

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SEMİZOTU, ISIRGAN OTU, MENENGİÇ VE KUŞBURNU
GİBİ TIBBİ VE AROMATİK BİTKİLERDE FLAVONOLLERİN
HPLC-MS İLE TAYİNİ**

Cemile ÖZCAN

**Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Mehmet YAMAN**

**DOKTORA TEZİ
KİMYA ANA BİLİM DALI**

ELAZIĞ - 2009

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SEMİZOTU, ISIRGAN OTU, MENENGİÇ VE KUŞBURNU
GİBİ TIBBİ VE AROMATİK BİTKİLERDE FLAVONOLLERİN
HPLC-MS İLE TAYİNİ**

**Hazırlayan
Cemile ÖZCAN**

**Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Mehmet YAMAN**

**DOKTORA TEZİ
KİMYA ANA BİLİM DALI**

ELAZIĞ – 2009

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SEMİZOTU, ISIRGAN OTU, MENENGİÇ VE KUŞBURNU
GİBİ TIBBİ VE AROMATİK BİTKİLERDE FLAVONOLLERİN
HPLC-MS İLE TAYİNİ**

Cemile ÖZCAN

Doktora Tezi
Kimya Ana Bilim Dalı

Bu tez, Tarihinde, Aşağıda Belirtilen Jüri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile Başarılı/Başarısız Olarak Değerlendirilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Mehmet YAMAN

Üye: Prof. Dr. Candan HAMAMCI

Üye: Doç. Dr. Ökkeş YILMAZ

Üye: Doç. Dr. Habibe ÖZMEN

Üye: Doç. Dr. İbrahim YILMAZ

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada beni yönlendiren, çalışmalarım süresince büyük ilgi ve anlayışını esirgemeyen ve her konuda yardımcı olan Sayın Hocam Prof. Dr. Mehmet YAMAN' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Kimya Bölümünün kaynaklarından faydalanmamı sağlayan saygıdeğer hocam ve Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Mustafa BOYBAY' a teşekkür ederim.

Lise ve Üniversite öğrenimim boyunca bana yardımcı olan ve benden desteklerini esirgemeyen bütün hocalarıma içtenlikle teşekkür ederken özellikle Lisede kimya dersini sevmemi sağlayan saygıdeğer hocalarım Solmaz YAMAN, Osman DEMİR ve Orhan BOZYİL' e teşekkürü borç bilirim.

Deneysel çalışmalarımın her aşamasında bana katkıda bulunan ve yardımlarını esirgemeyen doktora arkadaşım Olcay KAPLAN' a teşekkür ederim. Ayrıca doktora ve yüksek lisans arkadaşlarımdan Muharrem İNCE, Nagihan KARAASLAN, İrfan TİMUR, Şükran AKKUŞ' a teşekkür ederim.

Araştırmalarım sırasında bana her türlü desteği veren, çalışmalarım süresince göstermiş oldukları sabır ve bana verdikleri moral için tüm aile bireylerime, eşim Şeref ÖZCAN' a ve kızıma bütün içtenliğimle teşekkür ederim.

CEMİLE ÖZCAN

İÇİNDEKİLER	Sayfa No
TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
ŞEKİLLER LİSTESİ	IV
TABLolar LİSTESİ	IX
KISALTMALAR	X
ÖZET	XI
ABSTRACT	XII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Flavonoidler	3
2.2. Flavonoidlerin Canlılar Üzerindeki Etkileri	3
2.3. Flavonoid Alt Sınıfından Olan Flavonoller	4
2.3.1. Kamferol	5
2.3.2. Kuersetin	5
2.3.3. Miyrisetin	6
2.4. Kullanılan Bitkilerin Özellikleri	7
2.4.1. Semizotu (<i>Portulaca oleracea</i> L.)	7
2.4.2. Isırgan Otu (<i>Urtica dioica</i> L.)	7
2.4.3. Menengiç (<i>Terebinthina chia</i> L.)	8
2.4.4. Kuşburnu (<i>Rosa canina</i> L.)	8
2.5. Ekstraksiyon Yöntemleri	9
2.5.1. Sıvı Sıvı Ekstraksiyonu	9
2.5.2. Sürekli Ekstraksiyon	9
3. ANALİZ YÖNTEMLERİ	10
3.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi	10
3.1.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Cihazı	11
3.1.2. Pompa Sistemleri	12
3.1.3. Örnek Enjeksiyon Sistemleri	14
3.1.4. Yüksek performanslı Sıvı Kromatografisi Kolonları	14
3.1.5. Kolon Dolgu Maddelerinin Tipleri	15
3.1.6. Dedektörler	15
3.2. Kütle Spektrometrisi	17
3.2.1. Moleküler Kütle Spektrometride İyon Kaynakları	17
3.2.1.1. Gaz Fazı İyon Kaynakları	18

3.2.1.1.1. Elektron İmpakt Kaynağı	18
3.2.1.1.2 Elektrosprey İyonlaştırma	20
3.2.2. Kütle Ayırıcıları	21
3.2.3. Kütle Spektrumlarının Karşılaştırılması ile Bileşiğin Tespit Edilmesi	24
3.2.4. Moleküler Kütle Spektrometrinin Uygulamaları	27
3.3. Literatürde Flavonoidler ile İlgili Yapılan Bazı Çalışmalar	28
3.4. Bazı Analitik Terimler	36
4. MATERYAL METOT	38
4.1. Kullanılan Cihazlar ve Cam Malzemeler	38
4.2. Kullanılan Standart Çözeltiler ve Reaktiflerin Hazırlanması	38
4.3. Örneklerin Temini	39
4.4. Bitki Örneklerinin Ekstraksiyonu	39
4.5. Flavonollerin Tayininde HPLC-MS' in Koşullarının Optimizasyon Çalışmaları	40
4.5.1. Miyrisetin Tayini için Optimum Koşulların Tayini	40
4.5.2. Kuersetin için Optimum Koşullarının Tayini	55
4.5.3. Kamferol için Optimum Koşullarının Tayini	66
4.6. Bulgular	78
4.6.1. Akış Hızı ile İlgili Bulunan Sonuçlar	78
4.6.2. Fragmentor ile İlgili Bulunan Sonuçlar	78
4.6.3. Enjeksiyon Hacmi ile İlgili Bulunan Sonuçlar	78
4.6.4. Kolon Sıcaklığı ile İlgili Bulunan Sonuçlar	79
4.7. Ölçümlerle İlgili Elde Edilen Optimum Şartlar	79
4.8. Çalışılan Bitkilerde Bulunan Flavonollerin kromatogramları	79
4.8.1. Miyrisetin için Bitkilerden Elde Edilen Kromatogramlar	80
4.8.2. Kuersetin için Bitkilerden Elde Edilen Kromatogramlar	96
4.8.3. Kamferol için Bitkilerden Elde Edilen Kromatogramlar	108
5. SONUÇ VE TARTIŞMA	123
6. KAYNAKLAR	127
ÖZGEÇMİŞ	134

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Bir flavonoidin genel yapısı	3
Şekil 3.1. Bir HPLC cihazı şeması	12
Şekil 3.2. Gradient elüsyon uyumlu bir HPLC cihazının şeması	12
Şekil 3.3. HPLC için bir pistonlu pompa	13
Şekil 3.4. Yüksek hızlı izokratik ayırma	15
Şekil 3.5. Duyarlılık, en düşük tayin sınırı, doğrusal çalışma bölgesi	16
Şekil 3.6. Gürültü ve en düşük tayin sınırı	16
Şekil 3.7. Elektron-impakt kaynağının yapısı	19
Şekil 3.8. Dekanol'ün (a) sert bir kaynakla ve (b) yumuşak bir kaynakla alınmış kütle spektrumları	20
Şekil 3.9. Dört kutuplu bir kütle ayırıcısı	24
Şekil 3.10. n-Heptanal'in elektron impakt spektrumu.	25
Şekil 3.11. LC/MS hareketli bant ara faz sistemi	26
Şekil 4.1. Ekstraksiyon yönteminin basamakları.	39
Şekil 4.2. HPLC-MS ile miyrisetin tayini için en uygun akış hızının bulunması.	42
Şekil 4.3. HPLC-MS ile miyrisetin tayini için en uygun akış hızının bulunmasıyla ilgili a) kromatogramların farklı gösterilişi ve b) akış hızına karşı alıkonma sürelerinin değişimi.	43
Şekil 4.4. HPLC-MS ile miyrisetin tayini için en uygun fragmentörün bulunması.	44
Şekil 4.5. HPLC-MS ile miyrisetin tayini için fragmentör-alan değişimi.	44
Şekil 4.6. HPLC-MS ile miyrisetin tayini için optimum enjeksiyon hacminin bulunması.	45
Şekil 4.7. HPLC-MS ile miyrisetin tayini için en uygun enjeksiyon hacminin bulunmasıyla ilgili kromatogramların farklı gösterilişi.	46
Şekil 4.8. HPLC-MS ile miyrisetin tayini için optimum kolon sıcaklığının bulunması.	47
Şekil 4.9. HPLC-MS ile miyrisetin tayini için en uygun kolon sıcaklığının bulunmasıyla ilgili a) kromatogramların farklı gösterilişi ve b) kolon sıcaklığının alıkonma süreleriyle değişimi.	48
Şekil 4.10. HPLC-MS ile miyrisetin için kalibrasyon çözeltilerinin kromatogramları.	49
Şekil 4.11. HPLC-MS ile miyrisetin için kalibrasyon çözeltilerinin kromatogramları.	50
Şekil 4.12. HPLC-MS ile miyrisetin için kalibrasyon çözeltilerinin kromatogramları.	51
Şekil 4.13. HPLC-MS ile miyrisetin için kalibrasyon çözeltilerinin kromatogramların farklı gösterimi.	52

Şekil 4.14. HPLC-MS ile miyrisetin 0.2-1 ppm aralığındaki kalibrasyon eğrisi.	52
Şekil 4.15. HPLC-MS ile miyrisetin 1-10 ppm aralığında kalibrasyon eğrisi.	53
Şekil 4.16. HPLC-MS ile miyrisetin 10-100 ppm aralığında kalibrasyon eğrisi.	53
Şekil 4.17. HPLC-MS ile miyrisetin için 0.2-100 ppm aralığına ait kalibrasyon eğrisi.	54
Şekil 4.18. Miyrisetin HPLC-MS ile optimum şartlarda elde edilen kütle spektrumu.	54
Şekil 4.19. HPLC-MS ile kuersetin tayini için en uygun akış hızının bulunması.	56
Şekil 4.20. HPLC-MS ile kuersetin tayini için en uygun akış hızının bulunmasıyla ilgili a) kromatogramların farklı gösterilişi ve b) akış hızının alıkonma süreleriyle değişimi.	57
Şekil 4.21. HPLC-MS ile kuersetin tayini için optimum fragmentörün bulunması.	58
Şekil 4.22. HPLC-MS ile kuersetin tayini için fragmentör-alan değişimi grafiği.	58
Şekil 4.23. HPLC-MS ile kuersetin tayini için optimum enjeksiyon hacminin bulunması.	59
Şekil 4.24. HPLC-MS ile kuersetin tayini için en uygun kolon sıcaklığının bulunmasıyla ilgili a) kromatogramların gösterilişi ve b) kolon sıcaklığının alıkonma süreleriyle değişimi.	60
Şekil 4.25. HPLC-MS ile kuersetin için kalibrasyon çözeltilerinin kromatogramları.	61
Şekil 4.26. HPLC-MS ile kuersetin için kalibrasyon çözeltilerinin kromatogramları.	62
Şekil. 4.27. HPLC-MS ile kuersetin için kalibrasyon çözeltilerinin kromatogramların farklı gösterimi.	63
Şekil 4.28. HPLC-MS ile kuersetinin 0.8-4 ppm aralığına ait kalibrasyon eğrisi.	63
Şekil 4.29. HPLC-MS ile kuersetinin 8-100 ppm aralığına ait kalibrasyon eğrisi.	64
Şekil 4.30. HPLC-MS ile kuersetinin 0.8-100 ppm aralığındaki kalibrasyon eğrisi.	64
Şekil 4.31. Kuersetinin HPLC-MS ile optimum şartlarda elde edilen kütle spektrumu.	65
Şekil 4.32. HPLC-MS ile kamferolün tayini için en uygun akış hızının bulunması.	67
Şekil 4.33. HPLC-MS ile kamferolün tayini için en uygun a) akış hızının bulunmasıyla ilgili kromatogramların farklı gösterilişi ve b) akış hızının alıkonma süreleriyle değişimi.	68
Şekil 4.34. HPLC-MS ile kamferol tayini için fragmentörün bulunması.	69
Şekil 4.35. HPLC-MS ile kamferol tayini için fragmentör-alan grafiği değişimi.	69
Şekil 4.36. HPLC-MS ile kamferol tayini için optimum enjeksiyon hacminin bulunması.	70
Şekil 4.37. HPLC-MS ile kamferol tayini için optimum kolon sıcaklığının	71

bulunması.	
Şekil 4.38. HPLC-MS ile kamferol tayini için en uygun kolon sıcaklığının bulunmasıyla ilgili a) kromatogramların farklı gösterilişi ve b) kolon sıcaklığının alıkonma süreleriyle değişimi.	72
Şekil 4.39. HPLC-MS ile kamferol için kalibrasyon çözeltilerinin kromatogramları.	73
Şekil 4.40. HPLC-MS ile kamferol için kalibrasyon çözeltilerinin kromatogramları.	74
Şekil 4.41. HPLC-MS ile kamferol için kalibrasyon çözeltilerinin kromatogramları.	75
Şekil 4.42. HPLC-MS ile kamferolün 0.2-1 ppm aralığına ait kalibrasyon eğrisi.	76
Şekil 4.43. HPLC-MS ile kamferolün 1-10 ppm aralığına ait kalibrasyon eğrisi.	76
Şekil 4.44. HPLC-MS ile kamferolün 10-100 ppm aralığına ait kalibrasyon eğrisi.	77
Şekil 4.45. HPLC-MS ile kamferolün 0.2-100 ppm aralığına ait kalibrasyon eğrisi.	77
Şekil 4.46. Kamferolün HPLC-MS ile optimum şartlarda elde edilen kütle spektrumu.	78
Şekil 4.47. Semizotunda miyrisetin tayinine ilişkin HPLC-MS kromatogramı.	82
Şekil 4.48. Semizotunda miyrisetin tayinine ilişkin HPLC-MS kromatogramının farklı gösterimi.	83
Şekil 4.49. Semizotunda miyrisetin tayini için elde edilen kütle (SIM-SCAN) spektrumu.	84
Şekil 4.50. Semizotunda miyrisetin tayini için uygulanan standart ekleme yöntemiyle elde edilen HPLC-MS kromatogramları.	85
Şekil 4.51. Semizotunda miyrisetin tayini için uygulanan standart ekleme yöntemiyle elde edilen HPLC-MS kromatogramlarının farklı gösterimi.	86
Şekil 4.52. Semizotu miyrisetin tayini için elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri.	86
Şekil 4.53. Isırgan otunda miyrisetin tayinine ilişkin HPLC-MS kromatogramı.	87
Şekil 4.54. Isırgan otunda miyrisetin tayinine ilişkin HPLC-MS kromatogramının farklı gösterimi.	87
Şekil 4.55. Isırgan otunda miyrisetin tayini için elde edilen kütle (SCAN) spektrumu.	88
Şekil 4.56. Isırgan otunun miyrisetin tayini için uygulanan standart ekleme yöntemiyle elde edilen HPLC-MS kromatogramları.	89
Şekil 4.57. Isırgan otu miyrisetin tayini için elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri.	90
Şekil 4.58. Menengiçte miyrisetin tayinine ilişkin HPLC-MS kromatogramı.	90
Şekil 4.59. Menengiçte miyrisetin tayini için elde edilen kütle (SCAN) spektrumu.	91

Şekil 4.60. Menengiçte miyrisetin tayini için uygulanan standart ekleme metoduyla elde edilen HPLC-MS kromatogramları.	92
Şekil 4.61. Menengiçte miyrisetin tayini için elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri.	93
Şekil 4.62. Kuşburnunda miyrisetin tayinine ilişkin HPLC-MS kromatogramı.	93
Şekil 4.63. Kuşburnunda miyrisetin tayini için elde edilen kütle (SIM-SCAN) spektrumu.	94
Şekil 4.64. Kuşburnunda miyrisetin tayini için uygulanan standart ekleme metoduyla elde edilen HPLC-MS kromatogramları.	95
Şekil 4.65. Kuşburnu miyrisetin tayini için elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri.	96
Şekil 4.66. Semizotunda kuersetin tayini için uygulanan standart ekleme metoduyla elde edilen HPLC-MS kromatogramları.	98
Şekil 4.67. Semizotu (10 gr) kuersetin tayini için elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri.	99
Şekil 4.68. Semizotunun farklı gramlarının ekstraksiyonuyla elde edilen kuersetin HPLC-MS kromatogramları.	100
Şekil 4.69. Semizotunda kuersetin tayini için elde edilen kütle (SIM-SCAN) spektrumu.	101
Şekil 4.70. Isırgan otunun farklı gramlarının kuersetin tayinine ilişkin HPLC-MS kromatogramları.	101
Şekil 4.71. Isırgan otunun kuersetin tayini için elde edilen kütle (SIM-SCAN) spektrumu.	102
Şekil 4.72. Isırgan otunda kuersetin tayini için uygulanan standart ekleme metoduyla elde edilen HPLC-MS kromatogramları.	103
Şekil 4.73. Isırgan otunda (2.5 gr) kuersetin tayini için elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri.	103
Şekil 4.74. Menengiçte kuersetin tayinine ilişkin HPLC-MS kromatogramı.	104
Şekil 4.75. Menengiçte kuersetin tayini için elde edilen kütle (SCAN) spektrumu.	105
Şekil 4.76. Kuşburnunda (10 gr) kuersetin tayinine ilişkin HPLC-MS kromatogramı.	105
Şekil 4.77. Kuşburnunda kuersetin tayinine ilişkin HPLC-MS kromatogramı.	106
Şekil 4.78. Kuşburnunda kuersetin tayini için elde edilen kütle (SIM-SCAN) spektrumu.	107
Şekil 4.79. Semizotunda kamferol tayini için uygulanan standart ekleme metoduyla elde edilen HPLC-MS kromatogramları.	110

Şekil 4.80. Semizotu kamferol tayini için elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri.	110
Şekil 4.81. Semizotunda kamferol tayini için elde edilen kütle (SIM-SCAN) spektrumu.	111
Şekil 4.82. Isırgan otunda kamferol tayini için uygulanan standart ekleme metoduyla elde edilen HPLC-MS kromatogramlarının farklı gösterimi.	112
Şekil 4.83. Isırgan otu kamferol tayini için elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri.	113
Şekil 4.84. Isırgan otunda kamferol tayini için elde edilen kütle (SIM-SCAN) spektrumu.	113
Şekil 4.85. Menengiçte kamferol tayinine ilişkin HPLC-MS kromatogramı.	114
Şekil 4.86. Menengiçin kamferol tayini için elde edilen HPLC-MS kromatogramının farklı gösterimi.	115
Şekil 4.87. Menengiçte kamferol tayini için elde edilen kütle (SIM-SCAN) spektrumu.	116
Şekil 4.88. Kuşburnunda (10 gr) kamferol tayinine ilişkin HPLC-MS kromatogramı.	116
Şekil 4.89. Kuşburnunda (10 gr) kamferol tayinine ilişkin HPLC-MS kromatogramının farklı gösterimi.	117
Şekil 4.90. Kuşburnunda (5 gr) kamferol tayinine ilişkin HPLC-MS kromatogramı.	118
Şekil 4.91. Kuşburnunda (5 gr) kamferol tayinine ilişkin HPLC-MS kromatogramının farklı gösterimi.	118
Şekil 4.92. Kuşburnunda kamferol tayini için elde edilen kütle (SIM-SCAN) spektrumu.	119
Şekil 4.93. Kuşburnunda (5 gr) kamferol tayini için uygulanan standart ekleme metoduyla elde edilen HPLC-MS kromatogramlarının farklı gösterimi.	121
Şekil 4.94. Kuşburnu kamferol tayini için elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri.	121

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1: Flavonoidlerin sınıflandırılması	3
Tablo 2.2. Bazı flavonoid bileşikleri	4
Tablo 2.3. Bazı flavonol bileşiklerinin molekül yapıları.	5
Tablo 2.4. Kamferolün genel özellikleri	6
Tablo 2.5. Kuersetinin genel özellikleri	6
Tablo 2.6. Miyrisetinin genel özellikleri.	7
Tablo 3.1. Gaz ve Sıvı kromatografilerinin karşılaştırılması	11
Tablo 3.2. Moleküler kütle spektroskopide kullanılan iyon kaynakları	18
Tablo 3.3. Bir elektron impakt kaynağındaki bazı tipik reaksiyonlar	21
Tablo 3.4. Bazı LC/MS ara faz sistemlerinin karakteristikleri	27
Tablo 3.5. Moleküler kütle spektrometrinin uygulamaları	28
Tablo 3.6. Literatürde bitki ekstraktlarında yapılan polifenol tayini çalışmaları.	33
Tablo 4.1. MS parametreleri için uygulanan şartlar	38
Tablo 4.2. Flavonollerin optimum tayin koşulları	79
Tablo 4.3. Şekil 4.1' de çözülen bitki örneklerindeki flavonol miktarları	122

KISALTMALAR

HPLC-MS: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi

GC-MS: Gaz Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi

MS: Kütle Spektroskopisi

FAB: Sürekli Akışlı Hızlı Atom Bombardımanı Sistemi

APCI: Atmosferik Basınçta Kimyasal İyonlaştırma Sistemi

LOD: Gözlenebilme Sınırı

LOQ: Belirleyebildiğimiz Minimum Madde Miktarı Değeri

ACN: Asetonitril

M: Miyrisetin

Q: Kuersetin

UV-Vis: Ultraviyole-Görünür bölge spektroskopisi

ppm: mg/kg, mg/lt, µg/ml, µg/gr

ÖZET

Doktora Tezi

SEMİZOTU, ISIRGAN OTU, MENENGİÇ VE KUŞBURNU GİBİ TIBBİ VE AROMATİK BİTKİLERDE FLAVONOLLERİN HPLC-MS İLE TAYİNİ

Cemile ÖZCAN

Fırat Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Ana Bilim Dalı

2009, Sayfa: 146

Antikanserojen özelliğe sahip olan flavonollerden kamferol, kuersetin ve miyrisetin bileşiklerinin tıbbi bitki ve sebzelerdeki konsantrasyonlarının tayinine olan ilgi son yıllarda artmaktadır. Özellikle iyi bir ayırma yapabilen HPLC ve hem duyarlı hem de doğru sonuçlar verebilen MS cihazlarının birleştirilmesiyle oluşan HPLC-MS sisteminin yaygınlaşması, bu bileşiklerin daha çok gıda çeşidi örneklerindeki derişimlerinin tayinine imkan vermektedir.

Bu çalışmada, önce HPLC-MS sisteminde doğru sinyal ölçümünü etkileyen fragmentor (parçalayıcı voltaj), enjeksiyon hacmi, kolon sıcaklığı, mobil faz akış hızı gibi parametreler değiştirilerek çalışma şartları optimize edildi. Mobil faz olarak su/metanol/asetonitril/formik asit karışımı kullanıldı. Optimum şart olarak; enjeksiyon hacmi için 5 µl, akış hızı için 0.6-0.8 ml/dk, kolon sıcaklığı için 30-40 °C ve fragmentor için 140-170 V aralığında değerler bulundu. Gözlenen bu optimum şartlar, Elazığ ve yöresinde yetişen meyve ve bitkilerdeki flavonollerin tayini için uygulandı. Böylece, semizotu, ısırgan, kuşburnu ve menengiç meyve ve bitkilerindeki miyrisetin, kuersetin ve kamferolun HPLC-MS ile tayini yapıldı. Bitkilerdeki flavonoller metanol/askorbik asit/HCl karışımıyla ekstrakte edildi. Bulunan sonuçlardan en büyük ve en küçük konsantrasyonların miyrisetin için semizotu (47 ppm) ve kuşburnu (0.63 ppm), kuersetin için semizotu (39 ppm) ve menengiç (< t.s) ve kamferol için ise ısırgan otu (7.7 ppm) ve menengiç (< t.s) olduğu görüldü.

Anahtar kelimeler: flavonol, tıbbi bitkiler, HPLC-MS, ekstraksiyon

ABSTRACT

Doctorate Thesis

Cemile OZCAN

DETERMINATION OF FLAVONOLS IN MEDICAL AND AROMATIC PLANTS SUCH AS *PORTULACA OLERACEA*, *URTICA DIOICA*, *TEREBINTHINA CHIA* AND *ROSA CANINA* BY HPLC-MS

Firat University

Graduate School of Natural and Applied Sciences,

Department of Chemistry

2009, Page: 146

Interest in the determination of flavonols concentrations in medicine plant and vegetables, including myricetin, quercetin and kaempferol which have anticancerogen properties, is increasing in recent years. Particularly, widespread usage of HPLC-MS system that is combining to very good separation method-HPLC and both sensitive and reliable detector-MS, make their determinations possible for more kinds of foods.

In this study, the parameters that may affect the signal of myricetin in the HPLC-MS were optimized. The mixture of water/methanol/CAN/formic acid was used as mobile phase. The optimum parameters were found to be injection volume=5.0 mikro liter, flow rate of mobile phase=0.6-0.8 ml/min, column temperature=30-40 °C and fragmentor=140-170 V. The optimum parameters observed were applied to determination of flavonols in fruits and vegetables grown in Elazig vicinity. So, determination of myricetin, quercetin and kaemferol in fruit and vegetabels such as terebinth (*Terebinthina chica* L.), nettle (*Urtica dioica* L.), rosa hip (*Rosa canina* L.) and purslane (*Portulace oleracea* L.) by HPLC-MS were carried out. Flavonols in plant samples were extracted by mixture of methanol/ascorbic acid/HCl. From the obtained results, the highest and the lowest concentrations for myricetin, quercetin and kaemferol were found to be *Portulace oleracea* L. (47 ppm) and *Rosa canina* L. (0.63 ppm), *Portulace oleracea* (39 ppm) and *Terebinthina chica* (< t.s), *Urtica dioica* (7.7 ppm) and *Terebinthina chica* (< t.s), respectively.

Keywords: Flavonol, medicine plants, HPLC-MS, extraction

1. GİRİŞ

Bitkiler farklı etkilere sahip doğal ilaç hammaddelerinin vazgeçilmez kaynaklarıdır. Bitkilerde doğal olarak bulunan birçok madde antimikrobiyal, antioksidan, antimitojen, antikanserojen, antidepresan vb. etkiye sahiptir. Bu nedenle, meyve ve sebzeleri düzenli olarak tüketen insanların kanser ve kalp hastalıklarına yakalanma riskinin azaldığı belirtilmiştir. Bu yararlı maddeler vitaminler, fitokimyasallar ve polifenoller şeklinde sınıflandırılırlar. Özellikle bu amaçla bitkilerde bulunan ve biyoyararlı özelliklere sahip polifenollere (flavonoidler, fenolik asitler, lignanlar ve stilbenler) olan ilgi daha fazladır [1-2].

Flavonoidler, bir C₁₅ flavon iskelet yapısında olan iki fenil halkası ve bir heterosiklik halkadan oluşan fenolik bileşiklerdir. Bu bileşikler flavonol, flavan-3-ol, flavanon, flavon, izoflavon ve antosiyanidinler şeklinde de sınıflandırılmaktadırlar. 6000 den fazla olan flavonoidlerin bulunduğu bitkiler genellikle sarı, turuncu ve kırmızı renklidirler [1-8]. Bunlardan antikanserojen özelliğe sahip olan flavonoidlerden kamferol, kuersetin, miyrisetin bileşikleri bazı çilek ve türleri, üzüm türleri gibi meyve ve sebze ekstraktlarında en çok çalışılanlardır. Ancak gerek ekstraksiyon yöntemlerinin farkından gerekse girişim etkilerinden dolayı literatürde verilen sonuçlar arasında büyük farklılıklar vardır. Bu nedenle bu bileşiklerin doğru ve güvenilir tayini çalışmalarına olan gereksinim artarak devam etmektedir.

Doğal ürünlerdeki flavonoidlerin tayini için HPLC, HPLC-MS, GC ve GC-MS gibi çok sayıda modern teknikler kullanılmaktadır [3-6]. Doğal örnekler milyonlarca bileşik içerebildiğinden ancak klasik ayırma ve kromatografik yöntemler kullanılarak bu bileşikler birbirinden ayrılabilir. Özellikle kromatografik ayırma teknikleriyle, duyarlı ve güvenilir sonuçların elde edildiği metodların birleştirilmesiyle oluşan HPLC-MS ve GC-MS son yıllarda yaygın kullanılmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, Elazığ yöresinden temin edilen semizotu (*Portulaca oleracea* L.), ısırgan otu (*Urtica dioica* L.), menengiç (*Terebinthina chia* L.) ve kuşburnu (*Rosa canina* L.) gibi tıbbi ve aromatik bitkilerdeki kamferol, kuersetin ve miyrisetin gibi flavonol bileşenlerinin nicel analizinin yapılmasıdır. Bu bileşenlerin tayini için HPLC-MS kullanıldı.

Nicel analizden önce HPLC-MS için optimum parametreler belirlendi. Bu parametrelerden enjeksiyon hacmi 3 bileşik için de 5 mikrolitre, kolon sıcaklığı miyrisetin ve kamferol için 40 °C olarak bulunurken, kuersetin için 30 °C olarak bulundu. Fragmentör parametresi kuersetin ve kamferol için 140 V ve miyrisetin için 170 V optimum değer olarak bulundu. Akış hızı ise 3 bileşik için de farklı olup kuersetin için 0.6, miyrisetin için 0.7 ve kamferol için 0.8 ml/dk olarak bulundu.

Bitki örneklerinin eksatraksiyonu için metanol/1.2 M HCl/askorbik asit karışımı kullanıldı. Yukarıda verilen optimum şartlar uygulanarak bitki ekstraktlarına uygulandı.

Bulunan sonuçlardan, en yüksek ve en düşük kuersetin konsantrasyonun sırasıyla semizotu (39 ppm) ve menengiç (< t.s) bitkisinde bulundu. En yüksek ve en düşük kamferolun ise ısırgan otu (7.7 ppm) ve menengiç (< t.s) bitkisinde, ve en yüksek ve en düşük miyrisetin'in ise semizotu (47 ppm) ve kuşburnu (0.63 ppm) bitkisinde bulunduğu gözlemlendi.

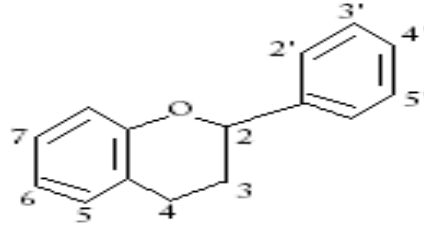
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Flavonoidler

Flavonoidler, özellikle meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunan bir C₁₅ flavon iskelet yapısında olan iki fenil halkası ve bir heterosiklik halkadan oluşan fenolik bileşiklerdir [1] (Şekil 2.1). Genellikle bu bileşikler sarı renkli bitkisel pigmentlerdir ve bitkilerde glikozitleri halinde bulunurlar. Flavonoidlerin HPLC ile tayini ilk kez 1976 yılında Fisher ve Wheaton tarafından yapılmıştır [2]. Flavonoidlerin sınıflandırılması Tablo 2.1' de gösterilmiştir ve bunlardan bazılarının bileşikleri Tablo 2.2' de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Flavonoidlerin sınıflandırılması.

Flavonoidler			
Kalgon (fenil stril (sinnamikasit) keton)	Flavanon	Flavonol	Antosiyanin
Flavon	Dihidroflavonol	İzoflavonoid	Neoflavonoid



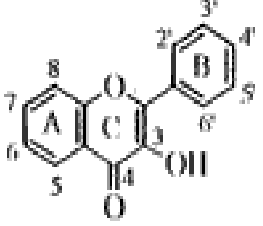
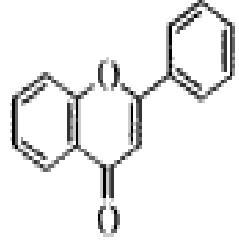
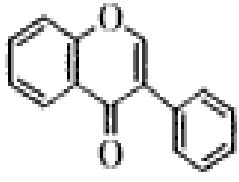
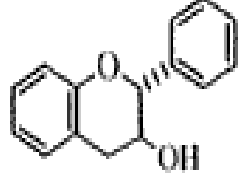
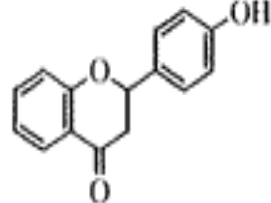
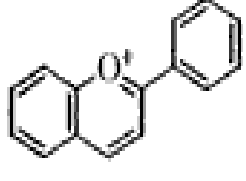
Şekil 2.1. Bir flavonoidin genel yapısı.

2.2. Flavonoidlerin Canlılar Üzerindeki Etkileri

Flavonoidler, antioksidan özellikleri ile hücrelere zarar veren radikallerle etkileşerek radikalleri zararsız hale getirirler, antibiyotik etkisi göstererek virüs ve bakterilerin aktivitelerini engellerler. Bağışıklık sistemini güçlendirip C vitamini vücut tarafından kullanımına yardımcı olan flavonoidler ülser ve ishal gibi hastalıklara karşı direnç sağlayarak romatizmal hastalıklarda ilaç gibi davranırlar. Vücuttaki alerjik reaksiyonların önlenmesini sağlarlar. Ayrıca vücut için önemli olan enzimlerin aktivitelerini düzenleyerek kanserli hücrelerin çoğalmasını engellerler [1-4].

Holman ve arkadaşları flavanol ve flavonların günlük alımını 23 mg olarak rapor etmişlerdir [5]. Buna ek olarak Hollanda’ da kuersetin flavanolünün günlük kullanımının 16 mg olduğu rapor edilmiştir [5]. Ortalama yiyeceklerle flavonoid alımının 26 mg/gün [5] olduğu belirlenirken, baskın olarak bulunan flavonoidin kuersetin olduğu saptanmıştır [5, 6].

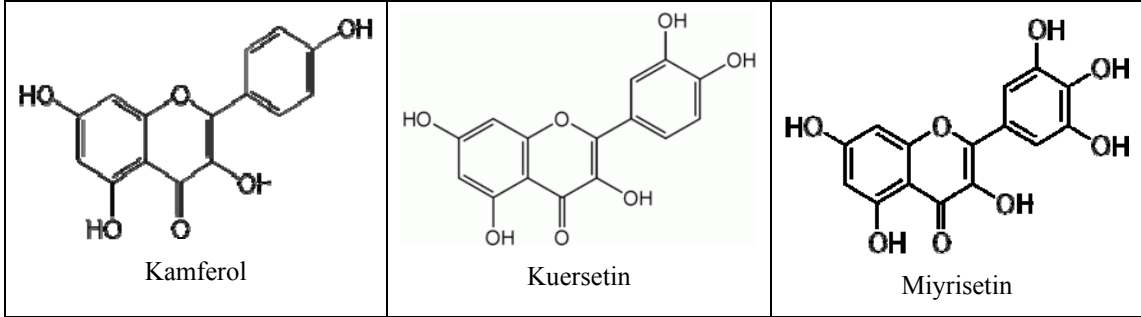
Tablo 2.2. Bazı flavonoid bileşikleri.

		
Flavanol	Flavon	izoflavonid
		
Flavan-3-ol	flavanon	Antosiyanin

2.3. Flavonoid Alt Sınıfından Olan Flavonoller

Flavonoller 3-OH içeren flavonoidlerdir. Flavonollere örnek olarak kamferol, kuersetin, miyrisetin ve isorhamnetin gibi bileşikler verilebilir. Bazı flavanol bileşiklerinin molekül yapıları Tablo 2.3’ te gösterilmiştir.

Tablo 2.3. Bazı flavonol bileşiklerinin molekül yapıları.



2.3.1. Kamferol

Kamferol doğal bir favonoid bileşiğinin flavonol grubundadır. Çay, brokoli, greyfurt ve diğer bitkilerden elde edilebilen bir bileşiktir. Erime sıcaklığı 276-278 °C olan kamferol sarı renkte berrak bir katıdır. Suda çok az çözünmesine rağmen metanol, sıcak etanol ve dietiler gibi organik çözücülerde iyi çözünmektedir. Tablo 2.4' te kamferolün genel özellikleri verilmektedir. Kamferol kalp hastalığı ve pankreas kanseri riskini azaltan, antidepresan özelliği olan doğal bir antioksidan maddedir [7, 8]. Çay ve brokolideki kamferolün kalp hastalığı riskini azalttığı düşünülmektedir.

2.3.2. Kuersetin

Kuersetin, flavonol grubundan olan, rutin ve kuersitrin glikozitlerinin aglikonlarını oluşturan, oldukça özel bir flavonoid bileşiğidir. Kuersetin bileşiğinin genel özellikleri Tablo 2.5' te görülmektedir. Kuersetin kapari, elma, çay, soğan, özellikle kırmızı soğan, kırmızı üzüm, domates, brokoli ve diğer yeşil sebzeler, çilek türleri, meyve kabukları, vb. bitkilerde bol miktarda bulunmaktadır [9-18]. Serbest radikalleri yakalama özelliğinden dolayı güçlü bir antioksidandır. Bu özelliğiyle kardiyovasküler (kalp ve damarlarla ilgili) hastalıklardan koruduğu bilinmektedir [9]. Kuersetin iltihaplanmayı direk engelleme özelliğinden dolayı önemli bir iltihap önleyici aktiviteye sahip olduğu kanıtlanmıştır. Örneğin kuersetin histamine ve diğer alerjik/iltihaplanmanın hem üretimi hem de serbest bırakılmasını yavaşlatır [10]. Ayrıca, vitamin C gibi sitrat döngüsüne katılarak antioksidan özellikte gösterir. Anti kanser özellikte olduğu ve akut semptomlar için de kullanılmaktadır. LDL kolesterol oksidasyonunu azaltarak kalp hastalıklarından koruyucu özelliği araştırılmaktadır [8, 19].

Tablo 2.4. Kamferolün genel özellikleri.

Molekül formülü	C ₁₅ H ₁₀ O ₆
Molekül ağırlığı	286 g/mol
Faz	Katı
Erime noktası	276-278 °C
Kaynama noktası	-
Diğer çözücülerde çözünürlükleri	Su: çok az çözünür Metanol, etanol, dietileter gibi organik çözücülerde iyi çözünür.
Görünüşü	Sarı renk
IUPAC adı	3,5,7-trihydroxy-2-(4-Hydroxy phenyl)-4H-1-benzopyran-4-one

Tablo 2.5. Kuersetinin genel özellikleri.

Molekül formülü	C ₁₅ H ₁₀ O ₇
Molekül ağırlığı	302 g/mol
Faz	Katı
Erime noktası	316 °C
Kaynama noktası	-
Yoğunluğu	1.799 g/cm ³
Diğer çözücülerde çözünürlükleri	Su: çok az çözünür Metanol, etanol, dietileter gibi organik çözücülerde iyi çözünür.
Görünüşü	Sarı renk
IUPAC adı	2-(3,4- dihydroxyphenyl)- 3,5,7- trihydroxy- 4H- chromen- 4-one

2.3.3. Miyrisetin

Miyrisetin doğal olarak bulunan flavonoid grubundan olan bir flavonoldür. Miyrisetin genel özellikleri Tablo 2.6' da görülmektedir. Çoğunlukla meyvelerde özellikle üzüm ve kabuksuz meyvelerde (çilek türleri), sebzelerde, şifalı bitkiler ve diğer bitkilerde bulunur [13-16]. Ceviz zengin miyrisetin kaynağıdır. Antioksidan özellik gösterir. Bitkilerin yapısında

yaygın olarak glikozitleri halinde bulunur. Yapılan çalışmalar prostat kanserinin azalması ile fazla miktarda myrisetin tüketiminin ilişkisinin olduğunu göstermiştir. Hücre içi ile ilgili yapılan araştırmalar sonucunda LDL kolesterolünün düşürülebilmesi için yüksek konsantrasyondaki miyrisetin önerilmiştir [8].

Tablo 2.6. Miyrisetin genel özellikleri.

Molekül formülü	C ₁₅ H ₁₀ O ₈
Molekül ağırlığı	318 g/mol
Faz	Katı
Erime noktası	-
Kaynama noktası	-
Diğer çözücülerde çözünlükleri	Su: çok az çözünür Metanol, etanol, dietileter gibi organik çözücülerde iyi çözünür.
Görünüşü	Sarı renk
IUPAC adı	3,5,7-Trihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)- 4-chromenone

2.4. Kullanılan Bitkilerin Özellikleri

Semizotu (*Portulaca oleracea* L.), ısırgan otu (*Urtica dioica* L.), menengiç (*Terebinthina chia* L.) ve kuşburnu (*Rosa canina* L.) bitkilerinin genel özellikleri:

2.4.1. Semizotu (*Portulaca oleracea* L.) (Purslane)

Semizotugiller familyasından; bir yıllık otsu bir bitkidir. Gövdesi toprak üzerine yatık, yaprakları sapsız ve etlidir. Yenilen kısımları ise, küçük, yuvarlak yeşil yaprakları ve narin saplarıdır. C vitamini ve demir bakımından zengindir. Halk dilinde semizotu, parpar, pırpırım, pürpürüm, cibile, elmelik, semizebe, soğukluk, tohmegen olarak da bilinir [20, 21].

2.4.2. Isırgan Otu (*Urtica dioica* L.) (Nettle)

Isırgan otu (*Urtica dioica* L.), çok yıllık ve otsu bir bitkidir, boyu bazen 1 m' yi geçer, yapraklar koyu yeşil renkli, saplı, dişli kenarlı ve yakıcı tüylüdür [20]. Çiçekler, küçük yeşil renklidir. Uç yaprakların koltuklarından püskül gibi toplu olarak çıkar ve demet halinde

sarkarlar. Isırgan otu, Mayıs-Eylül ayına kadar çiçek açabilir. Meyvesi ise kuru ve tek tohumludur. Duvar kenarları ve harabeliklerde bol olarak görünür. İki türü vardır, her iki türün de yaprakları 2-4 cm uzunlukta, oval veya kalp biçimindedir. Taze iken deri ile temas edince deride kızartı ve yanma yapar. Dızlağan, cımbar, cızlangaç, cızgan, çinçar, daladiken, gazga, geznik, gendişken, dalayan diken ve dikenli ısırgan isimleriyle de bilinmektedir [20].

2.4.3. Menengiç (*Terebinthina chia* L.) (Terebinth)

Menengiç (*Pistacia terebinthus* L.), sakız ağacıgiller (Anacardiaceae) familyasından Akdeniz bölgesine özgü, yaprak döken bir çerfgalı türüdür. Türkiye' nin Güneydoğu Anadolu, Doğu Anadolu ve Akdeniz bölgelerinde kırsal kesimlerinde yetişen bir ağaçtır. Boyu 6-9 metreye kadar ulaşır [20, 21]. Mart ve nisan aylarında açan, bir önceki yıla ait sürgünlerde gelişen çiçekler kırmızımsı erguvan; küremsi küçük meyveler ise olgunlaştığında mavimsi yeşil renktedir. Menengiç yörelere göre çitlenbik, çedene, çitlik, çitemik, bittim gibi farklı isimlerle anılır. Örneğin Elazığ yöresinde sakız ağacı ya da çedene olarak isimlendirilir. Bitki olarak fıstık ağacına benzerlik gösterir ve antep fıstığı bu ağacın aşlanmasıyla üretilir [22]. Ağacın meyvesi olan tanelerinden menengiç kahvesi veya çedene kahvesi olarak bilinen Elazığ yöresine has bir kahve üretilir. Bu kahvenin içerisinde kimyasal madde yoktur ve % 100 doğaldır. Menengiç kahvesinin faydalarına bakarsak [22, 23]: Öksürüğü keser ve balgamı söktürerek nefes açıcı özelliği vardır, antiseptik özelliği sayesinde iltihabi yaraları tedavi eder, göğsü yumuşatır, böbrek kumlarının dökülmesine yardımcı olur, mide ağrılarını dindirir, kalp yetmezliği riskini azaltır, yağlı bir içecek olmasından dolayı yüksek E vitamini ve doymamış yağ asidi düzeyi ile kandaki kolesterolü düşürmeye ve kalp ve damar sertliğini önlemeye yardımcı olur.

2.4.4. Kuşburnu (*Rosa canina* L.) (Rosa hip)

Kuşburnu bitkisi halk arasında yabani gül, it burnu ve kuşkonmaz olarak bilinir. Kuşburnu fazla dallanan, dik ve çalı formunda bazen de tırmanıcıdır. Bitkinin boyu 3-4 m kadar olabilir. Güçlü büyüyen gövde ve dalları dikenli, dağınık ve sık yapılıdır. Yapraklar, almaşıklı ve 5-7 parçacıktan oluşmuş bileşik yapraklardır. Mayıs-temmuz aylarında yetişir, pembe beyaz renkli çiçekleri 3-5 cm çapındadır. Meyveler 1.5-3.8 cm büyüklüğündedir. Oval olan meyveler temmuz ayı başında olgunlaşmaya başlar ve portakal rengindedir [20, 21, 24]. Bu meyveler çekirdeklerinden ayrılıp demlenir ve ezilip süzgeçten geçirilerek reçel yapımında kullanılırlar [20].

2.5. Ekstraksiyon Yöntemleri

Ekstraksiyon, bir çözeltili içerisindeki bileşenlerin yoğunluk farkından faydalanılarak birbirinden ayrılması işlemidir.

2.5.1. Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu

Kaynama noktası birbirine çok yakın olan, birbiri içerisinde karışmayan ve kaynama noktasında bozulan sıvıların ayrılmasında kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem için ayırma hunisi kullanılır. Sıvı-sıvı ekstraksiyonunda ayırma hunisi kullanılarak ve yoğunluk farkından yararlanarak yani dağılma oranlarının farkından ayırma yapılabilen sistemlerdir.

2.5.2. Sürekli Ekstraksiyon

Diğer ekstraksiyon yöntemleri ile ayrılması zor olan maddeleri bu yöntemle ayırmak mümkündür. Dağılma oranlarının küçük olduğu durumlarda çok sayıda sıvı-sıvı ekstraksiyonu uygulamak gerekir. Bu uzun zaman aldığı ve fazla çözücü gerektirdiğinde dolayı sürekli ekstraksiyon yöntemine başvurulur. Sürekli ekstraksiyon katılardan yapılacak olan çekme işlemi için de kullanılır. Bunun için en uygun yöntem Soxhlet cihazıyla yapılacak olan ekstraksiyon işlemidir. Katı örnekler sürekli çözücüyle sirkülasyon halinde etkileştirilerek çekme işlemi yapılır ve böylece işlem istenildiği kadar tekrarlanır (Yani çözücü sürekli örnekle etkileştirilir). Böylece istenilen bileşenler daha az çözücü kullanarak ve daha kısa sürede ayrılabilir.

3. ANALİZ YÖNTEMLERİ

3.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Kromatografi, birden fazla bileşen içeren bir karışımın bir kolondaki hareketli bir faz (çözücü) ile sabit bir faz (dolgu maddesi) içinden geçirilmesi işlemlerini içerir. Bu teknikte ayrılacak bileşenler sabit ve hareketli fazda farklı dağılıma ve tutunma özellikleri gösterdiğinden kolonu farklı sürelerde terk ederler. Kolondaki farklı alıkonma sürelerinden faydalanılarak kolon çıkışına bileşenlerle orantılı sinyal üreten bir dedektörün yerleştirilmesiyle hem nitel hem de nicel analiz yapan bir metod geliştirilmiştir. Bu alanda yaygın olarak HPLC sistemleri kullanılmaktadır. Bir HPLC cihazının şeması Şekil 3.1-3.2' de görülmektedir.

Sıvı kromatografisinde kolon verimi dolgu maddesinde kullanılan tanecik boyutunun küçültülmesi (normalde 100–250 μm ' den 1–15 μm ' ye) ile önemli derecede artmaktadır. Ancak tanecik çapı 3–10 μm ' ye kadar küçük olan dolgu maddeleri 1960' lı yılların son dönemlerinde kullanılmaya başlanmıştır. Tanecik çapının, kolon çapının küçüldüğü ve yüksek basıncın uygulandığı sıvı kromatografisine yüksek performanslı sıvı kromatografisi denir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi günümüzde en çok kullanım alanı bulan kromatografik metotlardandır [25].

Bunun nedenleri arasında; duyarlılığının yüksek olması, kantitatif tayinlerde kullanılabilmesi, uçucu olmayan türlerin ve sıcaklıkla kolayca bozulabilen türlerin ayrılmasına uygun olması, sanayi ve benzeri birçok alanda uygulanabilirliği sayılabilir. Özellikle, yaşamın birinci derece temel taşı olan maddelerden; Amino asitler, Proteinler, Nükleik asitler, Hidrokarbonlar, Karbonhidratlar, İlaçlar ve Antibiyotikler bu metodla tayin edilirler.

Kromatografi çok gelişme gösteren analitik yöntemlerdendir. Onlarca yönteme yenileri eklenmektedir. Her yöntemin diğerine bazı üstünlükleri vardır. Bu nedenle kromatografik yöntemlerin genel bir karşılaştırmasını yapmak zorundadır. Tablo 3.1.' de gaz ve sıvı kromatografi yöntemlerinin genel bir karşılaştırması yapılmıştır.

Sıvı kromatografideki büyük gelişme her şeyden önce çok küçük tanecik çaplı dolgu maddelerinin (sabit faz) hazırlanabilmesi ve bu taneciklerin üzerinden sıvı fazın yürütülmesini sağlayacak yüksek basınç pompalarının teknik olarak yapılabilmesinden kaynaklanmaktadır. Uygun dedektörlerin de geliştirilmesi, çeşitli sabit fazların kullanılabilir olması, sıvı kromatografiyi, özellikle yüksek basınç sıvı kromatografiyi (HPLC), gaz kromatografi ile yarışabilir hale getirdi. O kadar ki zaman zaman HPLC' nin daha avantajlı olduğu iddia edildi. Ancak genellikle gaz ve sıvı kromatografilerinin birbirlerinin rakibi değil, birbirlerinin tamamlayıcısı olduğu kabul edilmektedir [26].

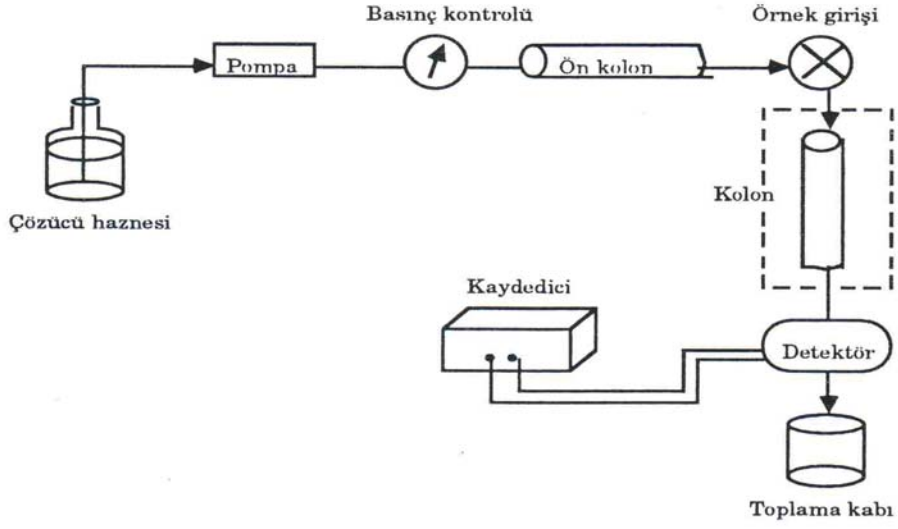
Tablo 3.1. Gaz ve Sıvı Kromatografilerinin Karşılaştırılması [26].

Faktör	Gaz Kromatografisi	Sıvı Kromatografisi
Prencip	Örnek sıvıya dayanıklı,	Örnek uygun bir sıvıda buharlaşabilir.
Örnek türü molekül ağırlık<500	Gazlar, sıvılar, katılar	Sıvı ve katılar, iyonlar
Hareketli faz	H ₂ , He, N ₂ ile sınırlı	Tüm organik ve inorg. Sıvılar
Sabit faz	Sınırlı sayıda	Bağlı faz şeklinde
En düşük tayin sınırı	10 ⁹ -10 ¹² g	10 ⁶ -10 ⁹ g
Analiz süresi	Dakika	Dakikalardan saatlere
Teorik tepki sayısı	2 000-100 000	500-10 000
Prepara. amaç için	Uygun değil	Uygun
Sıcaklık progr.	Yapılabilir	Güç ve yapılamaz
Gradyent yürütme	Yapılamaz	Yapılabilir

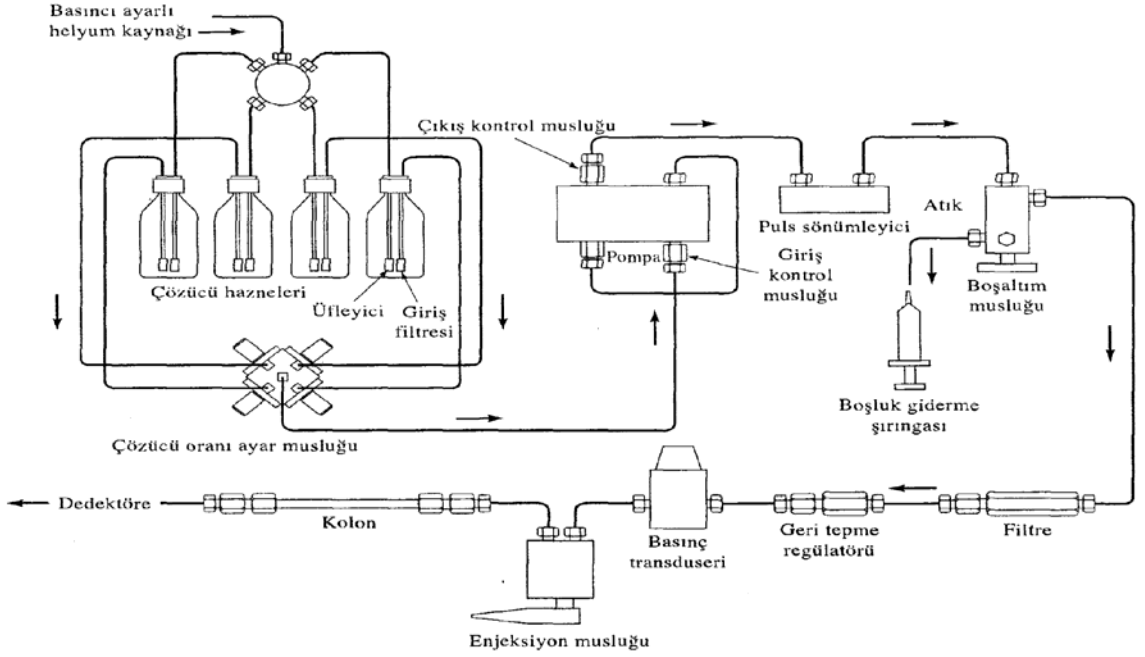
3.1.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Cihazı

Bir HPLC cihazı her biri 200–1000 ml çözücü içerebilen camdan veya çelikten yapılmış hazne içermektedir. Bazı cihazlarda bu haznelere kolonda ve dedektör sisteminde gaz oluşturarak bozucu etkilere sebep olan çözünmüş gazların (genellikle oksijen ve azot) giderilmesi için bir cihazla donatılmıştır. Bu gaz kabarcıkları bant genişlemesine ve çoğu zaman da dedektörün performansında bozucu etkilere neden olabilir. Cihazda bulunan ön kolon çözücü içinde bulunabilecek toz ve partikül halindeki maddelerin pompaya veya enjeksiyon sistemine zarar vermemesi veya kolonu tıkamaması için toz ve partikül halindeki maddeleri tutar. Böylece çözücü kaybı en aza indirilmiş olur.

Sabit bileşimdeki tek bir çözücü kullanılarak yapılan ayırma *izokratik elüsyon* olarak adlandırılır (Şekil 3.4). Genellikle ayırma etkililiği *gradient elüsyonu* ile artırılır. Bunun için polariteleri birbirinden çok farklı, iki ya da üç çözücü sistemi kullanılır. Elüsyon başladıktan sonra, belli bir programa göre bazen sürekli olarak, bazen de seri basamaklar halinde, çözücülerin oranı değiştirilir. Genellikle HPLC cihazları, çözücülerin hacimleri oranı zamanla doğrusal olarak veya üstel olarak değiştirilebilecek nitelikte, iki veya daha fazla haznedenden aldığı çözücülerini bir karıştırma odasında sürekli olarak değişen hızlarda bir araya getiren sistemlerle donatılmıştır.



Şekil 3.1. Bir HPLC cihazı şeması [26].



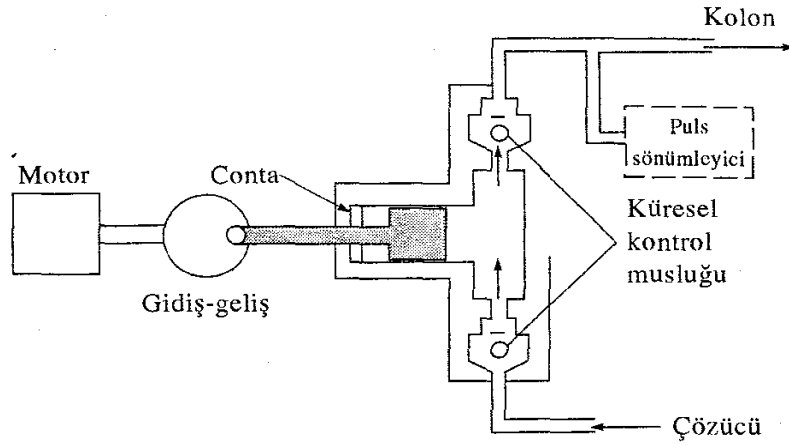
Şekil 3.2. Gradient elüsyon uyumlu bir HPLC cihazının şeması [27].

3.1.2. Pompa Sistemleri

Bir HPLC pompalama sistemi için gerekli şartlar, 400 atm' ye kadar basınç üretimi, 0,1–10 ml/ dk aralığında akış hızları, % 0.5 veya daha iyi bir bağıl tekrarlanabilirlikle akış kontrolü, korozyona dayanıklı parçaları içermelidir.

