journal of Food Measurement and Characterization, 2016. **10**(1): p. 42-47.
66. Proestos, C., et al., *RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity*. Journal of agricultural and food chemistry, 2005. **53**(4): p. 1190-1195.
67. Jankovska, P., J. Copikova, and A. Sinitsya, *The determination of ferulic acid in sugar beet pulp*. Czech journal of food sciences, 2001. **19**(4): p. 143-147.
68. Tian, W., et al., *Rapid quantification of total phenolics and ferulic acid in whole wheat using UV-Vis spectrophotometry*. Food Control, 2021. **123**: p. 107691.
69. Jadhav, A., et al., *Spectrophotometric estimation of ferulic acid from Ferula asafoetida by Folin-ciocalteu's reagent*. Der Pharmacia Sinica, 2012. **3**(6): p. 680-684.
70. Divakaran, S.A. and C. Anitha, *Estimation of ferulic acid from selected plant materials by Spectrophotometry and High performance liquid chromatography*. Journal of Applied and Natural Science, 2021. **13**(3): p. 815-819.
71. Ozyurt, D., B. Demirata, and R. Apak, *Determination of total antioxidant capacity by a new spectrofluorometric method based on Ce (IV) reduction: Ce (III) fluorescence probe for CERAC assay*. Journal of fluorescence, 2011. **21**(6): p. 2069-2076.
72. Kim, H., et al., *Development of p-Coumaric Acid Analysis in Human Plasma and Its Clinical Application to PK/PD Study*. Journal of Clinical Medicine, 2020. **10**(1): p. 108.
73. Sharma, A., et al., *In-vitro and in-vivo pharmacokinetics of IS01957, p-coumaric acid derivative using a validated LC-ESI-MS/MS method in mice plasma*. Journal of Pharmaceutical Investigation, 2018. **48**(5): p. 565-574.
74. Ou, S., et al., *Production of coumaric acid from sugarcane bagasse*. Innovative food science & emerging technologies, 2009. **10**(2): p. 253-259.
75. Neo, Y.-P., et al., *Phenolic acid analysis and antioxidant activity assessment of oil palm (E. guineensis) fruit extracts*. Food Chemistry, 2010. **122**(1): p. 353-359.
76. Cui, Y., et al., *LC- MS determination and pharmacokinetics of p-coumaric acid in rat plasma after oral administration of p-coumaric acid and freeze-dried red wine*. Journal of agricultural and food chemistry, 2010. **58**(23): p. 12083-12088.
77. Karthikeyan, R., C. Devadasu, and P. Srinivasa Babu, *Isolation, characterization, and RP-HPLC estimation of P-coumaric acid from methanolic extract of durva grass (Cynodon dactylon Linn.)(Pers.)*. International Journal of Analytical Chemistry, 2015. **2015**.
78. Saad, W.M.M., et al., *Determination and Quantification of p-Coumaric Acid in Pineapples (Ananas comosus) Extracts using Gradient Mode RP-HPLC*. Pharmacognosy Research, 2019. **11**(1).
79. Hashizume, K., et al., *Analysis of Ferulic and p-Coumaric Acids in Japanese Rice for Sake Brewing*. Cereal Chemistry, 2014. **91**(1): p. 45-49.
80. Wen, D., et al., *A universal HPLC method for the determination of phenolic acids in compound herbal medicines*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(17): p. 6624-6629.
81. Dhamole, P.B., et al., *Extraction of p-coumaric acid from agricultural residues and separation using 'sugaring out'*. Korean Journal of Chemical Engineering, 2016. **33**(6): p. 1860-1864.

82. García Sánchez, F., C. Carnero, and A. Heredia, *Determination of p-coumaric and ferulic acids in mixtures by isodifferential derivative spectrophotometry*. Analytical letters, 1988. **21**(7): p. 1243-1257.
83. Yu, P., et al., *The specificity and the ability of Aspergillus feruloyl esterase to release p-coumaric acid from complex cell walls of oat hulls*. Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology, 2004. **79**(7): p. 729-733.
84. Burcu, E. and A.S. DİNÇEL, *Kromatografiye giriş, yüksek performanslı sıvı kromatografi kullanımında basit ipuçları*. Sağlık Hizmetleri ve Eğitimi Dergisi, 2018. **2**(2): p. 51-57.
85. Gündüz, T., *Elektroanalitik Kimya*. İnrümentel Analiz. Gazi Kitabevi, Ankara, 2007: p. 849-897.
86. Reuhs, B.L., *High-performance liquid chromatography*, in *Food analysis*. 2017, Springer. p. 213-226.
87. ERTAŞ, Ö.S. and A. KAYALI, *Ankara Ecz. Fak. Derg. J. Fac. Pharm, Ankara 34 (1) 41-57, 2005 34 (1) 41-57, 2005 ANALİTİK YÖNTEM GEÇERLİLİĞİNE GENEL BİR BAKIŞ AN OVERVIEW ON ANALYTICAL METHOD VALIDATION*.
88. Bose, A., *HPLC calibration process parameters in terms of system suitability test*. Austin Chromatogr, 2014. **1**(2): p. 1-4.
89. ÖZKAN, S.A., *İlaç Analizlerinde Analitik Validasyon Ve İlgili Parametreleri*. İlaç Analizlerinde Analitik Validasyon Ve İlgili Parametreleri. Hatay, Antakya, Türkiye Cumhuriyeti: VI. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, 2012.
90. Buick, A., et al., *Method validation in the bioanalytical laboratory*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 1990. **8**(8-12): p. 629-637.
91. Gupta, P., *Method validation of analytical procedures*. PharmaTutor, 2015. **3**(1): p. 32-39.