Sıvılar çok fazla sıkıştırılmadığından dolayı HPLC pompaları tarafından üretilen basınç bir patlama tehlikesi oluşturmaz. Böylece sistemin parçalarından herhangi birinde meydana gelecek bir çatlak, sadece çözücünün dışarı sızmasına neden olur. Ancak sızıntılar bir yangın tehlikesi oluşturabilir.

a. Pistonlu Pompalar: HPLC sistemlerinin %90' ında pistonlu pompalar kullanılmıştır. Pistonlu pompalar, genellikle motor kontrollü bir pistonun ileri ve geri hareketiyle çözücünün pompalandığı küçük bir silindirden meydana gelmiştir (Şekil 3.3). Sırasıyla açılıp kapanan iki tane küresel kontrol musluğu, çözücünün silindir içine giriş ve çıkış akışını kontrol eder. Piston çözücü ile doğrudan temas etmektedir.



Şekil 3.3. HPLC için bir pistonlu pompa [27].

Pistonlu pompaların üstünlükleri; küçük iç hacimleri (35–400 μL), yüksek çıkış basıncı (700 atm' ye kadar), gradiyent elüsyona uygun oluşları, kolon geri basıncından ve çözücü viskozitesinden büyük ölçüde bağımsız olan sabit akış hızlarıdır.

b. Sürgülü Pompalar: Sürgülü pompalar, bir kademeli motordan güç alan vidalı güdüm mekanizması ile kontrol edilen sızdırmaz bir sürgüsü olan, şırınga benzeri silindirik bir kaptan oluşur. Sürgülü pompalarda çıkış akımı pulssuzdur. Dezavantajları ise sınırlı çözücü kapasitesi (~ 250 ml) ve çözücü değiştirilmesi gerektiğinde karşılaşılan güçlüklerdir.

c. Pnömatik Pompalar: En basit pnömatik pompalarda sıvı, hareketli, sıkıştırılmış bir gaz ile basınçlandırılabilen bir kap içine yerleştirilmiş, bir kap içine konur. Pnömatik pompalarda çıkış basıncı düşüktür ve akış hızı çözücü viskozitesine ve kolon geri basıncına

bağlıdır. Ayrıca pnömatik pompalar, gradiyent elüsyona uygun değildir ve basınçları genellikle 135 atm' den daha düşüktür.

3.1.3. Örnek Enjeksiyon Sistemleri

Genellikle sıvı kromatografik ölçümlerinin kesinliğini, numunenin kolon dolgu maddesine taşınmasının tekrarlanabilirliği belirler. Aşırı numune yüklenmiş kolonlarda görülen bant genişlemesi de kesinliği etkiler. Bu yüzden kullanılan hacim oldukça küçük olmalıdır. Ayrıca, sistemin basıncı düşürülmeden numunenin sisteme girişi sağlanmalıdır.

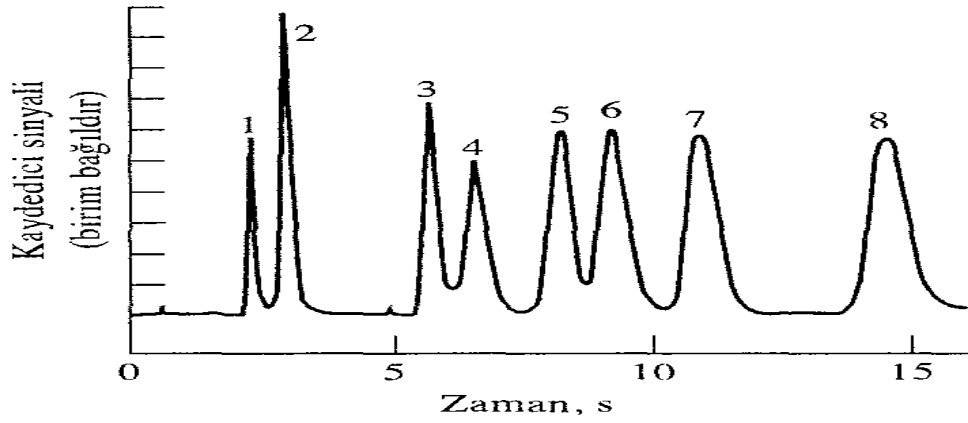
3.1.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Kolonları

Sıvı kromatografisi kolonları normal olarak düzgün iç çaplı paslanmaz çelik borulardan yapılır. Fakat bazen de kalın cidarlı cam borularda kullanılır.

Analitik Kolonlar (Kolon): Sıvı kromatografisi kolonlarının çoğunun boyu 10–30 cm, iç çapı 4-10 mm ve kolon dolgu maddesinin büyüklüğü 5–10 µm arasındadır. Normalde kolonlar düzgündür ve gerektiği yerlerde kolonların birbirine eklenmesiyle kolonun boyu artırılabilir.

Son yıllarda daha küçük boyutlarda yüksek hızlı ve yüksek performanslı kolonlar üretilmektedir. Bu kolonların iç çapı 1–4.6 mm, tanecik büyüklüğü 3–5 µm ve boyu 3–7.5 cm arasındadır. Bu kolonlarda çözücü sarfiyatı minimumdur.

Emniyet Kolonları (Ön kolon): Analitik kolonun ömrünü artırmak için analitik kolondan önce kısa kolon yerleştirilir. Bu kolonun görevi partikül halindeki maddeleri, çözücü içindeki yabancı maddeleri tutmak, numune içinde bulunan ve dolgun fazda tersinmez olarak bağlanan bileşenleri tutmaktır. Ayrıca hareketli fazı, durgun faz ile doyurarak analitik kolondaki çözücü kaybını en aza indirmektedir.



Şekil 3.4. Yüksek hızlı izokratik ayırma. Kolon boyutları 4 cm uzunluk, 0.4 cm iç çap, dolgu maddesi 3 µm boyutlu. Hareketli faz n-hekzanda % 4.1 etli asetat. Bileşikler: (1) p-ksilen, (2) anisol, (3) benzil asetat, (4) dioktil ftalat, (5) dipentil ftalat, (6) dibütil ftalat, (7) dipropil ftalat, (8) diethyl ftalat [27].

3.1.5. Kolon Dolgu Maddelerinin Tipleri

Sıvı kromatografisinde iki tip kolon dolgu maddesi kullanılmaktadır. Bunlar;

- i. Film Dolgular
- ii. Gözenekli Dolgular

i. Film Dolgular: Bunlar, küresel, gözeneksiz, çapları 30–40 µm olan cam veya polimer taneciklerden oluşur. Bu taneciklerin yüzeyine silis, alumina, polistiren-divinil benzen sentetik reçinesi veya bir iyon değiştirici reçineden oluşan ince gözenekli film kaplanmıştır

ii. Gözenekli dolgular: Çapları 3–10 µm arasındadır. Partiküller silis, alumina, polistiren-divinil benzen sentetik reçinesi veya bir iyon değiştirici reçineden meydana gelmiştir.

3.1.6. Dedektörler

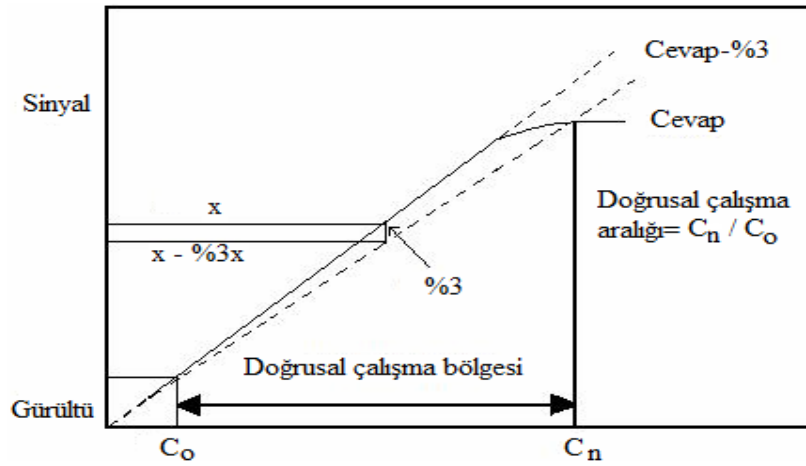
Hareketli fazda meydana gelen fiziksel veya kimyasal değişiklikleri izleyerek kalitatif ve kantitatif analiz yapılmasına imkan sağlayan elektronik araçlar **dedektör** olarak adlandırılmaktadır. Dedektör özelliklerini belirlemede kullanılan çeşitli parametreler vardır. Bunların başlıcaları;

- Seçicilik,
- Duyarlılık,

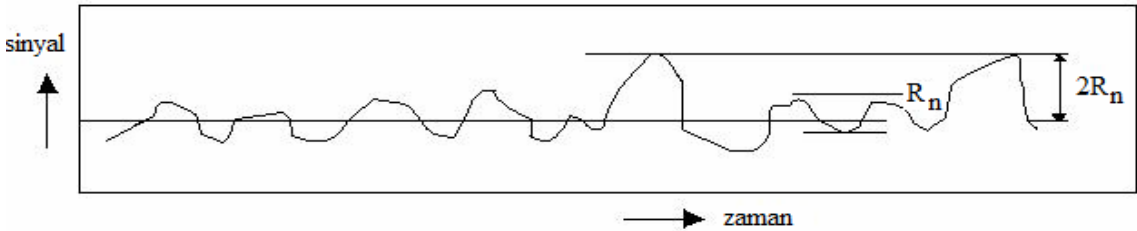
- En küçük tayin sınırı,
- Doğrusal çalışma bölgesi,
- Tekrarlanabilirlik,
- Diğerleri (dedektör hacmi, bilgi saklama, diğer dedektörlere bağlanabilme, vb.)

Bu parametrelerden bazıları:

Seçicilik: Bir örnek içinde karışım halindeki maddelerden yalnızca benzer özelliklere karşı duyarlık göstermesi diğerlerini algılamaması demektir. Örneğin; florimetrenin yalnızca floresan ışımaya yapabilen maddelere karşı duyarlı olması.



Şekil 3.5. Duyarlılık, en düşük tayin sınırı, doğrusal çalışma bölgesi.



Şekil 3.6. Gürültü ve en düşük tayin sınırı.

Duyarlık: Madde miktarına karşı dedektörün verdiği sinyalin çizilmesi ile elde edilen kalibrasyon (çalışma) eğrisinin eğimi duyarlık olarak tanımlanır. Bir başka ifadeyle madde miktarındaki değişimin dedektör sinyalinde sebep olduğu değişim demektir (Şekil 3.5).

Tayin Sınırı: Kalibrasyon eğrisinin en alttaki konsantrasyon değeri aynı zamanda en tayin sınırıdır. Ancak bu alt sınırın belirlenmesi dedektörün elektronik gürültüsüne bağlıdır (Şekil 3.6). Alt sınır, örnek sinyalinin gürültü sinyaline oranının en az « 2 veya 3 » olduğu

minimum örnek derişimidir. Bir analitik yöntemle tayin edilebilecek madde miktarı yalnızca yöntemle değil aynı zamanda dedektörlede sınırlıdır.

Doğrusal Çalışma Bölgesi: Kalibrasyon eğrisinin doğrusal bölgesi olarak tanımlanır. Maddenin miktarı ile dedektörün verdiği elektronik sinyalin doğrusal değişmesini ifadesidir. Bu bölgenin olabildiğince büyük olması istenir (Şekil 3.5).

3.2. Kütle Spektrometresi

Kütle spektrometresi, organik ve anorganik moleküllerinin yapılarının aydınlatılmasında, karışımların nicel ve nitel analizinde, katı-sıvı-gaz maddelerinin yapılarının ve bileşimlerinin aydınlatılmasında, bir örnekteki atomların izotoplarının belirlenmesinde en çok kullanılan analitik yöntemdir. Bir kütle spektroskopisinde spektrumu alınacak örneğin ilk olarak gaz halinde iyonlarını elde etmek gereklidir. Kütle spektrumlarının görünüşü kullanılan iyonlaştırma yöntemlerine önemli ölçüde bağlıdır [25].

3.2.1. Moleküler Kütle Spektrometride İyon Kaynakları

Moleküler kütle spektrometride iyon kaynakları iki bölüme ayrılır (Tablo 3.2):

1. Gaz fazı iyon kaynakları
 2. Dispersiyon kaynakları
- Gaz fazı kaynaklarında örnek önce buharlaştırılır sonra iyonlaştırılır.
 - Gaz fazı kaynakları kaynama noktaları 500 °C' den küçük olan termal olarak kararlı maddelere uygulanır.
 - Desorpsiyon yönteminde ise katı ve sıvı haldeki madde doğrudan gaz iyonu haline dönüştürülür.
 - Desorpsiyon kaynaklı kütle spektrometreleri uçucu olmayan ve termal olarak kararsız maddelere uygulanabilir.

Tablo 3.2. Moleküler kütle spektroskopide kullanılan iyon kaynakları [27].

Temel Tip	Adı ve Kısaltılması	İyonlaştırıcı
Gaz fazı	Elektron impakt (EI)*	Enerjik elektronlar
	Kimyasal iyonlaştırmalı (CI)	Reaktif gaz iyonları
	Alan iyonlaştırma	Yüksek potansiyelli elektrot
Desorpsiyon	Alan desorpsiyonu (FD)	Yüksek-potansiyelli elektrot
	Elektrosprey iyonlaştırma (ESI)	Yüksek elektrik alanı
	Matriks yardımcı desorpsiyon/iyonlaştırma (MALDI)	Lazer demeti
	Plazma desorpsiyonu (PD)	²⁵² Cf'nin fisyon ürünleri
	Hızlı atom bombardımanı (FAB)	Enerjik atom demeti
	İkincil iyon kütle spektrometri (SIMS)	Enerjik iyon demeti
	Termospray iyonlaştırma (TS)	Yüksek sıcaklık

3.2.1.1. Gaz Fazı İyon Kaynakları

3.2.1.1.1. Elektron İmpakt Kaynağı

Bu yöntemde, örnek yeterince buharlaşabilecek bir sıcaklığa getirilir ve enerjik elektronlarla bombardıman edilerek iyonlaştırılır. Şekil 3.7' de bir elektron impakt kaynağının yapısı görülmektedir. Elektron impakt kaynağındaki bazı tipik reaksiyonlar Tablo 3.3' te görülmektedir.

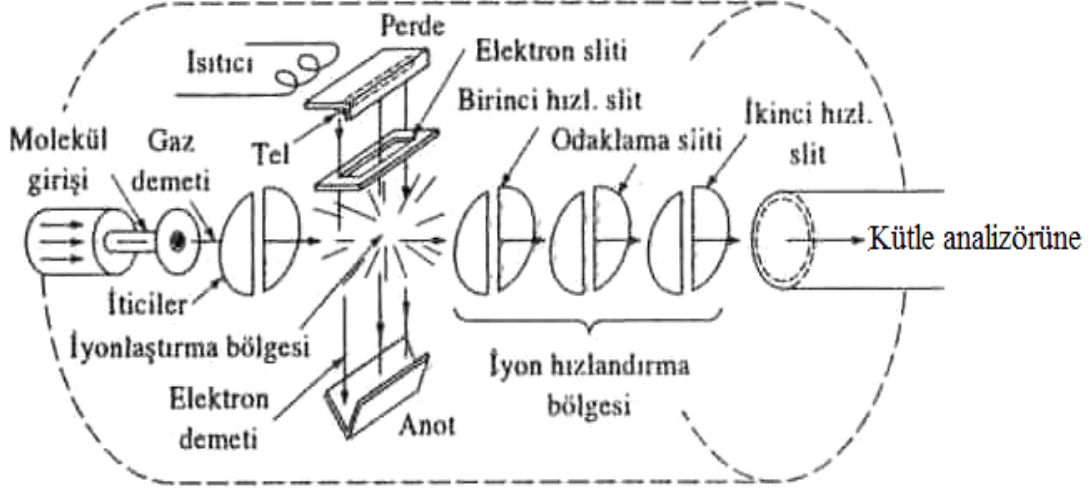
Bu yöntemde;

➤ Bazı moleküllerde parçalanma yüzünden moleküler iyon oluşmayabilir. Bu yüzden de analitin tanınması için birinci derecede önemli olan mol kütlesi tespit edilemez.

➤ Elektron impakt spektrumlarında temel pik genellikle parçalanma ürünlerinin arasından çıkar ve bu moleküler iyon piki değildir.

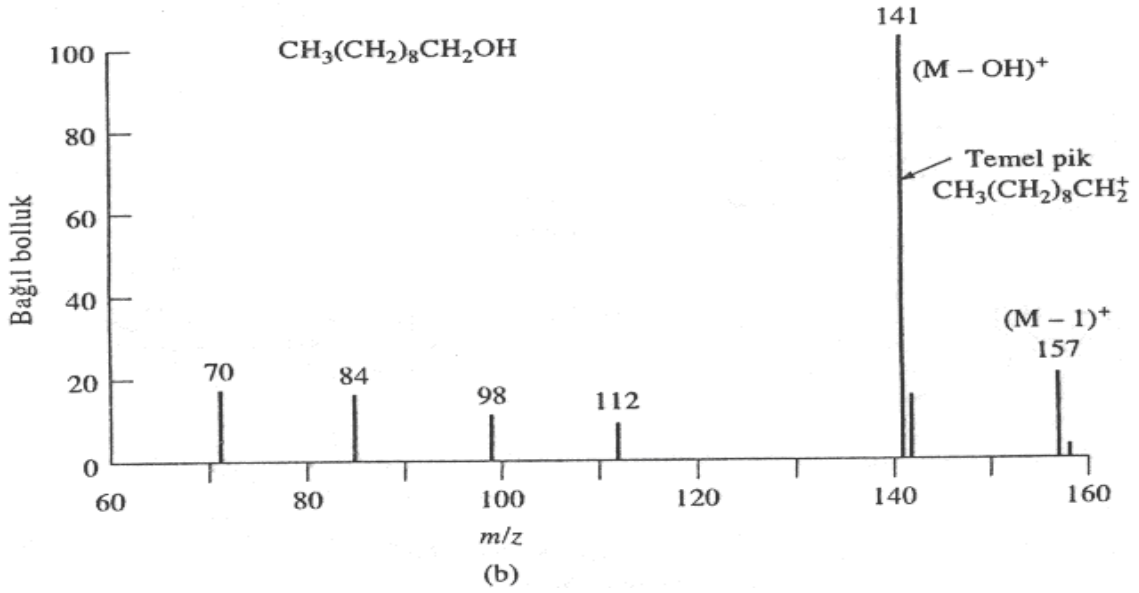
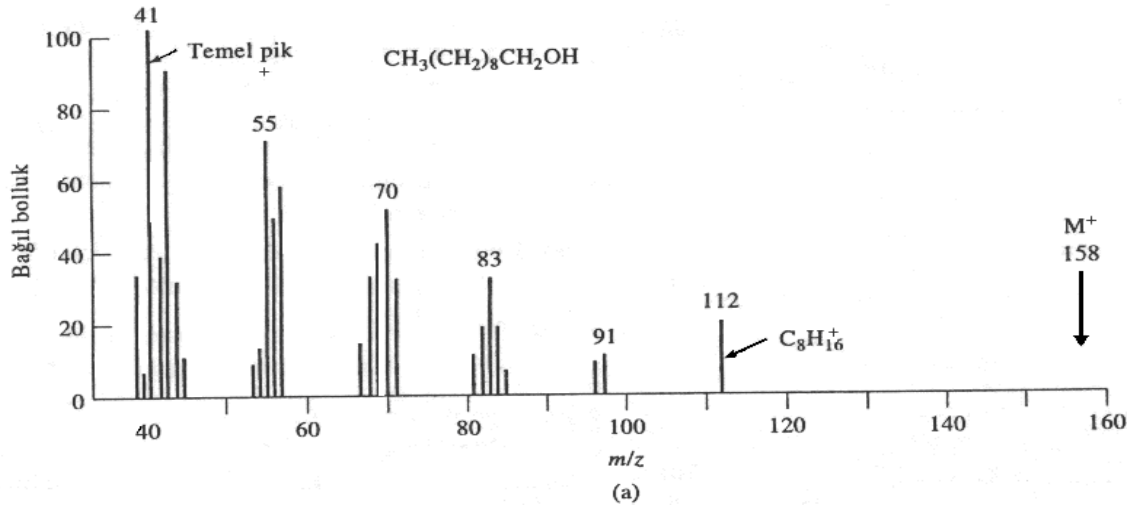
➤ Elektron impakt kaynakları yüksek iyon akımı üretmek için uygundur ve bu nedenle duyarlılıkları iyidir.

➤ Bu yöntemde parçalanmalar çok sayıda olur ve çok sayıda pik görülür, bu durum analiz edilen maddenin şüpheli kısımlarının tanımlanmasında yardımcı olur.



Şekil 3.7. Elektron-impakt kaynağının yapısı [27].

Elektron impakt kaynaklarının kullanımının dezavantajı, örneğin buharlaştırılmasıdır. Bazı örneklerde iyonlaşmadan önce termal bozulma olayı gözlenir. Bazı durumlarda ise piklerden bazıları moleküler iyon pikinden daha büyük olur. Bu pikler, aynı kimyasal formüle sahip olmasına karşılık farklı izotop bileşimlerinden dolayı ortaya çıkar. Ayrıca iyon/molekül çarpışmaları moleküler iyonun kütesinden daha büyük kütlede piklerin meydana gelmesine sebep olabilir. İyon kaynakları sert kaynaklar ve yumuşak kaynaklar olarak sınıflanır. Sert kaynaklar yeterli enerjiyi analit moleküllerine aktaran ve molekülleri yüksek enerjili uyarılmış hüllere çıkaran kaynaklardır. Bu moleküllerin durulması bağların kopması şeklinde olur ve kütle/yük oranı moleküler iyonunkinden daha küçük iyonlar ortaya çıkar. Yumuşak kaynaklar analitin daha az parçalanmasına sebep olur. Bunun sonucunda elde edilen kütle spektrumlarında moleküler pik çoğu zaman görülür ve bunun yanında birkaç başka pik bulunur. Şekil 3.8' de görülen spektrum, kütle spektrumlarının genel sunuluş tarzını göstermektedir. Sert ve yumuşak iyon kaynaklarının her ikisinde analizlerde kullanılır. Sert kaynaklarla elde edilmiş bir spektrumda gözlenen çok sayıda pik fonksiyonlu grupların tiplerini belirlemede ve analitlerle ilgili yapısal bilgi, dolayısıyla yapı aydınlatmada kullanılır. Yumuşak kaynaklarla alınan spektrumlar ise analiz edilen molekül veya moleküllerin doğru olarak tayin edilmesinde yararlıdır.

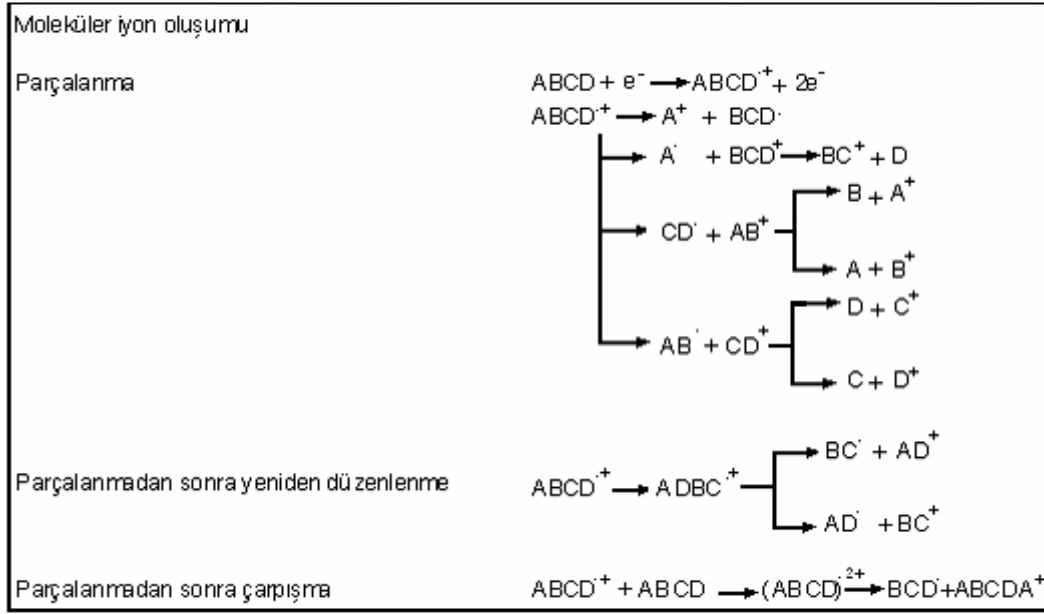


Şekil 3.8. Dekanol'ün (a) sert bir kaynakla ve (b) yumuşak bir kaynakla alınmış kütle spektrumları [27].

3.2.1.1.2 Elektrosprey İyonlaştırma

Elektrosprey iyonlaştırma atmosfer basıncında ve oda sıcaklığında gerçekleşir. Örnek çözelti, iğne şeklindeki bir kapiler ile bir dakikada birkaç mikrolitre pompalanır. İğneye etrafındaki elektrottan birkaç kilovolt potansiyel uygulanır. Oluşan çok küçük elektrik yüklü damlacıklar, daha sonra bir çözücü giderme kapilerinden geçer. Burada çözücü buharlaşır (elektrik yükleri örnek moleküllerine tutturulur). İyonlar gaz fazına desorbe olur.

Tablo 3.3. Bir elektron impakt kaynağındaki bazı tipik reaksiyonlar [27].



3.2.2. Kütle Ayırıcıları

Kütle spektrometresinde iyonlaşma bölgesinde elde edilen iyonlar, elektrikle yüklü plakalara doğru çekilerek hızlandırılır ve kütle ayırıcısına gönderilir. Kütle ayırıcısında kütle/yük (m/z) oranlarına göre hızlıca ayrılır. İyonların çoğu tek yüklü olduğundan, oran basitçe iyonun kütlesine eşittir. Çeşitli tipte kütle spektrometreler kullanılmaktadır.

Kullanılan kütle ayırıcıları;

1. Manyetik
2. Elektrostatik
3. Uçuş zamanlı
4. Dört kutuplu ve
5. İyon siklotron rezonanslı olmak üzere 5 türüdür.

En çok kullanılan kütle ayırıcısı manyetik ayırıcıdır. Vakum altında tutulan spektrometrenin içinde ayırıcıya giren pozitif yüklü hızlandırılmış iyonlar kütleleri ne olursa olsun yaklaşık aynı kinetik enerjiye sahiptirler. Manyetik alan içerisine giren bu iyonlar bu alan içinde doğrusal olan yollarından saptırılır ve dairesel bir yol izlemeye başlarlar. İyonların izledikleri bu yola ait dairenin yarıçapı r , iyonun kütle/yük oranına, (m/e), bağlıdır. İyonların m/e oranıyla manyetik alan şiddeti (B) ve iyonun manyetik alana göndermeden önce uygulanan hızlandırıcı elektriksel potansiyel değeri (E) arasında,

$$\frac{m}{e} = \frac{B^2}{2E} \cdot r^2 \quad 3.1$$

gibi bir bağıntı (3.1) vardır. Spektrometrenin dedektörüne ulaşan dairesel yolun yarıçapı değiştirilmediğinden, bu yolu izleyerek dedektöre farklı (m/e) değerine sahip iyonların ulaşması, sabit bir manyetik alan şiddetinde, hızlandırıcı gerilim değerini (E), değiştirmekle sağlanır. Aynı amaca, sabit bir E değerini kullanıp; B değerini değiştirerek de ulaşılır. Tek odaklamalı olan spektrometrelerde böylece çeşitli (m/e) değerlerine sahip iyonlar kaydedilerek örneğin spektrumları elde edilir ve

$$r_e = \frac{2E}{V} \quad 3.2$$

3.2 eşitliği ile belirlenir. Çift odaklamalı bu tür spektrometrede, istenilen kinetik enerjili iyonlar manyetik ayırıcıya gönderilir ve kütle spektrumunda pikler böylece daha büyük bir ayırıcılıkla elde edilmiş olur. Daha basit bir kütle ayırıcısı uçuş zamanlı ayırıcıdır. Kinetik enerjileri eşit iyonlar, farklı kütlelerde iseler, farklı hızlara sahiptirler. Farklı hız ve eşit kinetik enerjili vakum altında tutulan bir uçuş tüpünün diğer tarafında bulunan dedektöre farklı zamanlarda ulaşırlar.

Uçuş zamanı değerleri ölçülerek farklı (m/e) değerlerine sahip olan iyonlar kaydedilir. iyonların (m/e) değerleri ile uçuş zamanları arasındaki ilişki

$$\frac{m}{e} = \frac{2E}{d} \cdot t^2 \quad 3.3$$

3.3 eşitliği ile verilir. Burada E, iyonları hızlandıran gerilim değeri, d ise uçuş tüpünün uzunluğudur.

Dört kutuplu ayırıcı hızlandırıcıdan çıkarak bu ayırıcıya gelen iyonlar, bu dört silindirin ortasındaki boşluktan karşıdaki dedektöre doğru karmaşık bir yol izleyerek ilerlemeye çalışırlar. Bu ayırıcının kullanılması ile ekonomik ve hızlı bir biçimde ölçüm yapılır (Şekil 3.9).

İyon siklotron rezonans ayırıcısı adını alan ve dikdörtgen prizması şeklindeki bir başka tür ayırıcıda, iyonların hızlandırıcıdan çıkarak ilerledikleri yola dik yönde bir manyetik alan ile hem iyonların ilerleme yönüne hem de uygulanan manyetik alana dik yönde bir alternatif elektriksel alan birlikte uygulanır. İyonlar bu ayırıcının içinde dönerek ilerlerler ve iyonların bu kabın çeperlerine çarpması, kaba ayırıcı sabit bir gerilim uygulayarak önlenir.

Bir kütle ayırıcısının ayırıcılığı, R,

$$R = \frac{m}{\Delta m} \quad 3.4$$

3.4 eşitliğindeki formül ile hesaplanır.

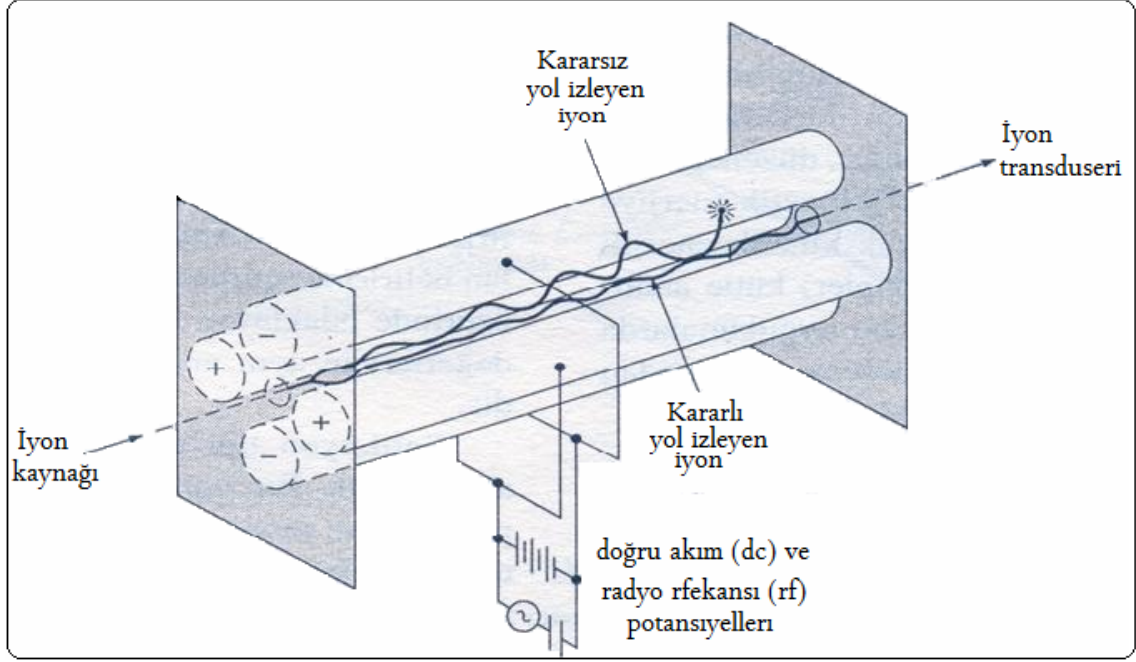
Ayırıcılığı 3000 olan bir ayırıcı, kütlesi 3000 ile 3001 olan iki iyonu pik yüksekliklerinin en çok yüzde 10' u kadar birçok çakışma ile birbirinden ayırıyor demektir.

Tek odaklamalı manyetik ayırıcısı olan aletlerle 2000-5000 değerleri arasında bir ayırıcılık elde edilir. Ayırıcılık, çift odaklamalı, yani elektrostatik ve manyetik ayırıcıları ardarda kullanan spektrometreler ile 20000-50000 değerlerine yükseltilebilir. Uçuş zamanlı kütle ayırıcısı ile elde edilen ayırıcılık değeri 500, dört kutuplu ayırıcı ile elde edilebilen ise 1500 civarındadır. Birçok organik molekülün tanımlanabilmesi için 500-1500 arasındaki ayırıcılık yeterlidir. İyon siklotron rezonans ayırıcısı ile özellikle pulslu uygulamalarda elde edilen ayırıcılık değeri ise çok büyük olup, 100000-1000000 değerine ulaşabilir.

Hem moleküler hem de atomik kütle spektrometrelerinde iyonları algılamak üzere kullanılan dedektörlerin en basiti "faraday kabıdır". Bu dedektörlerde bir iletken kap, spektrometrenin öteki kısımlarına göre negatif bir potansiyelde tutulur ve böylece bu kaba doğru çekilen pozitif yüklü iyonlar elektrik akımı oluştururlar. Kütle spektrometresinde kullanılan daha iyi bir dedektör türü "elektron çoğaltıcısı" adını alır. Bu düzenekte detektöre çarpan pozitif yüklü iyonlar yüzeyden birkaç elektron fırlatılır ve bu elektronlar anotta tutularak elektrik akımına dönüştürülürler. "sintilasyon sayıcısı" adını alan bir başka dedektörde ise iyonlar lüminesans özelliğine sahip bir ekrana çarpar ve foton yayılmasına neden olurlar.

Oldukça sık kullanılan ve iyonları öteki dedektörlerdeki gibi teker teker değil, iyonların tümünü birden algılayan bir başka dedektör türü de "fotoğraf plakası" dır. Plakaya çarpan iyonlar kararmaya neden olur. Fotoğraf plakaları ile uzun poz süreleri kullanılarak duyarlılık artırılabilir ancak, plakaların banyo edilmesi zaman alıcı bir işlemdir. Fotoğraf plakaları daha çok nitel analizde kullanılır, çünkü bu plakalarda oluşan kararma miktarını nicel anlamda ölçmek her zaman hata getiren bir işlemdir.

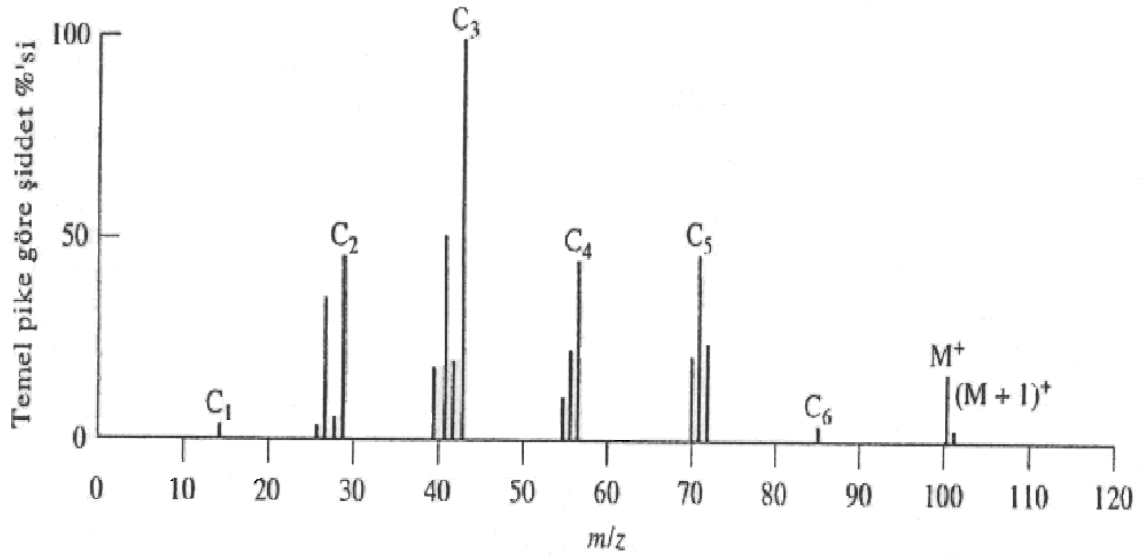
İyon siklotron rezonans ayırıcısı adını alan ve dikdörtgen prizması şeklindeki bir başka tür ayırıcıda, iyonların hızlandırıcıdan çıkarak ilerledikleri yola dik yönde bir manyetik alan ile hem iyonların ilerleme yönüne hem de manyetik alana dik yönde bir alternatif elektriksel alan birlikte uygulanır. İyonlar bu ayırıcının içinde dönerek ilerlerler ve iyonların bu kabın çeperlerine çarpması kaba ayrıca sabit bir gerilim uygulanarak önlenir.



Şekil 3.9. Dört kutuplu bir kütle ayırıcısı.

3.2.3. Kütle Spektrumlarının Karşılaştırılması ile Bileşiğin Tespit Edilmesi

Kütle spektrumlarında parçalanma şeklinden maddenin yapısı hakkında bilgi elde edebiliriz. Saf maddelerin parçalanma şekli üzerine yapılan sistematik çalışmalar, parçalanma mekanizmaları üzerine mantıksal değerlendirmeler, spektrum yorumlanmasına yarayan bir dizi genel kuralın ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bir spektrumda tüm piklerin sayılması her zaman mümkün olmamaktadır, hatta bu istenen bir durum da değildir. Bunun yerine parçalanmanın karakteristik şekilleri aranır. Örneğin, Şekil 3.10' daki spektrum, kütle farklılıkları 14 olan pik toplulukları şeklinde tanımlanabilir. Bu çeşit bir dizilim, düz zincirli alkanlar için çok tipiktir. Düz zincirli alkanlarda birbirine yakın karbon-karbon bağlarının kopmasıyla, kütlesi 14 birim olan CH_2 gruplarının yapıdan ayrılması sonucu bu spektrumlar ortaya çıkar. Genel olarak en kararlı hidrokarbon parçaları üç veya dört karbonlu parçalardır, bunlara karşılık gelen pikler en büyük piklerdir.



Şekil 3.10. n-Heptanal'in elektron impakt spektrumu. Pikler C₆, C₅, .. .C₁'e kadar, CH₂ eksilmeleriyle meydana gelen iyonların pikleridir [27].

Alkanlardaki parçalanma sonucu CH₂ grupları çıktığından dolayı pik grupları arasında 14 kütle birimlik fark çok karakteristik olarak şekildeki örnekte de görülmektedir.

Alkenlerde özellikle poliolefinik bileşiklerin moleküler piki belirgin olarak görülür. Halkalı olmayan alkenlerde spektrum çözülürken çift bağın yerini saptamak zordur. Çünkü parçalanma sırasında çift bağın yeri sürekli olarak molekül içinde yer değiştirir. Halkasız alkenlerde parçalanma grupları arasında alkanlardaki gibi 14 kütle birimlik (CH₂) fark görülür.

Arenlerde (aromatik halkalılar), aromatik halka moleküler iyonun kararlılığını artırdığından spektrumda miktarı yüksek olarak görülür. En fazla iyonun m/e 91'de görülmesi alkilenmiş benzenin olduğunu gösterir. En kolay en büyük süstitüent ayrılır. m/e 91'deki pik benzilik katyondan daha çok tropilyum iyonundan ileri gelir (C₇H₇⁺). Bu yapı kararlı olduğu için 91'deki pik çok şiddetlidir. m/e 65'de görülen pik ise tropilyum iyonundan nötr asetilen molekülünün ayrılmasıdır. Mono alkil benzenlerde ise α- yerinden kopma ve hidrojenin yer değiştirmesi sonucu karakteristik bir grup pik m/e 77 (C₆H₅⁺), 78 (C₆H₆⁺) ve 79 (C₆H₇⁺) görülür.

Karboksilli asitlerde ise en karakteristik pik m/e 60 iyonunun pikidir. Uzun zincirli asitlerde iki seri pik topluluğu ortaya çıkar; zincirdeki her C-C bağının kopması sonucu yük, oksijenli kısımda kalır (m/e 45, 59, 73, 87, 101, 115...) veya alkil grubunda kalır (m/e 29, 43, 57, 71, 85, 99, 113, 127). Böylece alkil grupları (m/e 27, 28; 41, 42;; 69, 70; 83, 84; 97, 98;....) bir seri pik daha verir. Fakat her grupta en büyük pik C_nH_{2n-1}O₂ 'ninkidir.

Aromatik esterlerde en fazla iyon (temel pik) OR ve COOR gruplarının ayrılması sonucu olur. Metil esterlerinde bu pikler M-31 ve M-59' da bulunur. Aromatik asitlerin metil

esterleri oldukça büyük moleküler iyon verir. Aynı koşullar altında analizi yapılan bileşikler daima aynı şekilde parçalanır. Örneğin, genel olarak en kararlı hidrokarbon parçaları 3 veya 4 karbonlu parçalardır.

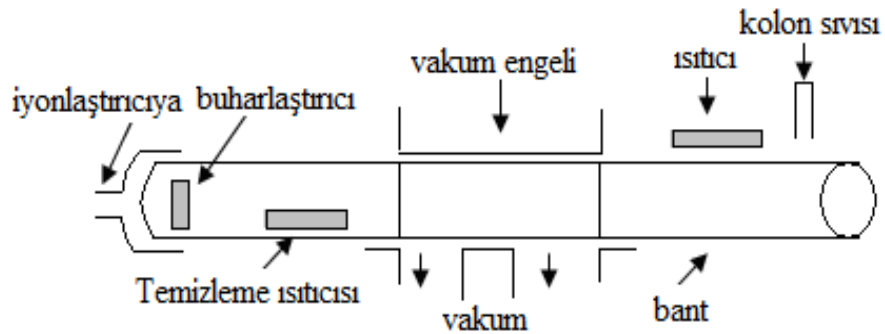
Bunlara karşı gelen pikler en şiddetli piklerdir. Alkollerin ise genelde moleküler iyon pikleri çok zayıftır veya hiç gözlenmez. Ancak alkoller çoğunlukla su kaybettiklerinde $(M-18)^+$ 'de şiddetli bir pik verirler. Primer alkollerde oksijenin yanındaki C-C bağının kopması sonucu CH_2OH^+ 'ya ait şiddetli bir pik gözlenir.

Ayrıca referans bileşiklerin kütle spektrumları varsa, bilinmeyen maddenin kütle spektrumunu, referans maddelerin kütle spektrumları ile karşılaştırılması ile madde tanınabilir. Farklı bileşiklerin aynı spektrumu verme olasılığı, spektral pik sayısı arttıkça belirgin şekilde azalır.

Kütle spektrum piklerinin yüksekliği ise; elektron ışınının enerjisi, örneğin ışına göre yeri, örneğin basıncı ve sıcaklığı, kütle spektrometrenin genel şekli gibi değişkenlere bağlıdır. Genellikle kaynama noktası yüksek, sıcaklığa dayanıksız maddelerin ayırımında kullanılan sıvı kromatografda da kütle spektrometresinin dedektör olarak kullanılması ayrı bir önem taşır.

Sıvı kromatografi kolonundan gelen sıvının kütle spektrometresine aktarılması sağlayan ara faz sistemi aşağıdaki sistemler kullanılmaktadır:

- Doğrudan sıvı enjeksiyonu
- Sürekli akışlı hızlı atom bombardımanı sistemi (FAB)
- Hareketli bant sistemi
- Termosprey
- Elektrospray
- Atmosferik basınçta kimyasal iyonlaştırma sistemi (APCI)



Şekil 3.11. LC/MS hareketli bant ara faz sistemi [26].

Tablo 3.4' te bazı LC/MS ara faz sistemlerinin (Şekil 3.11) karakteristikleri gösterilmiştir. Tabloda sistemler arası önemli farklar görülmektedir. Akış hızı, iyonlaştırıcı türü, tayin edilebilen minimum kütle ve minimum tayin sınırı tabloda verilmiştir.

Doğrudan sıvının enjekte edilebildiği sistemlerde kimyasal iyonlaştırıcı kullanılırken diğerlerinde farklı sistemlerin kullanılması gerekmektedir. Diğer taraftan hareketli bant sisteminde ancak kaynama noktası 170 °C olan maddelere uygulanabilmektedir. Ayrıca hareketli faz sistemi kompleks bir teknik sisteme sahiptir ve kullanılması zordur.

Tablo 3.4. Bazı LC/MS Ara Faz Sistemlerinin Karakteristikleri [26].

Özellik	Doğrudan enjeksiyon	Hareketli bant	Termosprey	APCI	Sürekli FAB
Hız (ml/dk)	0.01-0.05, 0.2-2.0	1-2	1-2	1-2	0.005-0.01
İyonlaştırıcı	CI	EI/CI/FAB	TSP/CI	APCI	FAB
Kütle aralığı (minimum)	130	50	120	150	-
Tayin sınırı (ng)	1-10	10-20	5-10	1-10	10-50

En çok kullanılan ara faz sistemi termospreydir. Ancak her madde için uygun değildir. Kimyasal iyonlaştırıcı (CI) kullanıldığı için fragmentasyon az olur ve madde yapısı hakkında yeterli bilgi sağlanamaz. Sonuç olarak şunu söyleyebiliriz: henüz sorunları çözülmüş bir LC/MS bağlantısı yapılabilmiş değildir.

3.2.4. Moleküler Kütle Spektrometrinin Uygulamaları

Moleküler kütle spektrometrinin uygulamaları çok geniş ve kapsamlıdır. Tablo 3.5' te, kütle spektrometrinin bu geniş kullanım alanına fikir vermek üzere, bu uygulamalardan bazıları listelenmiştir. uygulamalardan en çok rastlananlardan bazı önemli olanları verilmiştir.

Tablo 3.5. Moleküler Kütle Spektrometrinin Uygulamaları [26].

1. Organik ve biyokimyasal moleküllerin yapılarının aydınlatılması.
2. Peptitlerin, proteinlerin ve oligonükleotidlerin mol kütlelerinin tayin edilmesi.
3. İnce tabaka ve kağıt kromatografide ayrılan bileşiklerin tanınması.
4. Polipeptit ve protein numunelerinde amino asit dizilişinin tayini.
5. Kromatografi ve kapiler elektroforez ile ayrılan türlerin belirlenmesi ve teşhisi.
6. Zararlı ilaçların ve bu zararlı ilaçların metabolitlerinin kan, idrar ve tükürükte belirlenmesi.
7. Ameliyat sırasında hastanın nefesindeki gazların izlenmesi.
8. Yarış atları ve olimpik atletlerde doping kontrolü.
9. Arkeolojik numunelerin yaşlarının belirlenmesi.
10. Aerosol oluşturan partiküllerin analizi.
11. Yiyeceklerde pestisit kalıntılarının tayini.
12. Su kaynaklarında uçucu organik maddelerin izlenmesi.

3.3. Literatürde Flavonoidler ile İlgili Yapılan Bazı Çalışmalar

Souza ve arkadaşları Brezilya’ da halk arasında önemli miktarda kullanılan *Maytenus ilicifoliana* yapraklarındaki taninler ve flavonoidlerin (epiafzelechin, epicatechin ve epigallocatechin) karışımlarının analizini RP-C18 (ters fazlı C18 kolonu) kolonunu kullanarak HPLC/ESI- MS ve NMR cihazıyla yapmışlardır [1].

Bonaccorsi ve arkadaşları *Allium* (soğangiller familyası) türlerindeki (dört çeşit kuru soğan, 2 çeşit yeşil soğan ve sarımsak) flavonol glikosidlerini (kuersetin 3, 4 o-glukosit ve kuersetin 40-glukosit) HPLC–DAD–ESI-MS–MS ile karşılaştırmalı olarak çalışmışlardır. Soğan türlerinden beyaz soğanda flavonol içeriğini 7.0 mg/kg diğer türde ise 600-700 mg/kg gibi farklı değerler bulmuşlardır. Ayrıca örneklerin 1.0 g/kg’ ında kuersetin 3, 4 o-glukosit ve kuersetin 40-glukosit oranlarını da 10:1 olarak bulmuşlardır [9].

Volpi ve arkadaşları HPLC-elektrosprey kütle spektroskopisini kullanarak Çin, Azerbaycan, Etiyopya ve Kenya’ dan toplanan propolislerin etil alkollü ekstraktlarında kamferol, apigenin, krizin, asasetin ve pinocembrin gibi flavonoidlerin analizini yapmışlardır [11].

Rafael ve arkadaşları marul gibi yeşil salatalarda polifenollerden fenolik asitler, antosiyanidinler, flavonol ve flavonların, antioksidan özelliklerini 250x4 mm C 18 kolonu

kullanılarak HPLC-DAD-MS/MS ESI cihazı ile karakterize edip, bunlardaki C vitaminini tayin etmişlerdir [12].

Häkkinen ve arkadaşları 19 çeşit çilek türünde HPLC ile ODS-Hypersil 100x4 mm 3.5 mm çapında ve RP-18 10x4 mm 5 mm çapında farklı kolonlar kullanarak antioksidan ve antikanserojen etki gösteren kamferol, kuersetin, miyrisetin, p-kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit, p-hidroksi-benzoik asit, gallik asit, ellagik asit gibi bileşiklerin analizini yapmışlardır [13].

Häkkinen ve arkadaşları seçtikleri HPLC-ESI-MS (125x3 mm çapındaki LiChroCART kolonu ve 4x4 mm çapındaki LiChroCART kolonu) ve diode array UV dedektörünü kullanarak çilek türlerindeki flavonol aglikonları ve flavonol glikozidlerini tanımlamışlardır [14].

Häkkinen ve arkadaşları seçtikleri çilek ve vaccinium (kendiliğinden yetişen ve kültür bitkileri) türlerindeki flavonoller (kuersetin, miyrisetin and kamferol) ve fenolik asitlerin (ellagik, p-kumarik, kafeik and ferulik asit) içeriklerini HPLC –DAD (diyot-array) -UV ile analiz etmişlerdir [15].

Sultana ve arkadaşları seçtikleri 22 örnekte (5 meyve suyu, 9 sebze ve 8 tıbbi bitki) flavonol (kamferol, kuersetin, miyrisetin) konsantrasyonlarını ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi-ultraviyole (HPLC-UV) ile tayin etmişlerdir [16].

Zhanga ve arkadaşları *Adinandra nitidamun* yapraklarındaki flavonoidlerin (kuersetin, O-rhamnose, apigenin, rhoifolin, kamellianin A, kamellianin B) kalitatif ve kantitatif analizlerini Hypersil C18 kolonunu kullanarak 45 dakikada yüksek performanslı sıvı kromatografisi-UV dedektör-elektrosprey iyonlaştırma tandem kütle spektroskopisiyle yapmışlardır [17].

Ulla ve arkadaşları meyve suyu, sebzeler ve meşrubatlardaki flavonol, flavon ve flavanonların (apigenin, erioditiyol, hesperitin, isorhamnetin, kamferol, luteolin, miyrisetin, naringenin, phloretin, kuersetin), HPLC-PDA-MS ile kantitatif analizini yapmışlardır [18].

Karakaya ve El UV dedektörlü HPLC (HPLC-UV) kullanarak ısırgan otu, kuşburnu, adaçayı, ıhlamur çiçeği, siyah çay, mor havuç suyu, üzüm melası, bal ve tarhanada kuersetin, luteolin, apigenin ve kamferol içeriğini tayin etmişler. Siyah çay, ıhlamur çiçeği, adaçayı, kuşburnu, mor havuç suyu ve üzüm melasında kuersetin içerikleri sırasıyla 34.8, 21.7, 27.2, 16.7, 83.7 ve 1692 µg/lt olarak bulmuşlar. Tarhana ve ısırgan otunda kuersetin içeriği sırasıyla 5.92 ve 0.87 mg/100 gr olarak bulmuşlar. Kamferol içeriği olarak da siyah çay ve ıhlamur çiçeğinde 110 ve 113 µg/lt, ayrıca balda 2.42 mg/100 gr olarak bulmuşlar [4].

Vukics ve arkadaşları *Viola tricolor* L.' de ki flavonoid glikozitlerinin sıvı kromatografisi-çift kütle spektrometresi ile analizini yapmışlar. *Viola tricolor*' un metanollü ekstraktlarında flavonol o-glikosit, 9 flavon-C, glikosit ve 3-flavon c,o-glikositi karakterize

etmişler. Ayrıca altı aglikonun, apigenin, chrysoeriol, isorhamnetin, kamferol, luteolin ve kuersetini bulmuşlar [29].

Riberio ve arkadaşları Brezilya mango türlerinin fenolik bileşiklerinin içeriğini ve antioksidan kapasitelerini LC-ESI-MS cihazıyla analiz etmişler [30].

Lacopini ve arkadaşları kırmızı üzümde kateşin, epikateşin, kuersetin, rutin ve resveratrol içeriğini HPLC-UV ile analiz edip, bunların hücre içerisindeki (in vitro) antioksidan aktivitelerini ve etkileşimlerini incelemişler [31].

Özyürek ve arkadaşları modifiye edilmiş CUPRAC yöntemiyle fenolikler ve flavonoidlerin ksantin oksidazın inhibasyon aktivitesini UV-görünür bölge cihazıyla ölçmüşler [32].

Michalkiewicz ve arkadaşları HPLC cihazıyla, katı faz ekstraksiyonu ile fenolik asitlerin (gallik asit, vanilik asit, p-HBA, kafeik asit p-kumarik asit, syringik asit) ve bazı flavonoidlerin (kamferol, rutin ve kuersetin) tayinine çalışmışlar. Fenolik bileşikler için % verimi 40-101 arasında bulmuşlar. İhlamur balı için rutin, kuersetin ve kamferol içeriğini sırasıyla 5.0, 2.3 ve 1.7 mg/kg olarak, çalı balında ise yine sırasıyla 1.6, 0.4 ve 0.3 olarak tayin etmişler [33].

Meot-Duros ve Magne *Crithmum maritimum* L. bitkisinin yapılarındaki fenolik içeriğini (klorojenik asit) ve antioksidan özelliğini HPLC cihazıyla araştırmışlar [34].

Riihinen ve arkadaşları *Vaccinium myrtillus* (yaban mersini) ve *Vaccinium corymbosum* x *V. angustifolium*' da ki çiçek, yaprak, kök gövdesi, meyvenin kabuğu ve meyvenin etli kısmında fenolik bileşiklerin yani flavonoidler (antosiyeninler, proantosiyeninler, flavonoidler) ve hidroksisinnamik asitlerin dağılımını HPLC-DAD kullanarak analiz etmişler. *Vaccinium corymbosum*' nin çiçeklerinde kuersetin 1553 µg/gr, kamferol 198 µg/gr, meyvenin kabuğunda miyrisetin 31 µg/gr, kuersetin 531 µg/gr, meyvenin etli kısmında ve kök gövdesinde üç flavonoid de tayin sınırının altında, yeşil yapraklarda kuersetin ve kamferol sırasıyla 1784 ve 191 µg/gr, kırmızı yapraklarında yine sırasıyla 3530 ve 505 µg/gr olarak tespit etmişler. Yaban mersininde ise çiçeklerinde kuersetin 130 µg/gr, meyvenin kabuğunda miyrisetin ve kuersetin 47 ve 159 µg/gr, meyvenin etli kısımlarında miyrisetin ve kuersetin 3 ve 12 µg/gr, yeşil yapraklarında kuersetin ve kamferol 3369 ve 171 µg/gr, kırmızı yapraklarında ise kuersetin ve kamferol 10369 ve 244 µg/gr olarak tayin etmişler [35].

Novak ve arkadaşları elektrokimyasal dedektör ile ters-faz yüksek performanslı sıvı kromatografisiyle Portekiz kırmızı üzüm kabuklarının dört çeşidinden flavonoidlerin ultratitresimle (ultrasound) asidik metanolla ekstrakte ederek izokratik ve gradient elusyon tekniğini kullanmışlar. Kırmızı üzüm ekstraktları için mobil fazın akış hızını 1 ml/dk, pH' ını 2.20' ye, kolon sıcaklığını 40 °C' ye, enjeksiyon hacmini 50 µl' ye optimize edip enjekte etmişler. Mobil faz olarak su:metanol:formik asidin farklı oranlarını kullanmışlar (solvent

A=83:16:1, solvent B=68.5:30:1.5). İzokratik elüsyonda %100 solvent B, gradient elüsyonda %100 A ve %100 B' yi mobil faz olarak kullanmışlar. Rutin, kuersetin ve miyrisetin için elektrokimyasal dedektör kullanarak LOD değerleri sırasıyla 62.1, 44.2 ve 57.9 pg/lt, LOQ değerleri sırasıyla 29.1, 21.9 ve 49.8 ng/lt olarak tayin etmişler. Dört farklı üzüm çeşidinde flavonol konsantrasyonları rutin için 29.11-214.4 µg/gr, miyrisetin için nd-44.38 µg/gr, fesitin için nd-3000 µg/gr, kuersetin ve morin için nd (tayin sınırının altında) olduğunun tespit etmişler [36].

Arapitsas bamyaya tohumları ve kabuklarından HPLC/DAD-MS/MS cihazını kullanarak polifenolik bileşiklerin tanımlanmasını yapıp miktarını belirlemişler. Bamyaya tohumlarında flavonol türevlerini 3.4 mg/gr olarak tespit etmişler. Bamyanın kabuklarında ise kuersetin türevlerini 0.3 mg/gr olarak tayin etmişler. Mobil faz olarak pH 3.2' ye formik asitle ayarlanmış su (solvent A) ve asetonitril (solvent B) kullanılarak 0.2 ml/dk akış hızında, 27 °C kolon sıcaklığında, 3 µl enjeksiyon hacminde optimize edilen şartlarda ekstraktlar cihaza enjekte edilmiştir [37].

Figueirinha ve arkadaşları *Cymbopogon citratus* yapraklarında biyoaktif polifenollerin bir kaynağı olarak onların potansiyeli için HPLC-PDA (fotodiyod-array)-ESI/MS/MS ve bir yaklaşım tarzı ile flavonoidlerin karakterize edilerek, bunların radikalik reaksiyonları önlemeleri yani antioksidan özellikleri üzerine araştırma yapmışlar [38].

Simirgiotis ve arkadaşları HPLC-UV dedektör-kütle spektrometresini kullanarak papaya bitkisinin suyundan fenolik bileşiklerden rutin (kuersetin glikoziti) ve manghaslini tanımlamışlar. Spektroskopik yöntemleri kullanarak bunların yapılarını karakterize etmişler [39].

Kahoun ve arkadaşları yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile kolorimetrik-array ve UV dedektör kullanarak meads (mayalandırılmış bal ve sudan yapılan alkollü bir içki)' da ki fenolik bileşikler ve hidrosimetil furfuralın tayinini yapmışlar. Metodlarını hem fenolik bileşiklerin duyarlı olarak ayrılması hemde elektro-kimyasal dedektör ile maksimum duyarlılığını artırabilmek için optimize etmişler [40].

Olsen ve arkadaşları HPLC-DAD-ESI-MSⁿ ile karalahana bitkisinin kıvrık kıvrık olan kısmında kuersetin ve kamferolün glikozitlerini ve p-kumarik asit, ferulik asit, sinopik asit ve kafeik asit türevlerini içeren otuz iki fenolik bileşik sebzedeki fenolik bileşiklerin tümünün bir tanımlamasını içeren eski yayınları deneysel olarak teşhis etmişler. Farklı ekstraksiyon koşullarının etkisini incelemişler. Karalahana'daki toplam flavonol ve hidrosisisinnamik asit içerikleri sırasıyla taze ağırlık olarak 646 ve 204 mg/100 gr olduğunu bulmuşlar. Yalnız flavonoidlerin içeriği, (kamferol-3-sinapoyl-diglukosid-7-diglukosid (%18.7) ve kuersetin-3-sinapoyl-diglukosid-7-diglukosid (%16.5)), 2' den 159 mg/100gr' a kadar değişmekte olduğunu

tespit etmişler. Asidik hidrolizden sonra iki flavonol aglikonu karalahanada kuersetin ve kamferol toplam içeriği sırasıyla 44 ve 48 mg/100 gr olarak tayin etmişler [41].

Grzelak ve arkadaşları soğukta muhafaza edilen soğandaki kuersetin glikozitleri ve fruktooligosakkaritlerin içeriğini HPLC ile tayin etmişler. 2006-2007 yıllarında soğanın üç çeşidinde kuersetin glikosid içeriğini sırasıyla 1,381.6±123.1 ve 1,479.4±125.5 mg/100gr olduğunu kanıtlamışlar [42].

Huang ve arkadaşları HSCCC ile ultrasonik- mikrodalga yardımıyla ekstraksiyon yapmayı kullanarak *Anoectochilu roxburghii* Lindl içinde kuersetinin saflaştırılması işlemi için iki fazlı solvent sistemini n-hekzan:etilasetat:metanol:su (4:6:3:3, v/v/v/v) karışımı ile kullanmışlar. Kuersetinin yapısını ESI-MS, UV, FT-IR ve H¹NMR ile karakterize etmişler. HSCCC ayırma koşulları olarak LC' de kullanılan kolon Agilent Zorbax C18 kolonu ile oda sıcaklığında 1ml/dk akış hızında (mobil faz olarak %0.2 fosforik asit:metanol (50:50, v/v)), 20 µl enjeksiyon hacmini kullanarak 360 nm dalga boyunda ayarlama yaparak kuersetini tayin etmişler [43].

Qian ve arkadaşları HPLC-DAD ve MS ile Japon hanımelisindeki (*Flos lonicerae*) onüç biyoaktif bileşimin (iridoidler, fenolik asitler, flavonoidler) eş zamanlı kalitatif ve kantitatif tayinini gradient elüsyon tekniğiyle % 0.4' lük sulu asetik asit ve asetonytril kullanarak 1 ml/dk akış hızında 240 nm dalga boyunu da flavonoidler için kullanarak yapmışlar. Flavonoid içeriğini rutin için 0.775-1.120 mg/gr, kuersetin-3-o-glukoz için ise 0.131-0.331 mg/gr aralığında bulmuşlar [44].

Deng ve arkadaşları HPLC-UV/MS' in geçerli bir metodunu kullanarak noni yapraklarındaki flavonol glikozitleri ve aglikonlarının eşzamanlı karakterizasyonunu ve miktar tayinini etanolik ekstraktlar üzerinde 365 nm dalga boyunda ve ESI-MS negatif modunu kullanarak yapmışlar. Metanol içinde % 0.3 asetik asit ve su içinde %0.3 asetik asit mobil fazlarını kullanıp, 1 ml/dk akış hızında gradient elüsyon kullanarak, örneklerin her birini 20 µl enjeksiyon hacminde alıp ve 25 °C kolon sıcaklığında çalışılarak kuersetin, kamferol, rutin, kuersetin ve kamferol aglikonunun tayinini çalışmışlar. Flavonollerin tayin sınırını 0.012 µg/ml ve gözlenebilme sınırını da 0.165 µg/ml olarak tespit etmişler. Yüzde bağıl standart sapma açısından örneklerdeki kesinlik sırasıyla % 4.38 ve 3.50' de daha azdır. Yüzde verim açısından doğruluk %96.66' dan % 100.03 aralığındadır. Noni yapraklarındaki flavonoidlerin içerikleri kuru ağırlıkta 1.16 mg/100 gr' dan 371.6 mg/100 gr' a kadar değiştiğini tayin etmişler [45].

Yang ve arkadaşları yüksek performanslı sıvı kromatografisi-PAD/ESI-kütle spektroskopisi ile ekilen nilüfer taç yapraklarındaki antosiyaninler ve flavonollerin eş zamanlı analizini yapmışlar [46].

Barrington ve arkadaşları bağırsaklara ait olan CaCo-2/TC7 hücre kültürünü kullanarak HPLC cihazıyla kamferol ve galangin flavonoidlerinin absorpsiyonu, konjugasyonu ve atık olarak taşınmasını incelemişler [47].

Huang ve arkadaşları güneydoğu Amerikadaki Afrikalı Amerikalılar tarafından sıklıkla tüketilen sebzelerin fenolik bileşik içeriğini HPLC-MS cihazıyla incelemişler. Bamyacı, yeşil hardal, karalahana, patlıcan, fasulye, yeşil patates, semizotu vs. bitkilerde majör düzeyde bulunan isorhamnetin, kuersetin ve kamferol içeriklerini incelemişler. Semizotunda kuersetin içeriğini 1.3 mg/100 g, kamferol içeriğini 1.1 mg/100 g olarak tayin etmişler [48].

Michodjehoun-Mestres ve arkadaşları Amerikan elmasının monomerik fenollerini HPLC-DAD/ESI-MS kullanarak aseton:su (60:40) ile ekstrakte edilen örneklerin analizini yapmışlar [49].

Portet ve arkadaşları HPLC-APCI/MS kullanarak *Piper hostmannianum* var. *berbicense* bitkisinde minor flavonoidlerin analizini yapmışlar [50].

HPLC-MS ile bitki ekstraktlarında yapılan antioksidan ve benzeri yapıda polifenollerin tespitiyle ilgili çalışmalar tablo 3.6' da verilmiştir.

Tablo 3.6. Literatürde bitki ekstraktlarında yapılan polifenol tayini çalışmaları.

Bitki	Tayin edilen polifenol	Referans
Vitis vinifera L.)	Dihidro flavonoller, kuersetin türevleri ve kamferol türevleri	51
<i>Melissae herba</i>	Rosmarinik, <i>p</i> -kumarik, ferulik, kaffeik and klorojenik asit, kuersitrin	52
<i>Petroselinum crispum</i>	Apigenin ve apigenin türleri	53
<i>Fructus aurantii</i>	Tangeretin, nobiletin, hesperetin, naringenin, hesperidin, naringin	54
Yeşil çay	Kateşin ve epikateşin	55
<i>Portulaca oleracea</i> L.)	Antioksidan özelliği incelenmiş ve 3-kaffeoyl kuinik asit, 5-kaffeoyl kuinik asit polifenollerini tayin etmişler.	56
<i>Paeonia mascula</i> subsp. <i>arietina</i> , <i>Paeonia kesrouanensis</i> , <i>Paeonia peregrina</i>	Antibakteriyel özelliklerini incelemişler.	57
<i>Origanum vulgare</i>	Kuersetin, fisetin, kamferol, luteolin, apigenin, chrysin, eriodiktiyol, hesperetin, taksifolin, kateşin ve epikateşin	58

Tablo 3.6' nın devamı...

Beyaz üzüm türleri	Miyrisetin, miyrisetin-3-ramnoz, kamferol, kamferol-3-glukoz, kamferol-3-rutinoz, kuersetin, kuersetin-3-ramnoz, kuersetin-3-glukoz ve gallik asit	59
<i>Artemisia vulgaris</i>	Antioksidan aktivite ve toplam fenolik içeriğini incelemişler.	60
<i>Camellia sinensis</i>	kateşin, epikateşin, gallokateşin, epigallokateşin, epikateşin galat, epigallokateşin galat, epiafzeleşin gallat	61
<i>Andromeda polifolia</i> , <i>Thymus vulgaris</i> , <i>Filipendula ulmaria</i> , <i>Calluna vulgaris</i> ve <i>Rubus chamaemorus</i>	Antimikrobiyal etkilerini ve polifenol içeriklerini incelemişler.	62
<i>Vitis vinifera</i> ve <i>Vitis rotundifolia</i>	Farklı fenolik oluşumları incelemişler.	63
Propolis	3-Hydroxy-2,2-dimethyl-8-prenylchromane-6- ropenoic acid, 2,2-dimethyl-8-prenylchromene-6-propenoic acid, 2,2-dimethylchromene-6-propenoic acid, 2,2-dimethylchromene-6-karboklik asit, artepillin C, 4-dihydrosinamoyloks-3-prenylsinamik asit, 4-hidroksi-3-prenylsinamik asit, vanillin, koniferyl aldehit, isokupresik asit, 15-asetoksisokupresik asit, agathik asit, agathik asit 15-metil ester, agathalik asit, kupresik asit, tremetone, viskidon, kuersetin, sinamik asit	64
<i>O. fruticosa</i> , <i>O. natrix</i> subsp. <i>ramosissima</i> ve <i>O. tridentata</i>	Flavonlar; acerosin, agecorynin D, desmethylsudachitin, hymenoxin, nevadensin, pectolarigenin, sideritiflavone, xanthomicrol	65
<i>Heliotropium pycnophyllum</i> , <i>Heliotropium stenophyllum</i>	Apigenin, luteolin, trisetin, galangin, kamferol, kuersetin, pinosembrin, naringenin, erioditiyol	66
<i>Elma</i>	Antioksidan kapasitesini incelemişler, dihidrokalgonlar, flavan-3-oller, kuersetin	67
<i>Humulus lupulus</i>	Miyrisetin, kuersetin, kamferol	68
<i>Chromolaena squalida</i> ve <i>C. hirsuta</i>	kuersetagetin 3,6,7-trimethyl ether, kuersetin 3-O- α -L-rhamnosyl-(1-6)- β -Dgalactoside, kuersetin 3-O- α -L-rhamnoside, luteolin, kuersetin 3-methyl ether, kuersetin, 6-hydroxyluteolin-7-methyl ether, skutellarein 7-methyl ether, kuersetagetin 3,6-dimethyl	69

Tablo 3.6' nın devamı...

	ether, luteolin 7,3'-dimethyl ether, kuersetagetin 3,6,3'-trimethyl ether, 6-methoxyluteolin, luteolin 6,3'-dimethyl ether, kuersetagetin 3,6,7,3'-tetramethyl ether, 6-methoxyluteolin 7,3',4'-trimethyl ether	69
<i>Vitis vinifera</i> L.	Antosiyeninler ve flavonoller	70
<i>Trametes versicolor</i> L.	Kafeik asit, ferulik asit, syringik asit	71
Kırmızı şarap	Resveratrol, kuersetin, kateşin epikateşin, rutin	72
<i>Vaccinium arctostaphylos</i> L.	Benzoik asit türevleri, m-kumarik asit, p-kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit, sinapik asit	73
<i>Tilia rubra</i> ve <i>Tilia argentea</i>	Astragalın, kuersetin-3-7-dirhamnosid, isokuersitrin, rutin, kamferol-3-7-dirhamnosid	74
<i>Pistacia terebinthus</i>	Apigenin, luteolin, luteolin-7-o-glukosit, kuersetin, kuersetin-3-metil eter-7-o-glukosit,	75
16 üzüm türü	Toplam antosiyenin içeriği, toplam fenolik içeriği	76
<i>Phlomis</i> (Lamiaceae)	Forsythoside, verbascoside, samioside, alyssoniside, isoverbascoside, leucoceptosides A-B, martynoside	77
Şarap, kuşburnu, vişne suyu, yeşil çay, domates	Gallik asit, protokathekuik asit, p-hidroksi benzoik asit, vanilik asit, klorojenik asit, p-kumarik asit, ferulik asit, o-kumarik asit, trans sinnamik asit	78
	Flavonoidlerin anti-oksidan özelliklerini CUPRAC yöntemiyle incelemişler.	79
<i>Fagopyrum esculentum</i> Moench	Benzoik asit, 2-siklopenten-1,4-dion, 5-(hidroksimetil)furfural, isobutirik asit, 3-metoksikateşol, isovalerik asit, vanilin	80
<i>Zizyphus jujuba</i> , <i>Zizyphus spinachristi</i>	Kamferol, kuersetin, plorelin türevleri	81
<i>Teucrium polium</i> L.	Antioksidan özelliği incelenip, rutin, apigenin ve türevleri	82
<i>Melicoccus bijugatus</i>	Kateşin, epikateşin, epigallokateşin, gallik asit, elagik asit ve phloridzin	83
<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	Rutin, nikotiflorin, isokuersitrin, 4-hidroksibenzoik asit, syringic acid, vanilik asit	84
Ponkan ve Huyou	Protokatekuik, p-hidroksibenzoik, vanilik, kafeik, p-kumarik, ferulik, sinapik ve klorojenik asit,	85
<i>Rosa damascena</i> , <i>Rosa bourboniana</i> , <i>Rosa brunonii</i>	Antioksidan özelliklerini incelemişler. gallik asit, kafeik asit, kuersetin, kamferol, kateşin, epikateşin, kuersitrin, miyrisetin, rutin ve askorbik asit	86
Caco-2 cells	Tangeretin, wogonin, khrisin, apigenin, luteolin,	87

Tablo 3.6' nin devamı...

	kamferol, kamferid, tamariksetin, kuersetin, miyrisetin, morin, isokuersetin, rutin, hesperetin, naringin, epikateşin	
Vaccinium corymbosum ve Vaccinium myrtillus	Toplam fenolik asitler ve toplam antosiyaninler	88
<i>Oxalis tuberosa</i> Mol.	Vanilik, kafeik, sinamik asit, malvidin, kateşin, luteolin, apigenin ve naringenin	89
<i>Morus alba</i> L.	Klorojenik asit, kuersetin glikosid, rutin, isokuersitrin, astragalin, kuersetin 3-(6-malonilglukoz), kamferol 3-(6-malonilglukozit)	90
Liliaceae, celastraceae, fabaceae, brassicaceae, polygonaceae	Rutin, hiperosid, viteksin	91
<i>Allium cepa</i> L.	Kuersetin, kuersetin-4-glukosid, kuersetin-3,4'-diglukosid	92
<i>Lycopus lucidus</i>	Rosmarinik asit, ferulik, kafeik, klorojenik, vanilik, p-hidroksibenzoik, p-kumarik asitler	93
<i>Glycine max</i> (soybean)	İsoflavon, genistein, daidzein	94
Brassicaceae	Gallik asit, kamferol ve kuersetin glikozitleri	95
<i>Eruca vesicaria</i> ve <i>Diplotaxis tenuifolia</i>	Kuersetin türevleri	96
<i>Apocynum venetum</i> L.	Kuersetin glikozitleri	97
<i>Ginko biloba</i>	Kuersetin dihidrat, kamferol, isorhamnetin, rutin	98
Brezilya' daki yazlık ve kışlık sebzeler	Kuersetin, kamferol, apigenin	99
<i>Rheum rhabarbarum</i> L. ve <i>Rheum rhaponticum</i> L.	Resveratrol, rutin, kuersetin-3'-o-b-d-glukopiranosit, kateşin	100

3.4. Bazı Analitik Terimler

Hatalar: Deneysel hatalar sistematik ve rastgele olarak sınıflandırılabilir. Sistematik hatalar belirli hata olarak adlandırılırlar ve düzeltilebilirler. Rastgele hatalar ise belirsizdir ve düzeltilemezler, analiz sırasında sınırlama getirirler.

Mutlak Hata: Ölçümle ilgili belirsizliğin sınırlarının bir ifadesidir.

Bağıl Hata: Mutlak hata büyüklüğünün ilgili ölçümün büyüklüğü ile karşılaştırılmasının ifadesidir.

Mutlak hata = Doğru değer - Ölçüm değeri

Bağıl hata = Mutlak hata / Ölçüm değeri

Standart Sapma (S): Verilerin ortalama değeri etrafında hangi yakınlıkta kümelendiklerinin ölçüsüdür.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - x_{ortalama})^2}{n - 1}} \quad 3.5$$

Standart sapma ne kadar küçük ise veriler ortalama etrafında o kadar merkezlenmiştir.

Gözlenebilme Sınırı (Limit of Detection) (LOD): Kullandığımız alet ile belirleyebildiğimiz minimum derişim değeri. Bu ifade farklı aletlerin performanslarının karşılaştırılmasında kullanılmaktadır. IUPAC tarafından gözlenebilme sınırının belirlenmesi için aşağıdaki eşitlikler verilmiştir.

$$\%RSD = \left(\frac{s}{x_{ortalama}}\right) * 100 \quad 3.6$$

$$TS (LOD) = \frac{3 s}{m} \quad 3.7$$

m: Çizilen kalibrasyon eğrisinin eğimi

Tayin sınırı (Limit of Quantification) (LOQ) : Kullandığımız alet ile belirleyebildiğimiz minimum madde miktarı değeri. Bu ifade farklı aletlerin performanslarının karşılaştırılmasında kullanılması yanında analiz sonrasında elde edilen sonucun doğruluğunu da yansıtmaktadır. IUPAC tarafından tayin sınırının belirlenmesi için aşağıdaki eşitlikler verilmiştir.

$$\% RSD = \left(\frac{s}{x_{ortalama}}\right) * 100 \quad 3.8$$

$$TM (LOQ) = \frac{10 s}{m} \quad 3.9$$

m: Çizilen kalibrasyon eğrisinin eğimi.

4. MATERYAL METOT

4.1. Kullanılan Cihazlar ve Cam Malzemeler

Çalışmada Agilent 1200 HPLC ve 6110 quadropol MS dedektörü birlikte kullanılmıştır. MS için uygulanan şartlar Tablo 4.1' de verilmiştir. Kullanılan diğer yardımcı malzemeler şunlardır,

1. Ultra saf su cihazı (Millipore, direct-Q)
2. Etüv (Quapac-Ec)
3. Elektronik terazi (Gec-Avery)
4. Santrifüj (Hettich EBA III)
5. Enjeksiyon Filtresi
6. Isıtıcı karıştırıcı
7. Tek kullanımlık şırınga
8. Vial tüp
9. Değişik büyüklükte pipet, beher, balon joje, mezür vb cam malzemeler.

Tablo 4.1. MS parametreleri için uygulanan şartlar.

Kurutucu gaz akışı (L/dk)	6.0
Nebulizer basıncı (psi)	60
Kurutucu gaz sıcaklığı (°C)	300
Buharlaştırıcı sıcaklığı (°C)	500
	Pozitif Mod
Kapiler akım (V)	4000
Kıvılcım voltajı (µA)	6.0

4.2. Kullanılan Standart Çözeltiler ve Reaktiflerin Hazırlanması

Standart çözeltiler; kullanılan flavonollerin (kuersetin, kamferol ve miyrisetin) HPLC saflıkta 500 ppm' lik stok çözeltileri hazırlandı. Bu bileşenlerin hem stok çözeltileri hem de ara stok çözeltileri asetonitril (ACN) içinde hazırlandı. Bu çözeltilerden 0.1-100 ppm aralığında farklı konsantrasyonlarda çözeltiler ACN içinde hazırlandı.

Mobil faz: Su/metanol/asetonitril/formik asit karışımı (52:42:5:1) kullanıldı. Bu çözücüler de HPLC saflıktadır [14, 15, 16, 17].

6 M HCl' in hazırlanması: % 37' lik yoğunluğu 1.19 gr/ml ekstra pure HCl (Merck 100317) ten 49,74 ml alıp 100 ml' ye tamamlanarak 6 M HCl çözeltisi hazırlandı. 6 M HCl' den ise 20 ml alınıp 100 ml' ye tamamlanmasıyla 1.2 M HCl çözeltisi hazırlandı [16].

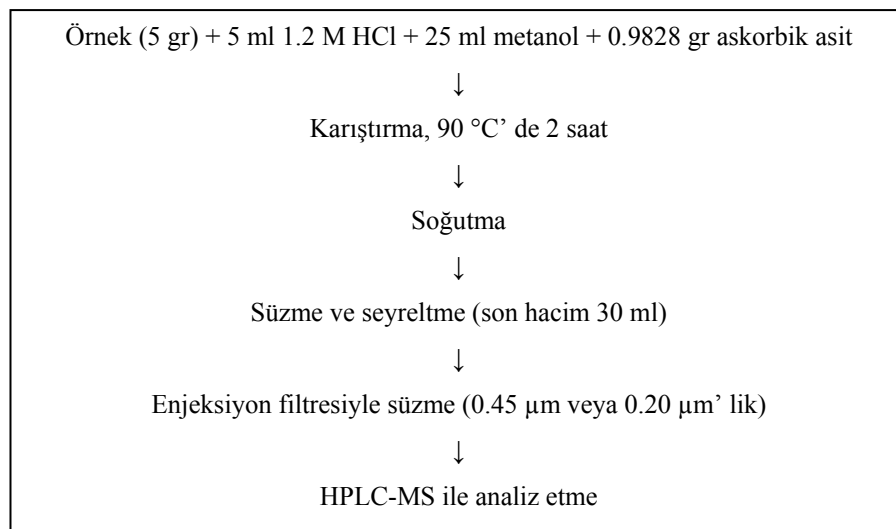
Askorbik asit: HPLC saflıkta (Merck) katı olarak kullanıldı.

4.3. Örneklerin Temini

Elazığ ve yöresinden toplanmış olan ısırgan otu, semizotu ve kuşburnu örnekleri, ayrıca aktardan alınan menengiç örnekleri normal saf suyla yıkandıktan sonra oda sıcaklığında kurutuldu. Daha sonra homojenize edilen (öğütülen) örneklere analizden önce aşağıdaki ekstraksiyon yöntemleri uygulandı.

4.4. Bitki Örneklerinin Ekstraksiyonu

Homojenize edilmiş olan bitki örnekleri (semizotu, ısırgan otu, kuşburnu ve menengiç: 5 g) 1.2 M HCl' den 5 ml, 25 ml metanol, 0.9828 gr askorbik asit eklenerek 2 saat 90 °C' de düzenli karıştırıldı. Soğutulduktan sonra adi süzgeç kağıdıyla ekstraktlar süzüldü. Süzülen ekstraktlar dolapta analiz için bekletildi (son hacim 30 ml). Analizden önce 0.45 µm (menengiç ekstraktları 0.20 µm) enjeksiyon filtresiyle süzülen ekstraktlar HPLC-MS cihazına enjekte edildi. Uygulanan ekstraksiyon basamakları Şekil 4.1' de verilmiştir.



Şekil 4.1. Ekstraksiyon yönteminin basamakları.

4.5. Flavonollerin Tayininde HPLC-MS' in Koşullarının Optimizasyon Çalışmaları

Bu amaçla çalışılan her bir bileşik için optimum şartlar ayrı ayrı belirlendi. Yine bu çalışmalarda bir parametre değiştirilirken, diğer parametrelerin optimum olarak bulunan değerleri kullanıldı.

4.5.1. Miyrisetin Tayini için Optimum Koşulların Tayini

Hazırlanan 25 ppm lik miyrisetin standart çözeltileri kullanılarak optimum şartlar tayin edildi. Öncelikle cihazın optimum mobil faz akış hızı tespit edildi. Bu amaçla, 0.2-1.0 ml/dk akış aralığında yapılan deneysel çalışmalarda elde edilen kromatogramların pik simetrisi ve alan değerleri karşılaştırıldı. Elde edilen kromatogramlardan (Şekil 4.2-4.3) 0.7 ml/dk'lık akış hızının optimum olduğu sonucuna varıldı. Bu nedenle bundan sonraki bütün deneysel çalışmalarda miyrisetin için bu akış hızı (0.7 ml/dk) kullanıldı.

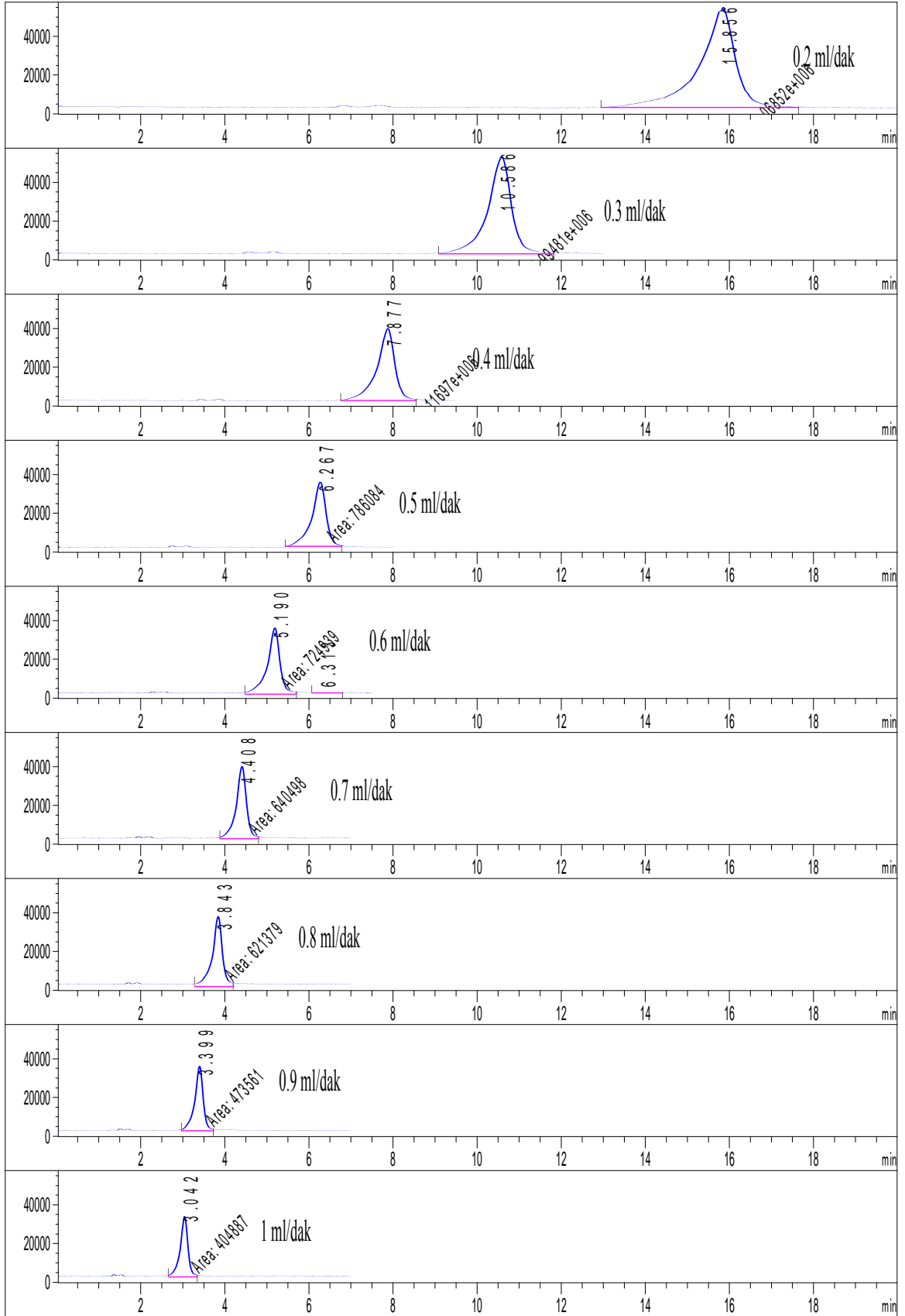
En iyi fragmentor voltajını (parçalayıcı voltaj) belirlemek için yapılan çalışmalarda, 10-200 V aralığında (diğer parametrelerin optimum değerlerinde) yine 25 ppm lik miyrisetin çözeltileri kullanılarak kromatogramlar alındı. Pik simetrisi ve alan dikkate alındığında, miyrisetin için en uygun fragmentorün 170 V olduğu sonucuna varıldı (Şekil 4.4). Şekil 4.5' te fragmentor' a karşılık alan grafiğinde de görüldüğü gibi 170 V daki alan değerleri ve pik simetrisi en iyi olduğu için bundan sonraki bütün deneysel çalışmalarda miyrisetin için bu fragmentor voltajı kullanıldı.

En iyi enjeksiyon hacmini belirlemek için yapılan çalışmada, 5-40 µl aralığında örnek hacimleri denendi. Enjekte edilen örnek hacminin artmasına bağlı olarak alan pik simetrisinde belirgin bir bozulma gözlemlendiğinden, pik simetrisinin en iyi olduğu 5 µl enjeksiyon hacmi optimum olarak kabul edildi (Şekil 4.6-4.7).

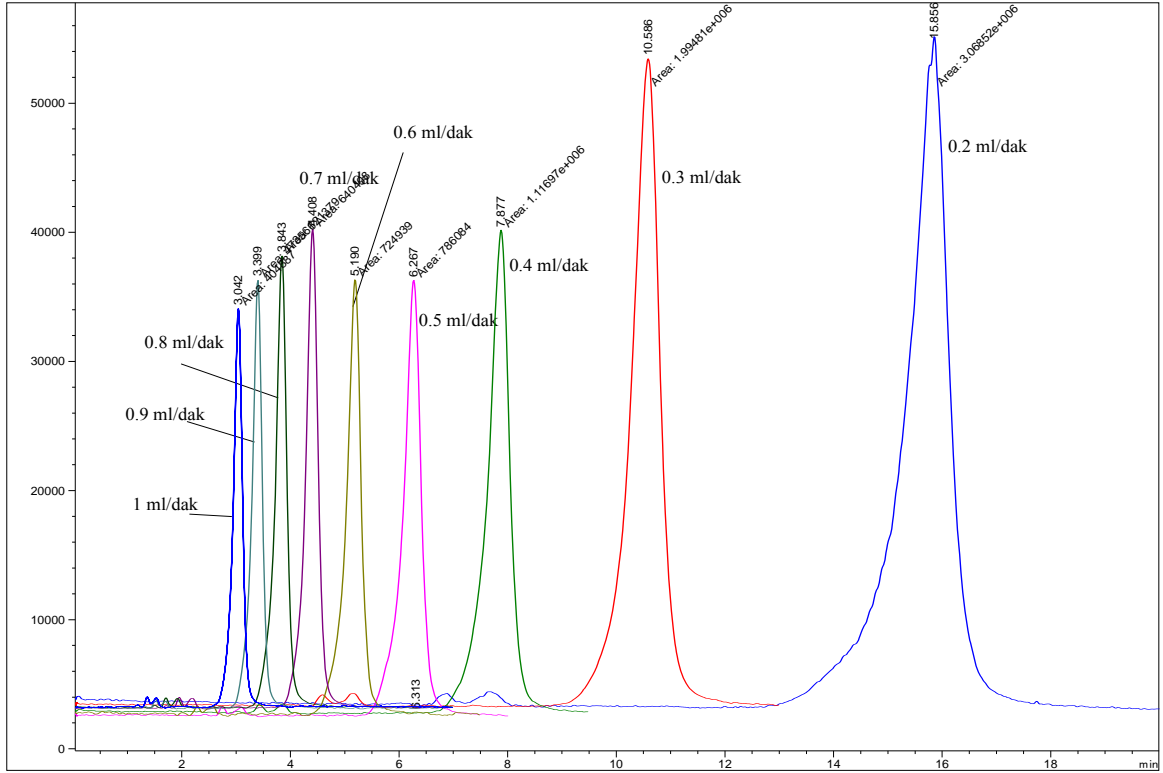
Uygun kolon sıcaklığının tayini için 20-55 °C aralığında aynı derişimdeki miyrisetin çözeltilerinin kromatogram ve spektrumları alındı (Şekil 4.8-4.9). Kolon sıcaklığı artışının pik çıkış süresini azalttığı açıkça görülmektedir.

Nicel analizde kullanılmak üzere çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan miyrisetin çözeltileri için optimum şartlarda elde edilen kromatogramlar Şekil 4.10-4.13' te verilmiştir. Bu kromatogramlardan da anlaşılacağı gibi standart maddenin konsantrasyonunun artması ile zemindeki gürültülerin bastırıldığı ve piklerin daha sade olduğu görülmektedir. Şekil 4.14-4.17' da standartların kalibrasyon grafikleri verildi. Bu şekillerden de görüldüğü gibi 0.2-10 ppm aralığında eğimleri birbirine çok yakın kalibrasyon eğrileri elde edilirken, 10-100 ppm aralığında az da olsa farklı eğime sahip ama yine doğrusal olan bir kalibrasyon eğrisi elde

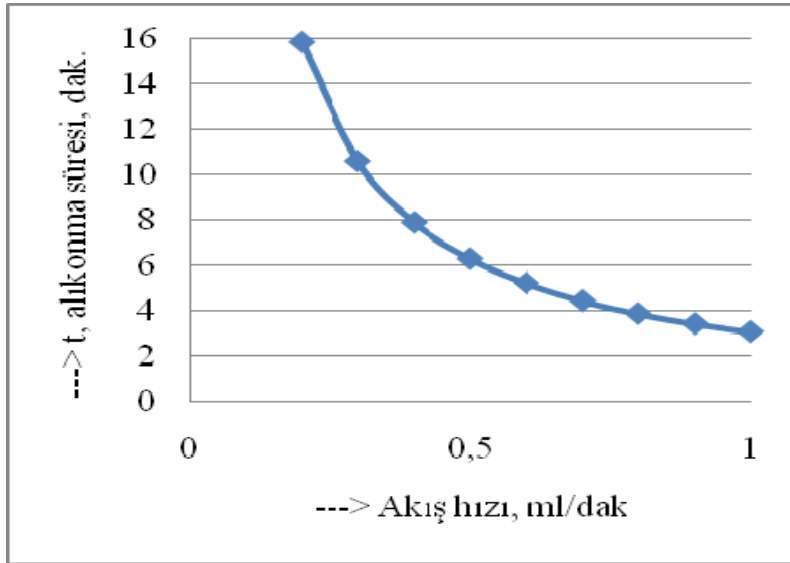
edilmiştir. Şekil 4.18’ de ise miyrisetin standardının MS spektrumu görülmektedir. Bu spektrumdan, miyrisetin molekülünden hidrojen iyonlarının ayrılması sözkonusudur.



Şekil 4.2. HPLC-MS ile miyrisetin tayini için en uygun akış hızının bulunması.



a)

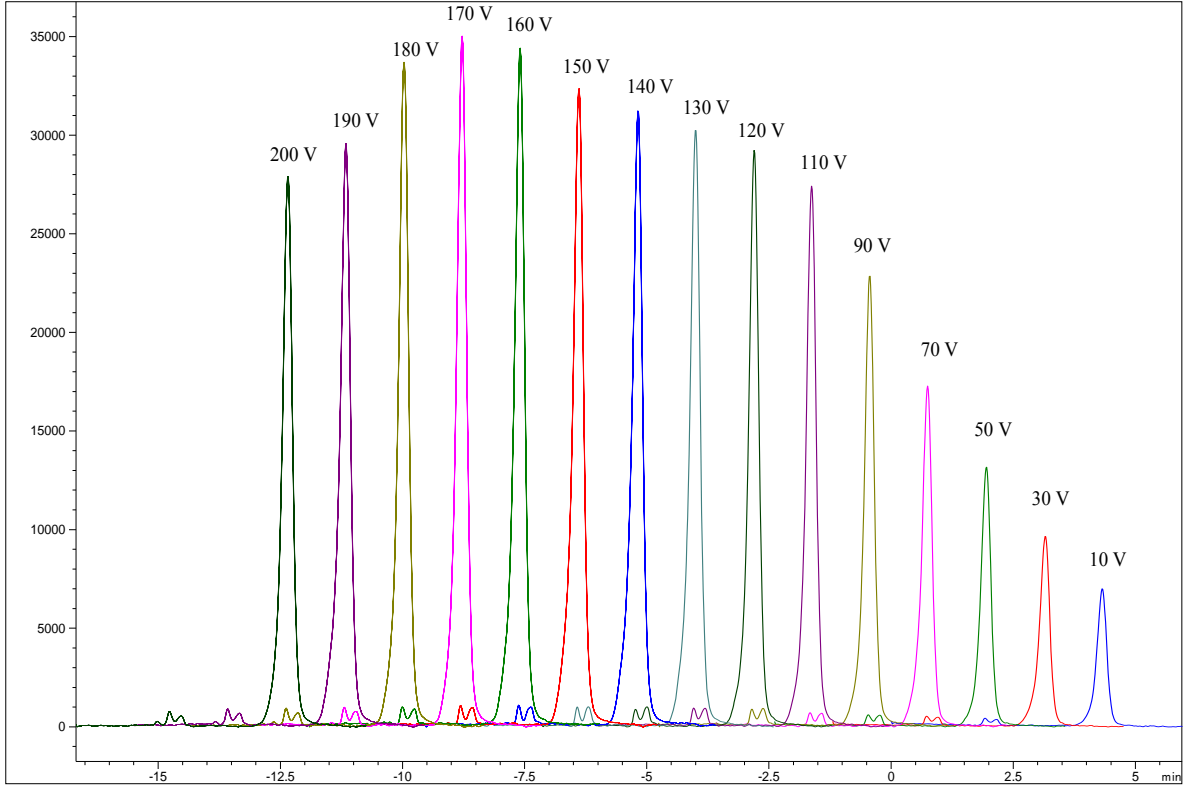


b)

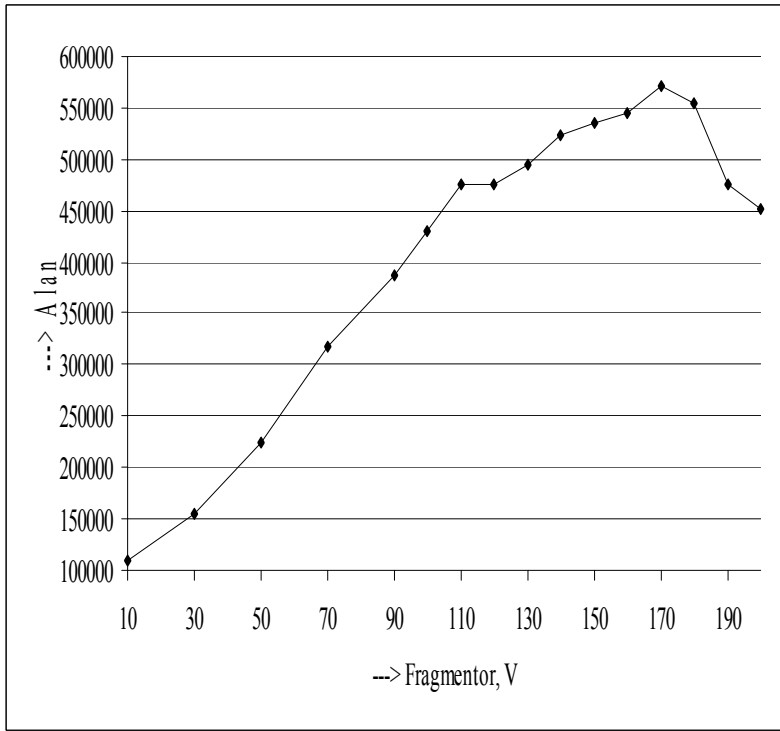
Akış hızı ml/dk	t Alıkonna süresi, dk
0,2	15,856
0,3	10,586
0,4	7,877
0,5	6,267
0,6	5,190
0,7	4,408
0,8	3,843
0,9	3,399
1	3,042

Şekil 4.3. HPLC-MS ile miyrisetin tayini için en uygun akış hızının bulunmasıyla ilgili

a) kromatogramların farklı gösterilişi ve b) akış hızına karşı alıkonna sürelerinin değişimi.

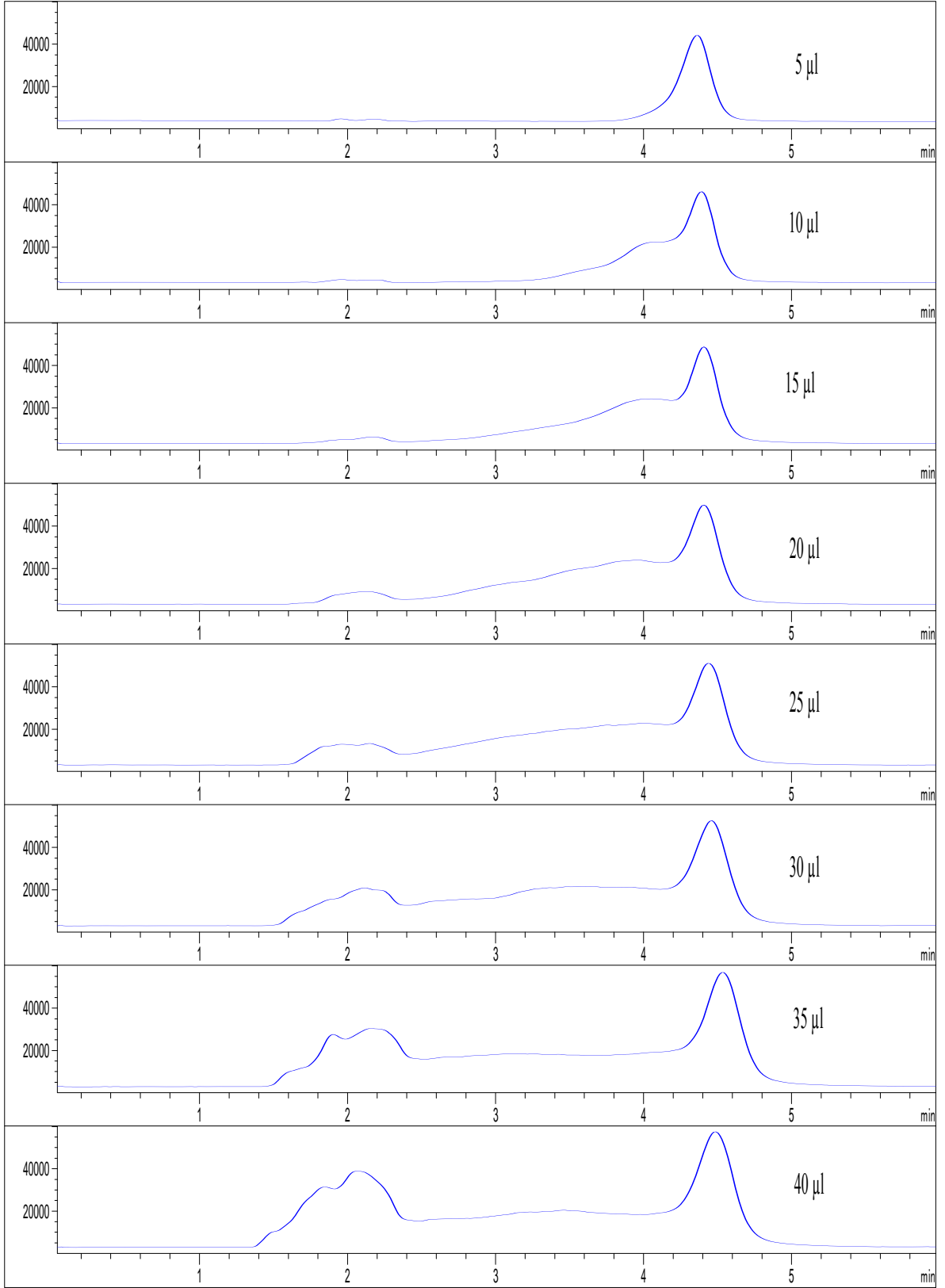


Şekil 4.4 HPLC-MS ile miyrisetin tayini için en uygun fragmentorün bulunması.

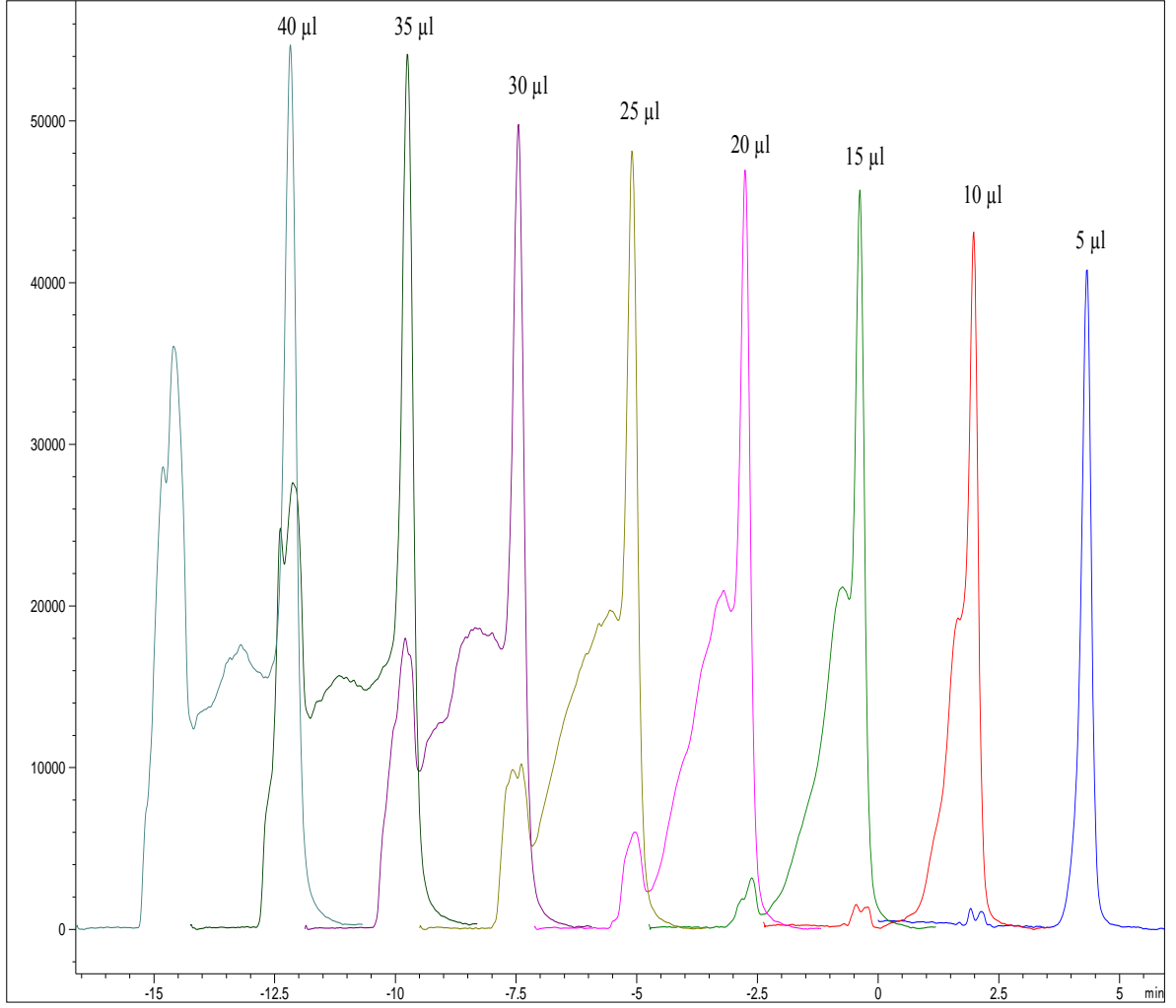


Şekil 4.5. HPLC-MS ile miyrisetin tayini için fragmentor-alan değişimi.

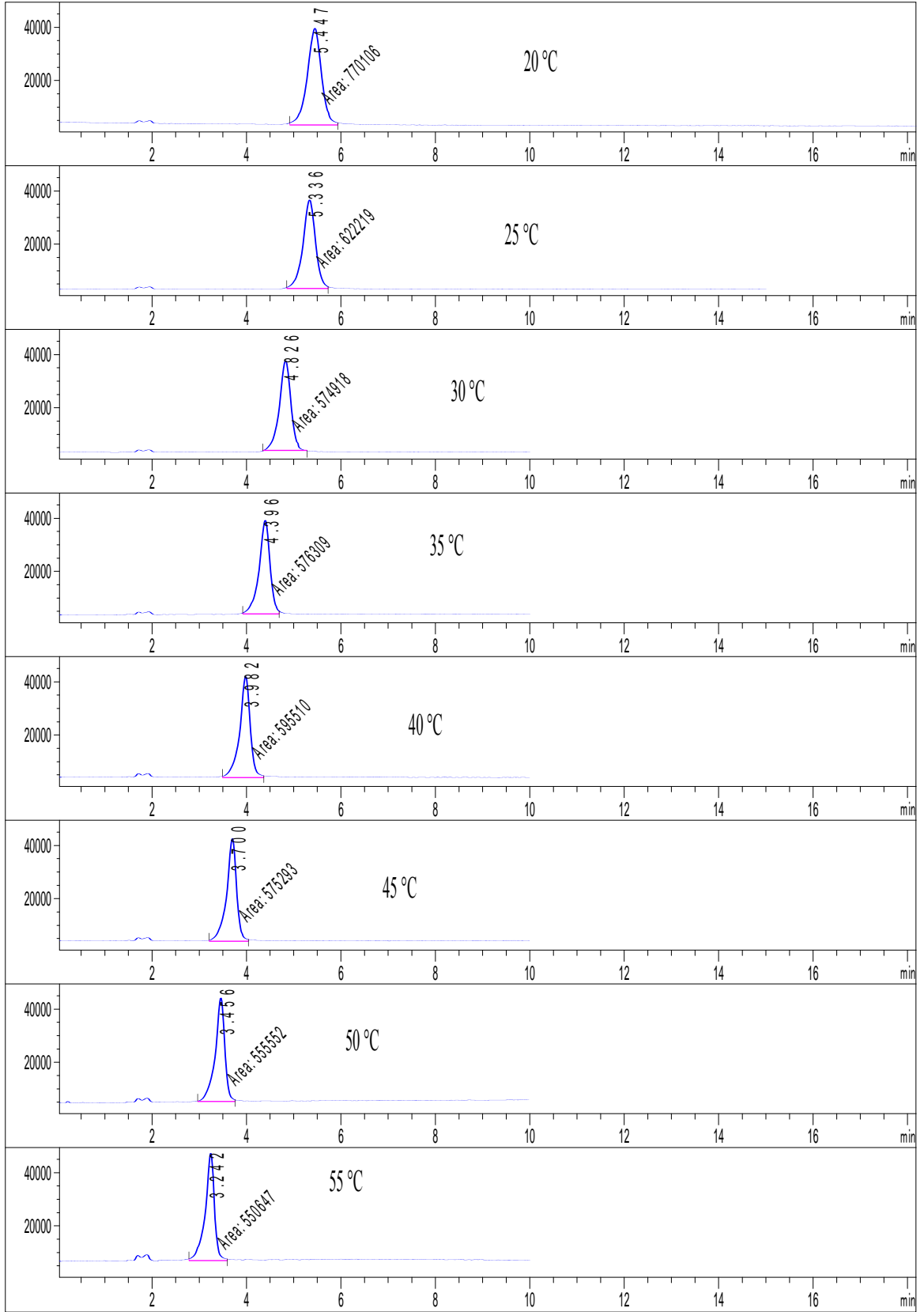
Fragmentor	Alan
10	110621
30	154664
50	225083
70	318486
90	387890
100	430270
110	475418
120	474879
130	494270
140	524115
150	535570
160	544920
170	570410
180	554052
190	476408
200	450668



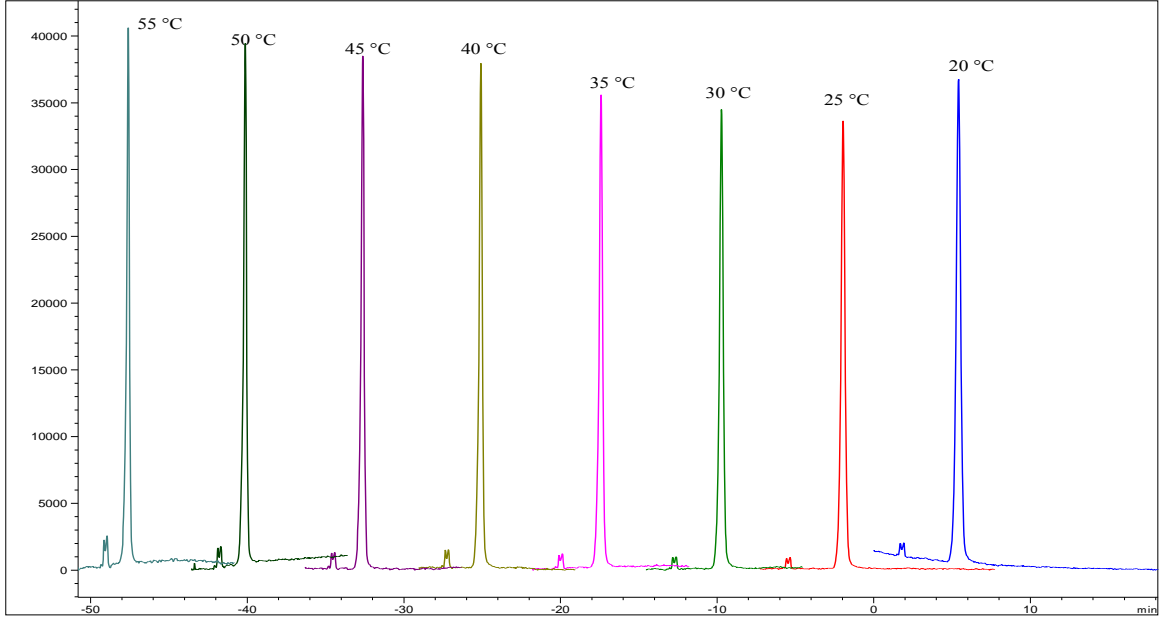
Şekil 4.6. HPLC-MS ile miyrisetin tayini için optimum enjeksiyon hacminin bulunması.



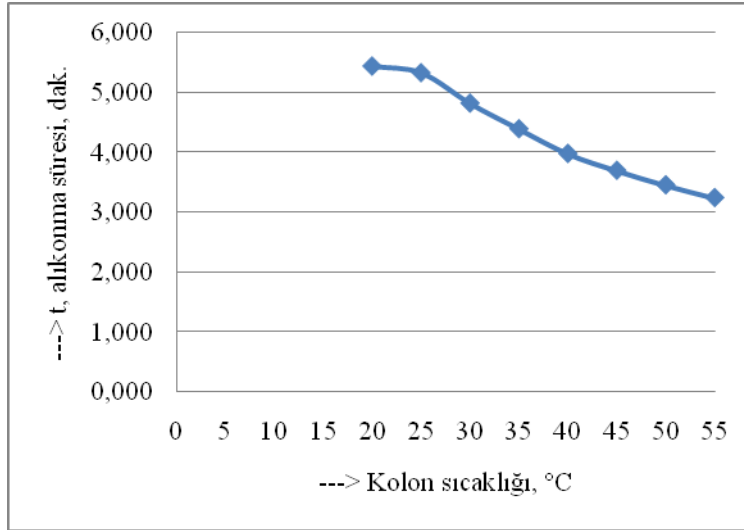
Şekil 4.7. HPLC-MS ile miyrisetin tayini için en uygun enjeksiyon hacminin bulunmasıyla ilgili kromatogramların farklı gösterilişi.



Şekil 4.8. HPLC-MS ile miyristetin tayini için optimum kolon sıcaklığının bulunması.



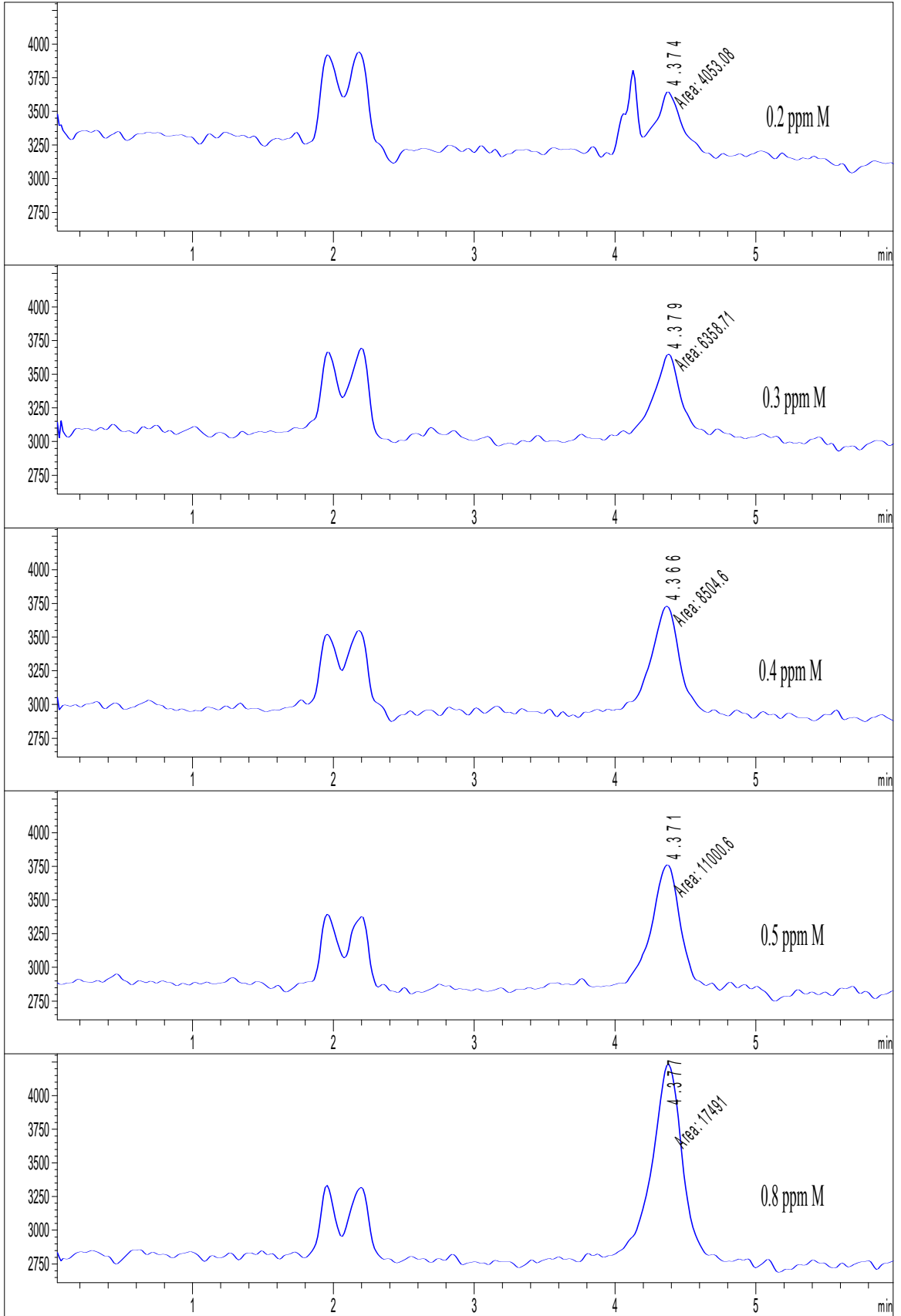
a)



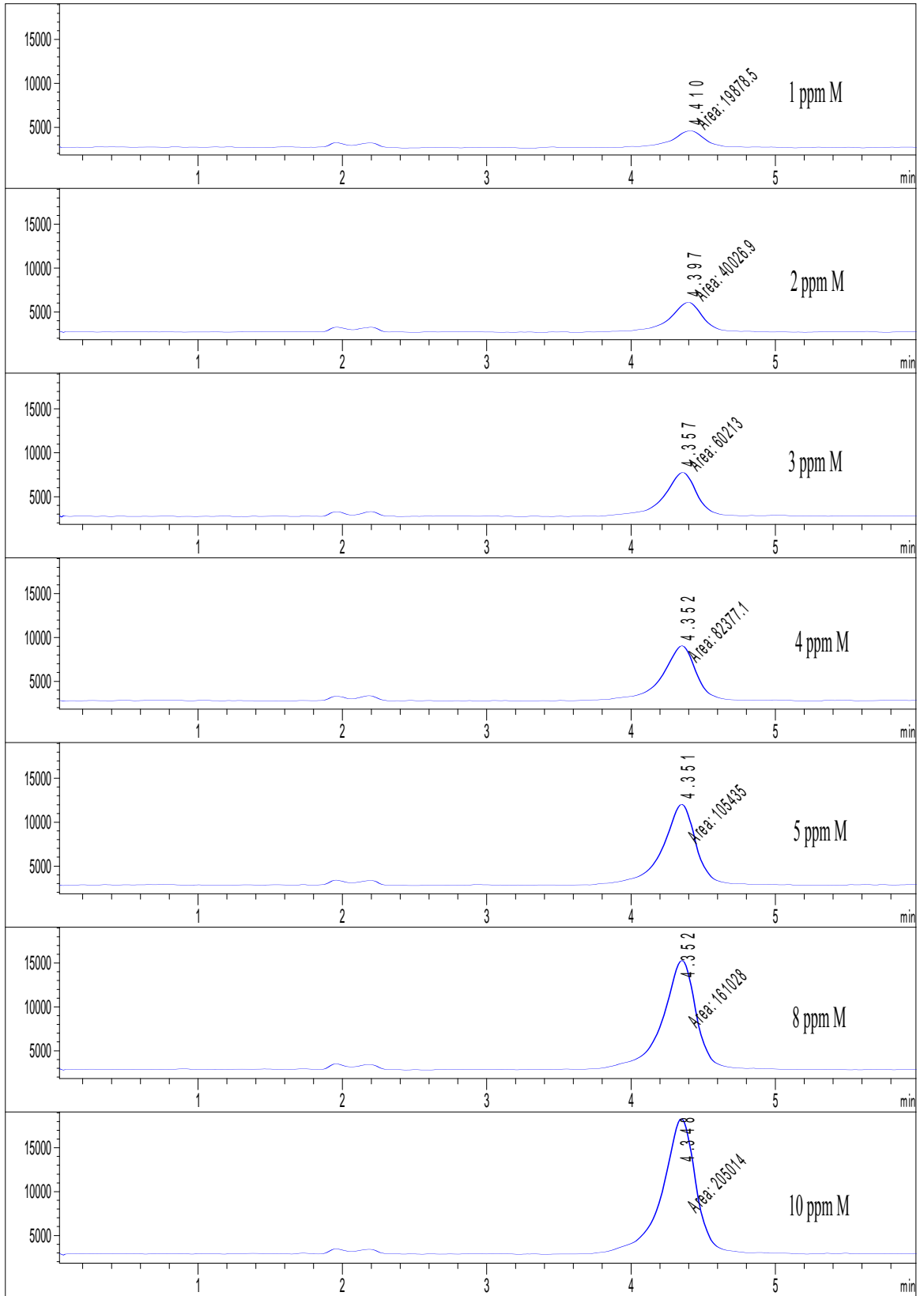
Kolon sıcaklığı	t alıkonma süresi
20	5,447
25	5,336
30	4,826
35	4,396
40	3,982
45	3,7
50	3,456
55	3,242

b)

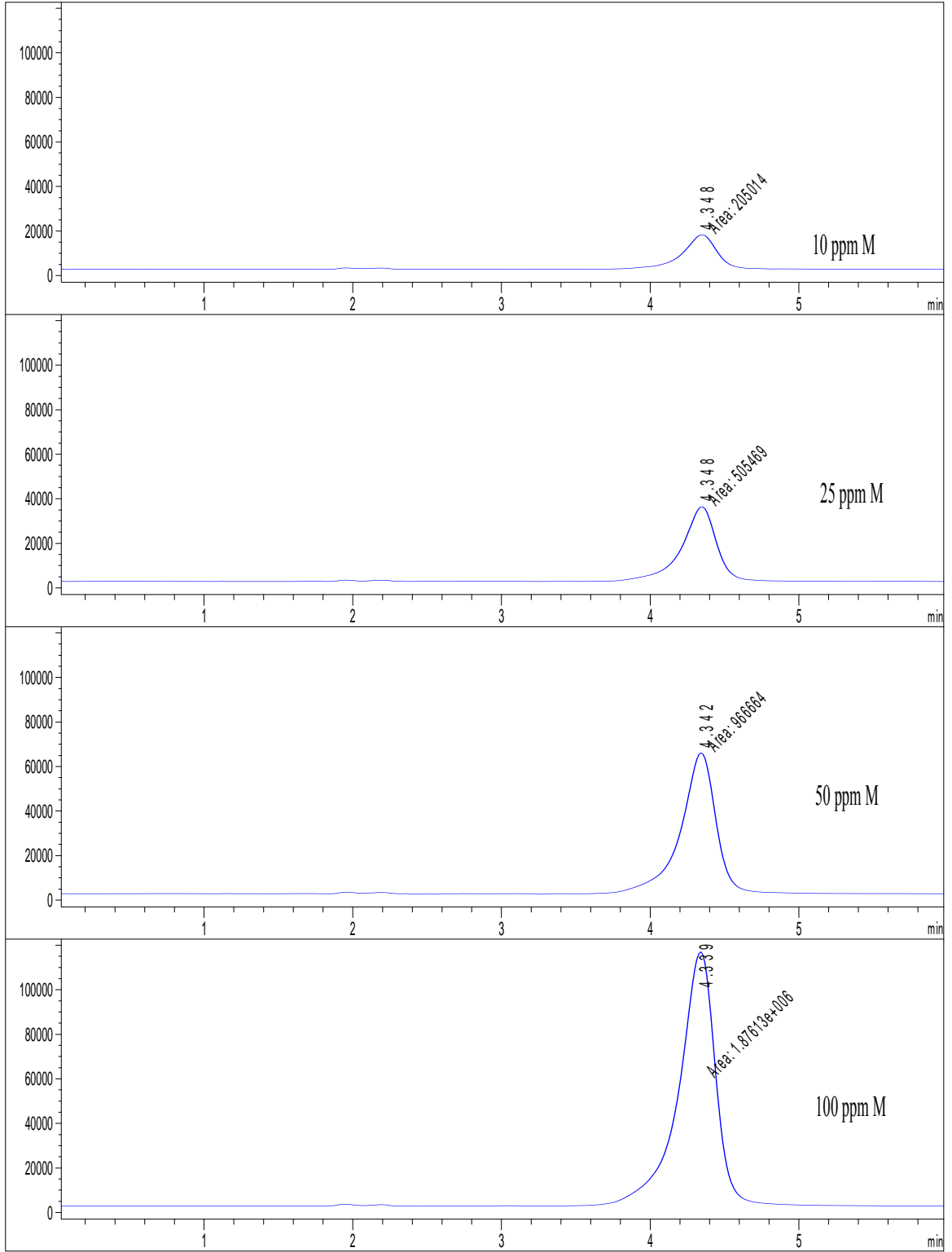
Şekil 4.9. HPLC-MS ile miyrisetin tayini için en uygun kolon sıcaklığının bulunmasıyla ilgili a) kromatogramların farklı gösterilişi ve b) kolon sıcaklığının alıkonma süreleriyle değişimi.



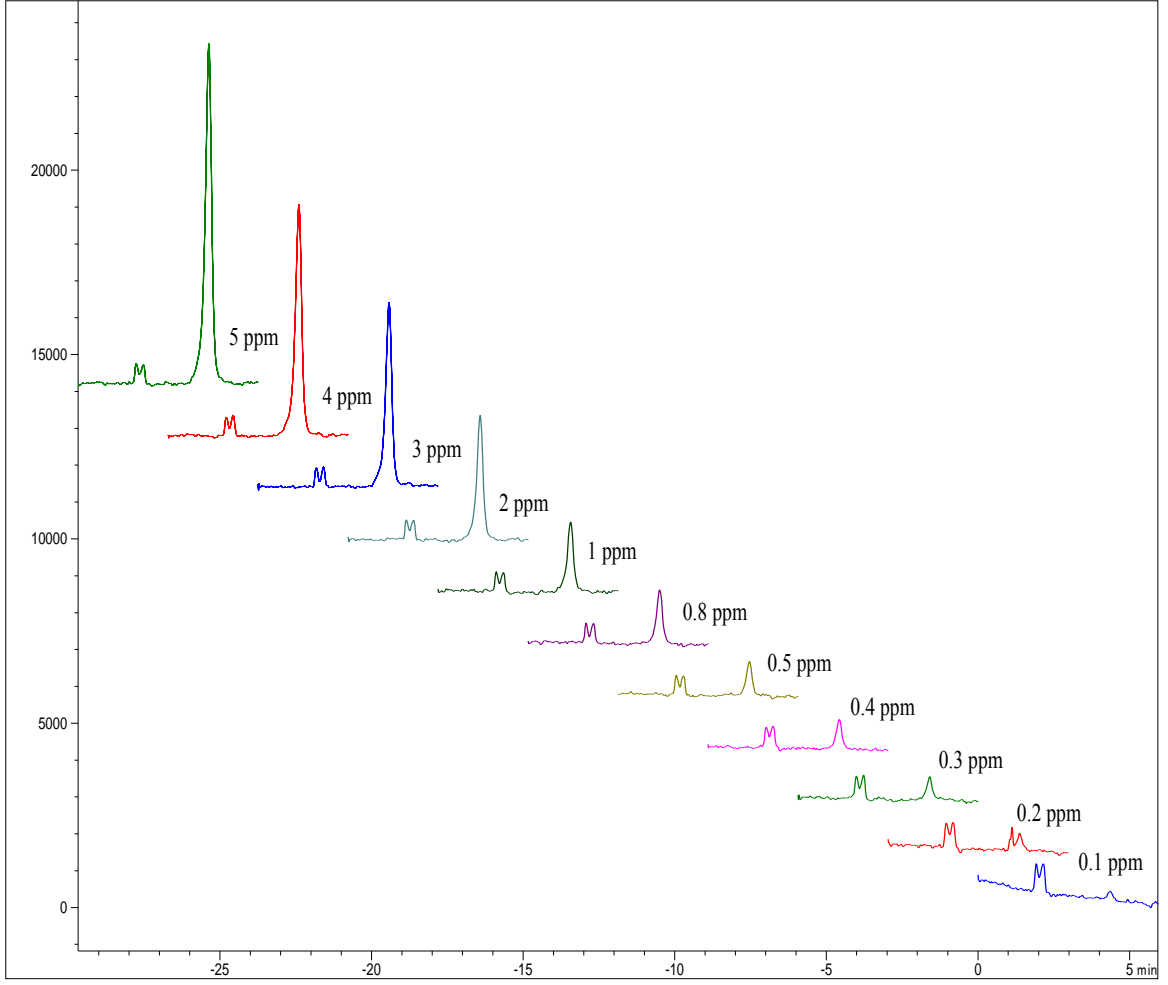
Şekil 4.10. HPLC-MS ile myristicin için kalibrasyon çözeltilerinin kromatogramları.



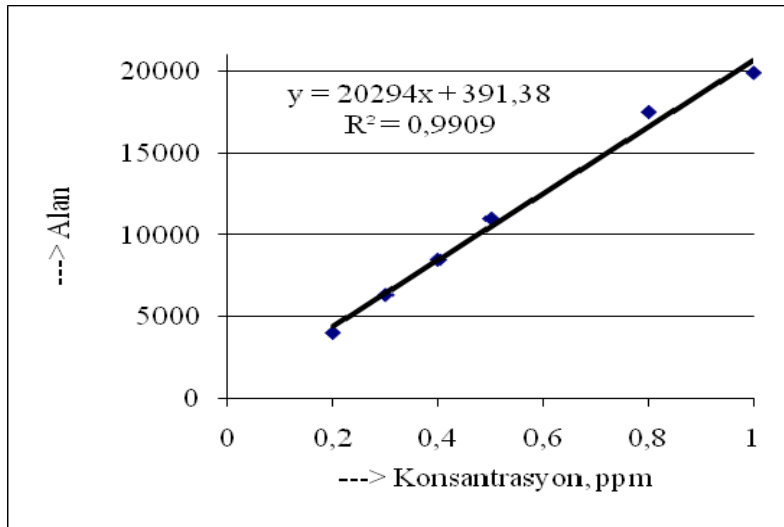
Şekil 4.11. HPLC-MS ile miyrisetin için kalibrasyon çözeltilerinin kromatogramları.



Şekil 4.12. HPLC-MS ile miyristetin için kalibrasyon çözeltilerinin kromatogramları.

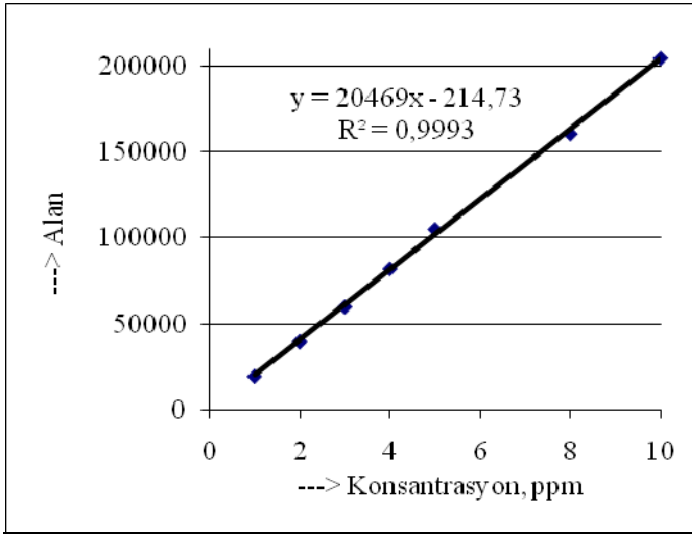


Şekil 4.13. HPLC-MS ile miyrisetin için kalibrasyon çözeltilerinin kromatogramların farklı gösterimi.

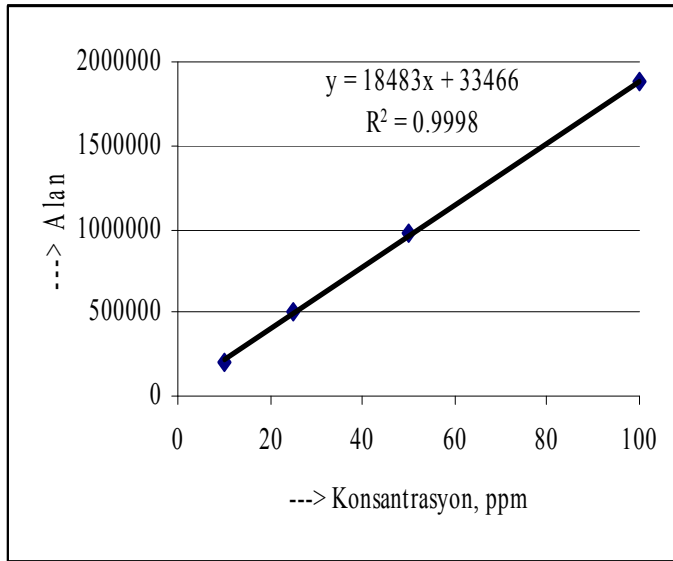


ppm	Alan
0.2	4053
0.3	6359
0.4	8505
0.5	11001
0.8	17491
1	19879

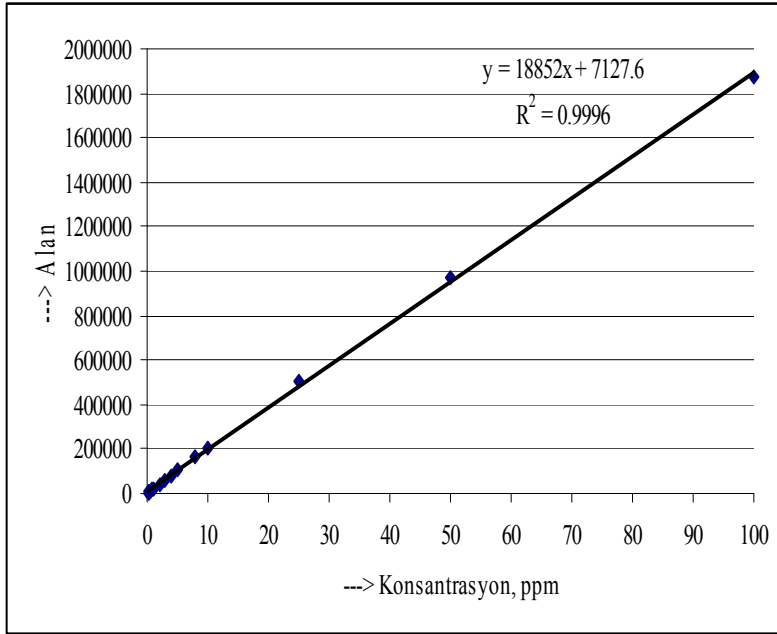
Şekil 4.14. HPLC-MS ile miyrisetin 0.2-1 ppm aralığındaki kalibrasyon eğrisi.



Şekil 4.15. HPLC-MS ile miyrisetin 1-10 ppm aralığında kalibrasyon eğrisi.

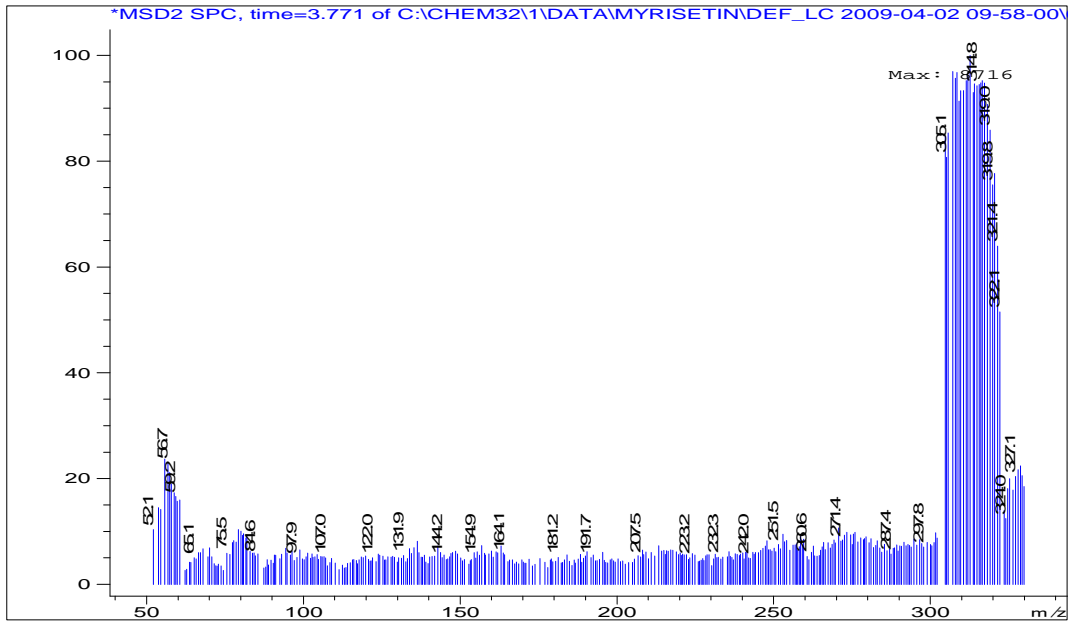


Şekil 4.16. HPLC-MS ile miyrisetin 10-100 ppm aralığında kalibrasyon eğrisi.



ppm	Alan
0.2	4053
0.3	6359
0.4	8505
0.5	11001
0.8	17491
1	19879
2	40027
3	60213
4	82377
5	105435
8	161028
10	205014
25	505469
50	966664
100	1876130

Şekil 4.17. HPLC-MS ile miyrisetin için 0.2-100 ppm aralığına ait kalibrasyon eğrisi.



Şekil 4.18. Miyrisetin HPLC-MS ile optimum şartlarda elde edilen kütle spektrumu.

4.5.2. Kuersetin için Optimum Koşullarının Tayini

Bu çalışmalarda bir parametre değiştirilirken diğer parametrelerin optimum olarak bulunan değerleri kullanıldı.

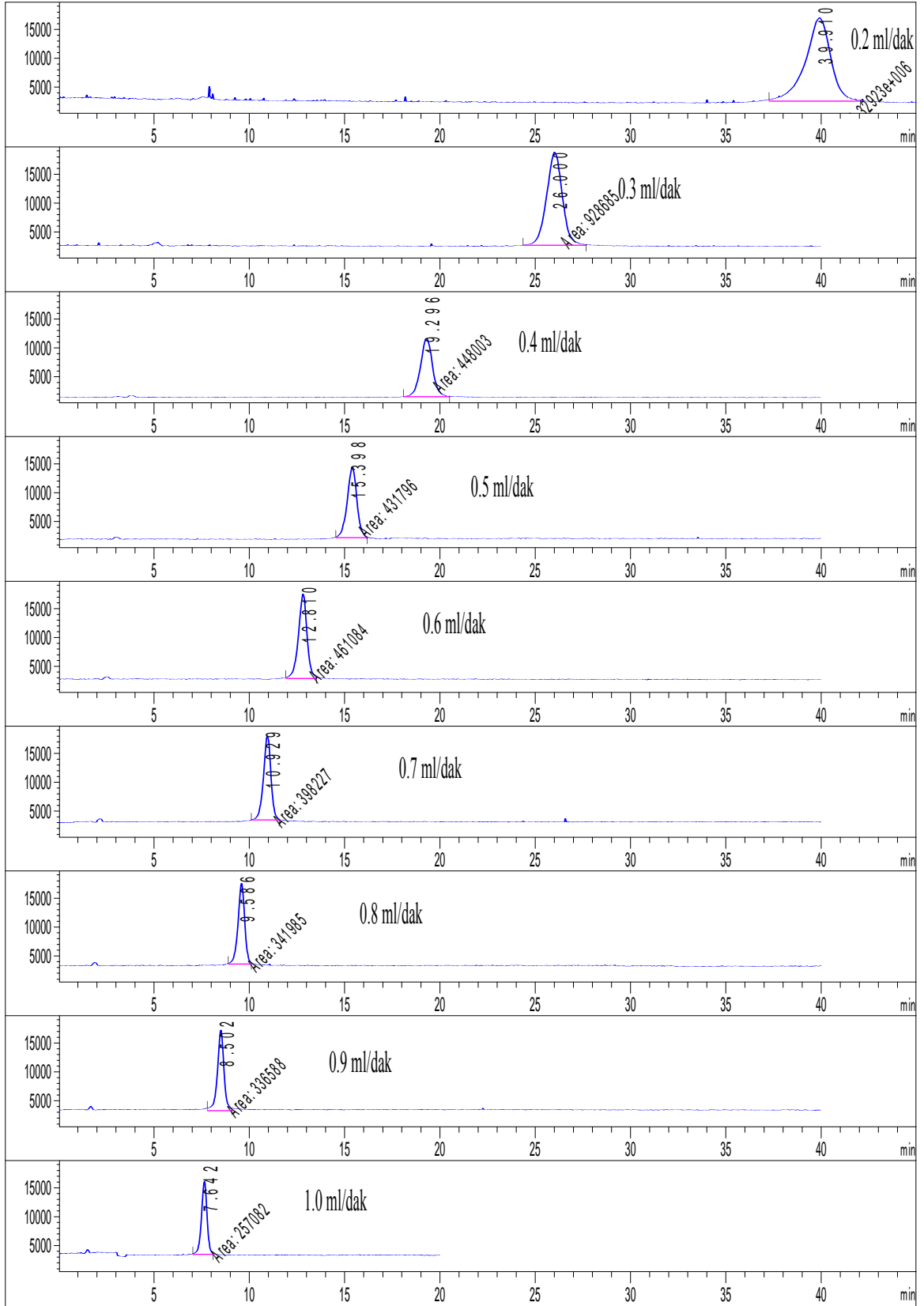
Hazırlanan 25 ppm' lik kuersetin standart çözeltileri kullanılarak optimum şartlar tayin edildi. Öncelikle cihazın optimum mobil faz akış hızı tespit edildi. Bu amaçla, 0.2-1.0 ml/dk akış aralığında yapılan deneysel çalışmalarda elde edilen kromatogramların pik simetrisi ve alan değerleri karşılaştırıldı. Elde edilen kromatogramlardan (Şekil 4.19-4.20) 0.6 ml/dk' lık akış hızının optimum olduğu sonucuna varıldı. Ayrıca akış hızına karşılık çizilen alan grafiğinde de aynı akış hızı değerinin en iyi olduğu görüldü. Bu nedenle bundan sonraki bütün deneysel çalışmalarda kuersetin için bu akış hızı (0.6 ml/dk) kullanıldı.

En iyi fragmentor voltajını (parçalayıcı voltaj) belirlemek için yapılan çalışmalarda, 10-200 V aralığında (diğer parametrelerin optimum değerlerinde) yine 25 ppm' lik kuersetin çözeltileri kullanılarak kromatogramlar alındı. Pik simetrisi ve alan dikkate alındığında, en uygun fragmentorün 140 V olduğu sonucuna varıldı (Şekil 4.21). Şekil 4.22' de fragmentore karşılık alan grafiğinde de görüldüğü gibi 140 V' daki alan değerleri ve pik simetrisi en iyi olduğu için bundan sonraki bütün deneysel çalışmalarda kuersetin için bu fragmentor voltajı kullanıldı.

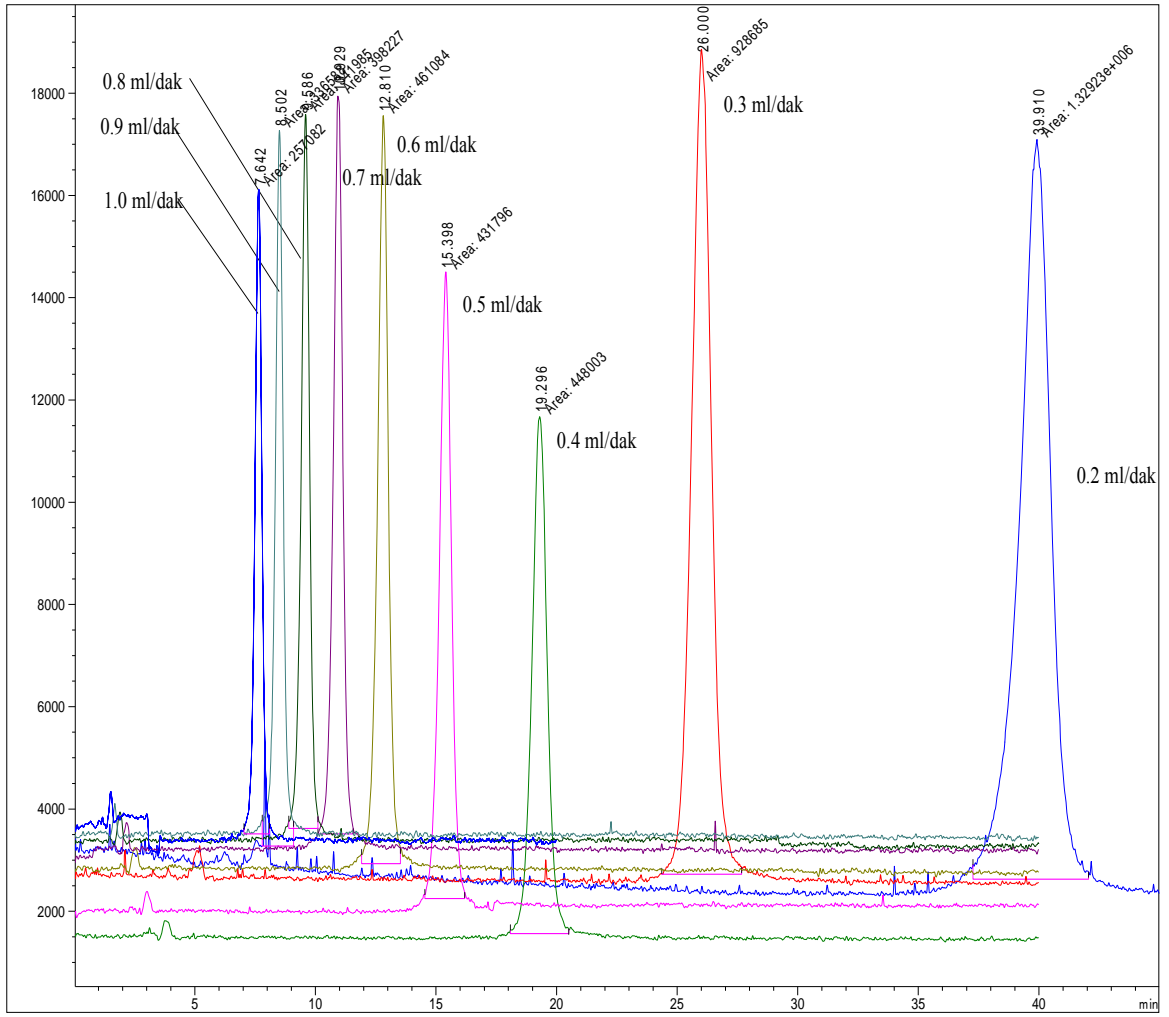
En iyi enjeksiyon hacmini belirlemek için yapılan çalışmada, 5–40 µl aralığında örnek hacimleri denendi. Enjektörde edilen örnek hacminin artmasına bağlı olarak alan pik simetrisinde belirgin bir bozulma gözlemlendiğinden, pik simetrisinin en iyi olduğu 5 µl enjeksiyon hacmi optimum olarak kabul edildi (Şekil 4.23).

En uygun kolon sıcaklığının tayini için 20-55 °C aralığında aynı derişimdeki kuersetin çözeltilerinin kromatogram ve spektrumları alındı (Şekil 4.24). Kolon sıcaklığı artışının pik çıkış süresini azalttığı açıkça görülmektedir. Bu değişimler göz önüne alındığında en iyi olan 30 °C' deki pik optimum olarak kabul edildi.

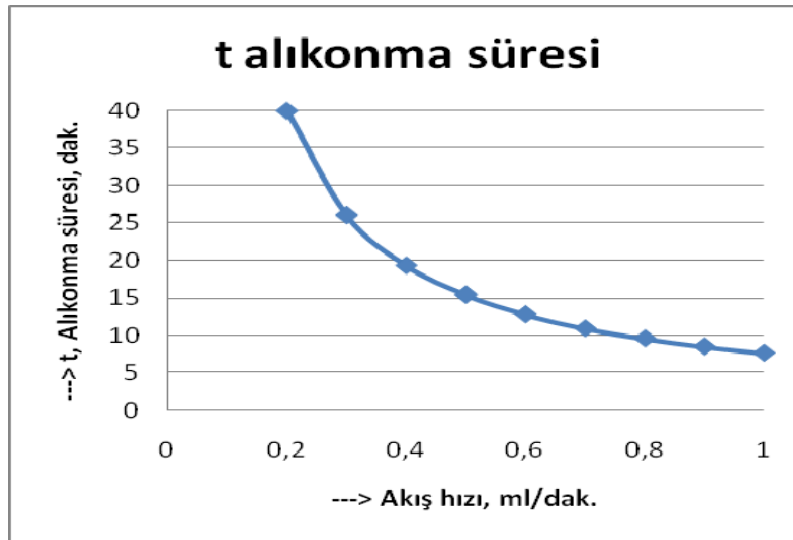
Nicel analizde kullanılmak üzere çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan kuersetin çözeltileri için optimum şartlarda elde edilen kromatogramlar Şekil 4.25-4.27' de verilmiştir. Bu kromatogramlardan da anlaşılacağı gibi standart maddenin konsantrasyonunun artması ile zemindeki gürültülerin bastırıldığı ve piklerin daha sade olduğu görülmektedir. Şekil 4.28-4.30' da standartların kalibrasyon grafikleri verildi. Bu şekillerden de görüldüğü gibi 0.8-100 ppm aralığında eğimleri birbirine çok yakın kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir. Şekil 4.31' de kuersetin standardının MS spektrumu görülmektedir. Bu spektrumdan, kuersetin molekülünden hidrojen iyonlarının ayrılması sözkonusudur.



Şekil 4.19. HPLC-MS ile kuersetin tayini için en uygun akış hızının bulunması.



a)

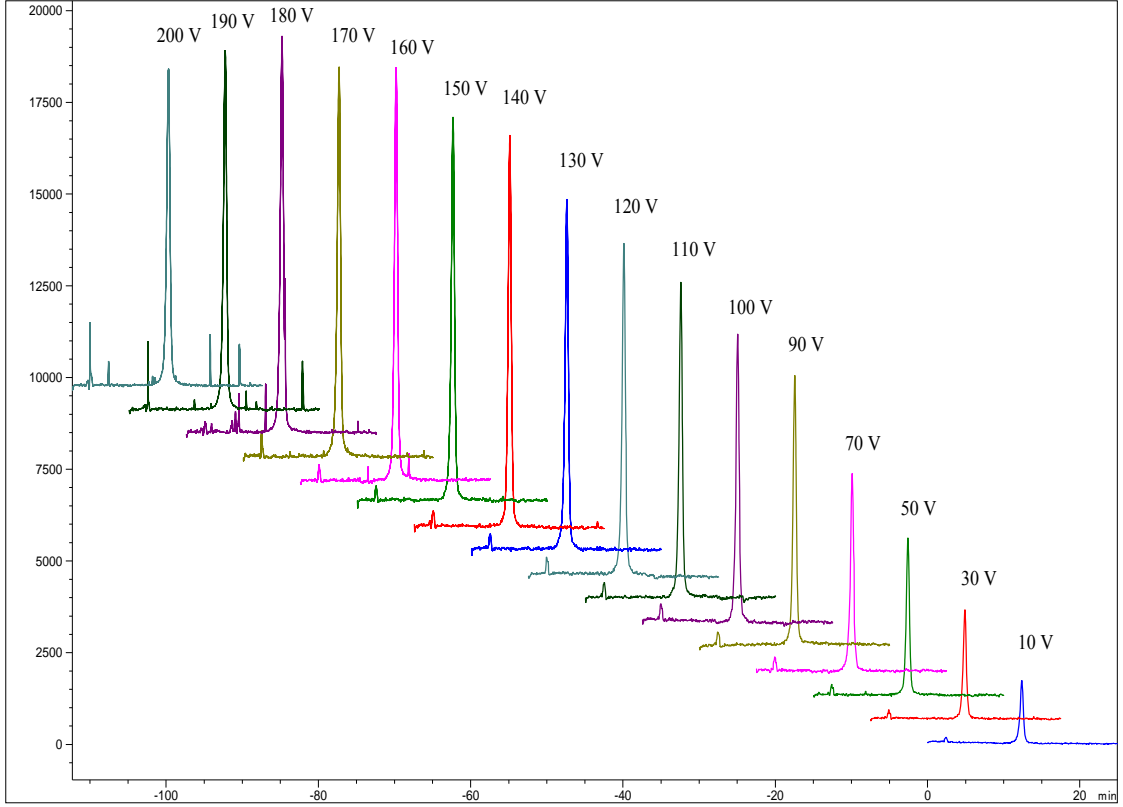


Akış hızı	t alıkonma süresi
0,2	39,91
0,3	26
0,4	19,296
0,5	15,398
0,6	12,81
0,7	10,929
0,8	9,586
0,9	8,502
1	7,642

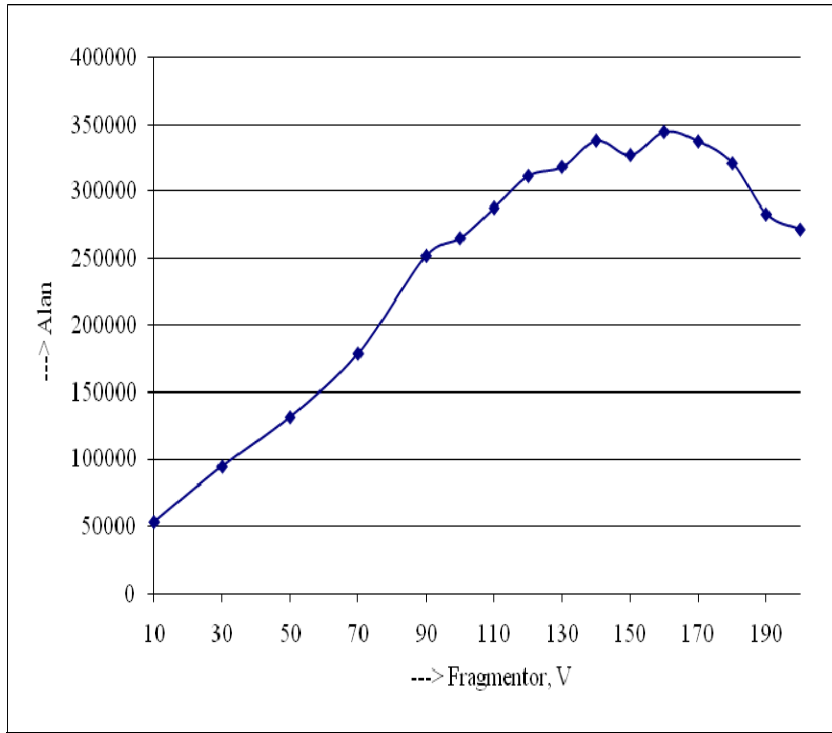
b)

Şekil 4.20. HPLC-MS ile kuersetin tayini için en uygun akış hızının bulunmasıyla ilgili

a) kromatogramların farklı gösterilişi ve b) akış hızının alıkonma süreleriyle değişimi.

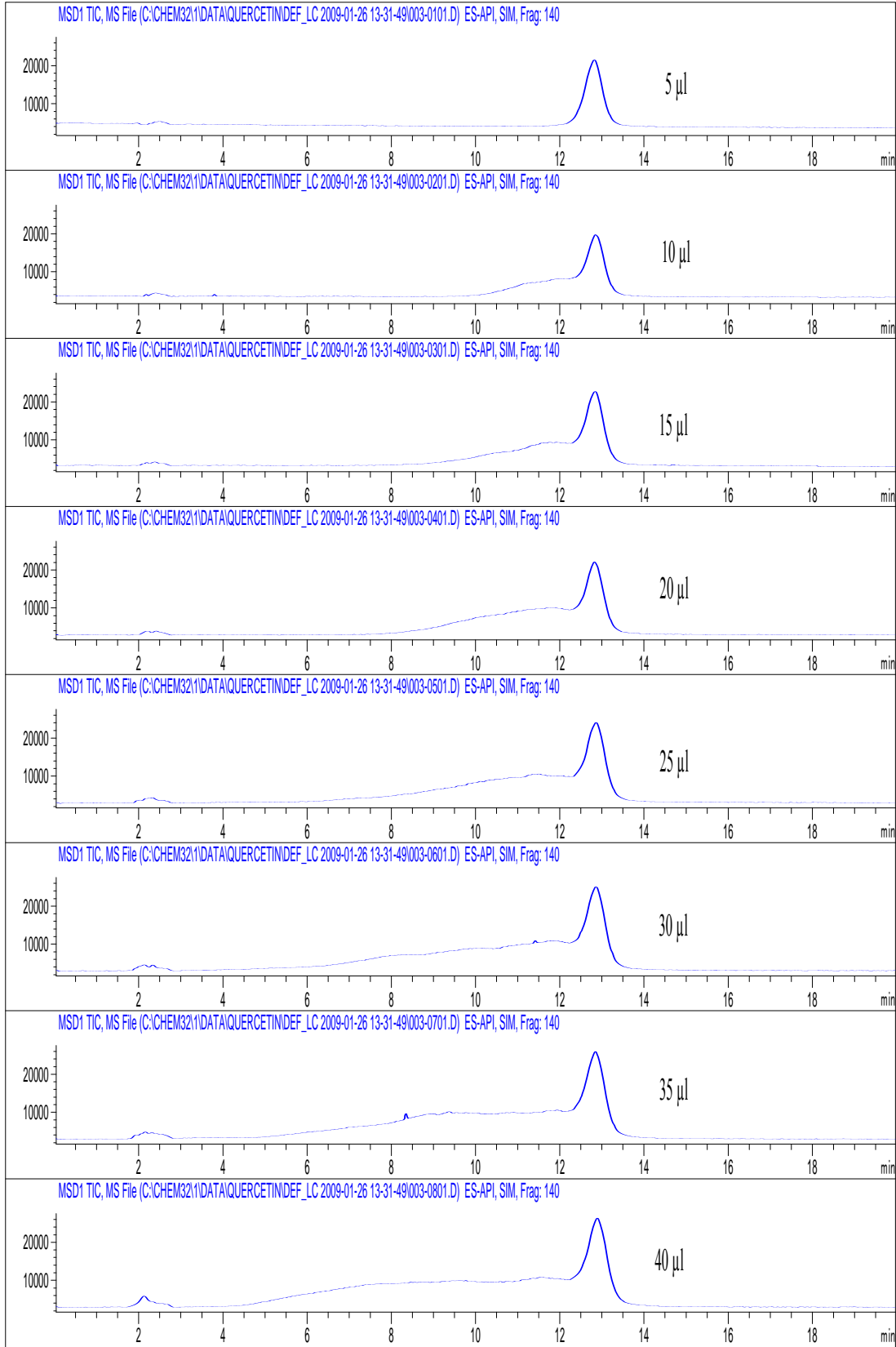


Şekil 4.21. HPLC-MS ile kuersetin tayini için optimum fragmentörün bulunması.

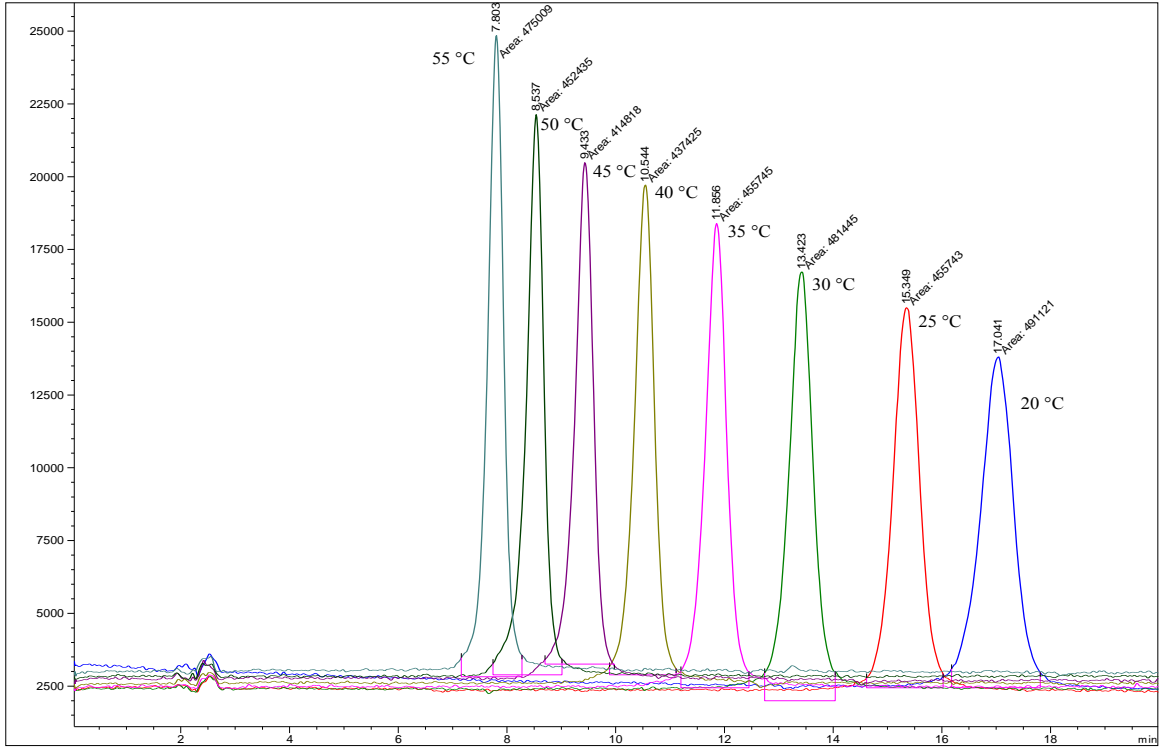


Fragmentör	Alan
10	53404
30	94553
50	131765
70	179057
90	252132
100	265373
110	288024
120	311726
130	318593
140	338355
150	327513
160	345021
170	337819
180	321266
190	283347
200	271940

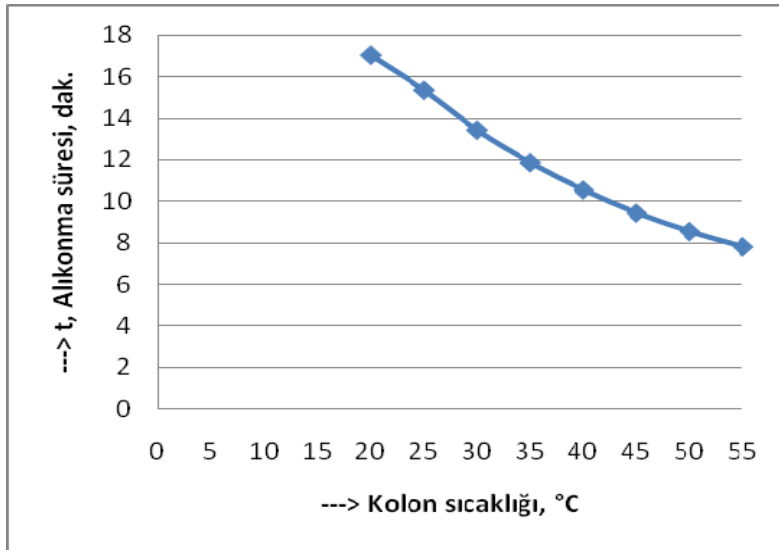
Şekil 4.22. HPLC-MS ile kuersetin tayini için fragmentör-alan değişimi grafiği.



Şekil 4.23. HPLC-MS ile kuersetin tayini için optimum enjeksiyon hacminin bulunması.



a)

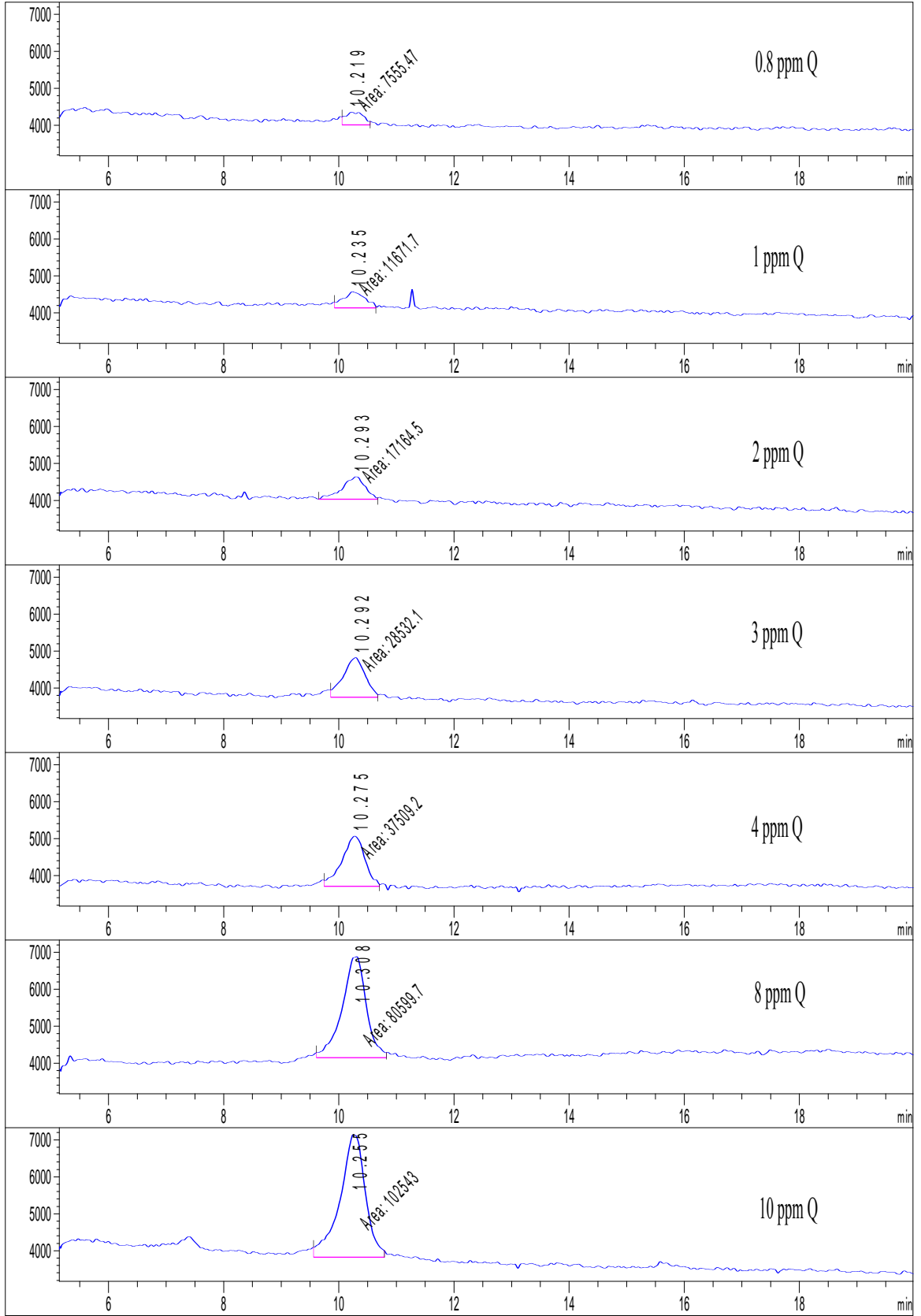


Kolon sıcaklığı	t alıkonma süresi
20	17,041
25	15,349
30	13,423
35	11,856
40	10,544
45	9,433
50	8,537
55	7,803

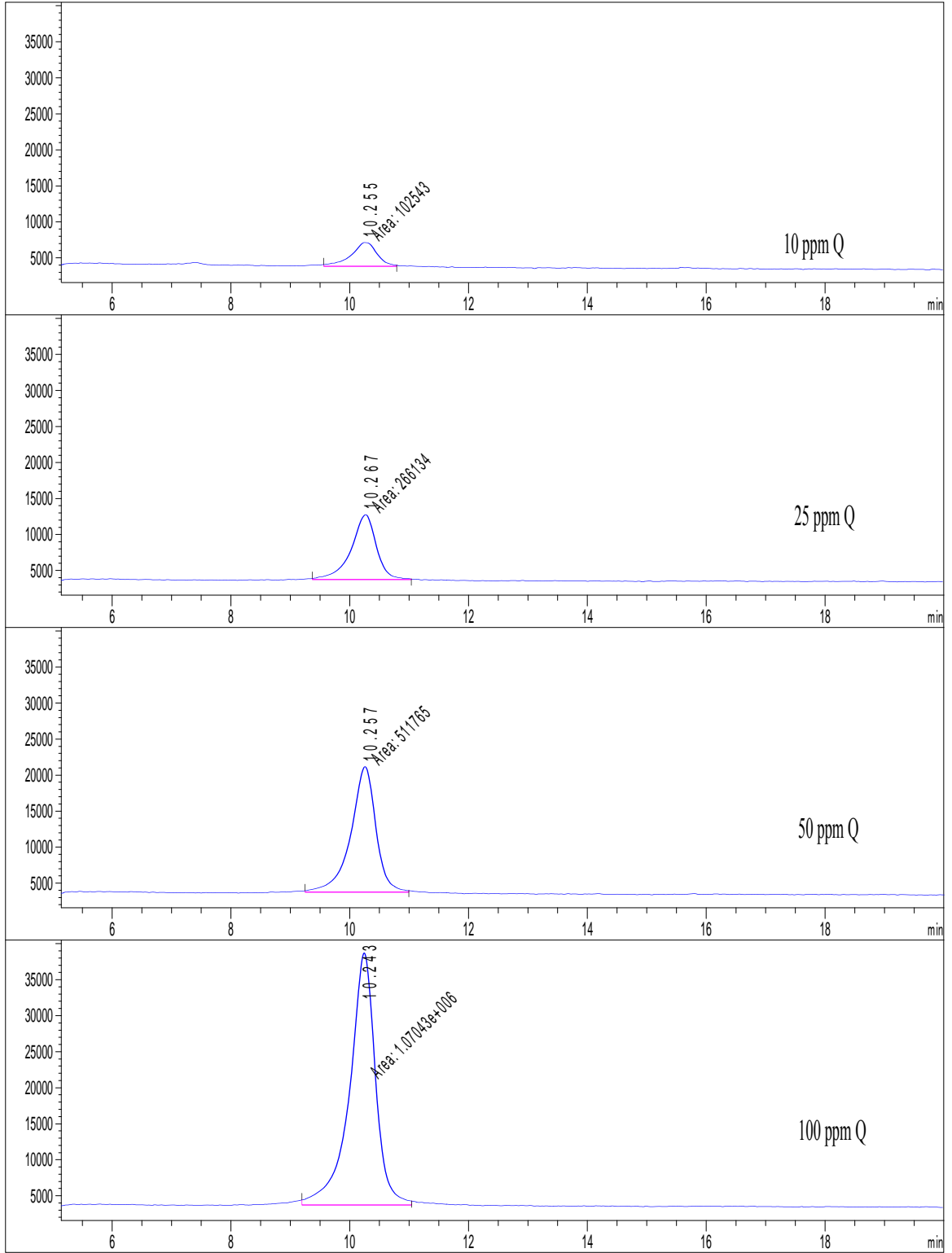
b)

Şekil 4.24. HPLC-MS ile kuersetin tayini için en uygun kolon sıcaklığının bulunmasıyla ilgili

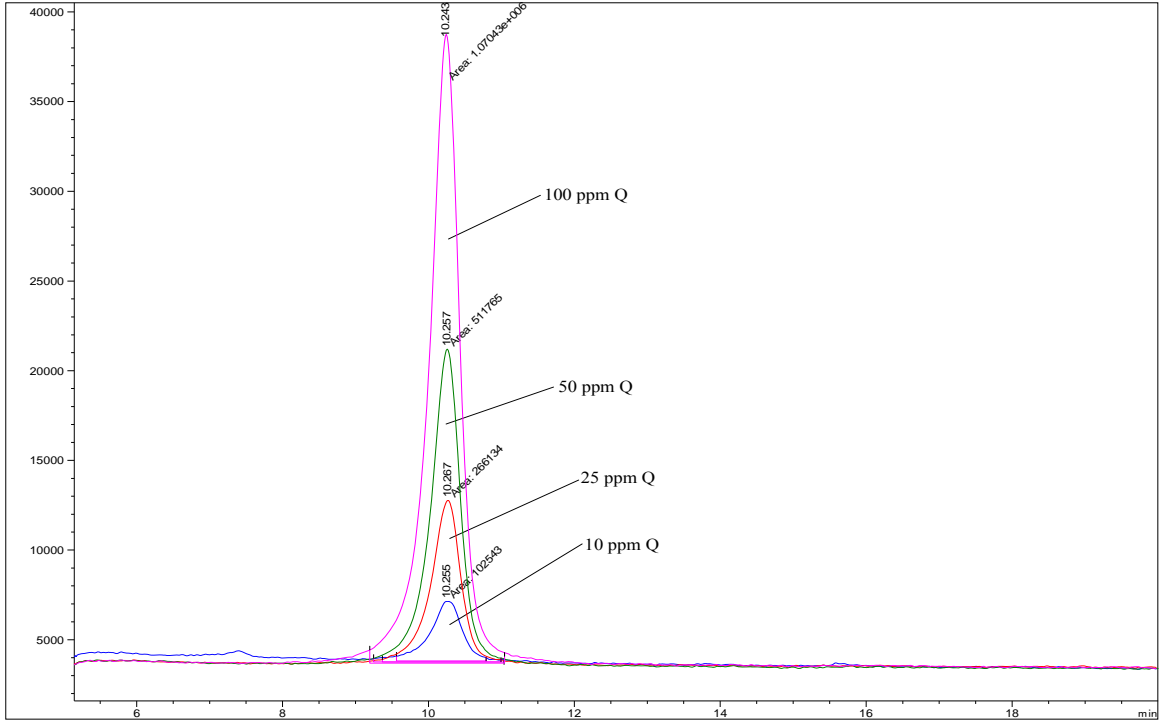
a) kromatogramların gösterilişi ve b) kolon sıcaklığının alıkonma süreleriyle değişimi.



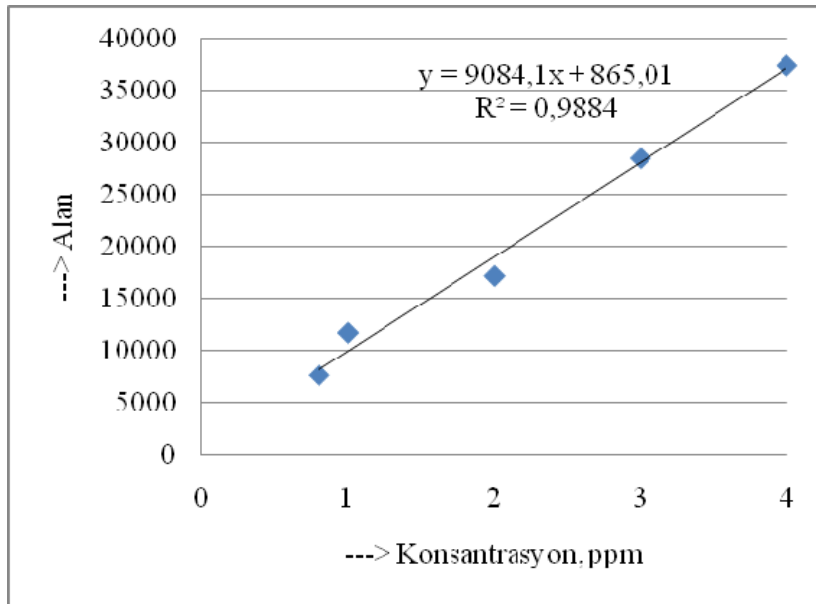
Şekil 4.25. HPLC-MS ile kuersetin için kalibrasyon çözeltilerinin kromatogramları.



Şekil 4.26. HPLC-MS ile kueretin için kalibrasyon çözeltilerinin kromatogramları.

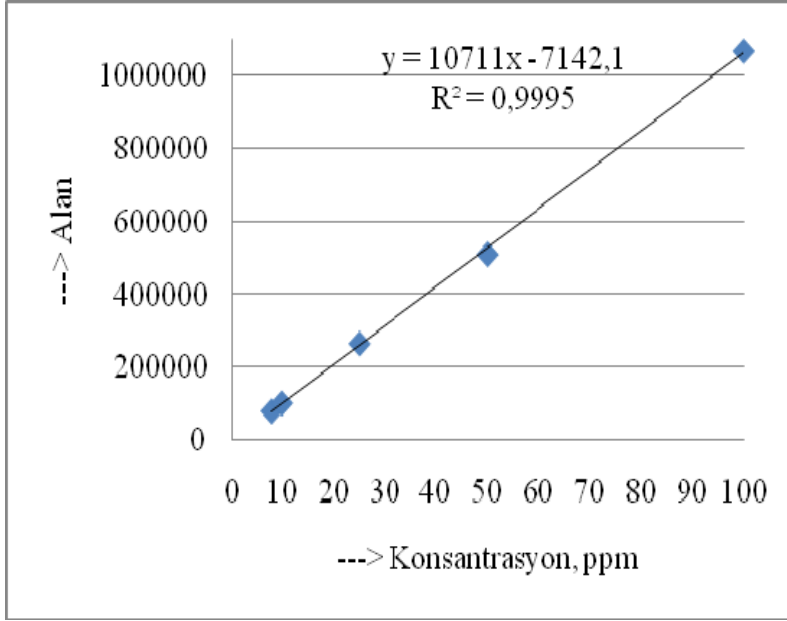


Şekil. 4.27. HPLC-MS ile kuersetin için kalibrasyon çözeltilerinin kromatogramların farklı gösterimi.



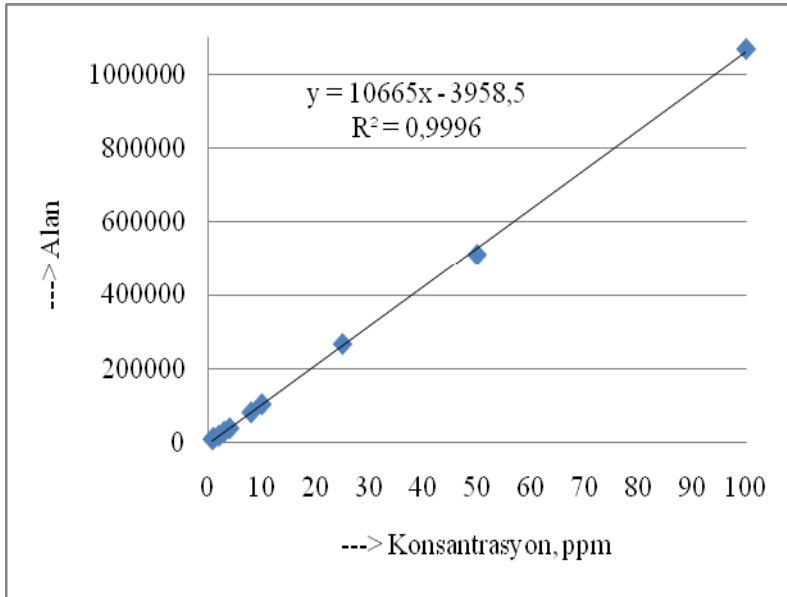
Kuersetin ppm	Alan
0,8	7555
1	11672
2	17165
3	28532
4	37509

Şekil 4.28. HPLC-MS ile kuersetinin 0.8-4 ppm aralığına ait kalibrasyon eğrisi.



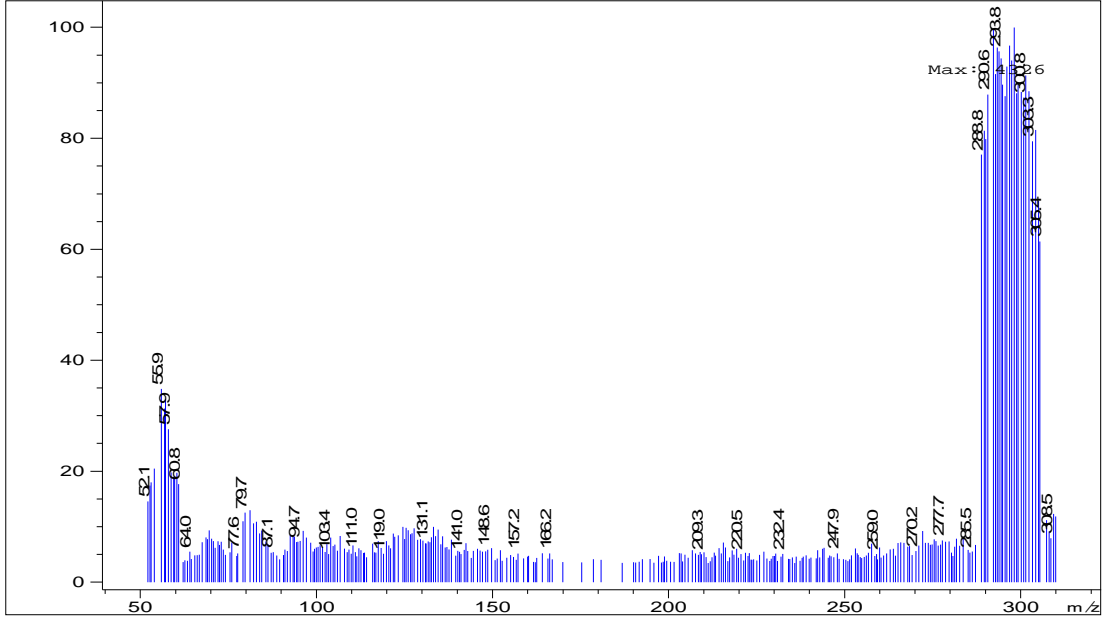
ppm	Alan
8	80560
10	102543
25	266134
50	511765
100	1070430

Şekil 4.29. HPLC-MS ile kuersetinin 8-100 ppm aralığına ait kalibrasyon eğrisi.



Kuersetin ppm	Alan
0,8	7555
1	11672
2	17165
3	28532
4	37509
8	80560
10	102543
25	266134
50	511765
100	1070430

Şekil 4.30. HPLC-MS ile kuersetinin 0.8-100 ppm aralığındaki kalibrasyon eğrisi.



Şekil 4.31. Kuersetinin HPLC-MS ile optimum şartlarda elde edilen kütle spektrumu.

4.5.3. Kamferol için Optimum Koşullarının Tayini

Bu çalışmalarda bir parametre değiştirilirken diğer parametrelerin optimum olarak bulunan değerleri kullanıldı.

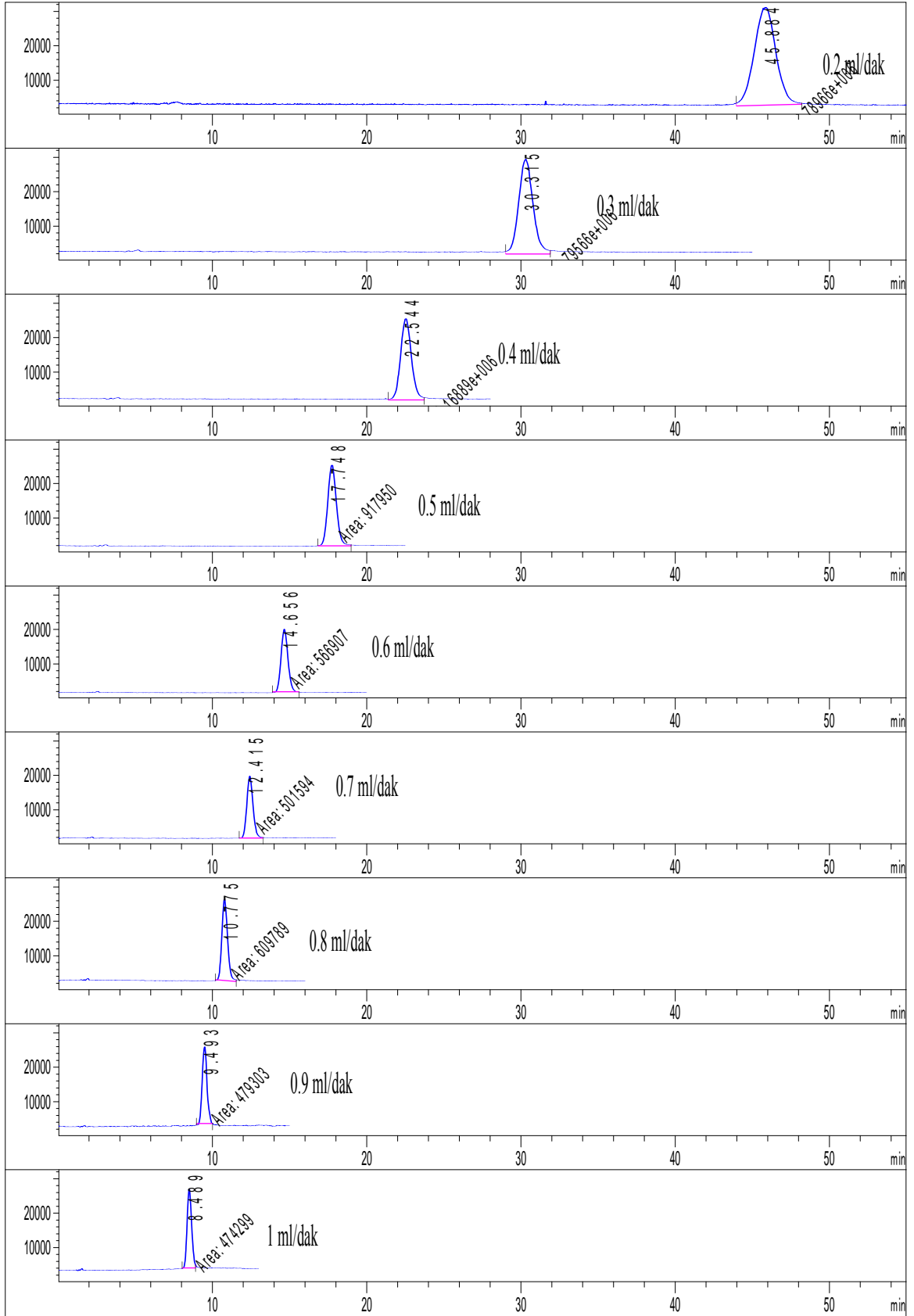
Hazırlanan 25 ppm' lik kamferol standart çözeltileri kullanılarak optimum şartlar tayin edildi. Öncelikle cihazın optimum mobil faz akış hızı tespit edildi. Bu amaçla, 0.2-1.0 ml/dk akış aralığında yapılan deneysel çalışmalarda elde edilen kromatogramların pik simetrisi ve alan değerleri karşılaştırıldı. Elde edilen kromatogramlardan (Şekil 4.32-4.33) 0.8 ml/dk' lık akış hızının optimum olduğu sonucuna varıldı. Bu nedenle bundan sonraki bütün deneysel çalışmalarda kamferol için bu akış hızı (0.8 ml/dk) kullanıldı.

En iyi fragmentor voltajını (parçalayıcı voltaj) belirlemek için yapılan çalışmalarda, 10-200 V aralığında (diğer parametrelerin optimum değerlerinde) yine 25 ppm' lik kamferol çözeltileri kullanılarak kromatogramlar alındı. Pik simetrisi ve alan dikkate alındığında, en uygun fragmentörün 140 V olduğu sonucuna varıldı (Şekil 4.34). Şekil 4.35' te fragmentora karşılık alan grafiğinde de görüldüğü gibi 140 V' daki alan değerleri ve pik simetrisi en iyi olduğu için bundan sonraki bütün deneysel çalışmalarda kamferol için bu fragmentor voltajı kullanıldı.

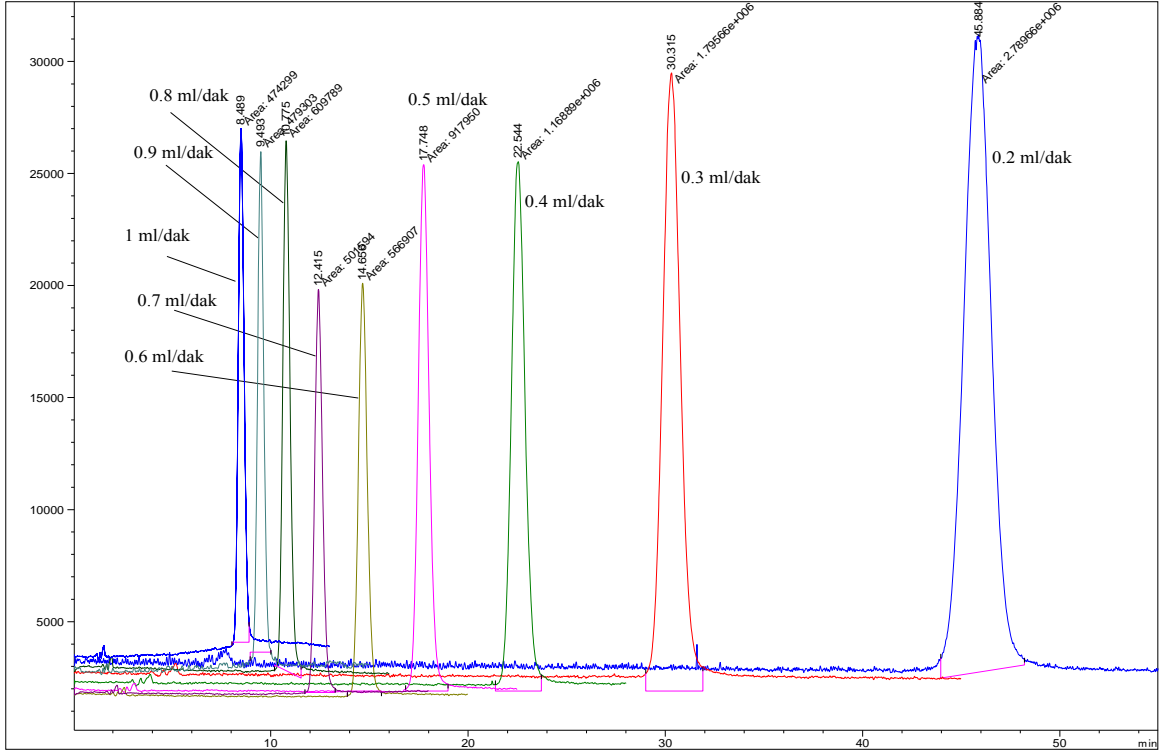
En iyi enjeksiyon hacmini belirlemek için yapılan çalışmada, 5–40 µl aralığında örnek hacimleri denendi. Enjekte edilen örnek hacminin artmasına bağlı olarak alan pik simetrisinde belirgin bir bozulma gözlemlendiğinden, pik simetrisinin en iyi olduğu 5 µl enjeksiyon hacmi optimum olarak kabul edildi (Şekil 4.36).

En uygun kolon sıcaklığının tayini için 20-55 °C aralığında aynı derişimdeki kamferol çözeltilerinin kromatogram ve spektrumları alındı (Şekil 4.37-4.38). Kolon sıcaklığı artışının pik çıkış süresini azalttığı açıkça görülmektedir. Bu değişimler göz önüne alınarak en iyi olan 40 °C' deki pik optimum olarak kabul edildi.

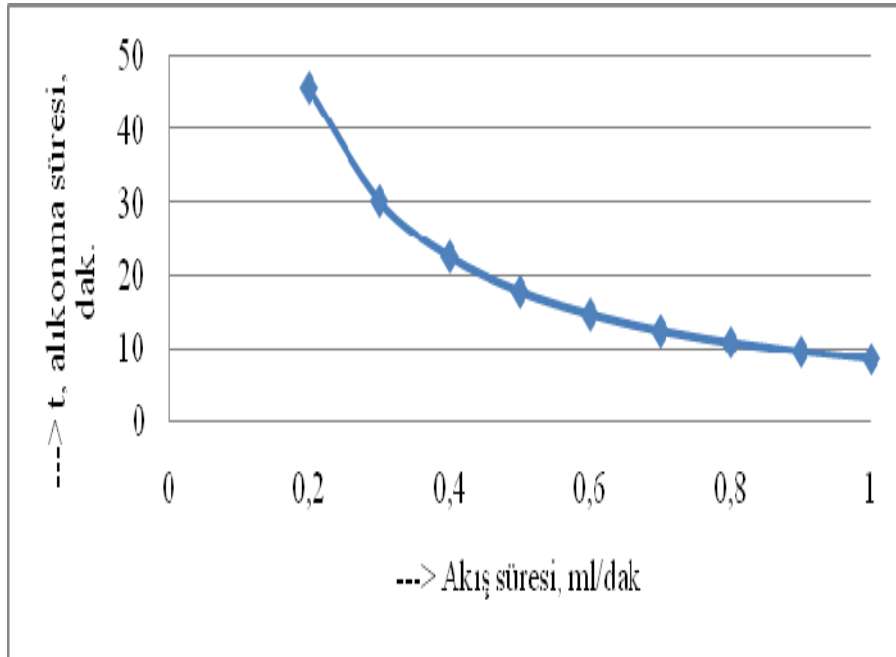
Nicel analizde kullanılmak üzere çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan kamferol çözeltileri için optimum şartlarda elde edilen kromatogramlar Şekil 4.39-4.41' de verilmiştir. Bu kromatogramlardan da anlaşılacağı gibi standart maddenin konsantrasyonunun artması ile zemindeki gürültülerin bastırıldığı ve piklerin daha sade olduğu görülmektedir. Şekil 4.42-4.45' te standartların kalibrasyon grafikleri verildi. Bu şekillerden de görüldüğü gibi 0.2-10 ppm aralığında eğimleri birbirine çok yakın kalibrasyon eğrileri elde edilirken, 10-100 ppm aralığında az da olsa farklı eğime sahip ama yine doğrusal olan bir kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Şekil 4.46' da kamferol standardının MS spektrumu görülmektedir. Bu spektrumdan, kamferol molekülünden hidrojen iyonlarının ayrılması sözkonusudur.



Şekil 4.32. HPLC-MS ile kamferolün tayini için en uygun akış hızının bulunması.

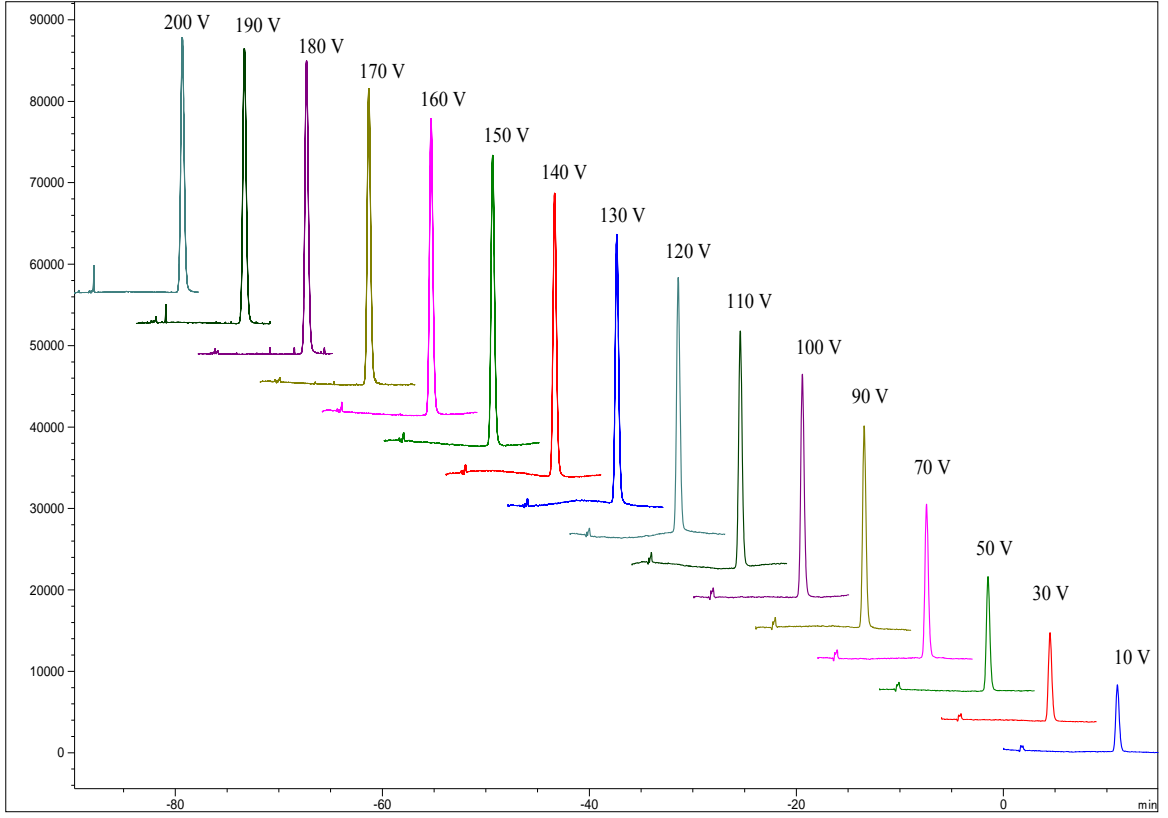


a)

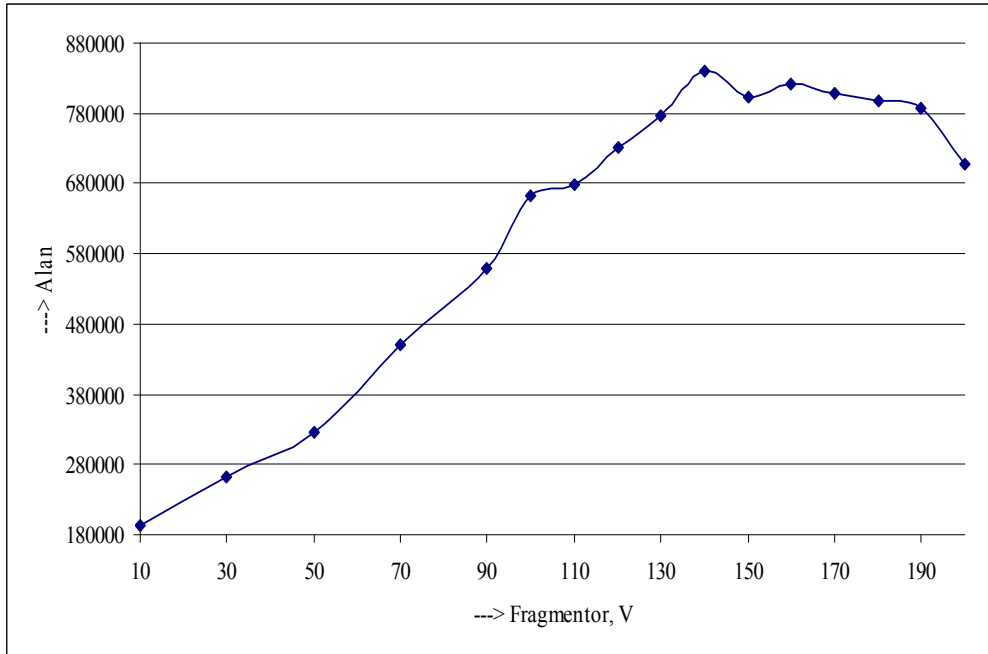


b)

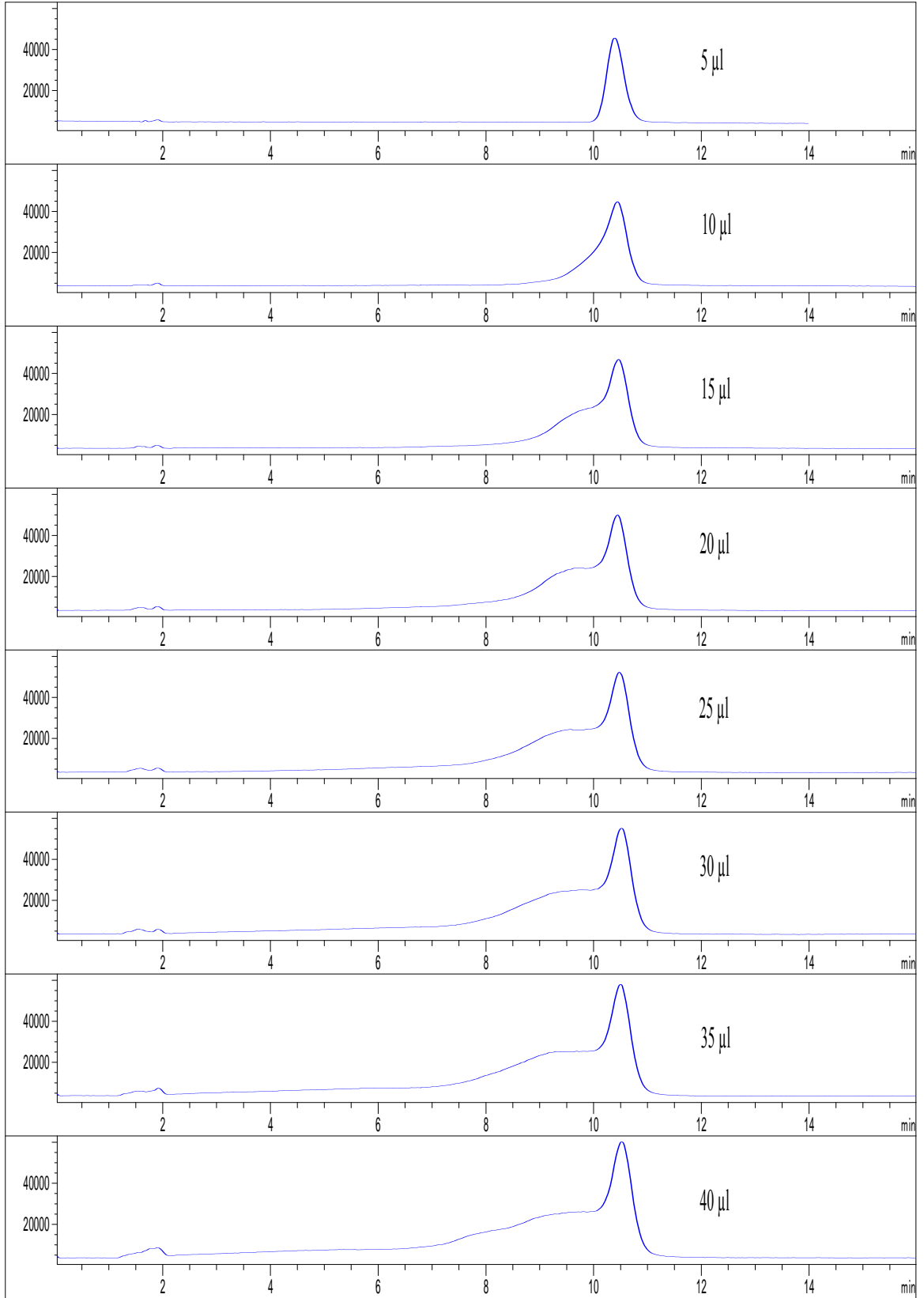
Şekil 4.33. HPLC-MS ile kamferolün tayini için en uygun a) akış hızının bulunmasıyla ilgili kromatogramların farklı gösterilişi ve b) akış hızının alıkonma süreleriyle değişimi.



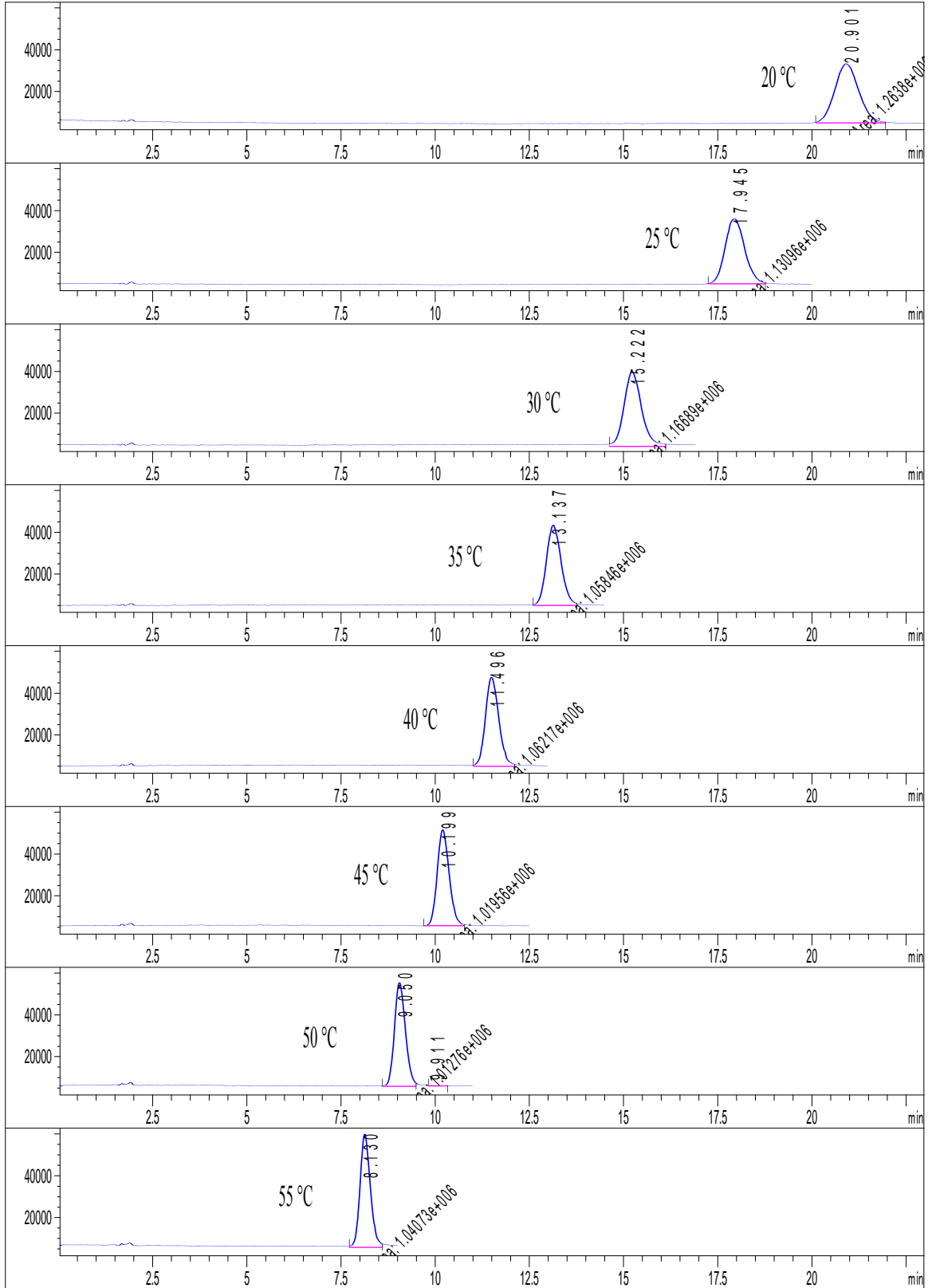
Şekil 4.34. HPLC-MS ile kamferol tayini için fragmentortün bulunması.



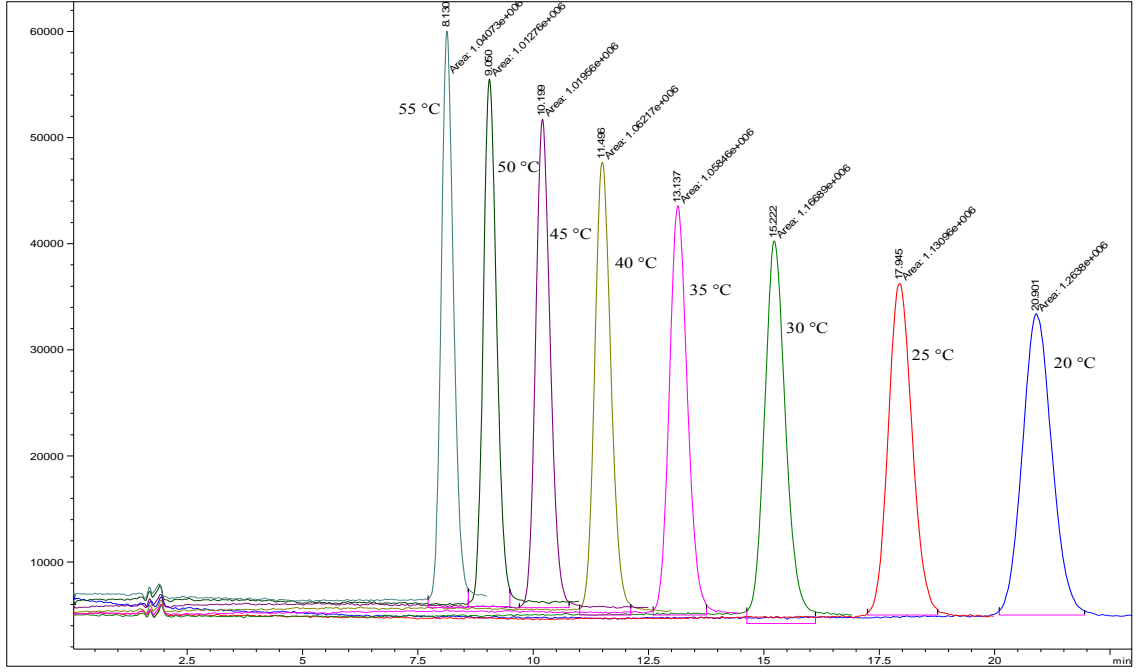
Şekil 4.35. HPLC-MS ile kamferol tayini için fragmentor-alan grafiği değişimi.



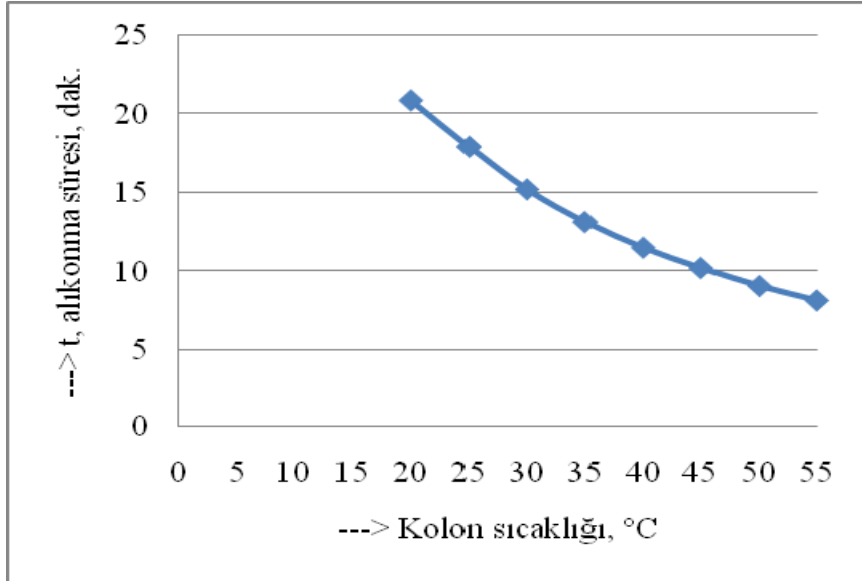
Şekil 4.36. HPLC-MS ile kamferol tayini için optimum enjeksiyon hacminin bulunması.



Şekil 4.37. HPLC-MS ile kamferol tayini için optimum kolon sıcaklığının bulunması.



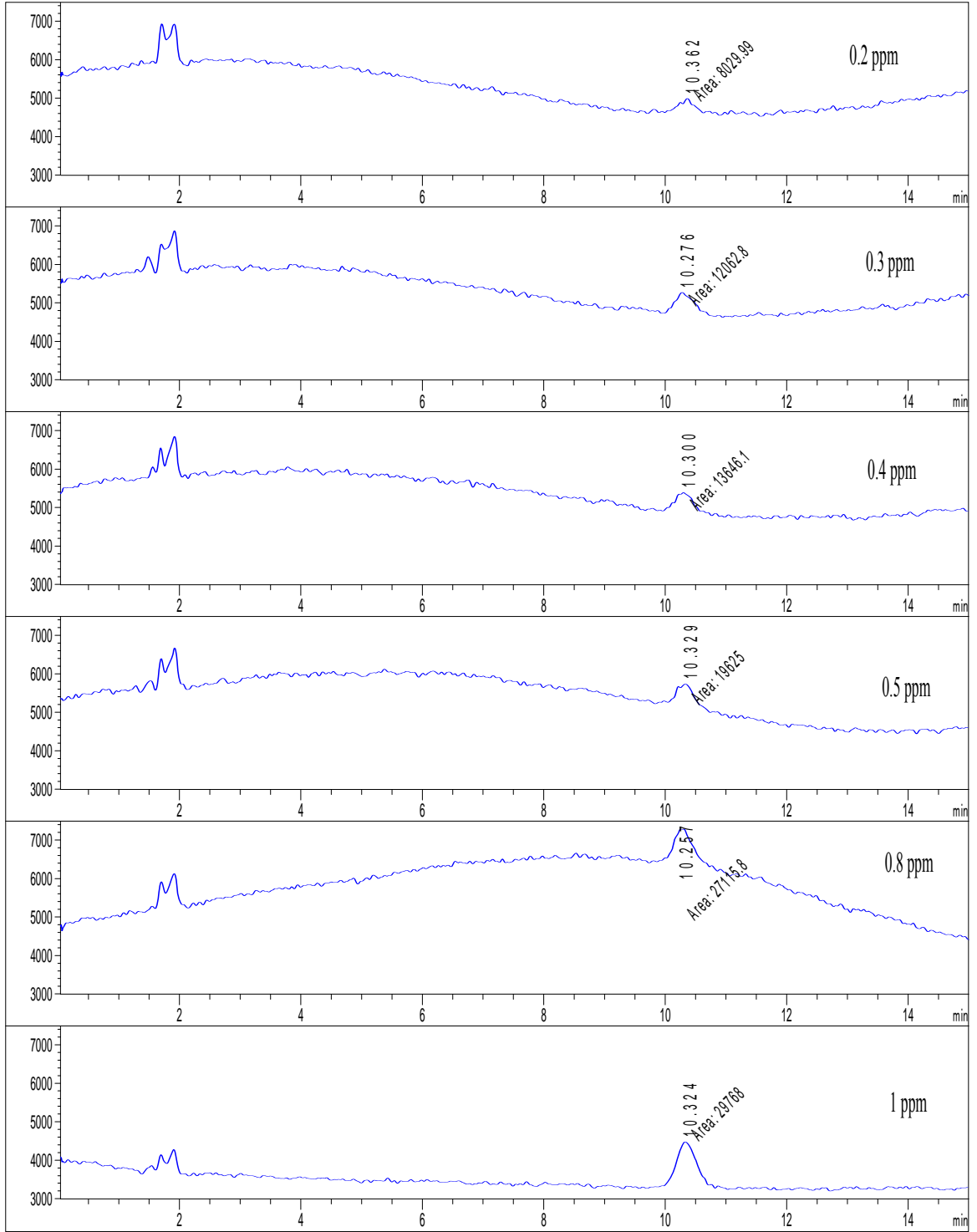
a)



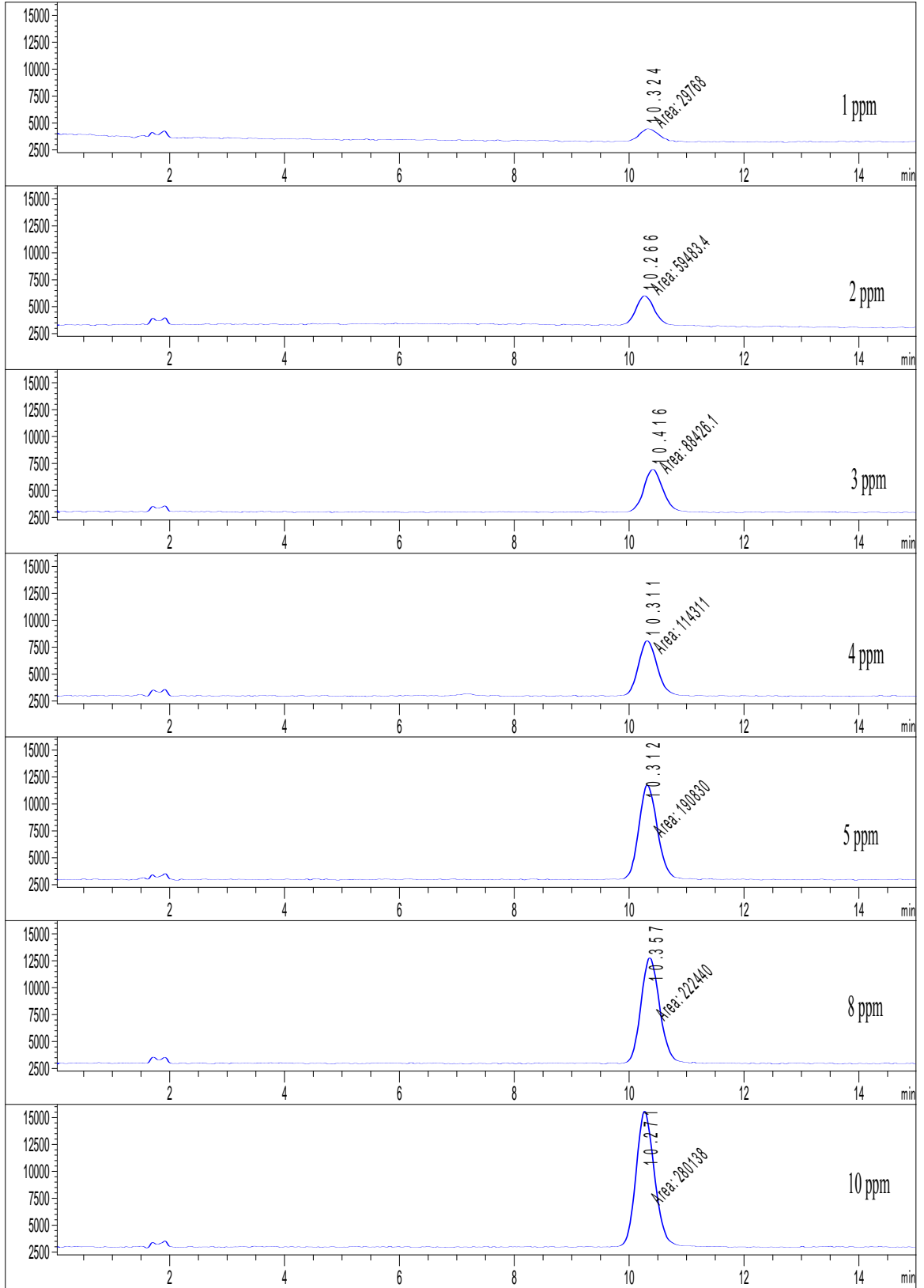
b)

Şekil 4.38. HPLC-MS ile kamferol tayini için en uygun kolon sıcaklığının bulunmasıyla ilgili

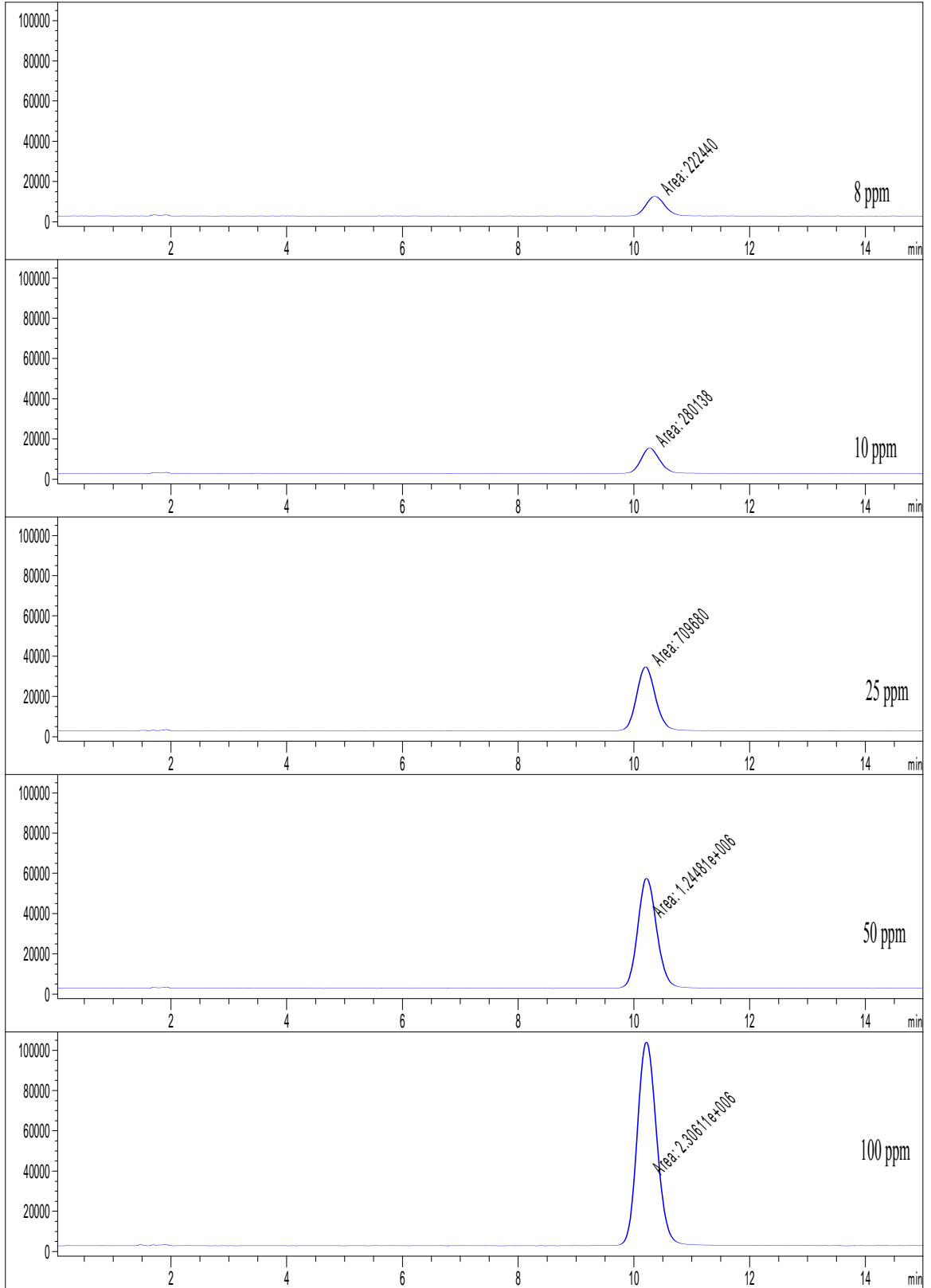
a) kromatogramların farklı gösterilişi ve b) kolon sıcaklığının alıkonma süreleriyle değişimi.



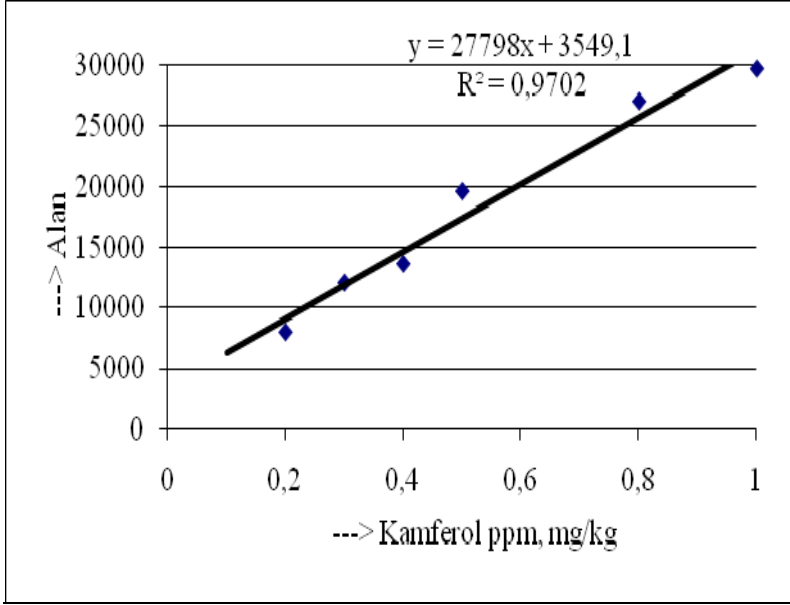
Şekil 4.39. HPLC-MS ile kamferol için kalibrasyon çözeltilerinin kromatogramları.



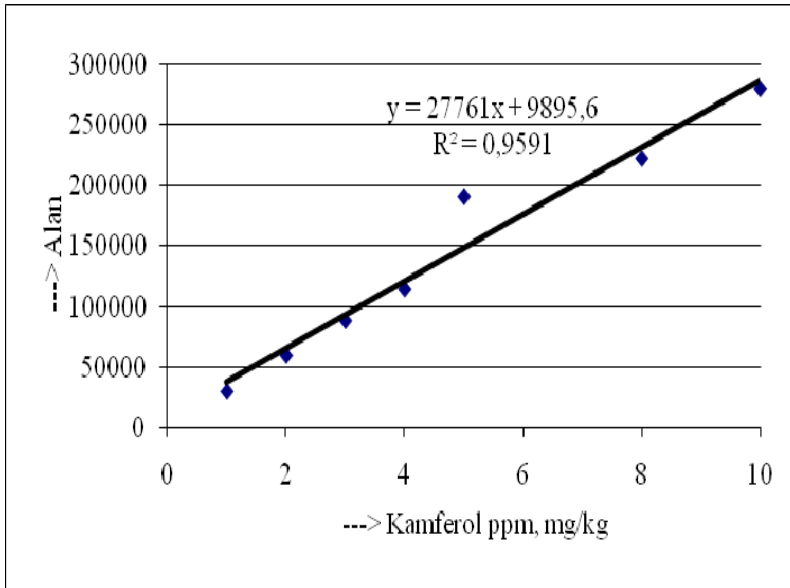
Şekil 4.40. HPLC-MS ile kamferol için kalibrasyon çözeltilerinin kromatogramları.



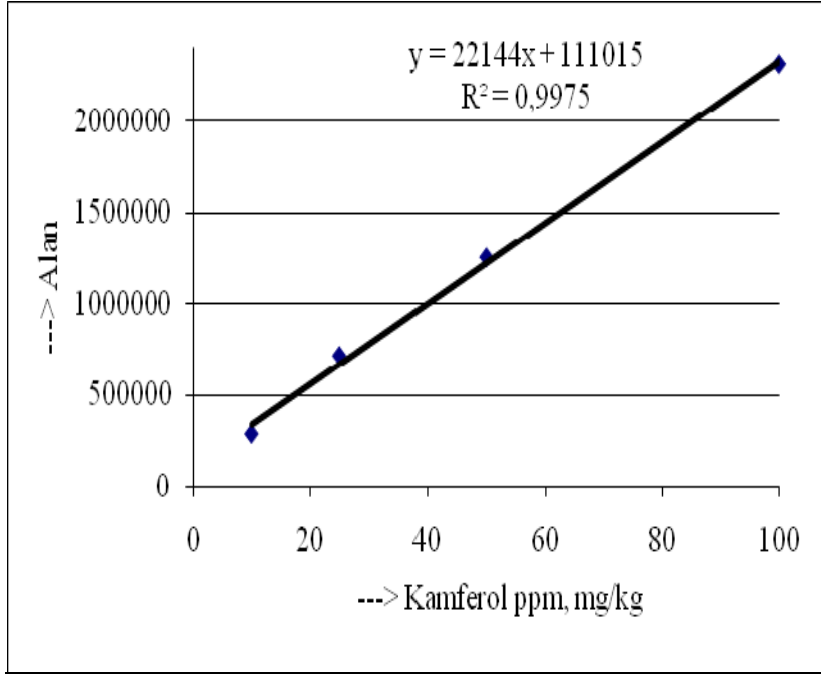
Şekil 4.41. HPLC-MS ile kamferol için kalibrasyon çözeltilerinin kromatogramları.



Şekil 4.42. HPLC-MS ile kamferolün 0.2-1 ppm aralığına ait kalibrasyon eğrisi.

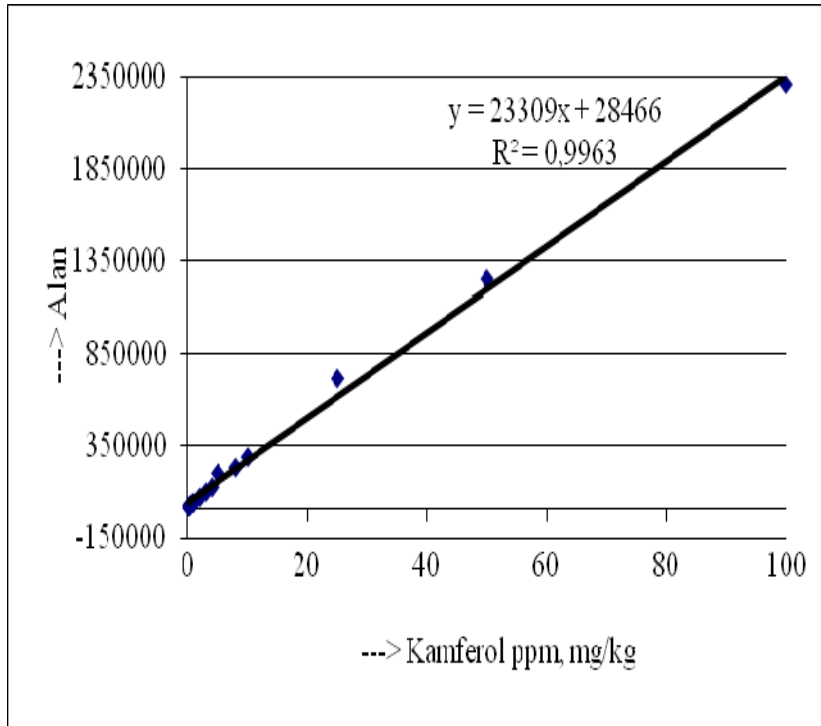


Şekil 4.43. HPLC-MS ile kamferolün 1-10 ppm aralığına ait kalibrasyon eğrisi.



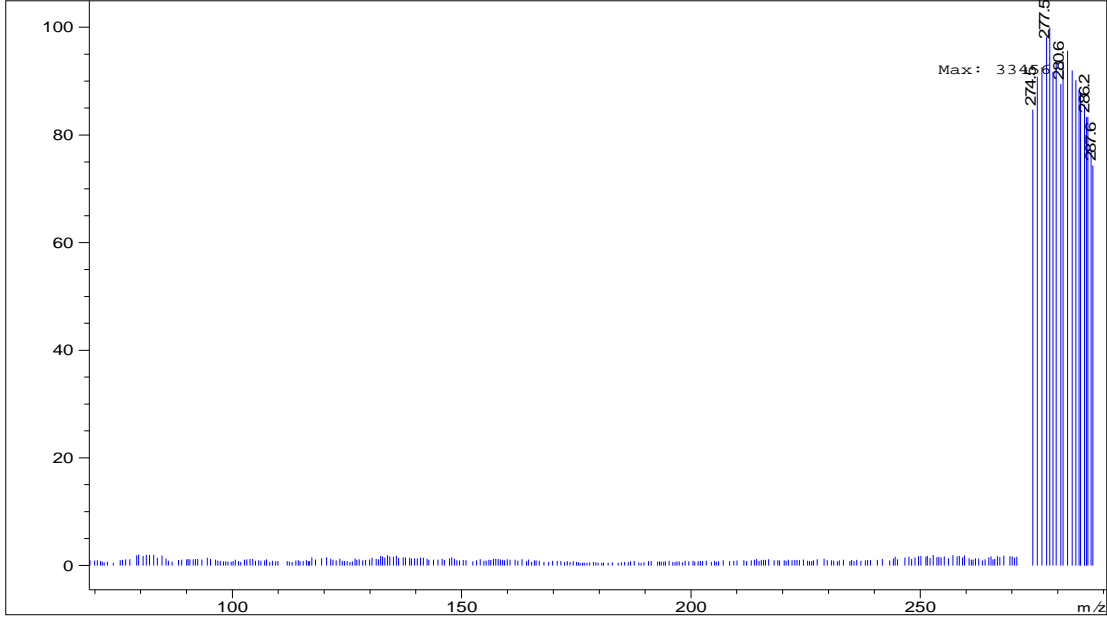
Kamferol ppm	Alan
10	280138
25	709680
50	1244810
100	2306110

Şekil 4.44. HPLC-MS ile kamferolün 10-100 ppm aralığına ait kalibrasyon eğrisi.



Kamferol ppm	Alan
0,1	
0,2	8030
0,3	12063
0,4	13646
0,5	19625
0,8	27116
1	29768
2	59483
3	88426
4	114311
5	190830
8	222440
10	280138
25	709680
50	1244810
100	2306110

Şekil 4.45. HPLC-MS ile kamferolün 0.2-100 ppm aralığına ait kalibrasyon eğrisi.



Şekil 4.46. Kamferolun HPLC-MS ile optimum şartlarda elde edilen kütle spektrumu.

4.6. Bulgular

4.6.1. Akış Hızı ile İlgili Bulunan Sonuçlar

Şekil 4.2-4.3, 4.19-4.20 ve 4.32-4.33' te görüldüğü gibi en iyi akış hızının; miyrisetin için 0.7 ml/dk, kuersetin için 0.6 ml/dk ve kamferol için 0.8 ml/dk olarak deneysel çalışmada tespit edilirken pik simetrilerinin yanında, alıkonma süreleri ve alan değerleri de dikkate alındı.

4.6.2. Fragmentor ile İlgili Bulunan Sonuçlar

Şekil 4.4-4.5, 4.21-4.22 ve 4.34-4.35' te görüldüğü gibi en iyi fragmentor; miyrisetin için 170 V, kuersetin için 140 V ve kamferol için 140 V fragmentor olarak tespit edildi. Optimum parçalayıcı voltajına karar verirken pik simetrisi düzgün ve kütle spektrumlarının maksimum olduğu voltaj seçildi.

4.6.3. Enjeksiyon Hacmi ile İlgili Bulunan Sonuçlar

Şekil 4.6-4.7, 4.23 ve 4.36' da görüldüğü gibi optimum enjeksiyon hacmi; miyrisetin, kuersetin ve kamferol için 5 µl olarak tespit edildi. Optimum enjeksiyon hacmi seçilirken pik simetrisi en iyi olana karar verildi. Çünkü enjekte edilen maddenin miktarı arttıkça görünür şekilde pik simetrisi bozuldu.

4.6.4. Kolon Sıcaklığı ile İlgili Bulunan Sonuçlar

Şekil 4.8-4.9, 4.24 ve 4.37-4.38’ de görüldüğü gibi optimum kolon sıcaklığı miyrisetin için 40 °C, kuersetin için 30 °C ve kamferol için 40 °C olduğu yapılan çalışmada ayrı ayrı tespit edilirken pik simetrisi ve MS spektrumlarının maksimum değerlerine göre karar verildi. Kolon sıcaklığının 20-55 °C aralığında çalışılması sonucu piklerin çıkış zamanları ve MS maksimum değerleri değiştiği gözlemlendi. Bu değişimler göz önüne alınarak simetrisi en iyi olan pik seçildi.

4.7. Ölçümlerle İlgili Elde Edilen Optimum Şartlar

Flavonollerin analizi için optimize edilen HPLC ve MS parametreleri aşağıda tablolar halinde verilmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Flavonollerin optimum tayin koşulları.

Şartlar	Miyrisetin	Kuersetin	Kamferol
Akış hızı (ml/dk)	0.7	0.60	0.8
Kolon Sıcaklığı (°C)	40	30	40
Enj. hacmi (µl)	5	5	5
Fragmenter (parçalayıcı voltaj)	170	140	140
t, alıkonma süresi, dak.	3.7-4.6	9.9-11.3	9.9-10.9
Kolon özellikleri	4.6x150 mm, 5 µm ZORBAX Eclipse XDB-C18	4.6x150 mm, 5 µm ZORBAX Eclipse XDB-C18	4.6x150 mm, 5 µm ZORBAX Eclipse XDB-C18

4.8. Çalışılan Bitkilerde Bulunan Flavonollerin kromatogramları

Şekil 4.1’ de açıklandığı gibi ekstrakte edilen bitki örnekleri için Tablo 4.2’ de verilen optimum şartlar kullanılarak elde edilen HPLC-MS kromatogramları ve MS spektrumları Şekil 4.47-4.94’ te verildi.

4.8.1. Miyrisetin için Bitkilerden Elde Edilen Kromatogramlar

Şekil 4.1' de açıklandığı gibi ekstrakte edilen bitki örnekleri için Tablo 4.2' de miyrisetin için verilen optimum şartlar kullanılarak elde edilen HPLC-MS kromatogramları ve MS spektumları Şekil 4.47-4.65' te verildi.

Şekil 4.47 ve 4.48' de 5 gr semizotunda miyrisetin tayinine ilişkin HPLC-MS kromatogramları birlikte ve ayrı verilmiştir. Semizotunun MS spektrumuna bakıldığında (Şekil 4.49) SIM tarama m/z 319 değerinin olduğu ve SCAN taramada ise miyrisetine ait olan spektrum görülmektedir.

Şekil 4.50-4.51' de semizotunda miyrisetin tayini için standart ekleme yöntemine ilişkin HPLC-MS kromatogramları birlikte ve ayrı verilmekle birlikte, Şekil 4.52' de standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri birlikte verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi standart ekleme metodunun eğiminin 20.717, kalibrasyon grafiği eğiminin 20.095 olduğu ve bu değerlerin birbirine yakın olmakla birlikte farklı oldukları anlaşılmaktadır. Bu nedenle semizotunda miyrisetin tayininde kimyasal girişim olduğu sonucuna varılmıştır. Böylece semizotu için elde edilen standart ekleme metoduyla elde edilen konsantrasyon değeri 2.6 ppm olarak hesaplandı. Gerekli hesaplamalar yapıldığı zaman semizotunda 47 ppm miyrisetin bulunduğu görülmektedir.

Şekil 4.53 ve 4.54' te 2.5 gr ısırgan otunda miyrisetin tayinine ilişkin HPLC-MS kromatogramları birlikte ve ayrı verilmiştir. Isırgan otunun MS spektrumuna bakıldığında (Şekil 4.55) SCAN taramada miyrisetine ait olan spektrum görülmektedir.

Şekil 4.56' da ısırgan otunda miyrisetin tayini için standart ekleme yöntemine ilişkin HPLC-MS kromatogramı verilmekte ve Şekil 4.57' de standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri birlikte verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi standart ekleme metodunun eğiminin 20.584, kalibrasyon grafiği eğiminin 20.882 olduğu ve bu değerlerin birbirine yakın olmakla birlikte farklı oldukları anlaşılmaktadır. Bu nedenle ısırgan otunda miyrisetin tayininde kimyasal girişim olduğu sonucuna varılmıştır. Böylece ısırgan otu için standart ekleme metoduyla elde edilen konsantrasyon değeri 0.35 ppm olarak hesaplandı. Gerekli hesaplamalar yapıldığında ise ısırgan otunda 13 ppm miyrisetin bulunduğu görülmektedir.

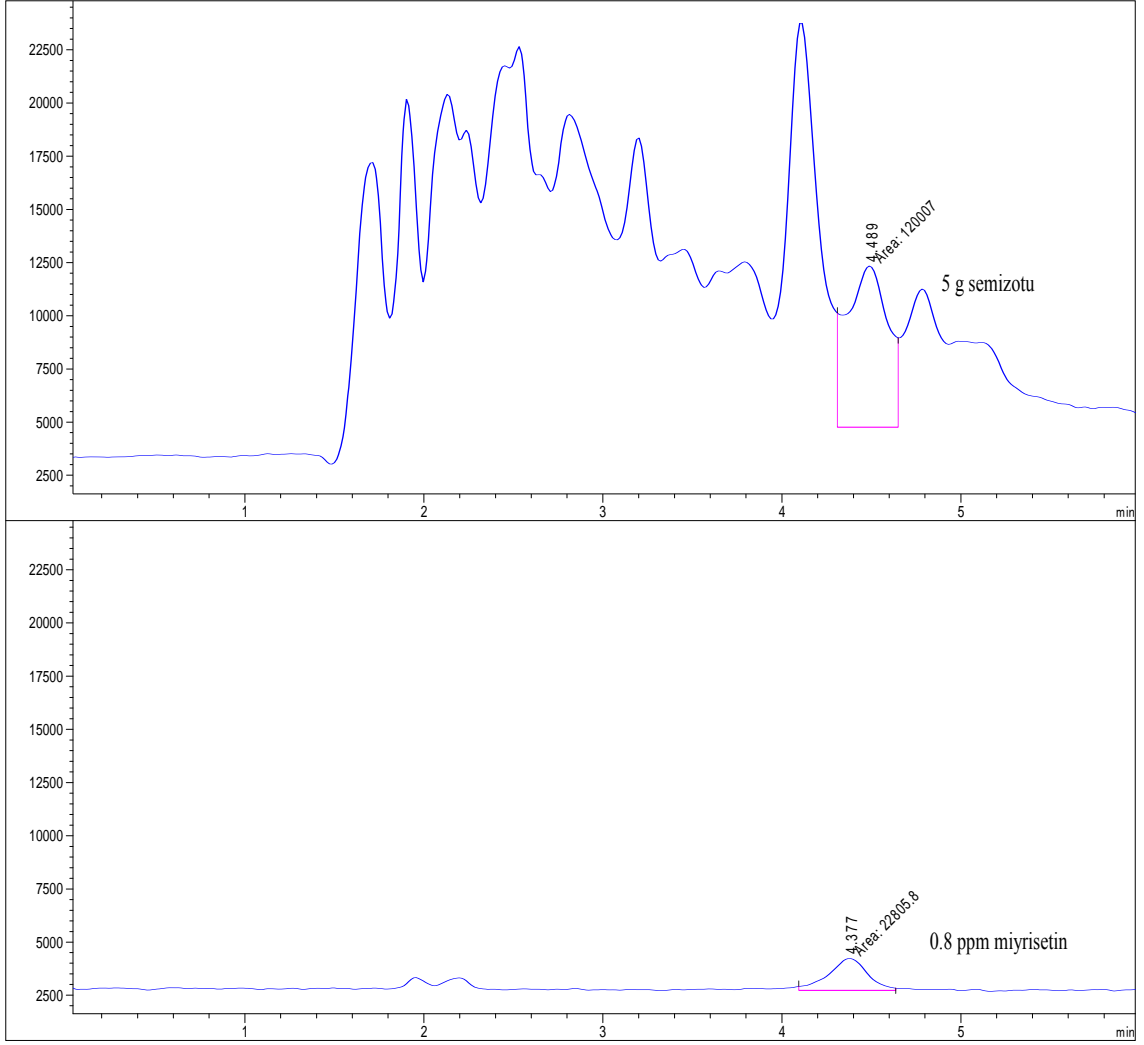
Şekil 4.58' de 5 gr menengiçte miyrisetin tayinine ilişkin HPLC-MS kromatogramı verilmiştir. Menengiçin MS spektrumuna bakıldığında (Şekil 4.59) SCAN taramada miyrisetine ait olan spektrum görülmektedir.

Şekil 4.60' da menengiçte miyrisetin tayini için standart ekleme yöntemine ilişkin HPLC-MS kromatogramı verilmekte ve Şekil 4.61' de standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri birlikte verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi standart ekleme metodunun eğiminin 18.777,

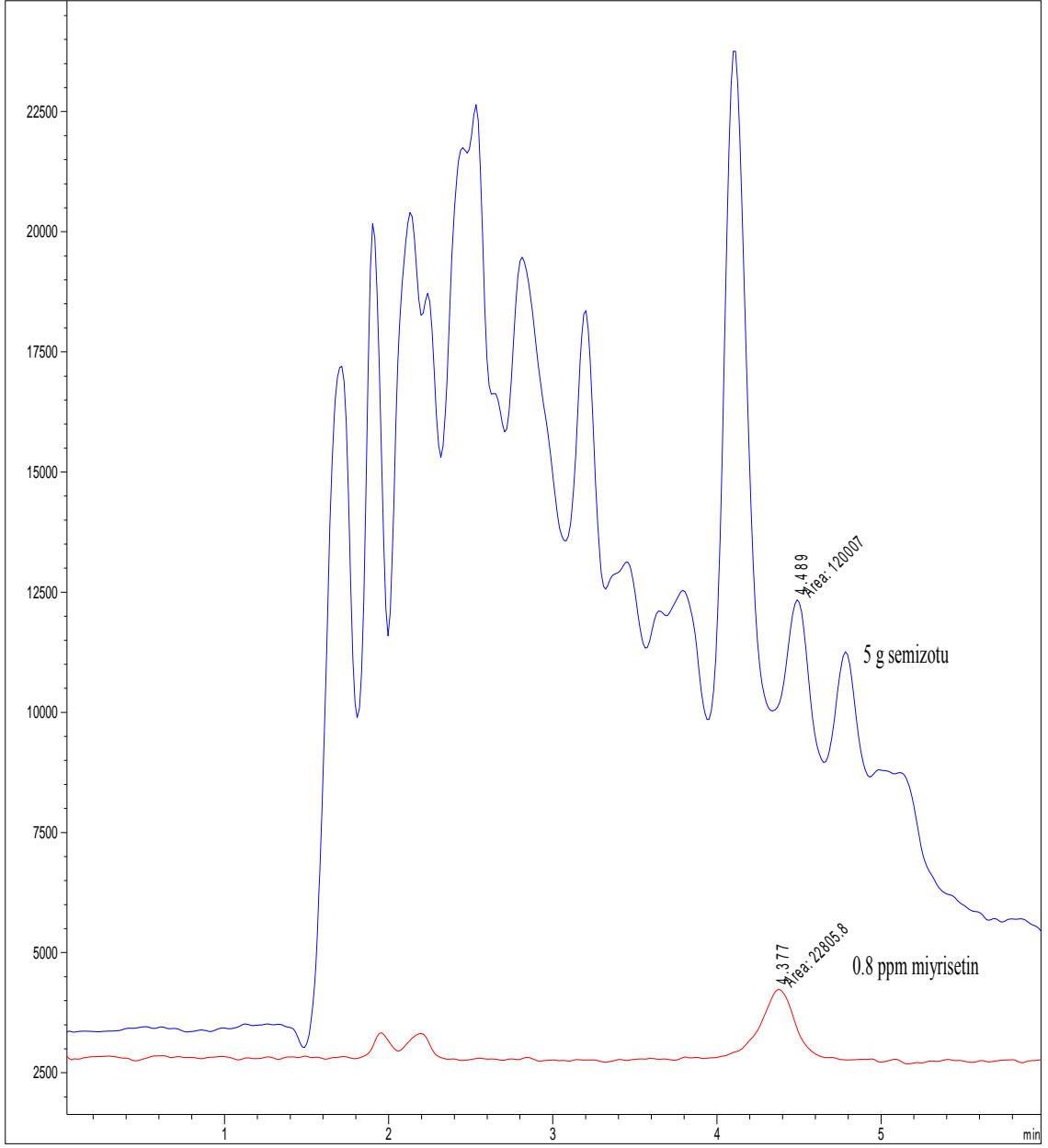
kalibrasyon grafiği eğiminin 19.465 olduğu ve bu değerleri birbirine yakın olmakla birlikte farklı oldukları anlaşılmaktadır. Bu nedenle menengiçte miyrisetin tayininde kimyasal girişim olduğu sonucuna varılmıştır. Böylece menengiç için elde edilen standart ekleme metoduyla elde edilen konsantrasyon değeri 0.29 ppm olarak hesaplandı. Gerekli hesaplamalar yapıldığında menengiçte 5.2 ppm miyrisetin bulunduğu görülmektedir.

Şekil 4.62' de 5 gr kuşburnunda miyrisetin tayinine ilişkin HPLC-MS kromatogramı verilmiştir. Kuşburnunun MS spektrumuna bakıldığında (Şekil 4.63) SIM tarama m/z 319 değerinin olduğu ve SCAN taramada ise miyrisetine ait olan spektrum görülmektedir.

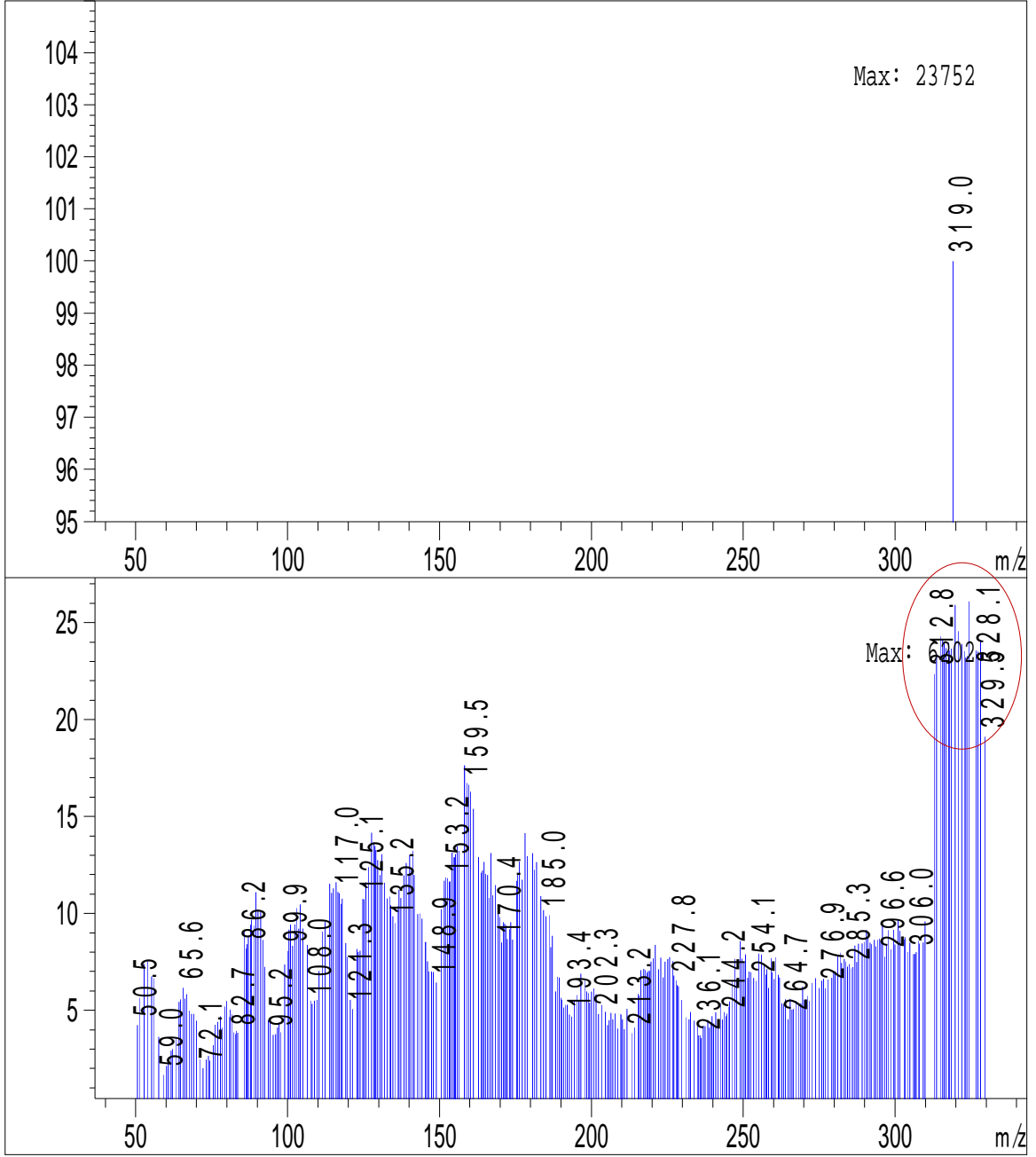
Şekil 4.64' te kuşburnunda miyrisetin tayini için standart ekleme yöntemine ilişkin HPLC-MS kromatogramı verilmekte ve Şekil 4.65' te standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri birlikte verilmiştir. Şekilden de görüldüğu gibi standart ekleme metodunun eğiminin 20.095, kalibrasyon grafiği eğiminin 20.415 olduğu ve bu değerlerin birbirine yakın olmakla birlikte farklı oldukları anlaşılmaktadır. Bu nedenle kuşburnunda miyrisetin tayininde kimyasal girişim olduğu sonucuna varılmıştır. Böylece kuşburnu için elde edilen standart ekleme metoduyla elde edilen konsantrasyon değerleri 0.035 ppm olarak hesaplandı. Gerekli hesaplamalar yapıldığında kuşburnunda 0.63 ppm miyrisetin bulunduğu görülmektedir.



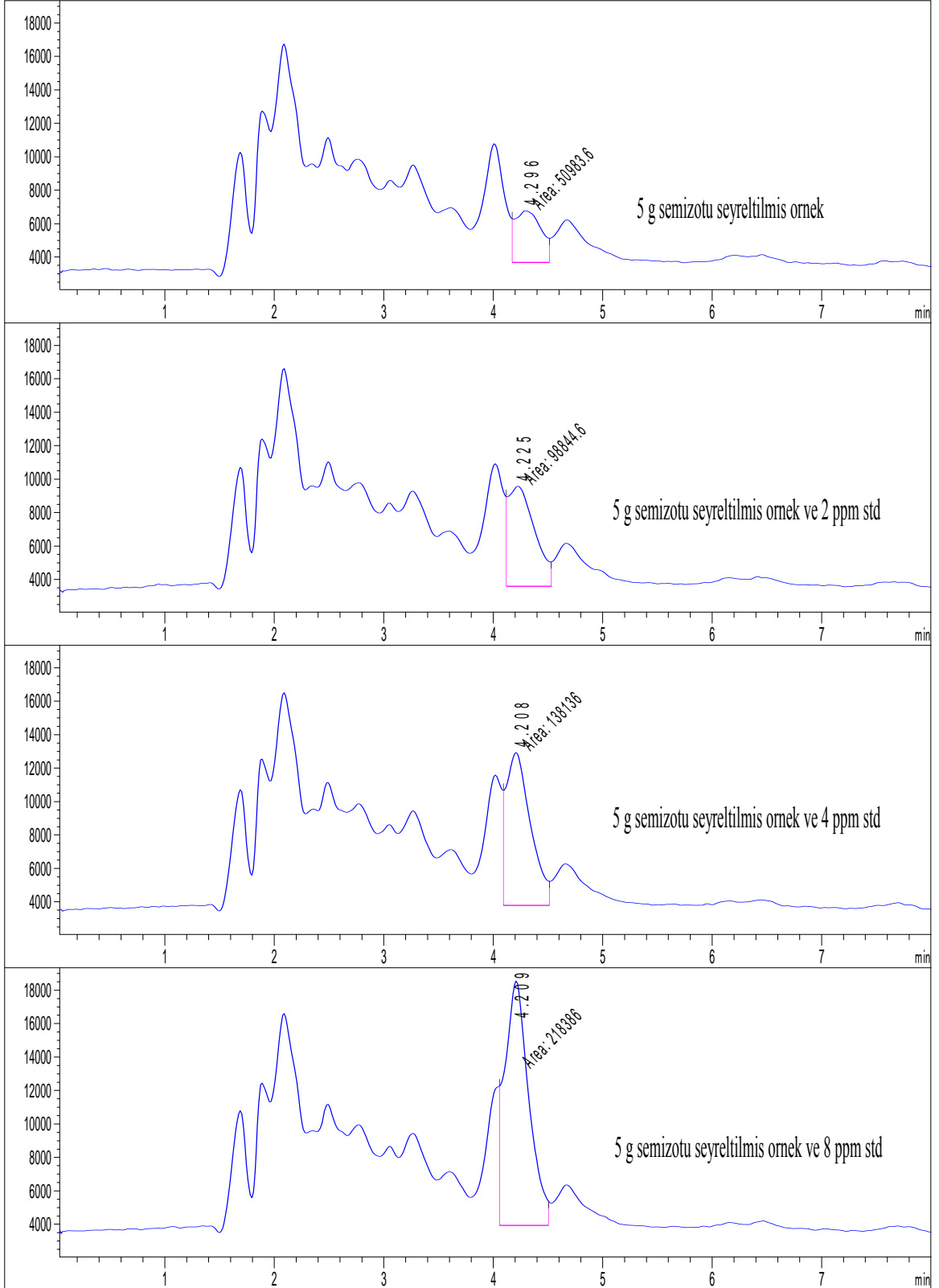
Şekil 4.47. Semizotunda miyrisetin tayinine ilişkin HPLC-MS kromatogramı.



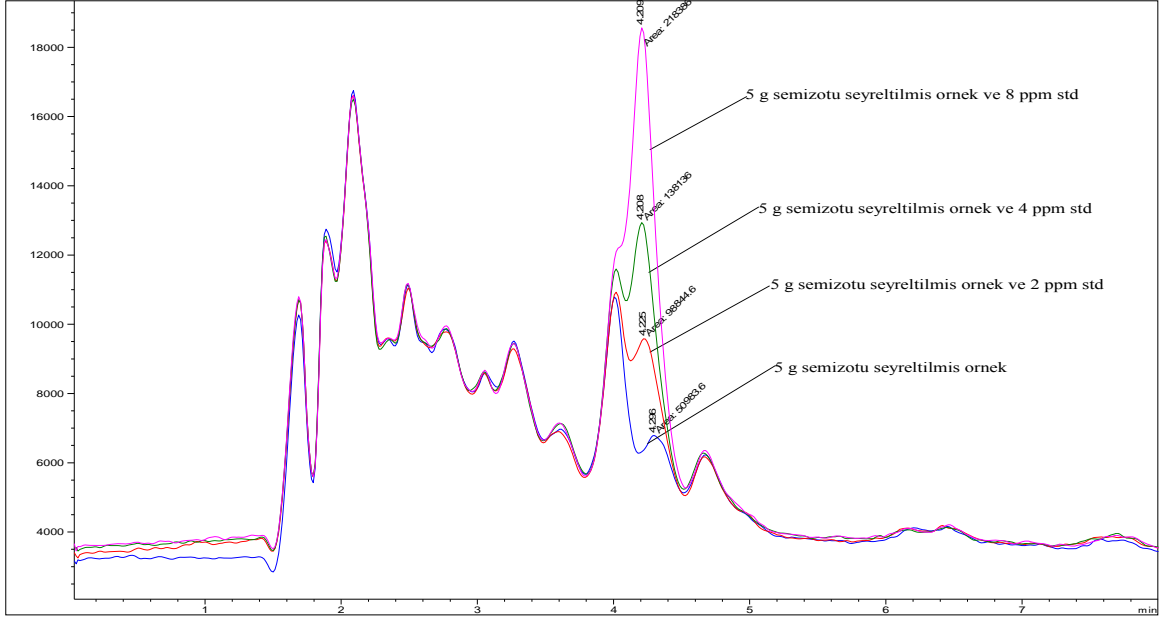
Şekil 4.48. Semizotunda miyrisetin tayinine ilişkin HPLC-MS kromatogramının farklı gösterimi.



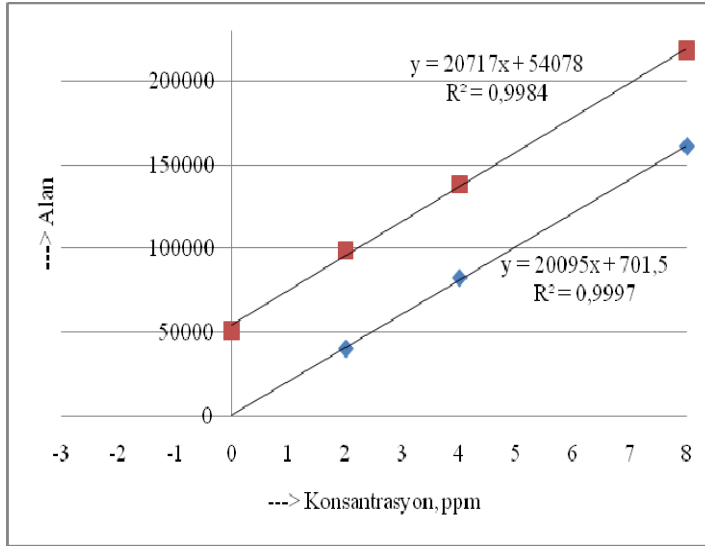
Şekil 4.49. Semizotunda miyrisetin tayini için elde edilen kütle (SIM-SCAN) spektrumu.



Şekil 4.50. Semizotunda miyrisetin tayini için uygulanan standart ekleme metoduyla elde edilen HPLC-MS kromatogramları.

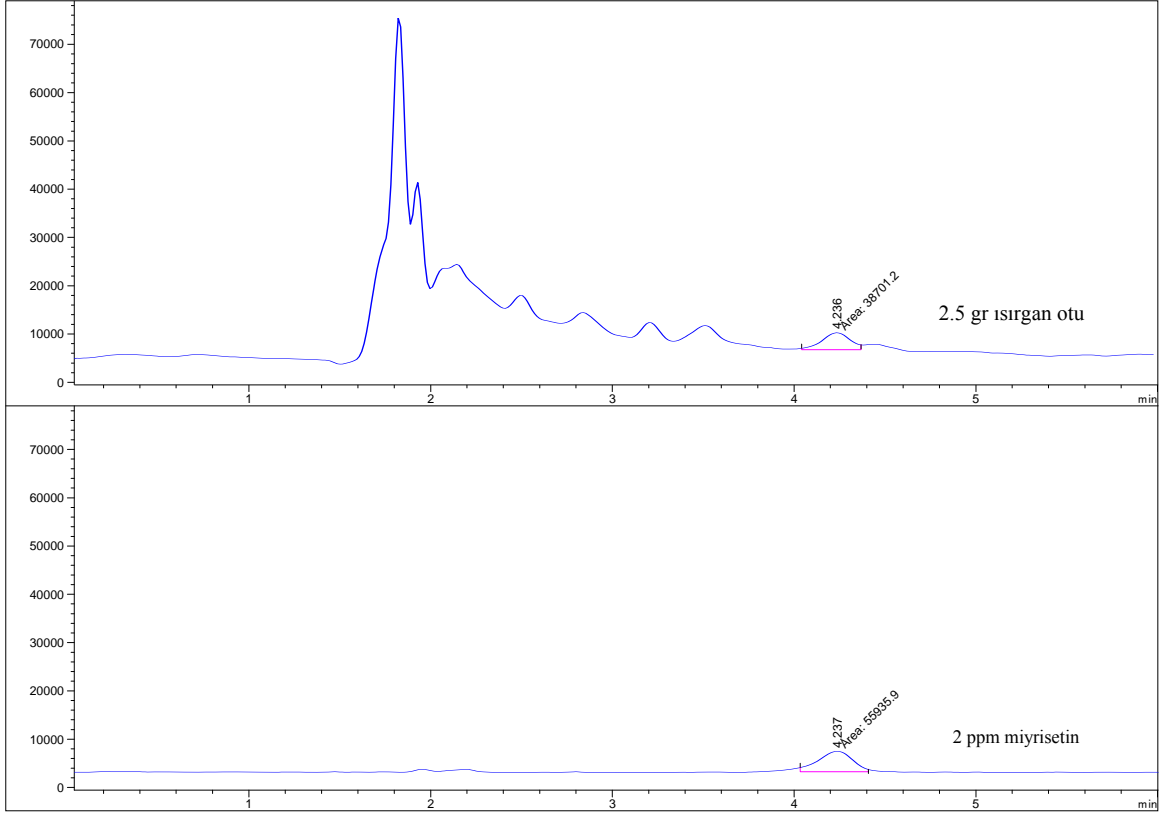


Şekil 4.51. Semizotunda miyrisetin tayini için uygulanan standart ekleme metoduyla elde edilen HPLC-MS kromatogramlarının farklı gösterimi.

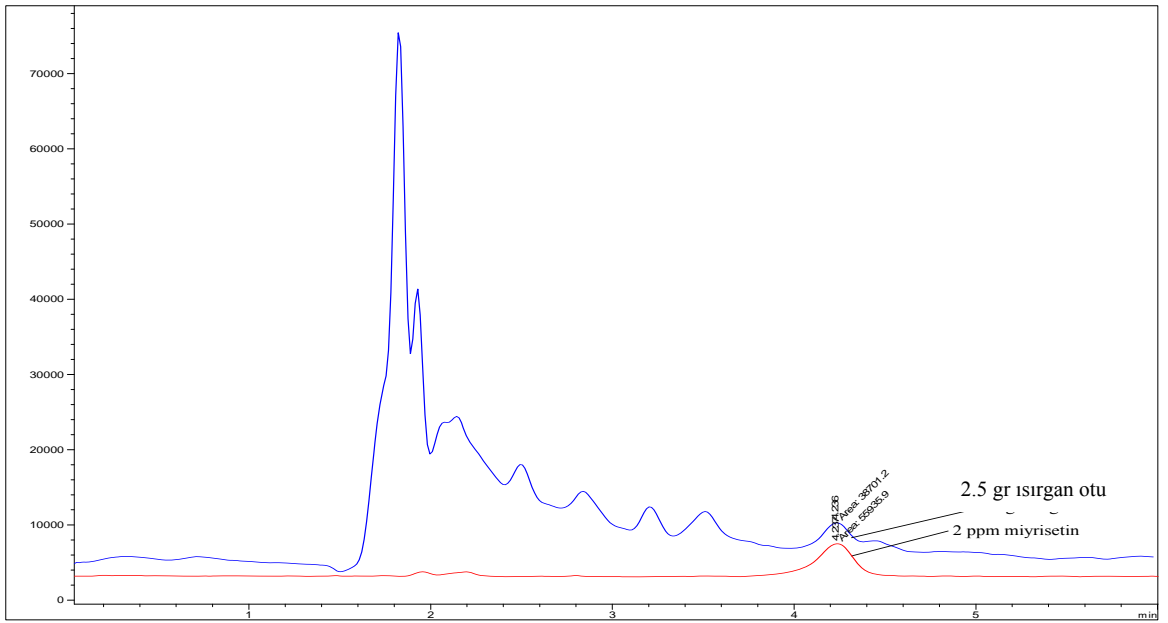


ppm	Alan	Örnek alan
0		50984
2	40027	98845
4	82377	138136
8	161028	218386

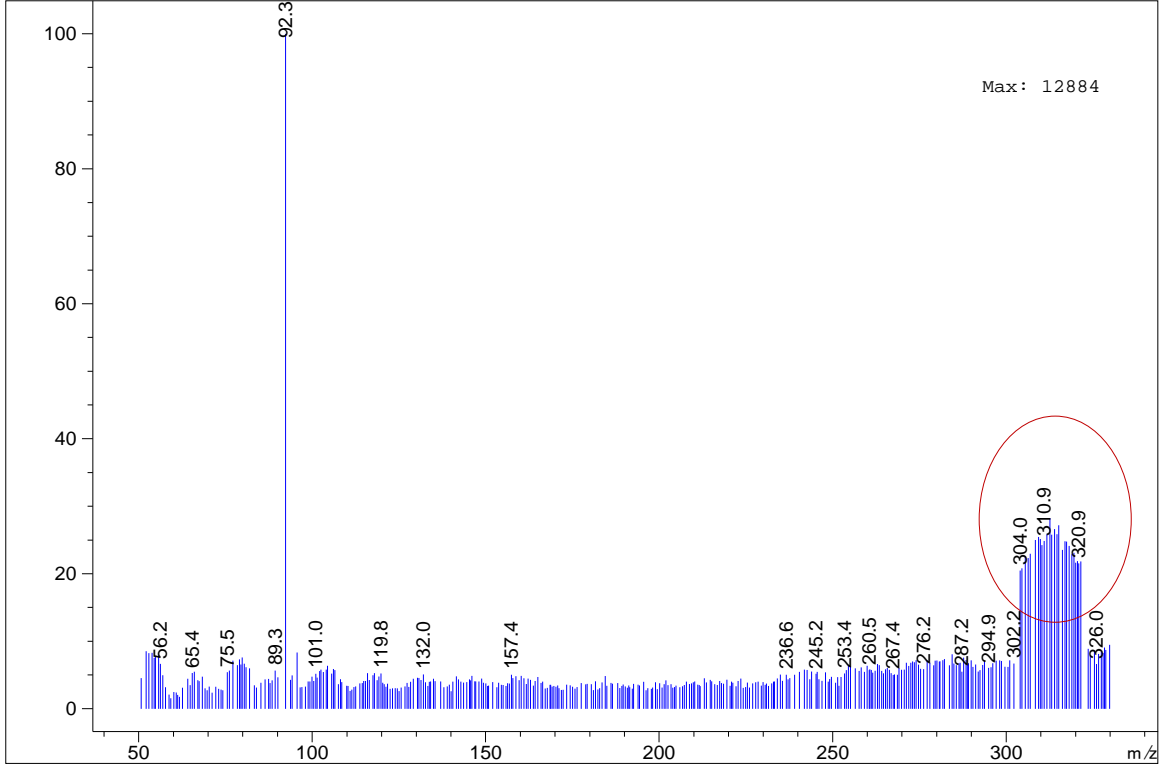
Şekil 4.52. Semizotu miyrisetin tayini için elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri.



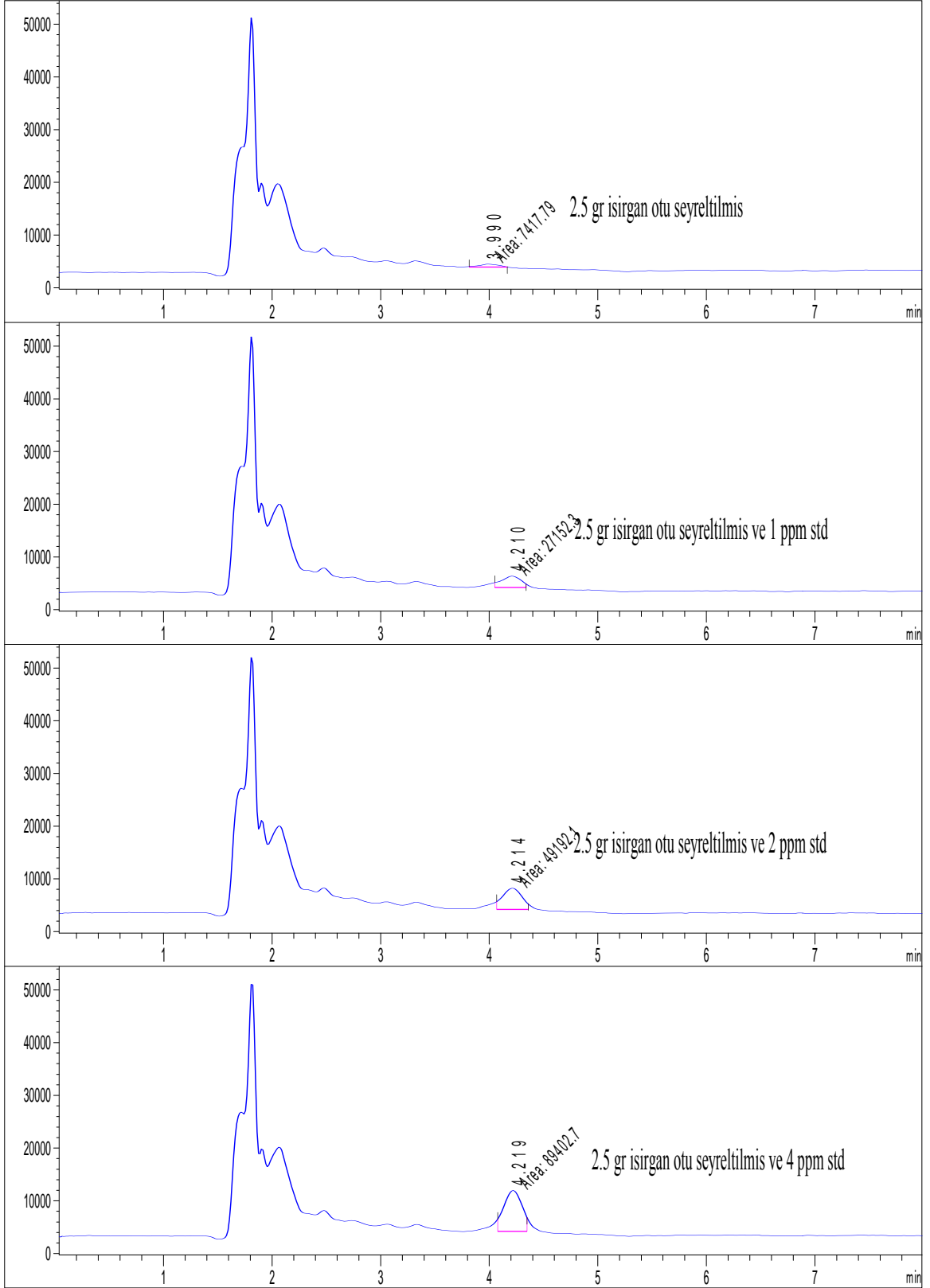
Şekil 4.53. ısırgan otunda miyrisetin tayinine ilişkin HPLC-MS kromatogramı.



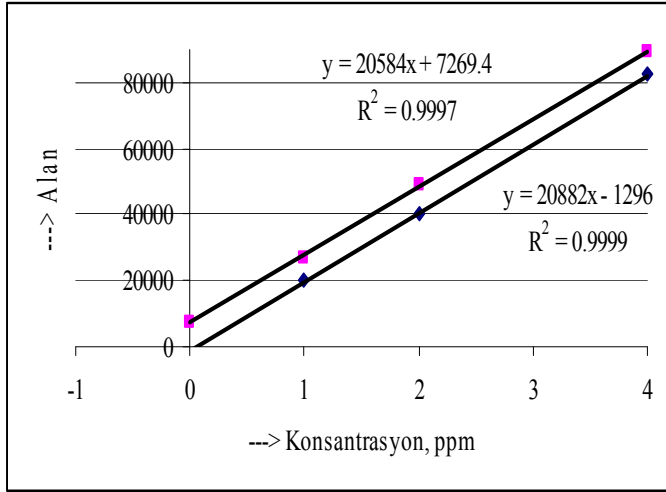
Şekil 4.54. ısırgan otunda miyrisetin tayinine ilişkin HPLC-MS kromatogramının farklı gösterimi.



Şekil 4.55. Isırgan otunda miyrisetin tayini için elde edilen kütle (SCAN) spektrumu.

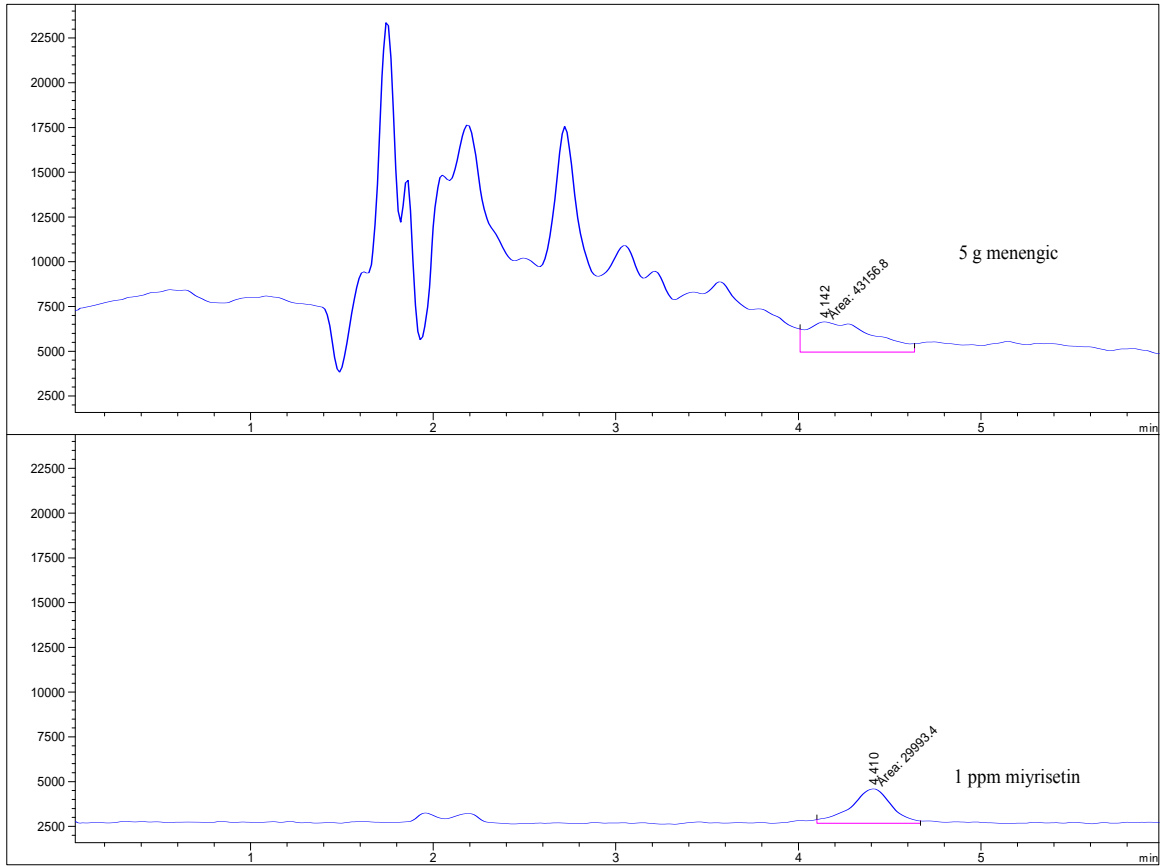


Şekil 4.56. Isirgan otunun miyrisetin tayini için uygulanan standart ekleme metoduyla elde edilen HPLC-MS kromatogramları.

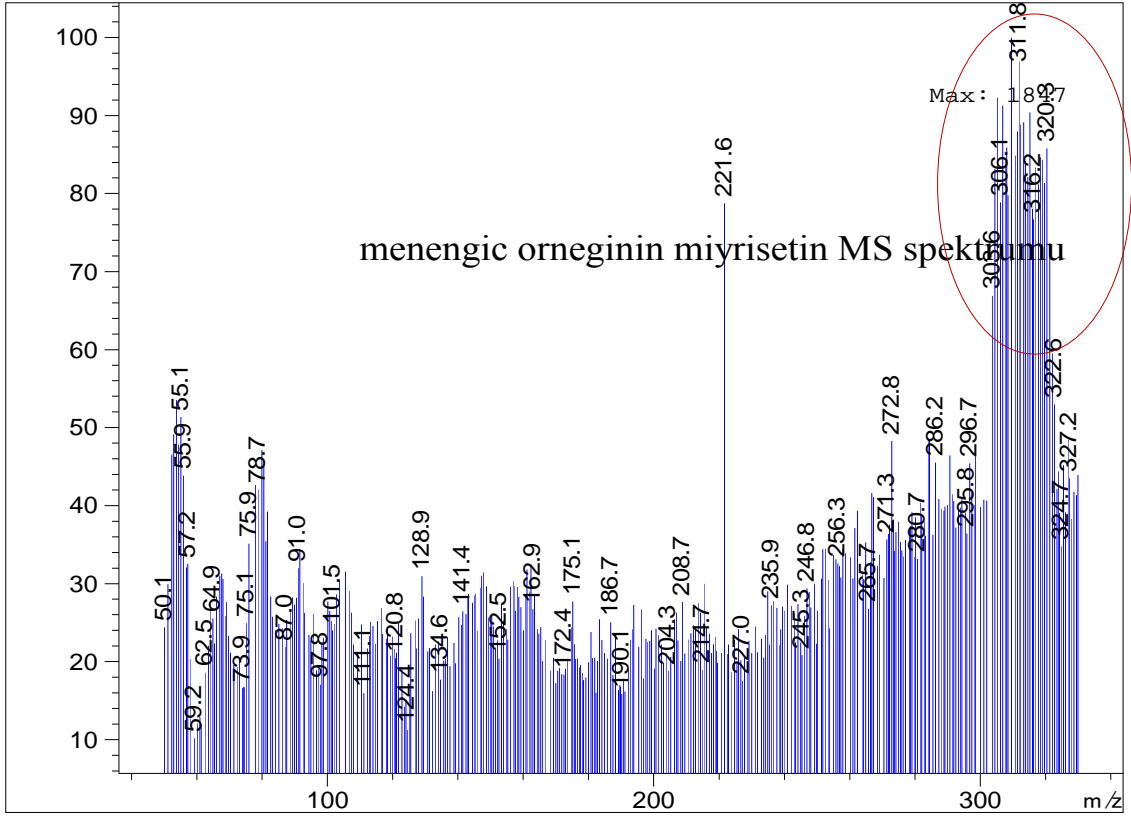


ppm	Alan	Örnek alan
0		7418
1	19879	27152
2	40027	49192
4	82377	89403

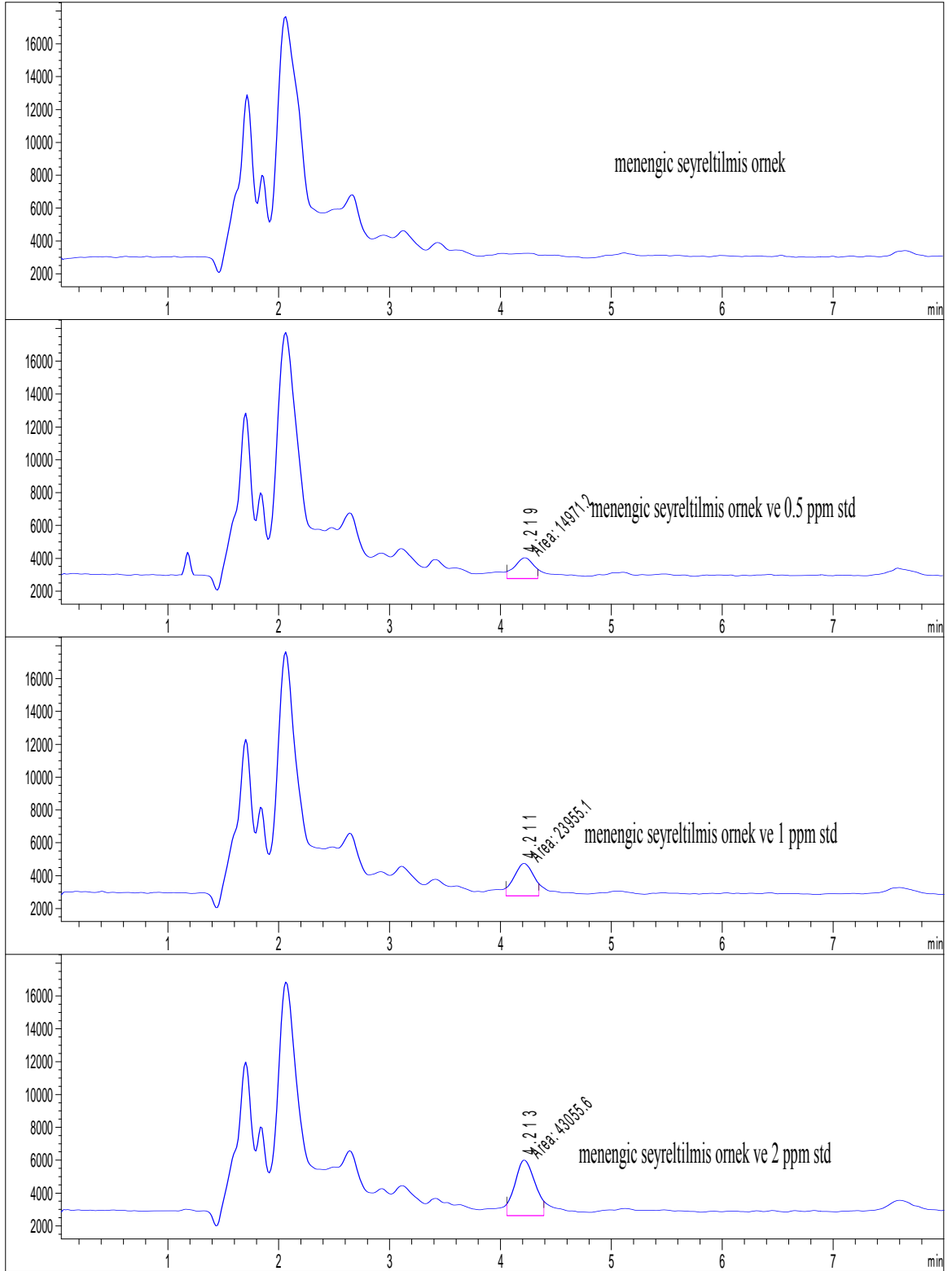
Şekil 4.57. Isırgan otu miyrisetin tayini için elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri.



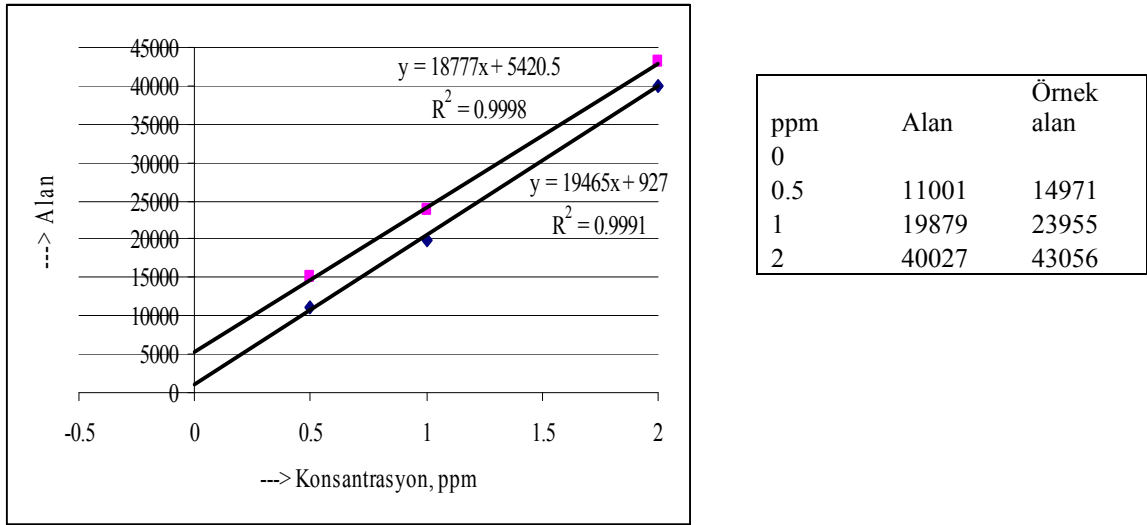
Şekil 4.58. Menengiçte miyrisetin tayinine ilişkin HPLC-MS kromatogramı.



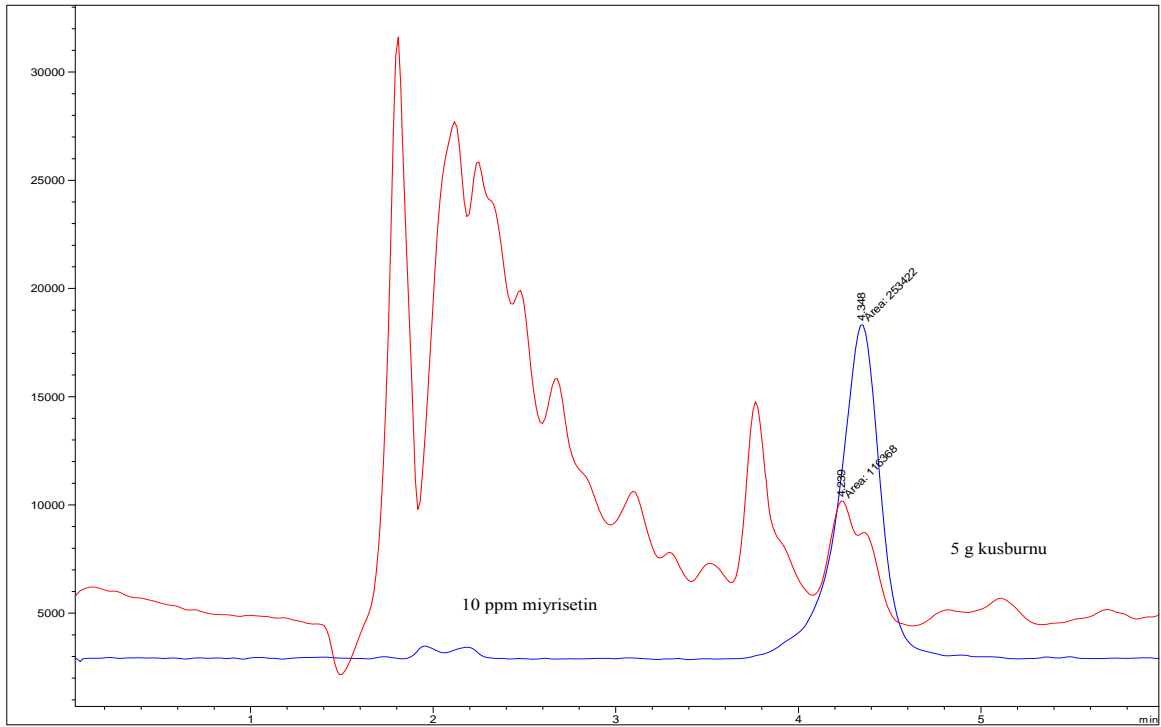
Şekil 4.59. Menengicte miyrisetin tayini için elde edilen kütle (SCAN) spektrumu.



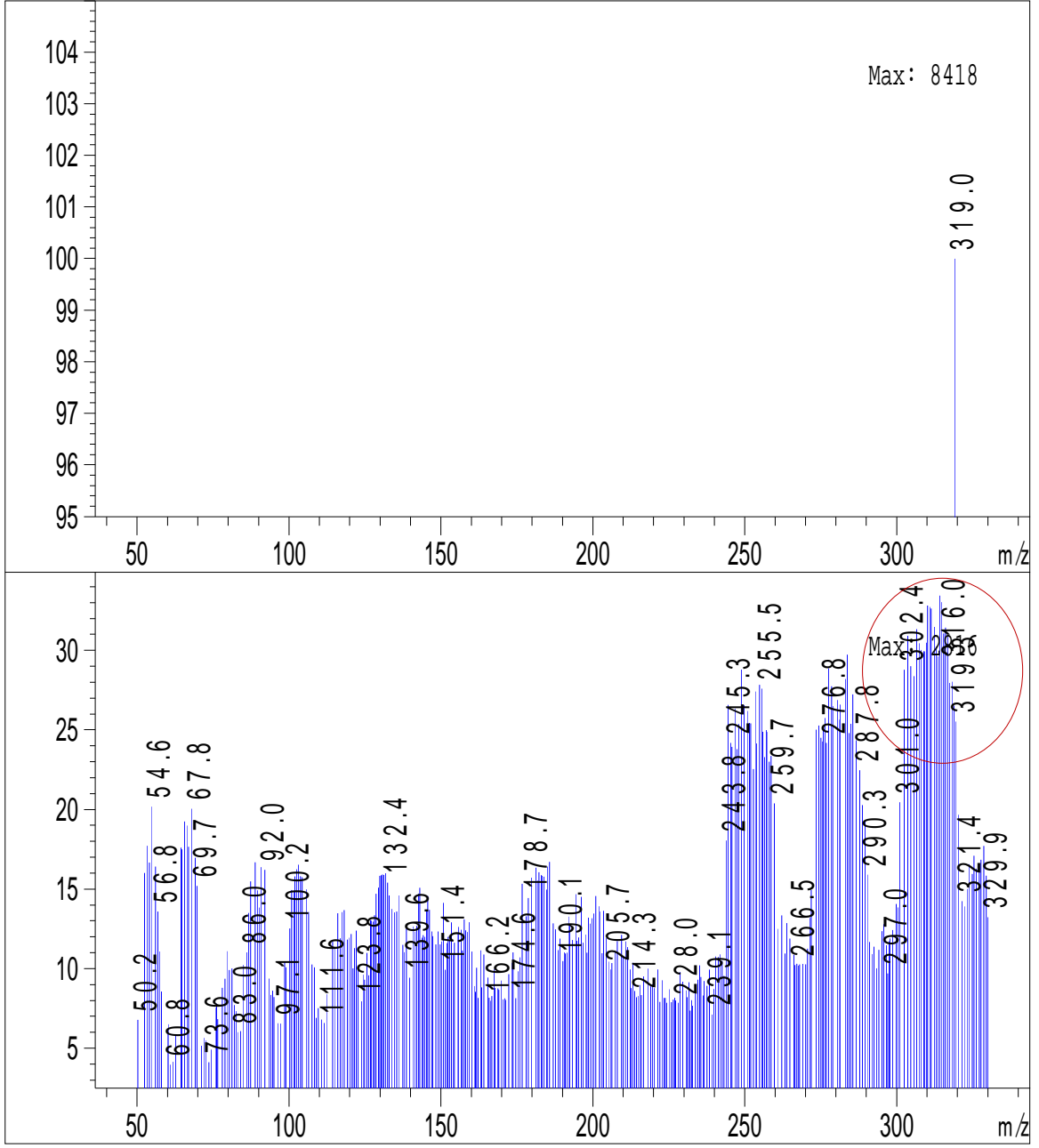
Şekil 4.60. Menengiçte miyrisetin tayini için uygulanan standart ekleme metoduyla elde edilen HPLC-MS kromatogramları.



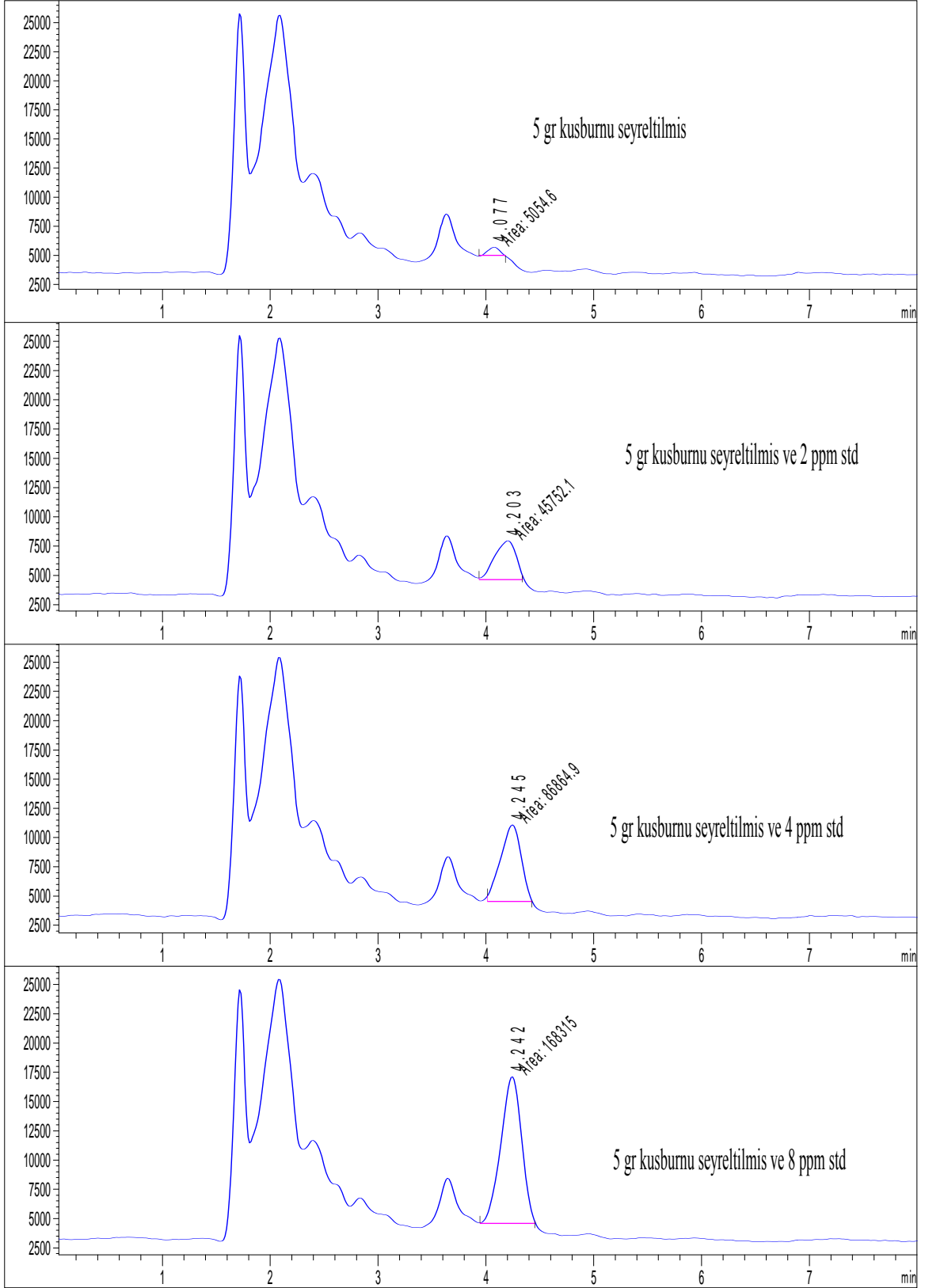
Şekil 4.61. Menengiçte miyrisetin tayini için elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri.



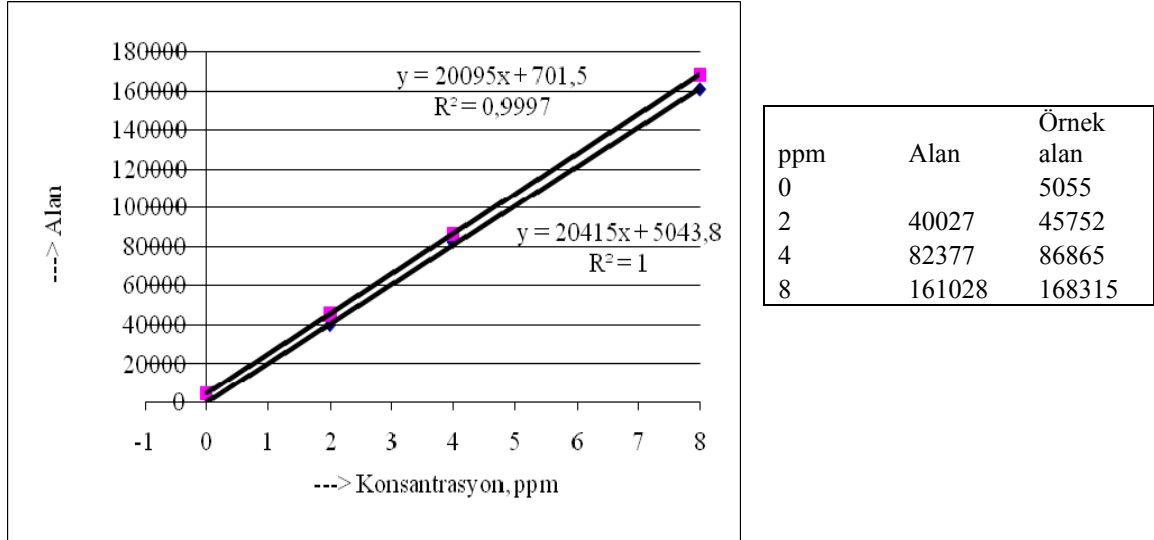
Şekil 4.62. Kusburnunda miyrisetin tayinine ilişkin HPLC-MS kromatogramı.



Şekil 4.63. Kuşburnunda miyrisetin tayini için elde edilen kütle (SIM-SCAN) spektrumu.



Şekil 4.64. Kuşburnunda miyrisetin tayini için uygulanan standart ekleme metoduyla elde edilen HPLC-MS kromatogramları.



Şekil 4.65. Kuşburnu miyrisetin tayini için elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri.

4.8.2. Kuersetin için Bitkilerden Elde Edilen Kromatogramlar

Şekil 4.1' de açıklandığı gibi ekstrakte edilen bitki örnekleri için Tablo 4.2' de kuersetin için verilen optimum şartlar kullanılarak elde edilen HPLC-MS kromatogramları ve MS spektrumları Şekil 4.66-4.78' de verildi.

Şekil 4.66' da semizotunda kuersetin tayini için elde edilen standart ekleme metoduyla elde edilen HPLC-MS kromatogramları görülmektedir. Şekil 4.67' de 10 gr semizotunda kuersetin tayinine ilişkin standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri birlikte verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi standart ekleme metodunun eğiminin 10934, kalibrasyon grafiği eğiminin 10013 olduğu ve bu değerlerin birbirine yakın olmakla birlikte farklı oldukları anlaşılmaktadır. Bu nedenle semizotunda kuersetin tayininde kimyasal girişim olduğu sonucuna varılmıştır. Böylece semizotu için standart ekleme metoduyla elde edilen konsantrasyon değeri 4.4 ppm olarak hesaplandı. Gerekli hesaplamalar yapıldığında 39 ppm kuersetin bulunduğu görülmektedir.

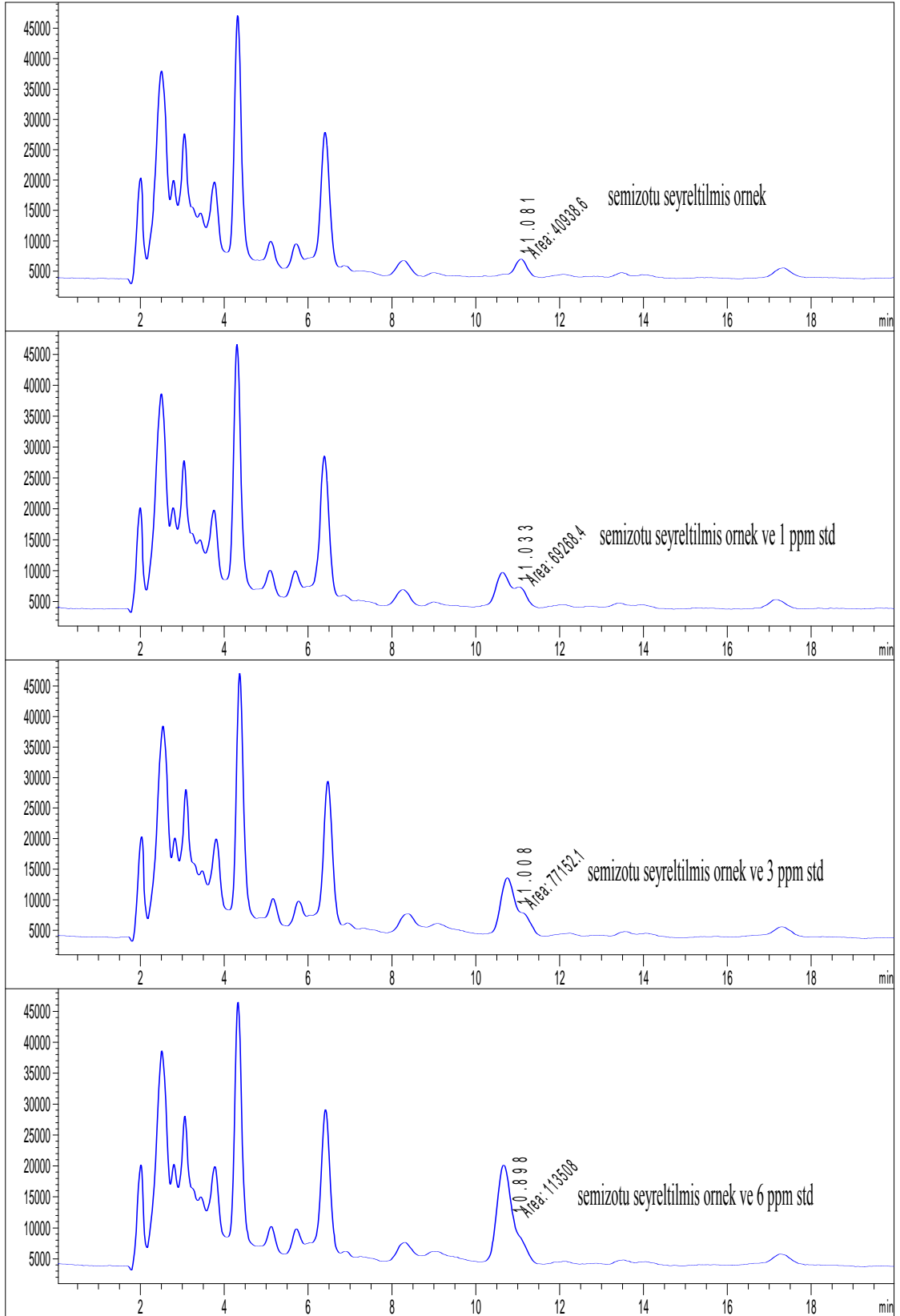
Semizotunun farklı gramlarının ekstraksiyonuyla elde edilen kuersetin HPLC-MS kromatogramları ise Şekil 4.68' de görülmektedir. Ayrıca semizotunun kuersetin MS spektrumuna bakıldığında (Şekil 4.69) SIM tarama m/z 303 değerinin olduğu ve SCAN taramada ise kuersetine ait olan spektrum görülmektedir.

Şekil 4.70' de ısırgan otunun farklı gramlarının ekstraksiyonuyla elde edilen HPLC-MS kromatogramları görülmektedir. Isırgan otunun kuersetin MS spektrumuna bakıldığında Şekil 4.71' de SIM tarama m/z 303 değerinin olduğu ve SCAN taramada ise kuersetine ait olan spektrum görülmektedir.

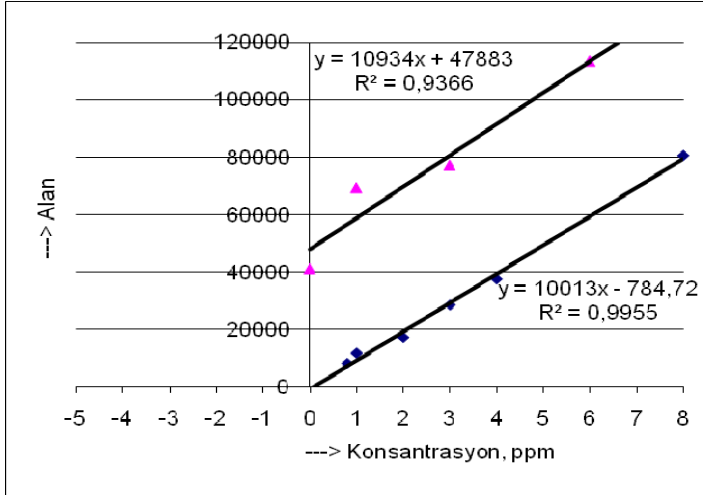
Isırgan otunda kuersetin tayini için uygulanan standart ekleme metoduyla elde edilen HPLC-MS kromatogramları Şekil 4.72' de görülmektedir. Şekil 4.73' te 2.5 gr ısırgan otunda kuersetin tayinine ilişkin standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri birlikte verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi standart ekleme metodunun eğiminin 23.369, kalibrasyon grafiği eğiminin 22.186 olduğu ve bu değerlerin birbirine yakın olmakla birlikte farklı oldukları anlaşılmaktadır. Bu nedenle ısırgan otunda kuersetin tayininde kimyasal girişim olduğu sonucuna varılmıştır. Böylece ısırgan otu için elde edilen standart ekleme metoduyla elde edilen konsantrasyon değeri 0.49 ppm olarak hesaplandı. Gerekli hesaplamalar yapıldığında 18 ppm kuersetin bulunduğu görülmektedir.

Şekil 4.74' de 5 gr menengiçte kuersetin tayinine ilişkin HPLC-MS kromatogramı verilmiştir. Menengiçin kuersetin MS spektrumuna bakıldığında (Şekil 4.75) SCAN taramda kuersetine ait olan spektrum görülmektedir.

Şekil 4.76' da 10 gr kuşburnunda kuersetin tayinine ilişkin HPLC-MS kromatogramı verilmiştir. Ayrıca Şekil 4.77' de 5 gr kuşburnunda kuersetin tayinine ilişkin HPLC-MS kromatogramı verilmiştir. Kuşburnunun kuersetin MS spektrumuna bakıldığında (Şekil 4.78) SIM tarama m/z 303 değerinin olduğu ve SCAN taramda ise kuersetine ait olan spektrum görülmektedir.

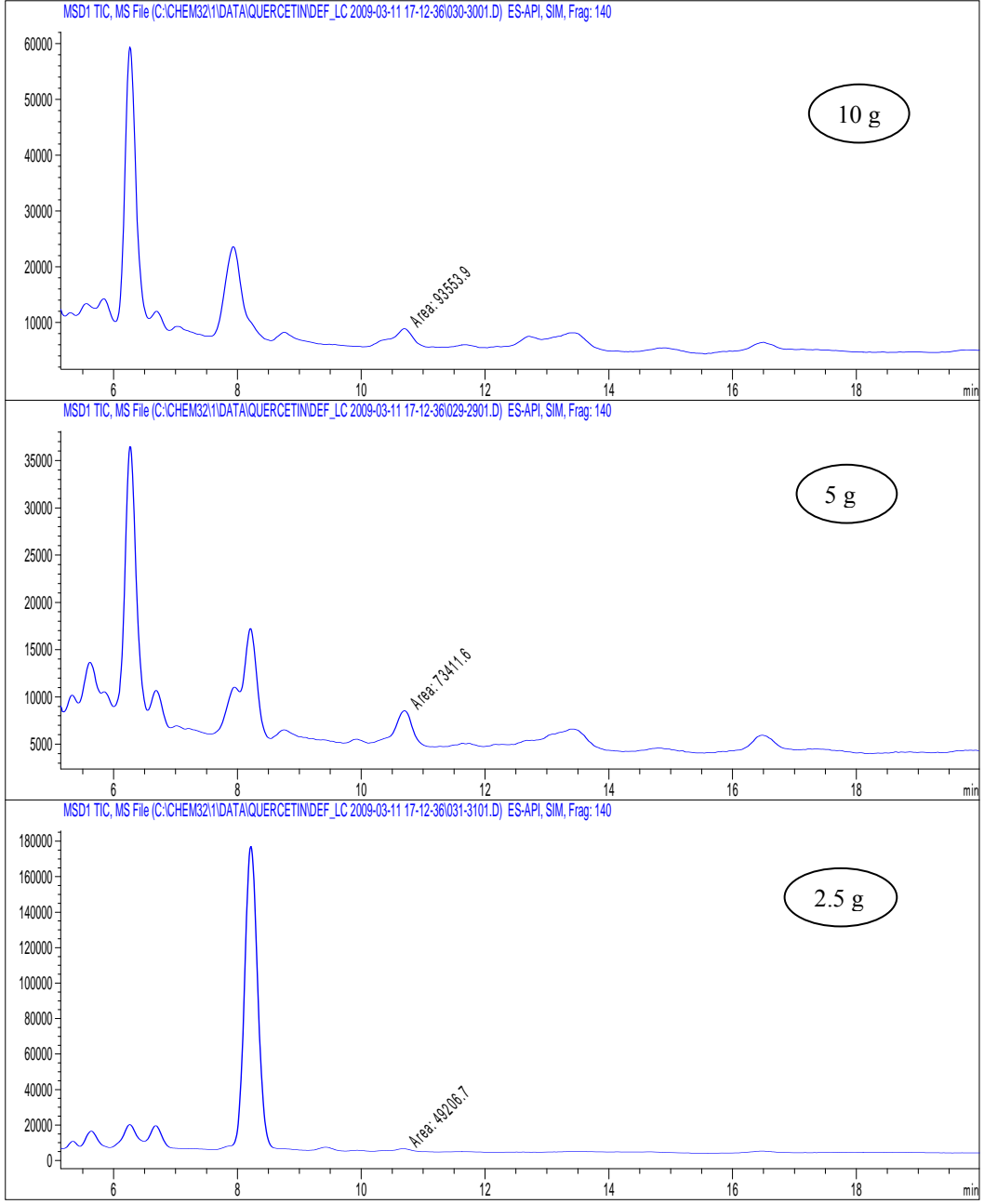


Şekil 4.66. Semizotunda kuersetin tayini için uygulanan standart ekleme metoduyla elde edilen HPLC-MS kromatogramları.

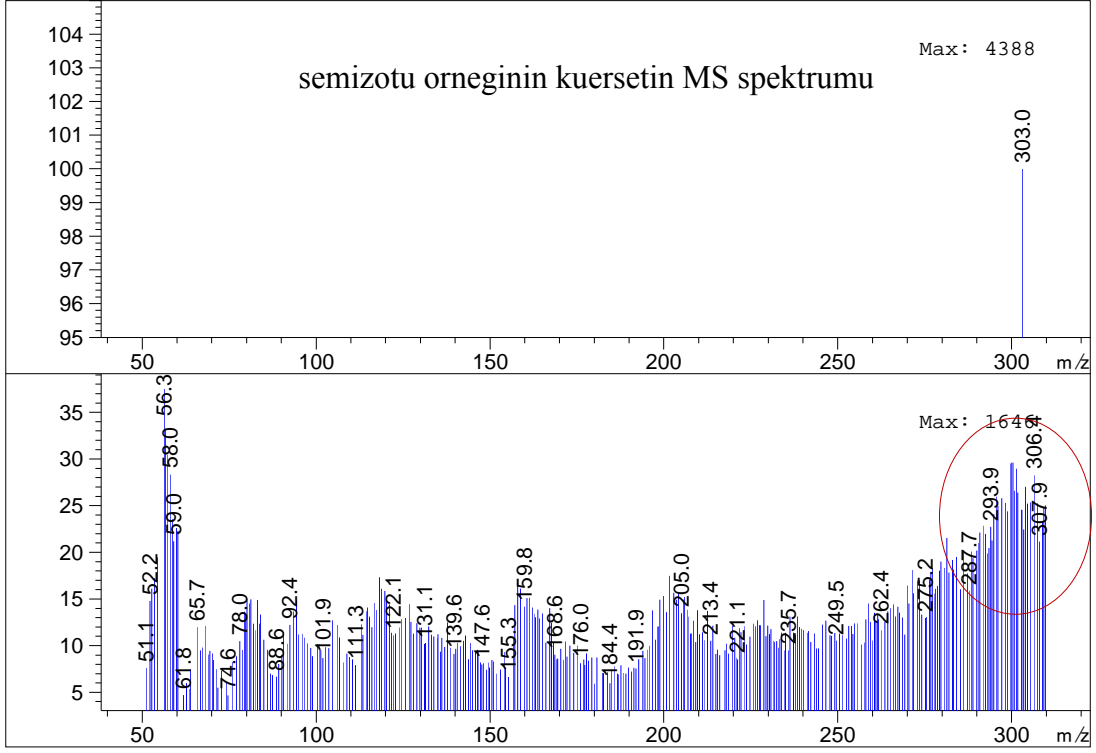


ppm	Alan	Örnek alan
0		40939
0.8	8059	
1	11671	69268
2	17165	
3	28532	77152
4	37509	
6		113508
8	80599	

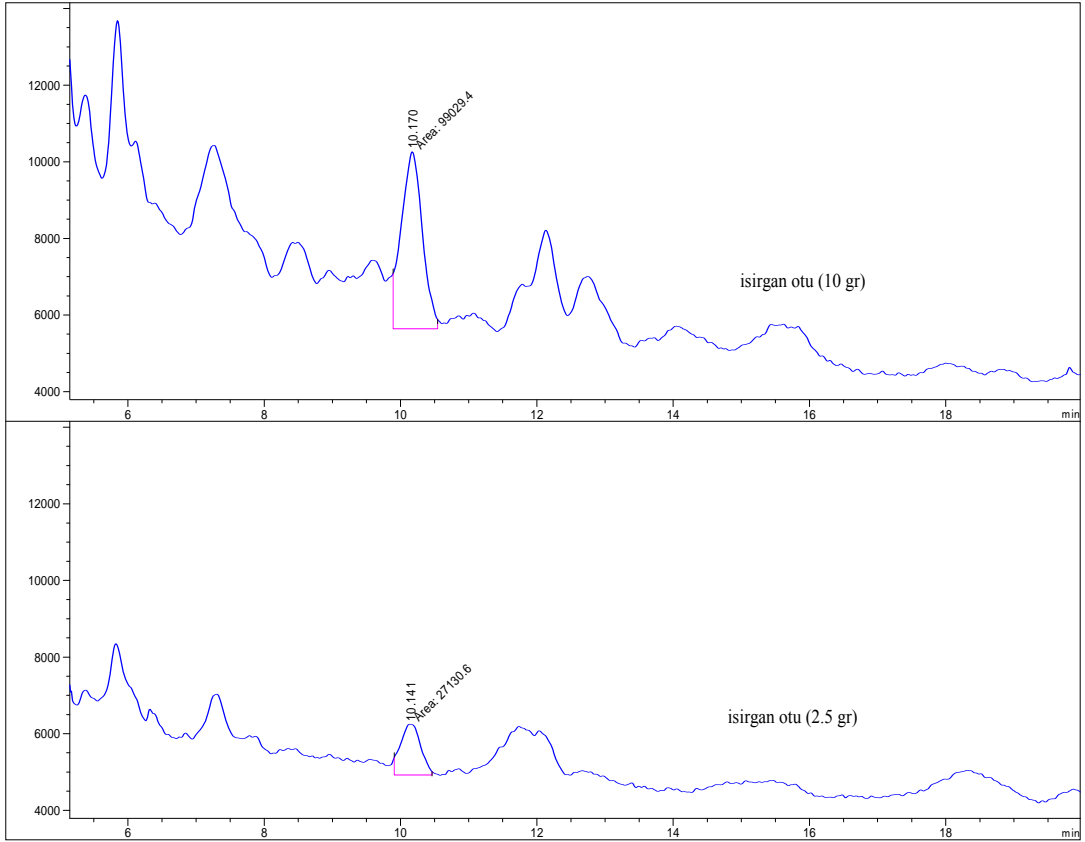
Şekil 4.67. Semizotu (10 gr) kuersetin tayini için elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri.



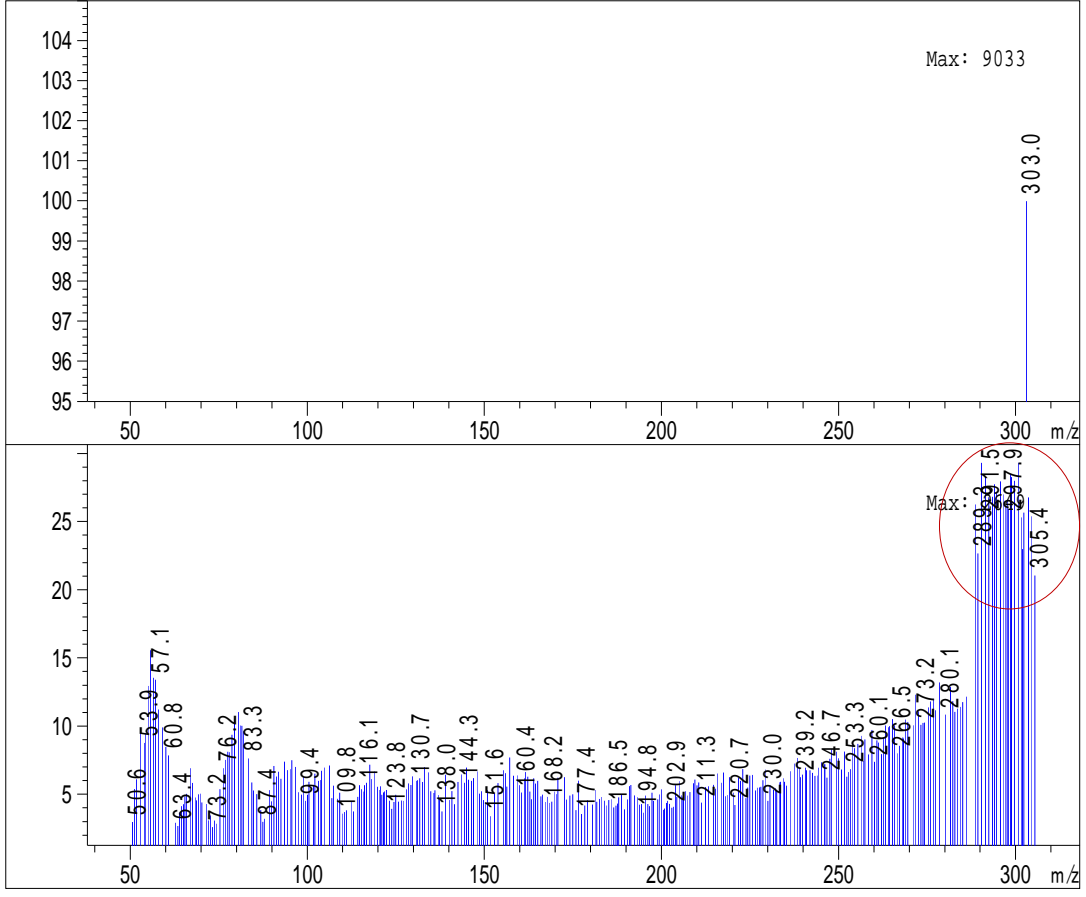
Şekil 4.68. Semizotunun farklı gramlarının ekstraksiyonuyla elde edilen kuersetin HPLC-MS kromatogramları.



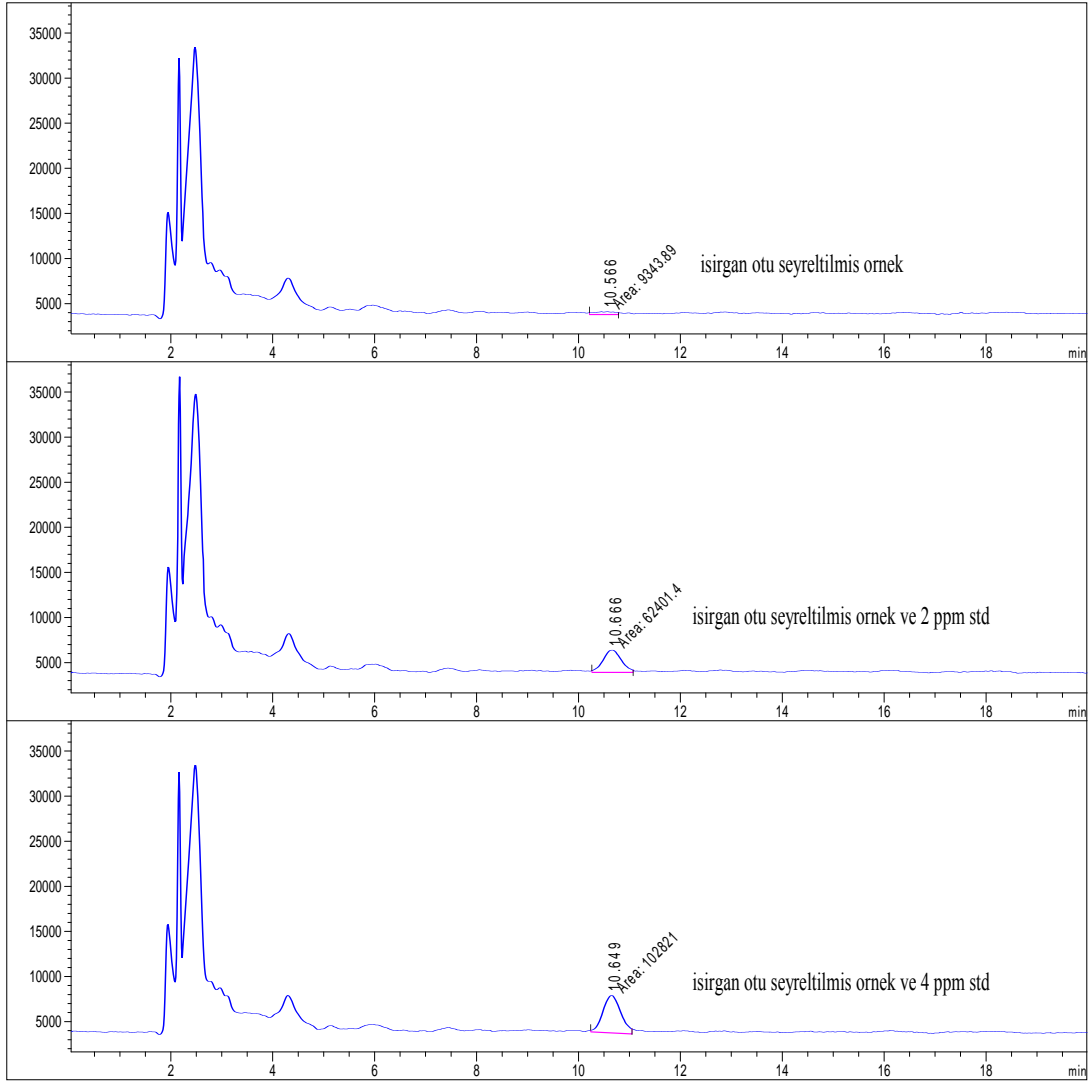
Şekil 4.69. Semizotunda kuersetin tayini için elde edilen kütle (SIM-SCAN) spektrumu.



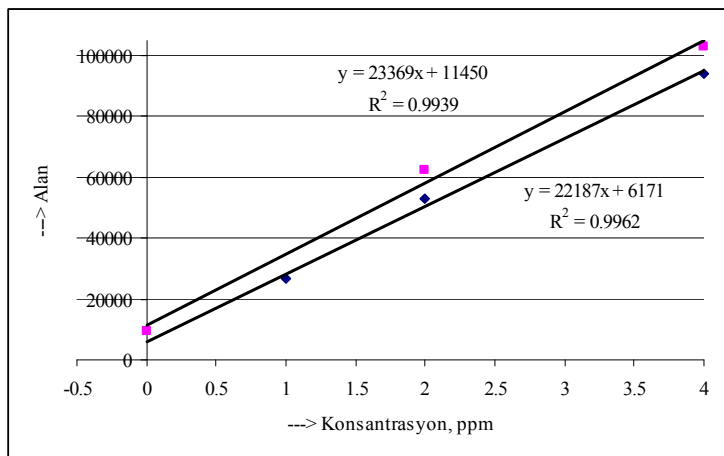
Şekil 4.70. Isirgan otunun farklı gramlarının kuersetin tayinine ilişkin HPLC-MS kromatogramları.



Şekil 4.71. Isırgan otunun kuersetin tayini için elde edilen kütle (SIM-SCAN) spektrumu.

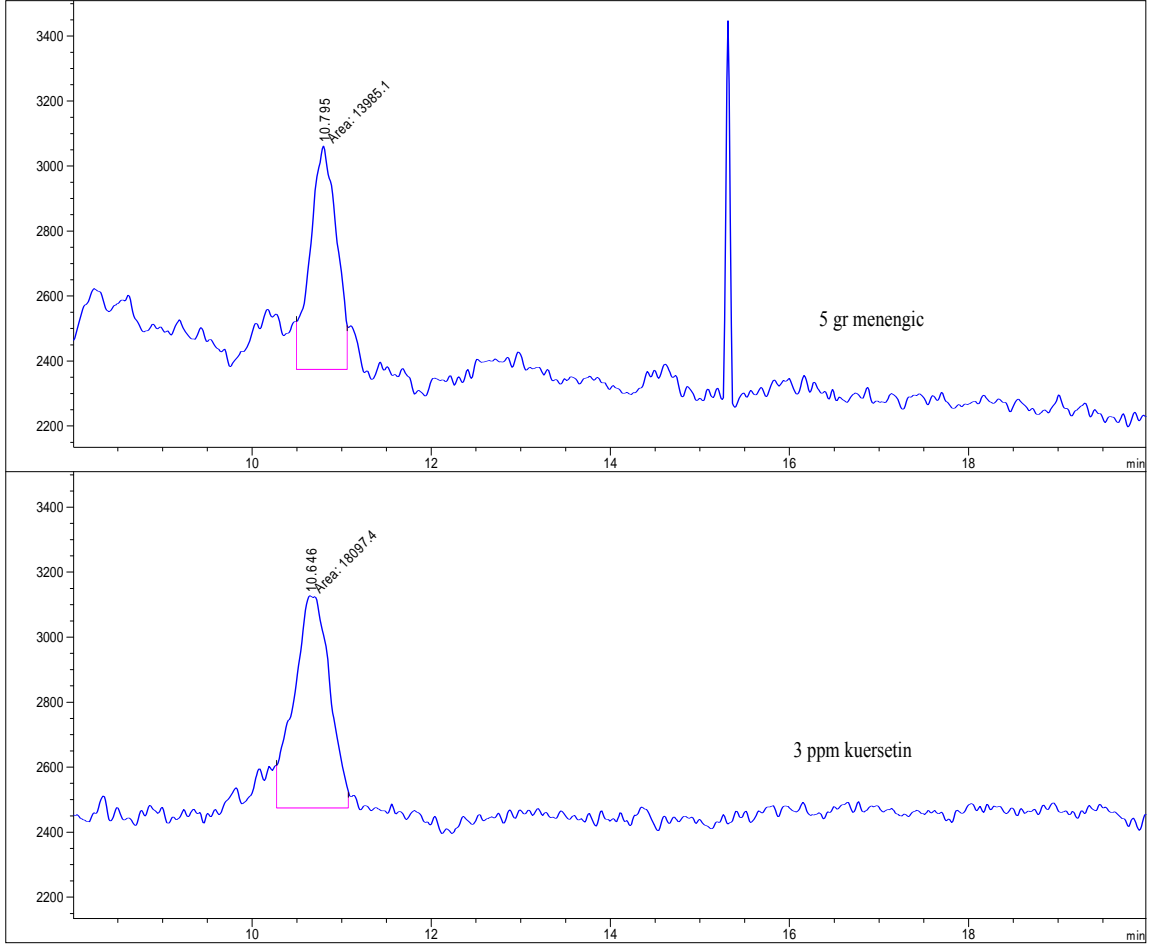


Şekil 4.72. Isırgan otunda kuersetin tayini için uygulanan standart ekleme metoduyla elde edilen HPLC-MS kromatogramları.



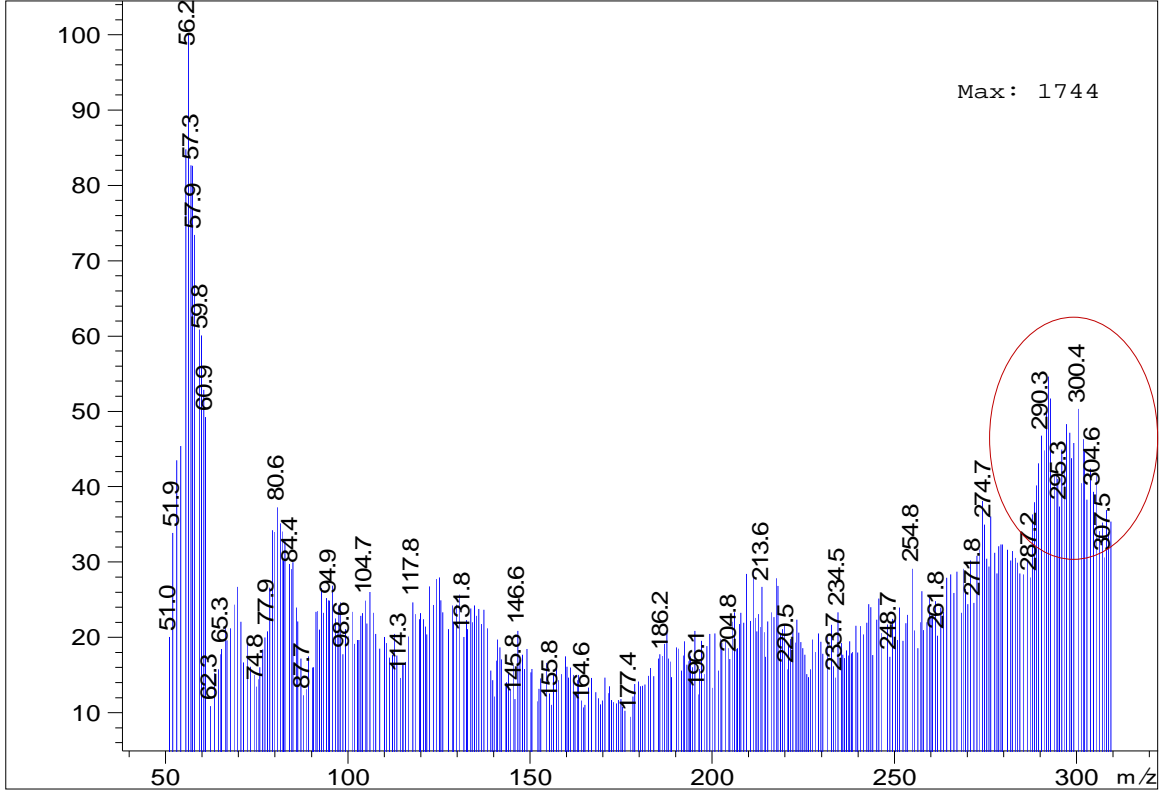
ppm	Alan	Örnek alan
0		9344
1	26772	
2	52924	62401
4	94126	102821

Şekil 4.73. Isırgan otunda (2.5 gr) kuersetin tayini için elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri.

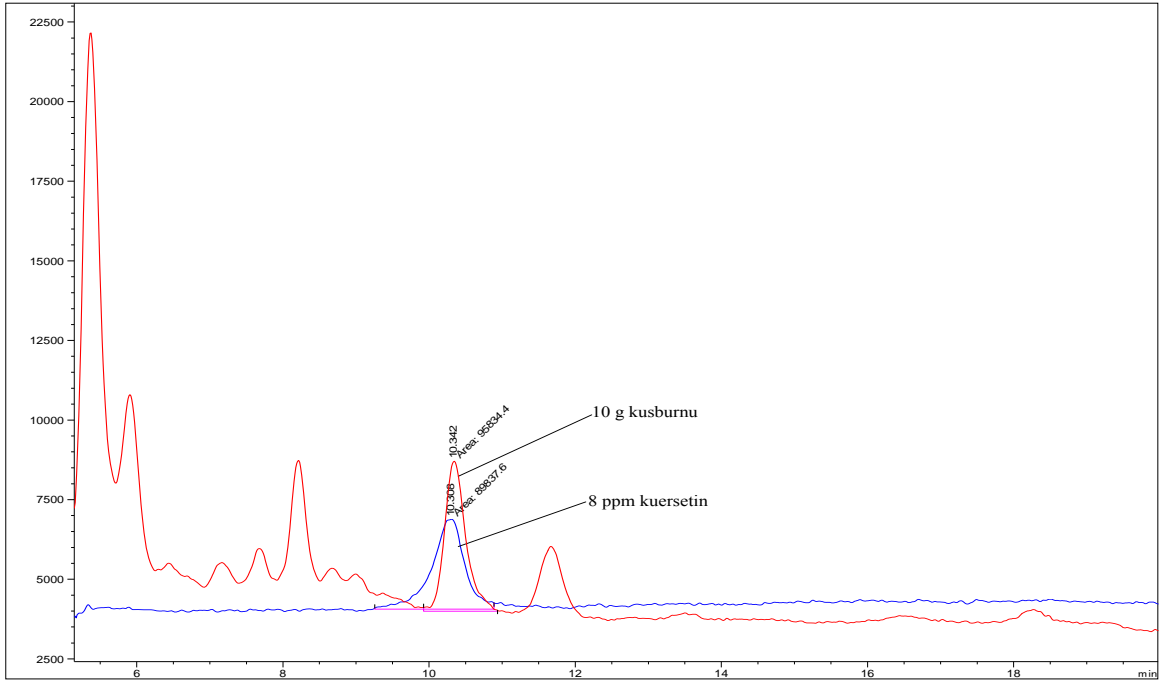


Şekil 4.74. Menengiçte kuersetin tayinine ilişkin HPLC-MS kromatogramı.

Şekil 4.74' deki 5 gr menengiçin kromatogramındaki alan 13985 olan değer Şekil 4.67' deki şartlardaki kromatogramdan $Y=10013X-784.72$ denkleminde yerine konulduğunda 1.5 ppm' e karşı gelmektedir. Bundan da gerekli hesaplamalar yapıldığında menengiçte 9 ppm kuersetin bulunduğu görülmektedir.

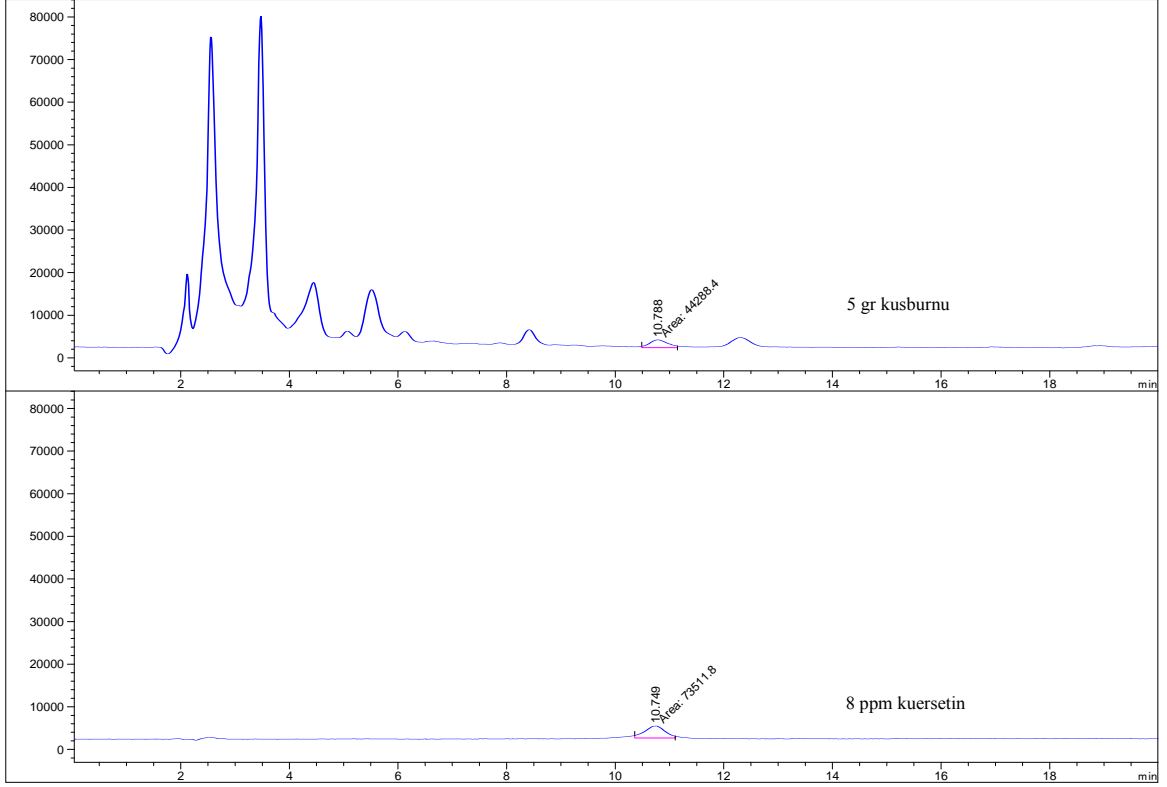


Şekil 4.75. Menengiçte kuersetin tayini için elde edilen kütle (SCAN) spektrumu.



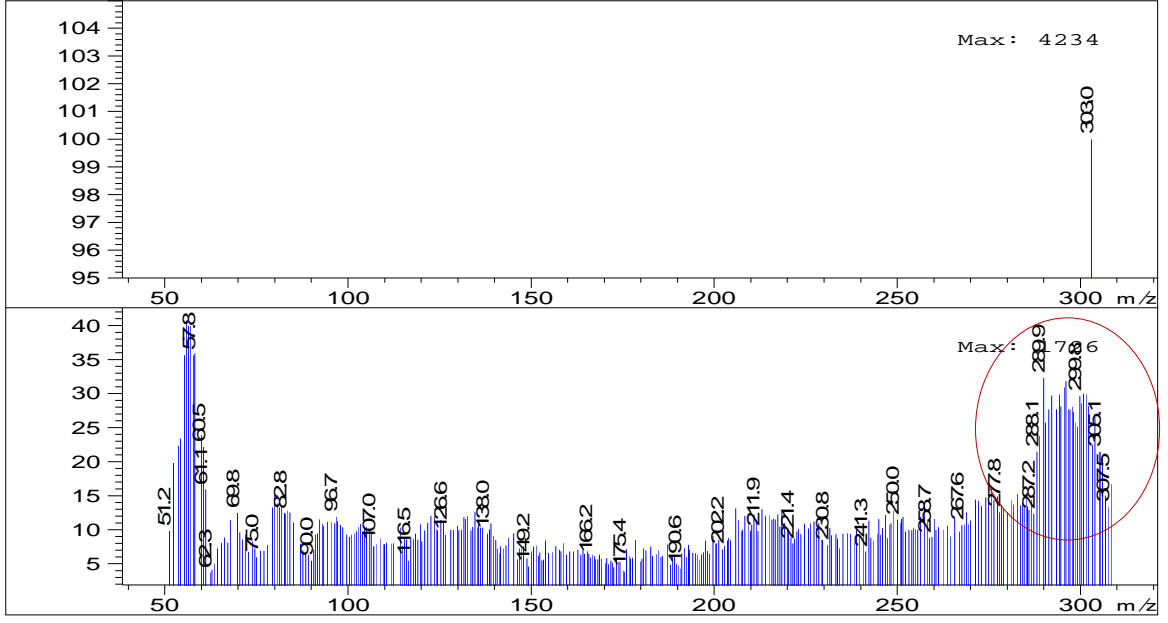
Şekil 4.76. Kuşburnunda (10 gr) kuersetin tayinine ilişkin HPLC-MS kromatogramı.

Şekil 4.76' daki 10 gr kuşburnunun kromatogramındaki alan 95834 olan değer Şekil 4.67' deki $Y=10013X-784.72$ denkleminde yerine konulduğunda 9.7 ppm' e karşı gelmektedir. Bundan da gerekli hesaplamalar yapıldığında kuşburnunda 29 ppm kuersetin bulunduğu görülmektedir.



Şekil 4.77. Kuşburnunda kueretin tayinine ilişkin HPLC-MS kromatogramı.

Şekil 4.77' deki 5 gr kuşburnunun kromatogramındaki alan 44288 olan değer Şekil 4.67' deki $Y=10013X-784.72$ denkleminde yerine konulduğunda 4.4 ppm' e karşı gelmektedir. Bundan da gerekli hesaplamalar yapıldığında kuşburnunda 27 ppm kuersetin bulunduğu görülmektedir.



Şekil 4.78. Kuşburnunda kuersetin tayini için elde edilen kütle (SIM-SCAN) spektrumu.

4.8.3. Kamferol için Bitkilerden Elde Edilen Kromatogramlar

Şekil 4.1' de açıklandığı gibi ekstrakte edilen bitki örnekleri için Tablo 4.2' de kamferol için verilen optimum şartlar kullanılarak elde edilen HPLC-MS kromatogramları Şekil 4.79-4.94' te verildi.

Şekil 4.79' da semizotunda kamferol tayinine ilişkin standart ekleme metoduyla elde edilen HPLC-MS kromatogramları verilmiştir. Şekil 4.80' de semizotunda kamferol tayinine ilişkin standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri birlikte verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi standart ekleme metodunun eğiminin 47571, kalibrasyon grafiği eğiminin 45577 olduğu ve bu değerlerin birbirine yakın olmakla birlikte farklı oldukları anlaşılmaktadır. Bu nedenle semizotunda kamferol tayininde kimyasal girişim olduğu sonucuna varılmıştır. Böylece semizotu için elde edilen standart ekleme metoduyla elde edilen konsantrasyon değeri 0.2 ppm olarak hesaplandı. Gerekli hesaplamalar yapıldığında 3.6 ppm kamferol bulunduğu görülmektedir. Ayrıca semizotunun kamferol MS spektrumuna bakıldığında (Şekil 4.81) SIM tarama m/z 287 değerinin olduğu ve SCAN taramda ise kamferole ait olan spektrum görülmektedir.

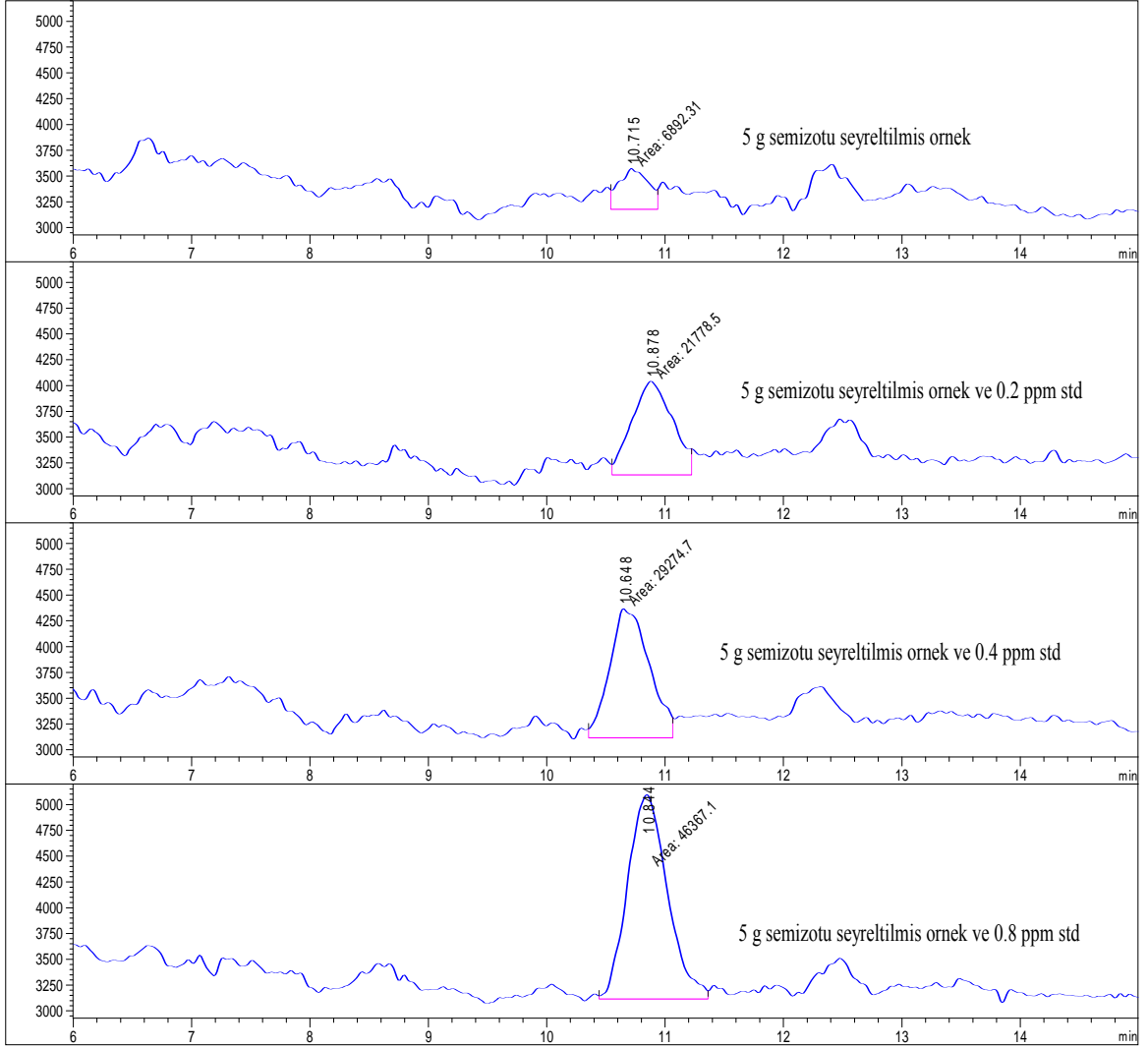
Şekil 4.82' de 2.5 gr ısırgan otunda kamferol tayinine ilişkin standart ekleme metoduyla elde edilen HPLC-MS kromatogramları verilmiştir. Şekil 4.83' te ısırgan otunda kamferol tayinine ilişkin standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri birlikte verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi standart ekleme metodunun eğiminin 48495, kalibrasyon grafiği eğiminin 49835 olduğu ve bu değerlerin birbirine yakın olmakla birlikte farklı oldukları anlaşılmaktadır. Bu nedenle ısırgan otunda kamferol tayininde kimyasal girişim olduğu sonucuna varılmıştır. Böylece ısırgan otu için standart ekleme metoduyla elde edilen konsantrasyon değeri 0.22 ppm olarak hesaplandı. Gerekli hesaplamalar yapıldığında 7.7 ppm kamferol bulunduğu görülmektedir. Isırgan otunun kamferolün MS spektrumuna bakıldığında Şekil 4.84' te SIM tarama m/z 287 değerinin olduğu ve SCAN taramda ise kamferole ait olan spektrum görülmektedir.

Şekil 4.85' de 5 gr menengiçte kamferol tayinine ilişkin HPLC-MS kromatogramı verilmiştir. Ayrıca 4.86' da menengiçin kamferol tayinine ilişkin HPLC-MS kromatogramının farklı bir gösterimi verilmiştir. MS spektrumuna bakıldığında (Şekil 4.87) SIM tarama m/z 287 değerinin olduğu ve SCAN taramda ise kamferole ait olan spektrum görülmektedir.

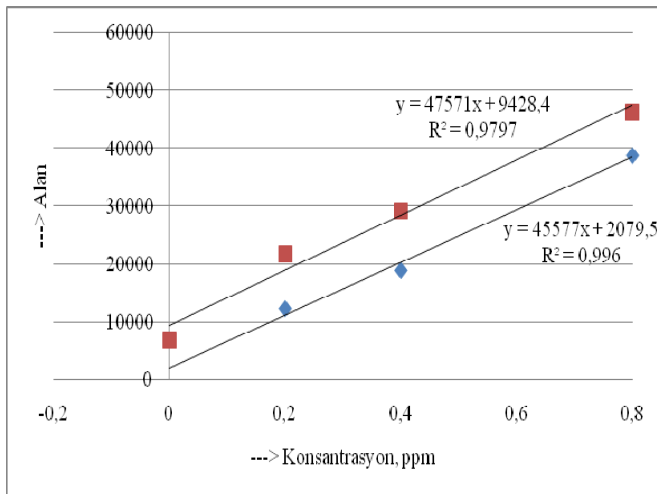
Şekil 4.88' de 10 gr kuşburnunda kamferol tayinine ilişkin HPLC-MS kromatogramı verilmiştir. Ayrıca Şekil 4.89' da 10 gr kuşburnunda kamferol tayinine ilişkin HPLC-MS kromatogramının farklı gösterimi verilmiştir.

Şekil 4.90' da 5 gr kuşburnunda kamferol tayinine ilişkin HPLC-MS kromatogramı verilmiştir. Ayrıca Şekil 4.91' de 5 gr kuşburnunda kamferol tayinine ilişkin HPLC-MS kromatogramının farklı gösterimi verilmiştir. Kuşburnunun kamferol MS spektrumuna bakıldığında (Şekil 4.92) SIM tarama m/z 287 değerinin olduğu ve SCAN taramda ise kamferole ait olan spektrum görülmektedir.

Şekil 4.93' te 5 gr kuşburnunda kamferol tayinine ilişkin standart ekleme metoduyla elde edilen HPLC-MS kromatogramları verilmiştir. Şekil 4.94' te kuşburnunda kamferol tayinine ilişkin standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri birlikte verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi standart ekleme metodunun eğiminin 56032, kalibrasyon grafiği eğiminin 49835 olduğu ve bu değerlerin birbirine yakın olmakla birlikte farklı oldukları anlaşılmaktadır. Bu nedenle kuşburnunda kamferol tayininde kimyasal girişim olduğu sonucuna varılmıştır. Böylece kuşburnu için standart ekleme metoduyla elde edilen konsantrasyon değeri 0.22 ppm olarak hesaplandı. Gerekli hesaplamalar yapıldığında 4.0 ppm kamferol bulunduğu görülmektedir.

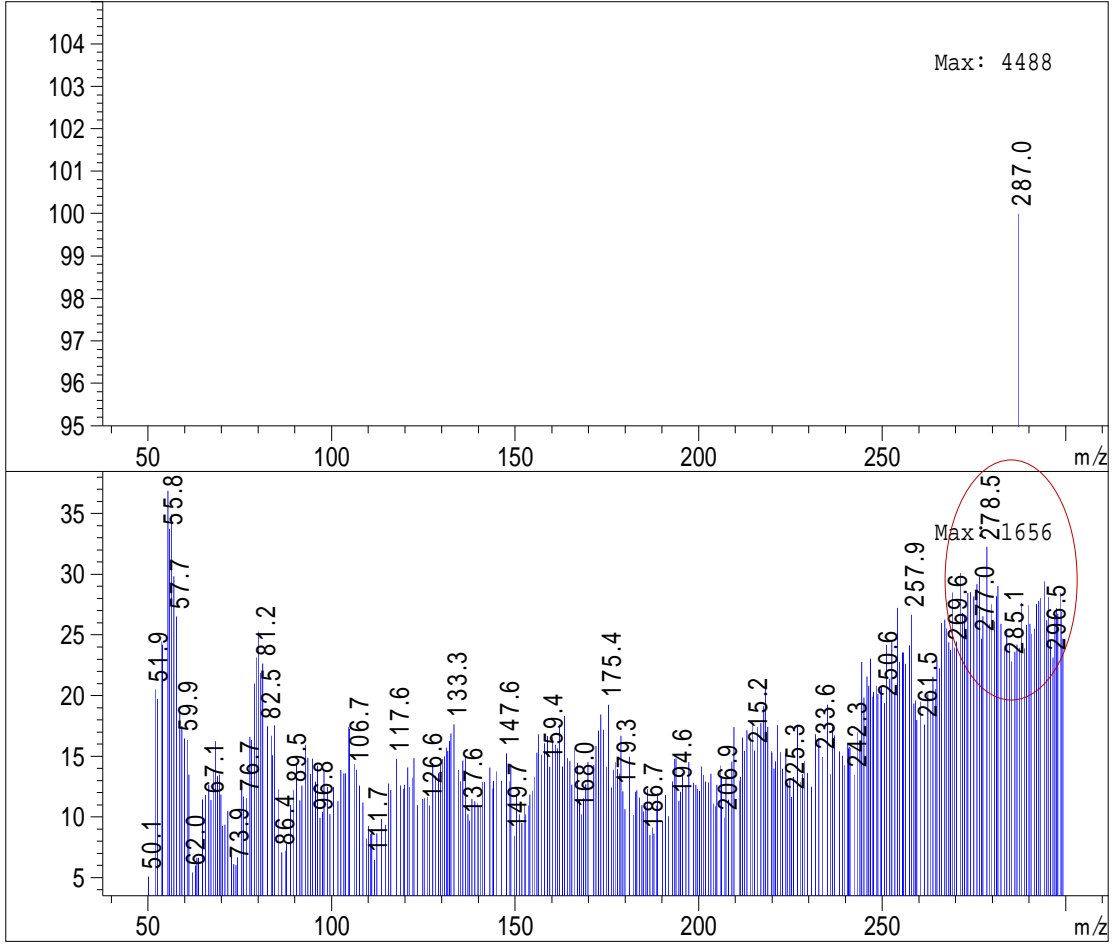


Şekil 4.79. Semizotunda kamferol tayini için uygulanan standart ekleme metoduyla elde edilen HPLC-MS kromatogramları.

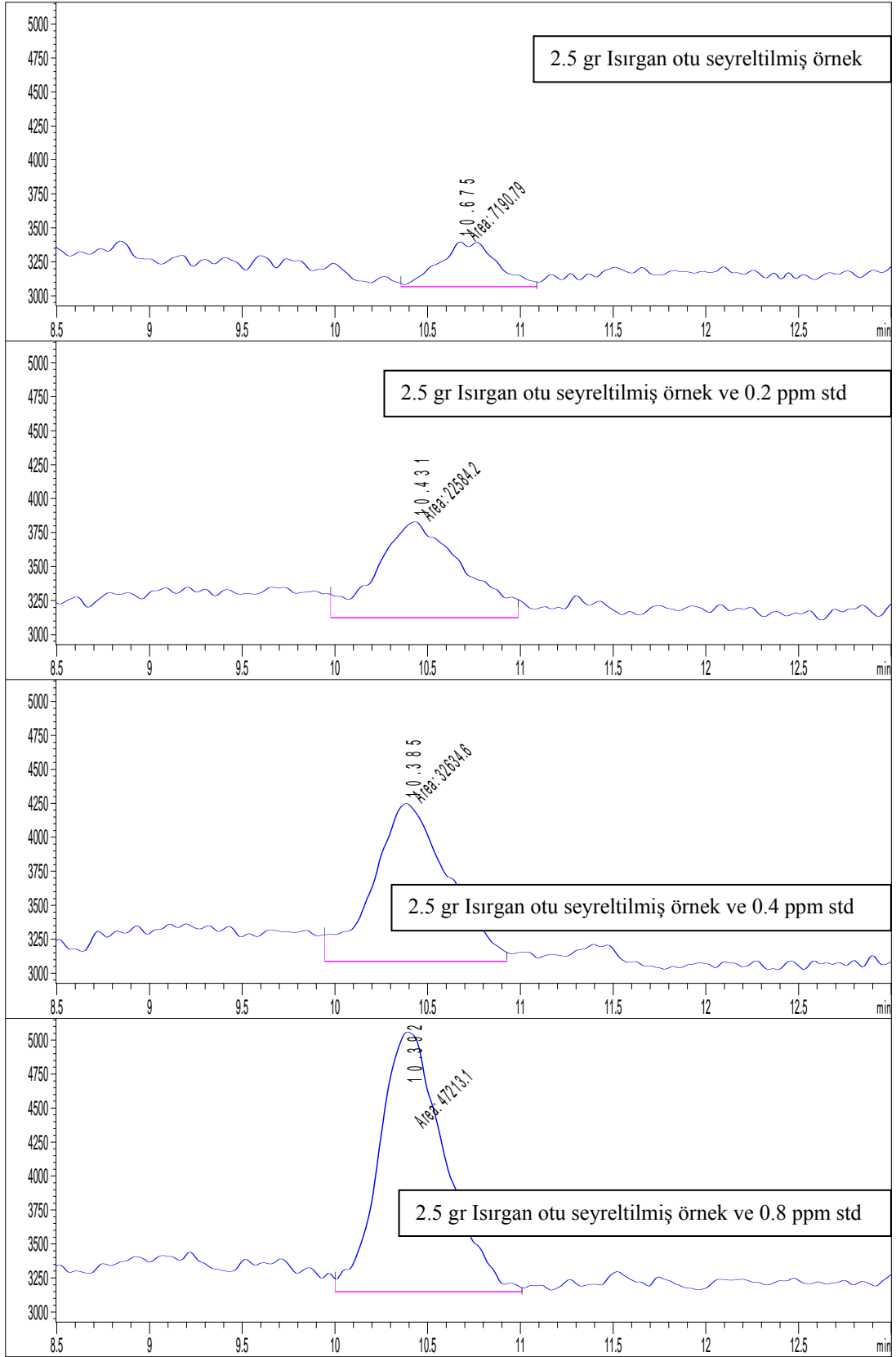


ppm	Alan	Örnek alan
0		6892
0,2	12238	21779
0,4	18850	29275
0,8	38750	46367
1	47865	

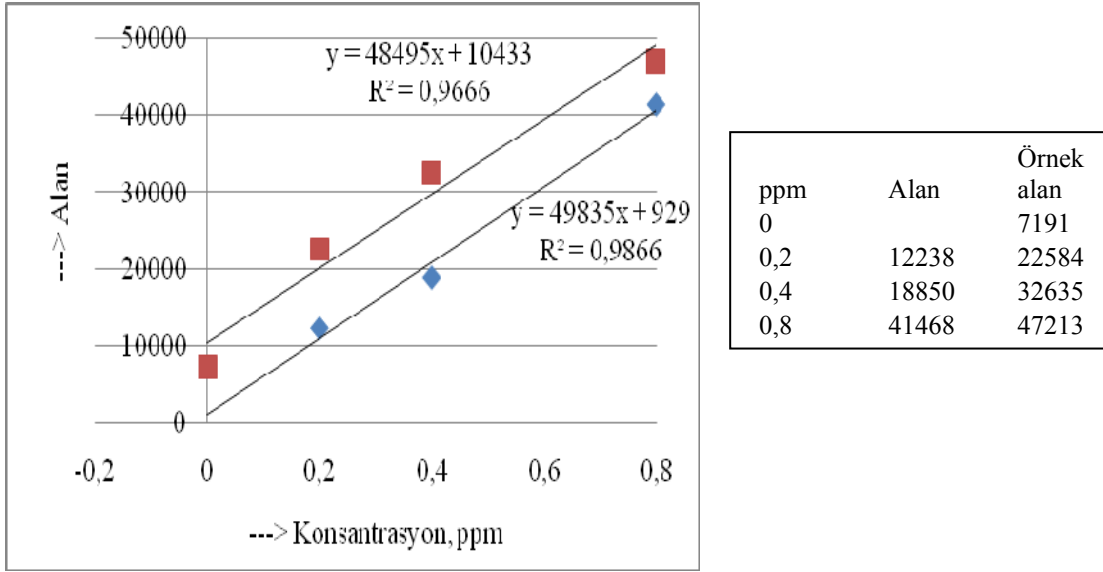
Şekil 4.80. Semizotu kamferol tayini için elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri.



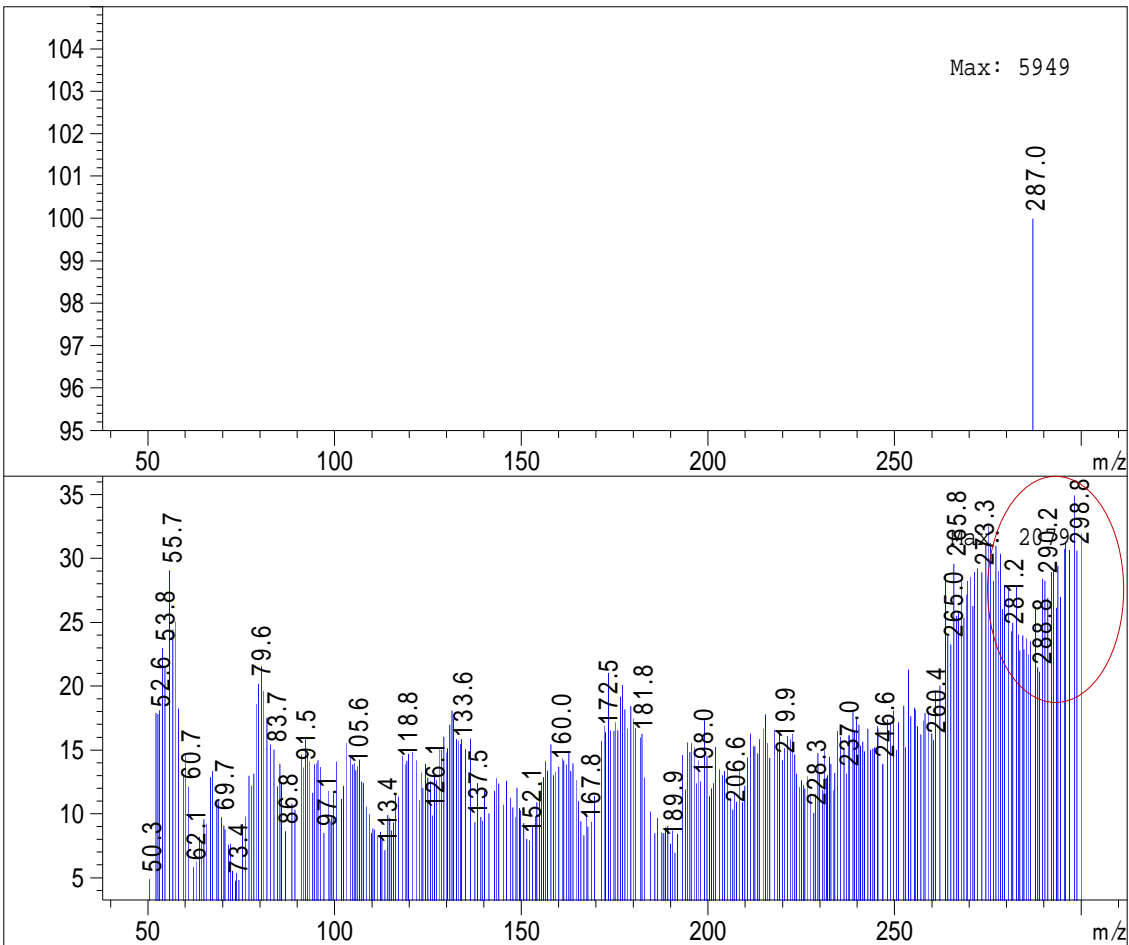
Şekil 4.81. Semizotunda kamferol tayini için elde edilen kütle (SIM-SCAN) spektrumu.



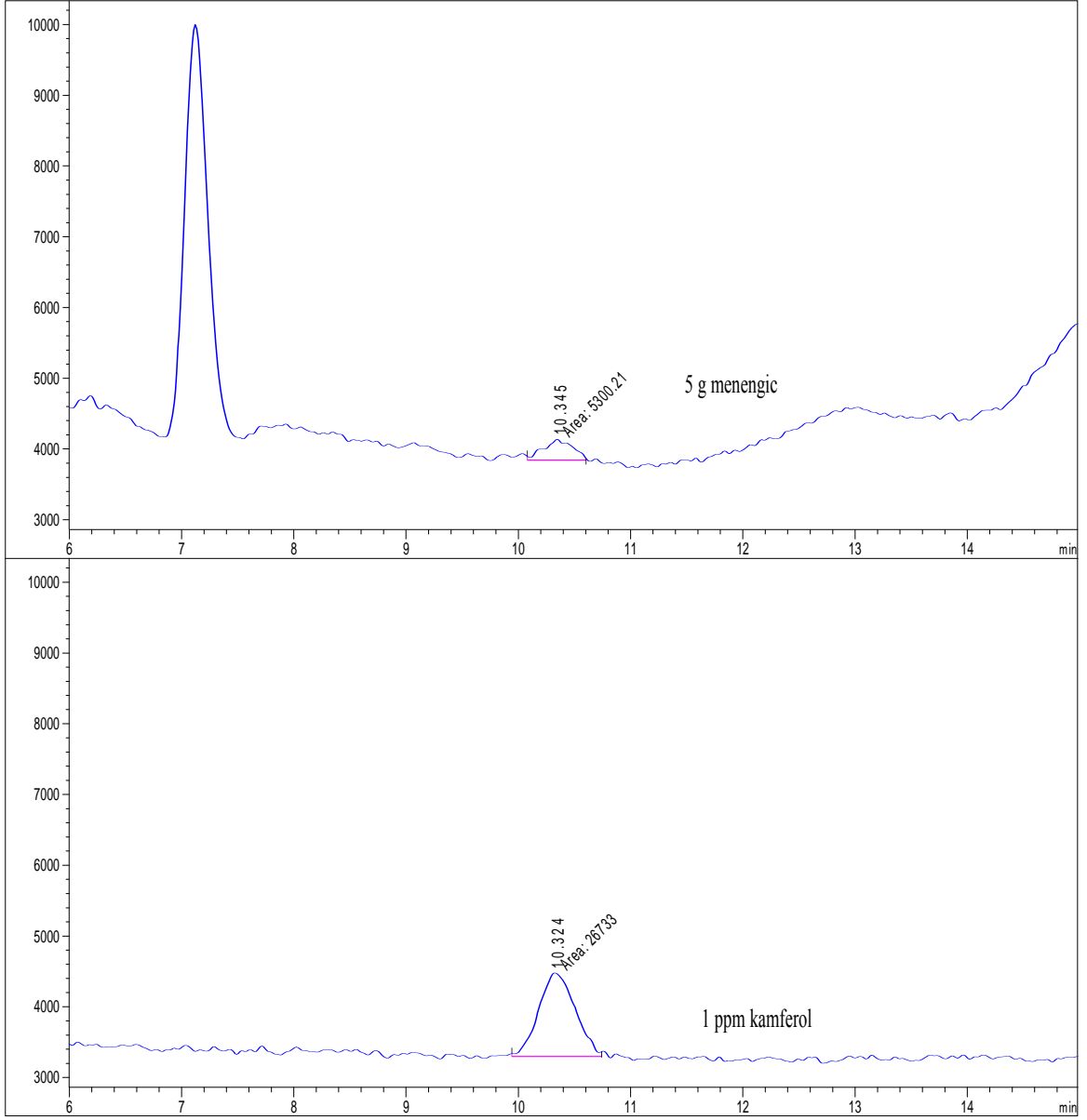
Şekil 4.82. Isırgan otunda kamferol tayini için uygulanan standart ekleme metoduyla elde edilen HPLC-MS kromatogramlarının farklı gösterimi.



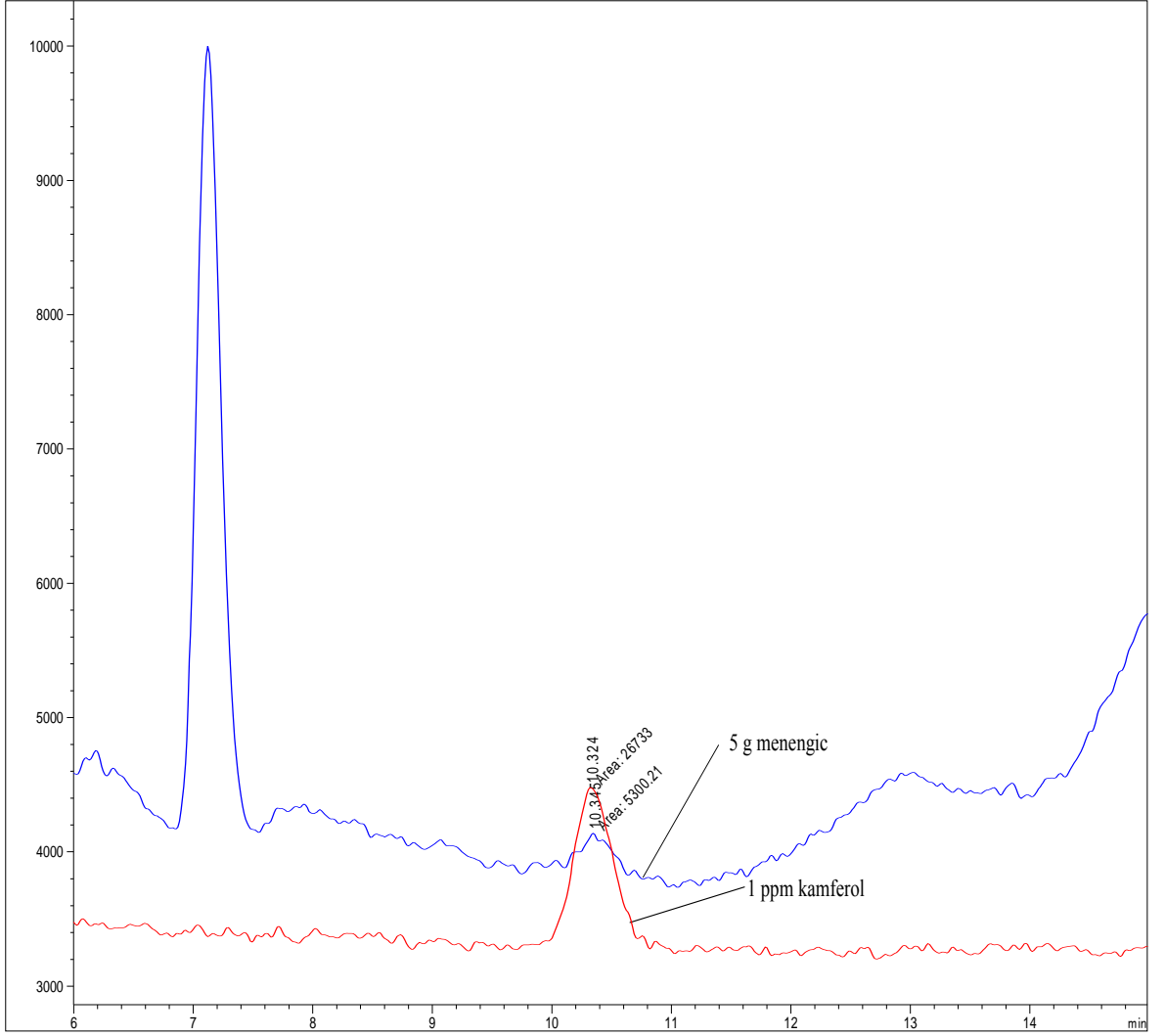
Şekil 4.83. Isırgan otu kamferol tayini için elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri.



Şekil 4.84. Isırgan otunda kamferol tayini için elde edilen kütle (SIM-SCAN) spektrumu.

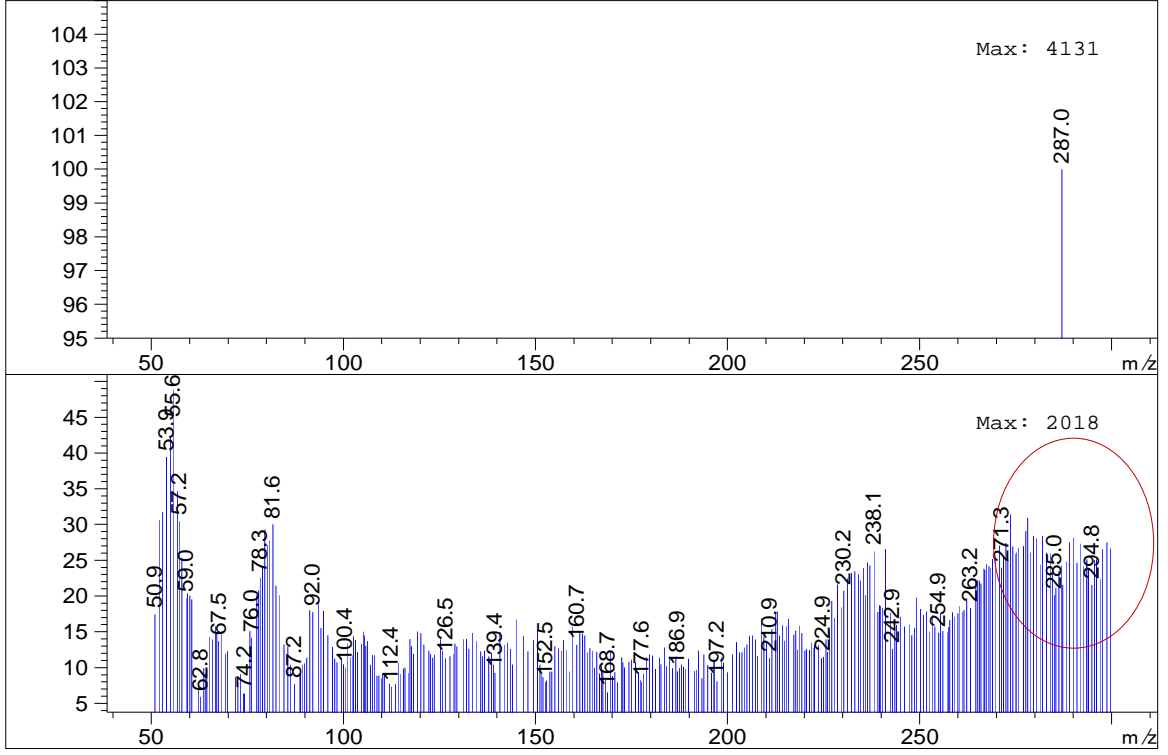


Şekil 4.85. Menengiçte kamferol tayinine ilişkin HPLC-MS kromatogramı.

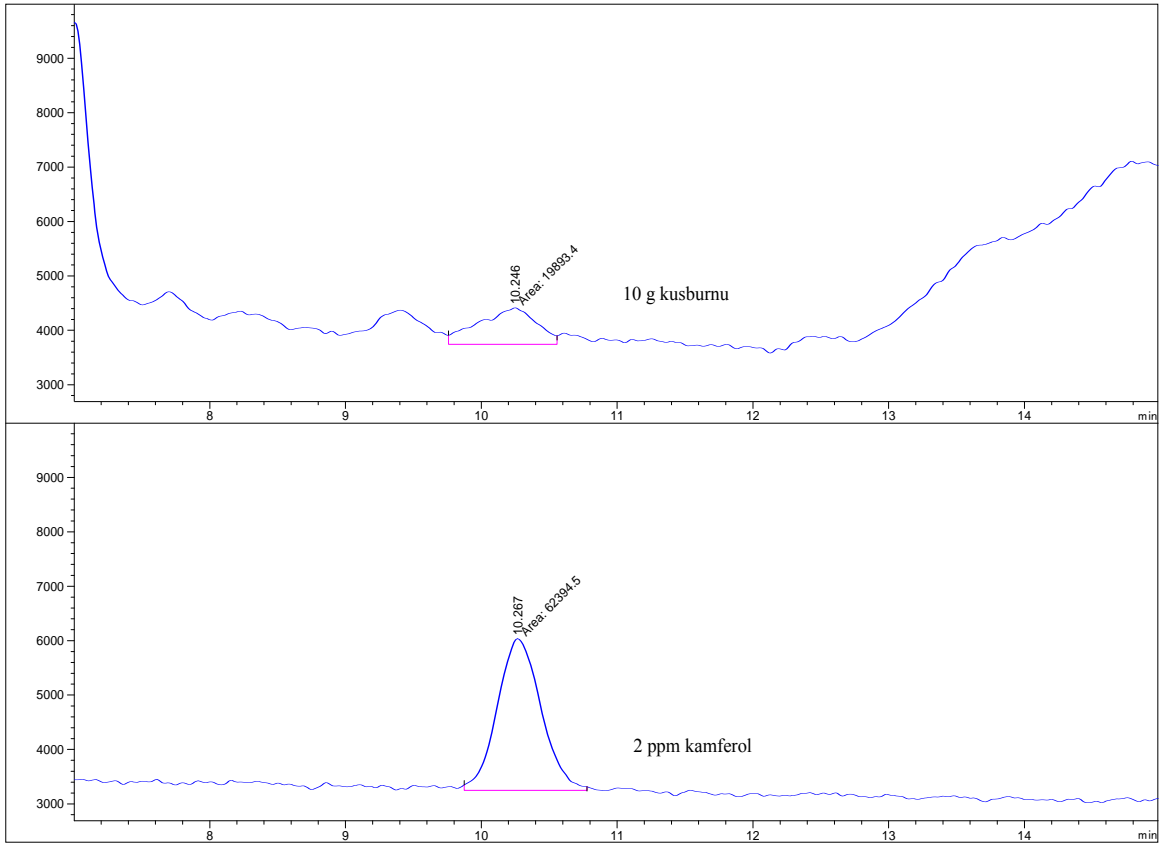


Şekil 4.86. Menengiçin kamferol tayini için elde edilen HPLC-MS kromatogramının farklı gösterimi.

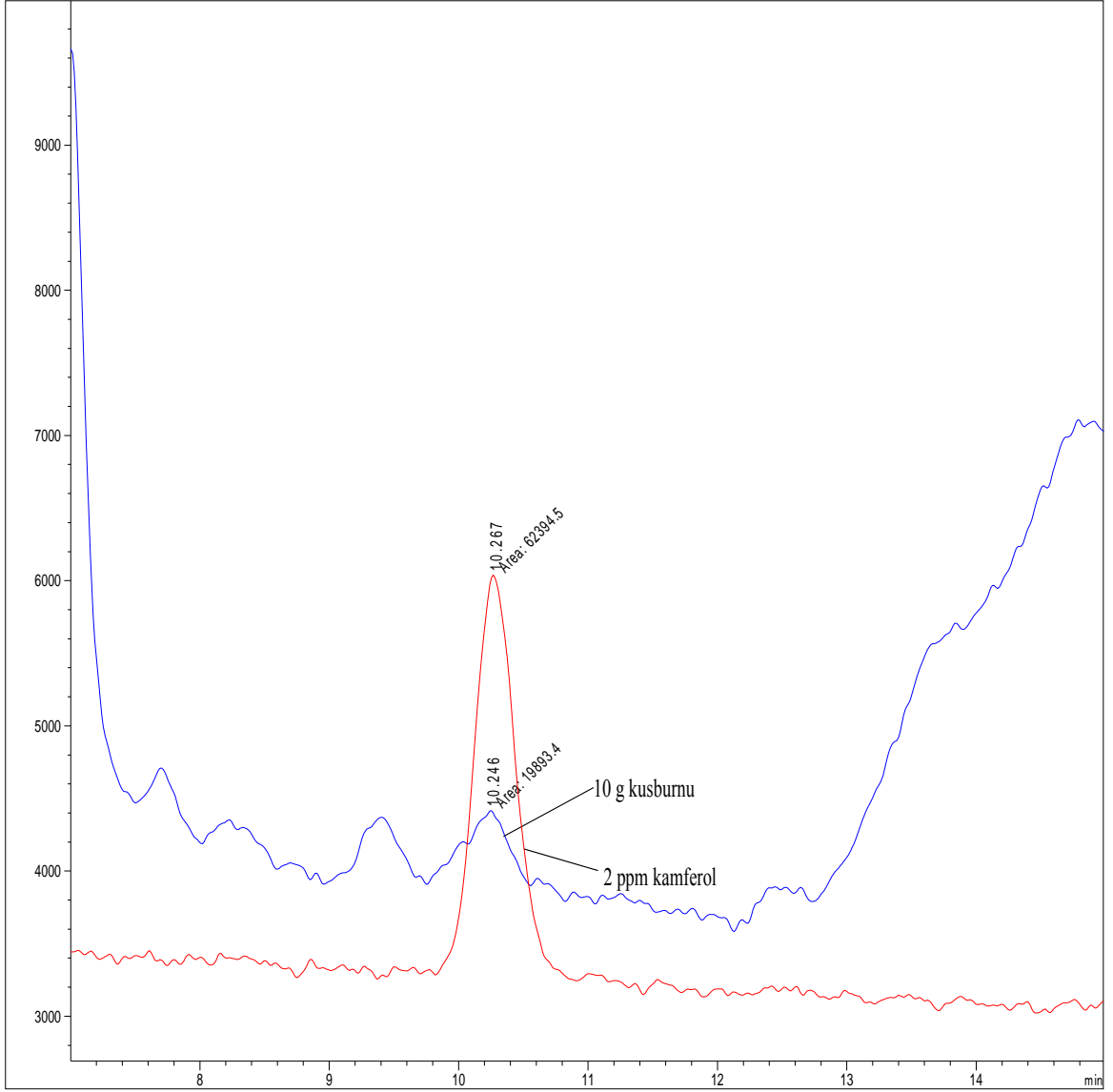
Şekil 4.85-4.86'daki 5 gr menengiçin kromatogramındaki alan 5300 olan değer Şekil 4.83' te $Y=49835X+929$ denkleminde yerine konulduğunda 0.89 ppm e karşı gelmektedir. Bundan da gerekli hesaplamalar yapıldığında menengiçte 5.34 ppm kamferol bulunduğu görülmektedir.



Şekil 4.87. Menengiçte kamferol tayini için elde edilen kütle (SIM-SCAN) spektrumu.

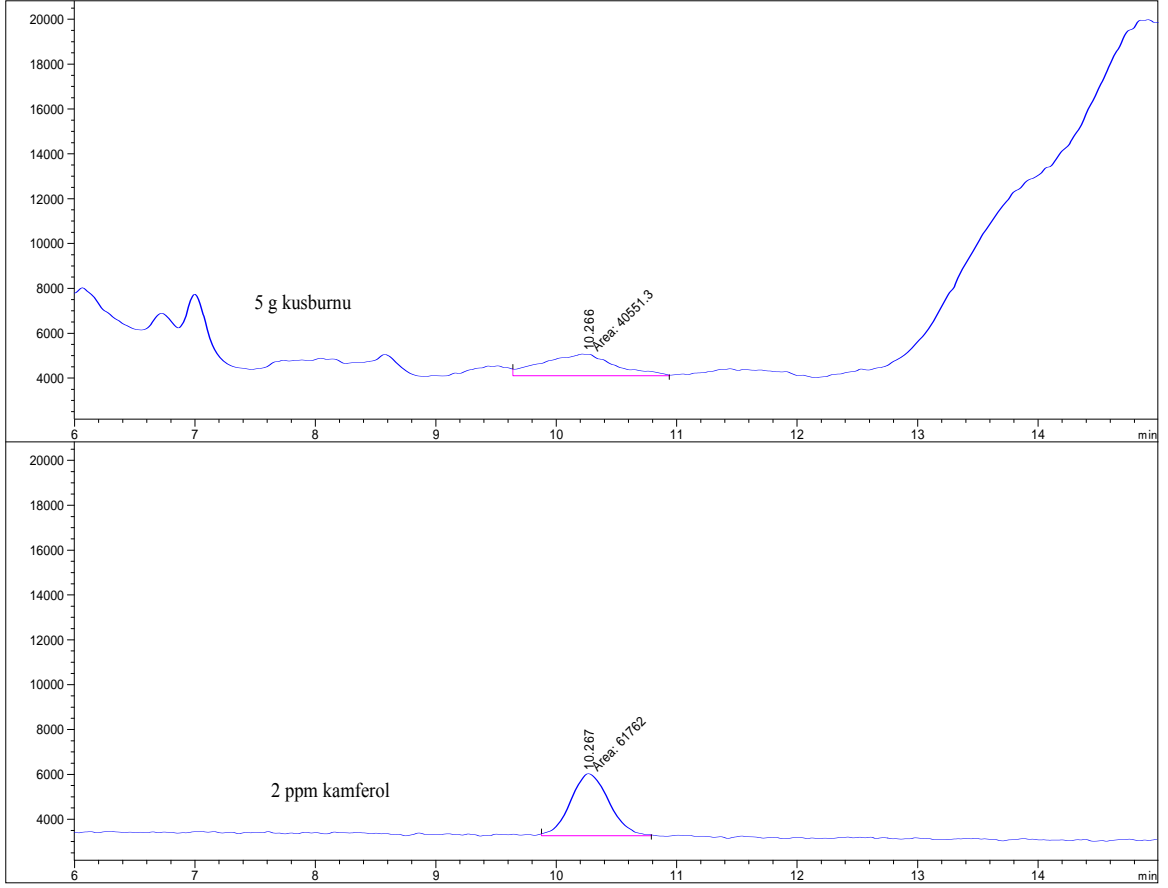


Şekil 4.88. Kuşburnunda (10 gr) kamferol tayinine ilişkin HPLC-MS kromatogramı.

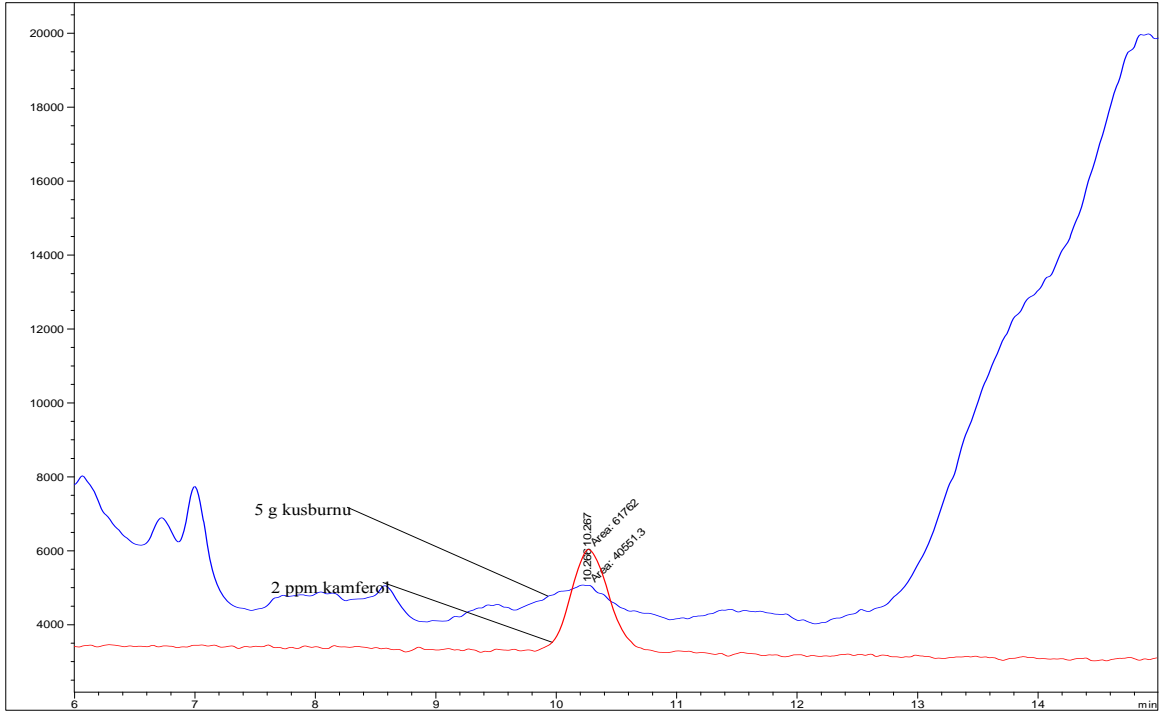


Şekil 4.89. Kuşburnunda (10 gr) kamferol tayinine ilişkin HPLC-MS kromatogramının farklı gösterimi.

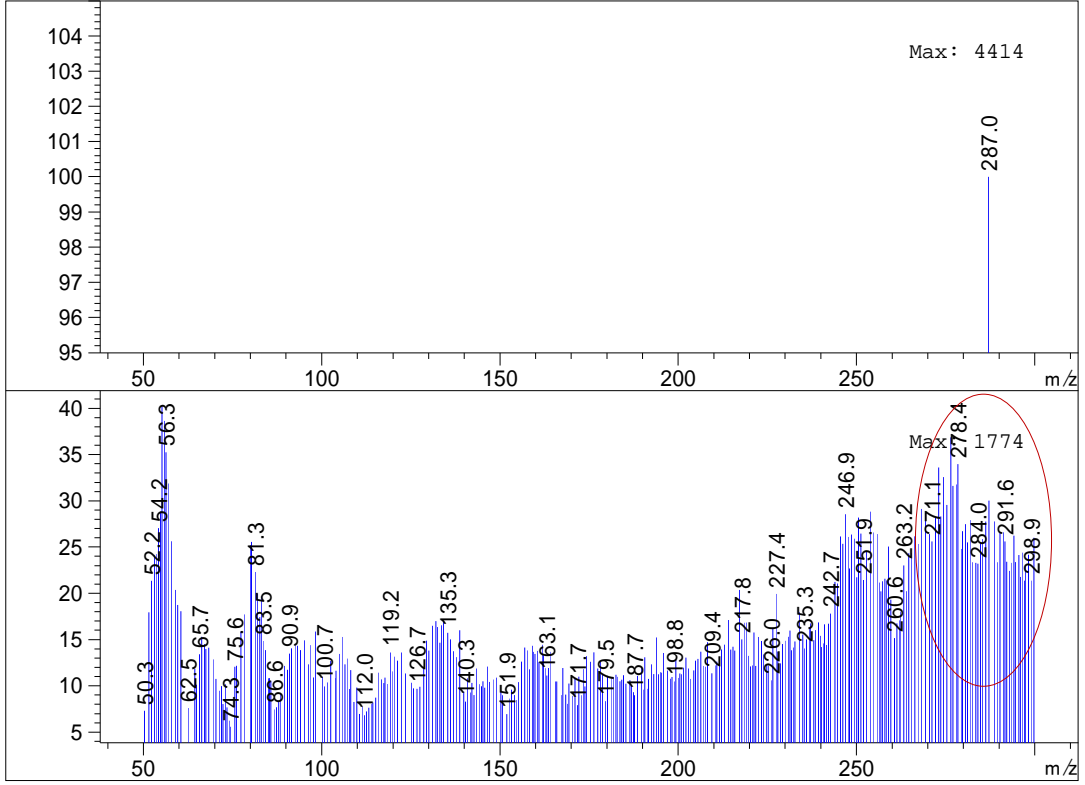
Şekil 4.88-89' daki 10 gr kuşburnun kromatogramındaki alan 19893 olan değer Şekil 4.83' te $Y=49835X+929$ denkleminde yerine konulduğunda 0.42 ppm e karşı gelmektedir. Bundan da gerekli hesaplamalar yapıldığında kuşburnunda 1.26 ppm kamferol bulunduğu görülmektedir.



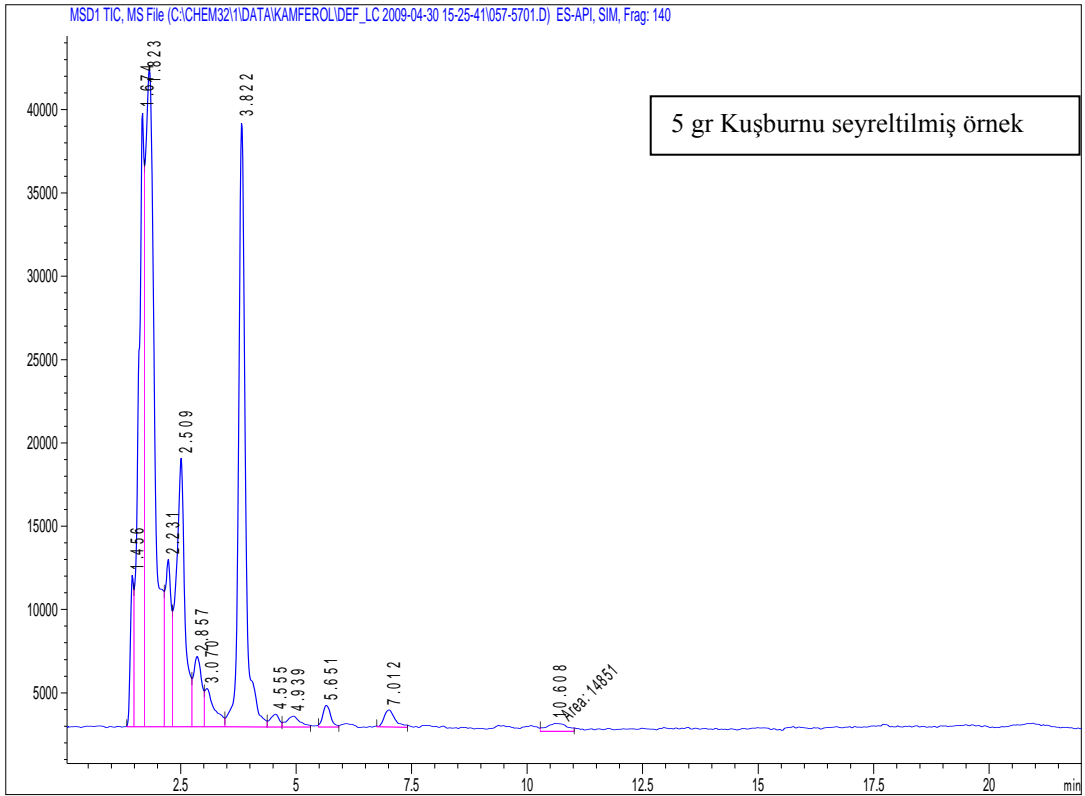
Şekil 4.90. Kuşburnunda (5 gr) kamferol tayinine ilişkin HPLC-MS kromatogramı.

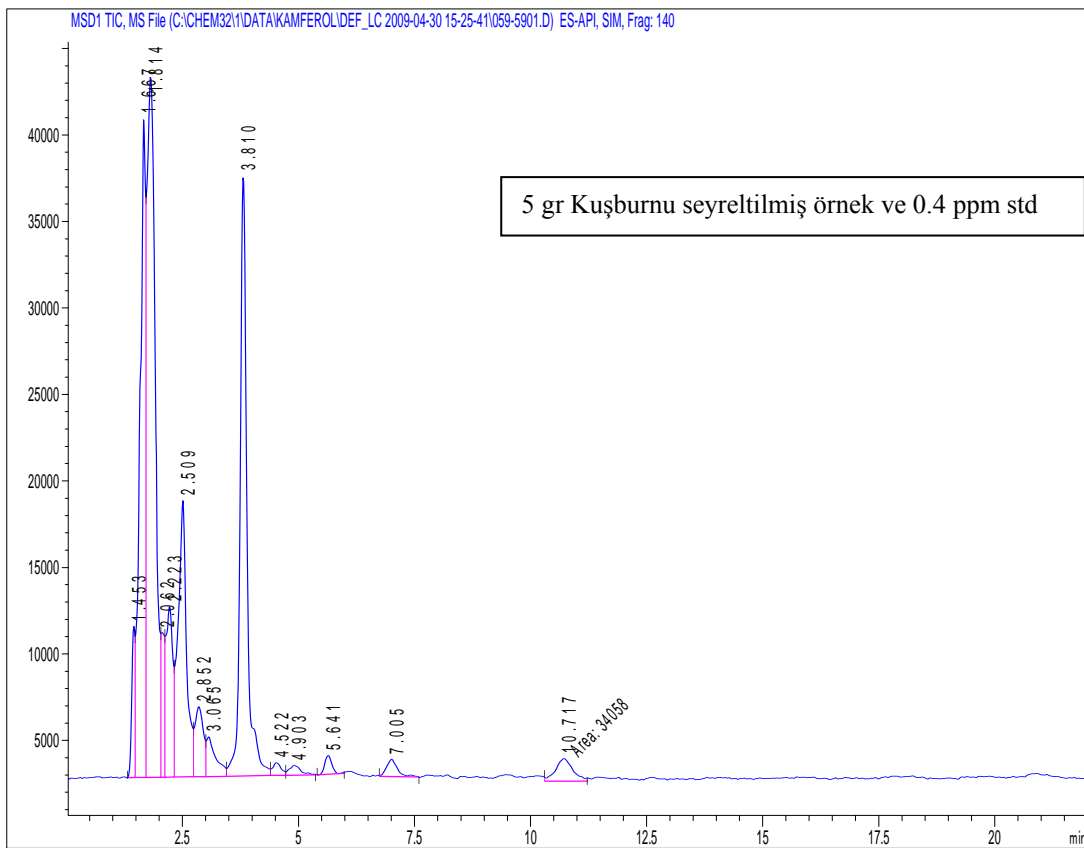
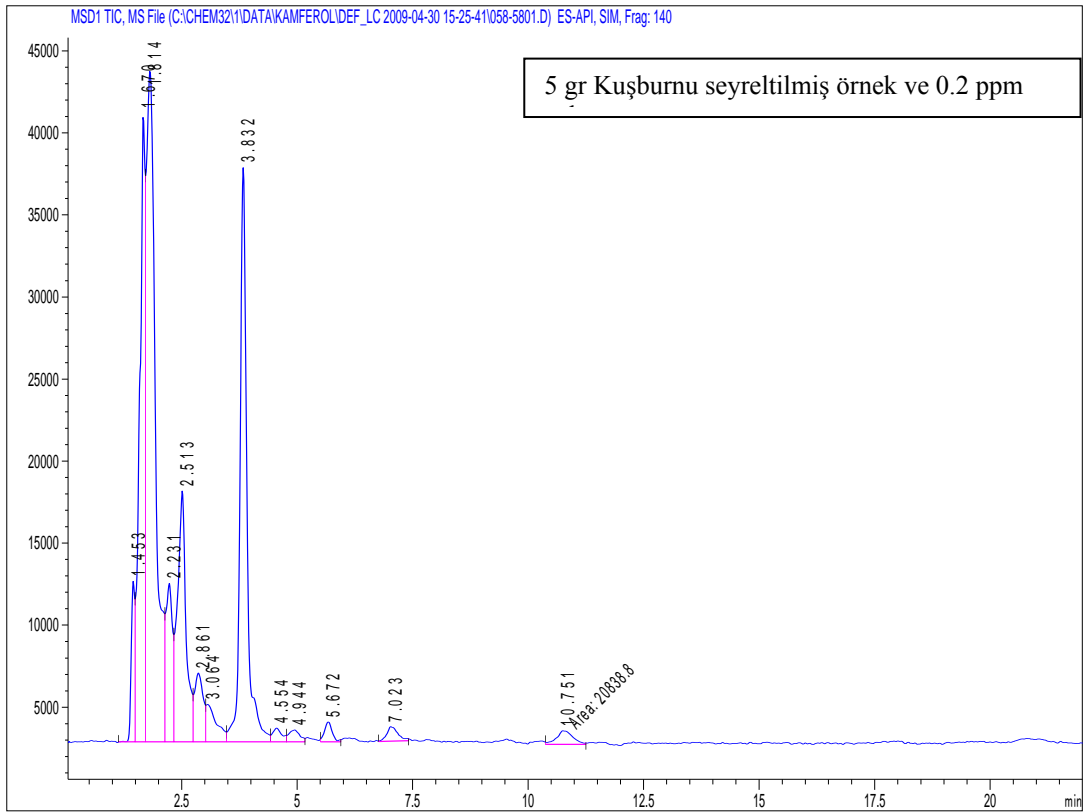


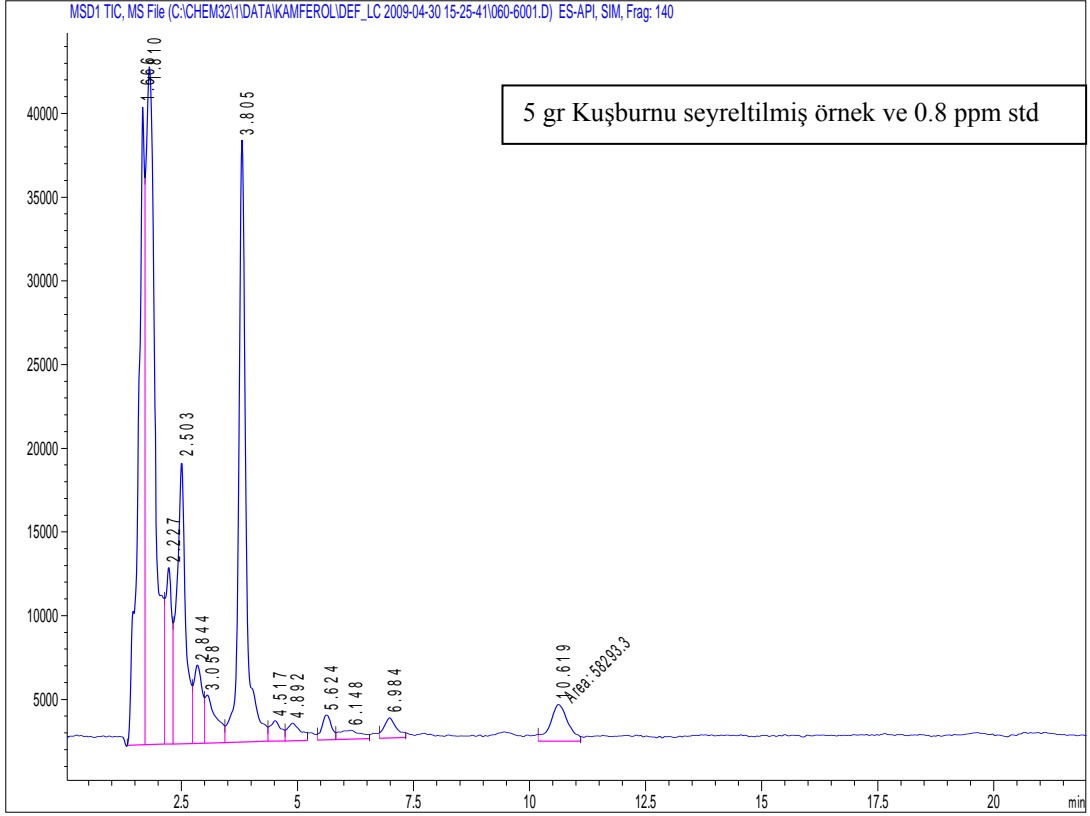
Şekil 4.91. Kuşburnunda (5 gr) kamferol tayinine ilişkin HPLC-MS kromatogramının farklı gösterimi.



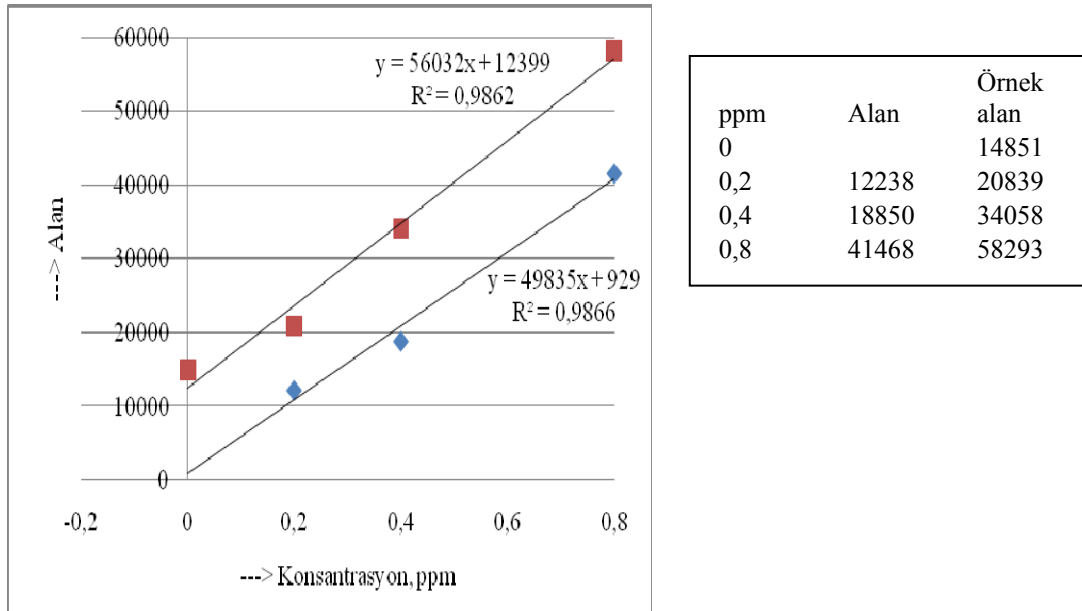
Şekil 4.92. Kuşburnunda kamferol tayini için elde edilen kütle (SIM-SCAN) spektrumu.







Şekil 4.93. Kuşburnunda (5 gr) kamferol tayini için uygulanan standart ekleme metoduyla elde edilen HPLC-MS kromatogramlarının farklı gösterimi.



Şekil 4.94. Kuşburnu kamferol tayini için elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri.

Tablo 4.3. Şekil 4.1’ de çözülen bitki örneklerindeki flavonol miktarları, ppm (n=3).

Bitki Örneği	mg/kg		
	Miyrisetin	Kuersetin	Kamferol
Semizotu	47±5	39±8	3.6±0.5
Isırgan otu	13±2	18±5	7.7±0.9
Menengiç	5.2±0.4	< t.s	< t.s
Kuşburnu	0.63±0.06	< t.s	4.0±0.5

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Kanser ve benzeri küresel boyutta insanlığı tehdit eden hastalıkların önlenmesinde ve/veya tedavisinde katkı sağlayabilecek çalışmaların önemi açıktır. Literatürde flavonol bileşiklerinden olan miyrisetin, kuersetin ve kamferol bileşiklerin antikanserojen ve oksidatif radikalik reaksiyonları engelleyici özellikleri olduğu rapor edilmiştir [1-9, 11-18, 28-100].

Bu çalışmada, adı geçen miyrisetin, kuersetin ve kamferol flavonol bileşiklerinin bazı meyve ve benzeri bitkilerdeki konsantrasyonlarının tayini amaçlandı.

Analiz metodu olarak HPLC-MS kullanıldı. Optimizasyon koşullarında iyi bir ayırmanın yapılabilmesi için su/metanol/ACN/formik asit (% olarak 52/42/5/1) çözücü sistemi olarak kullanıldı. Tayinden önce yapılan optimizasyon çalışmalarında; enjeksiyon hacmi için 5 µl, akış hızı için 0.6-0.8 ml/dk, kolon sıcaklığı için 30-40 °C ve fragmentor için 140-170 V aralığında değerler bulundu.

Bitki olarak semizotu (*Portulaca oleracea*), ısırgan Otu (*Urtica dioica*), menengiç (*Terebinthina chia*) ve kuşburnu (*Rosa canina L.*) türleri çalışıldı. Çalışılan bitkilerden flavonollerin ekstrakte edilmesi için çözücü olarak metanol/askorbik asit/HCl karışımı kullanıldı. HCl' nin eklenmesinin sebebi flavonoid glikozitlerinin hidroliz olmasını sağlamak yani yükseltgenmesini engellemektir. Askorbik asit eklenmesinin nedeni ise örneklerde bulunan bileşiklerin yükseltgenmesini engellemektir [4-28].

Bu nedenlerle HPLC-MS ile yapılan çalışmalarda girişim olup olmadığının tesbiti, ve girişim varsa standart ekleme metodunun kullanılmasıyla bu girişimlerinin etkisinin giderilerek doğru değerlerin bulunması için bütün örneklere standart ekleme metodu uygulandı. Standart ekleme grafiğinin kalibrasyon grafiğine paralel olması kimyasal girişim olmadığını göstermektedir. Ayrıca standart ekleme metodunun uygulanmasıyla verim tayini de yapılmış olmaktadır. Elde edilen sonuçlardan, semizotu, ısırgan otu ve kuşburnunda miyrisetin tayininde kalibrasyon grafiği ile standart ekleme grafikleri arasında paralellikten hafif sapma olduğu gözlemlendi. Sonuç olarak, Tablo 4.3' te verilen sonuçlar standart ekleme metoduyla elde edilen en az 3 sonuç ortalamasıdır.

Semizotunda miyrisetin tayini için elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri Şekil 4.52' de birlikte verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi standart ekleme metodunun eğiminin 20.717, kalibrasyon grafiği eğiminin 20.095 olduğu ve bu değerlerin birbirine yakın olmakla birlikte farklı oldukları anlaşılmaktadır. Böylece semizotu için standart ekleme metoduyla elde edilen grafikten miyrisetin konsantrasyon değerinin 2.6 ppm olduğu gözlemlendi. Gerekli hesaplamalar yapıldıktan sonra semizotunda 47 ppm miyrisetin bulunduğu görülmektedir. Şekil 4.49' da semizotunun MS spektrumuna bakıldığında SIM tarama m/z 319

değerinin olduğu ve SCAN taramada ise miyrisetine ait olan karakteristik pik grubu spektrumda görülmektedir.

Isırgan otunda miyrisetin tayini için elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri Şekil 4.57' de birlikte verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi standart ekleme metodunun eğiminin 20.584, kalibrasyon grafiği eğiminin 20.882 olduğu ve bu değerlerin birbirine çok yakın olmakla birlikte farklı oldukları anlaşılmaktadır. Böylece ısırgan otu için standart ekleme grafiğinden bulunan konsantrasyon değeri 0.35 ppm olarak gözlemlendi. Gerekli hesaplamalar yapıldığında ısırgan otunda 13 ppm miyrisetin bulunduğu görülmektedir.

Şekil 4.55' te ısırgan otunun MS spektrumuna bakıldığında SCAN taramada miyrisetine ait olan karakteristik pik grubu spektrumda görülmektedir.

Menengiçte miyrisetin tayini için elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri Şekil 4.61' de birlikte verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi standart ekleme metodunun eğiminin 18.777, kalibrasyon grafiği eğiminin 19.465 olduğu ve bu değerleri birbirine yakın olmakla birlikte farklı oldukları anlaşılmaktadır. Böylece menengiç için standart ekleme metoduyla elde edilen konsantrasyon değeri grafikten 0.29 ppm olarak okundu. Gerekli hesaplamalar yapıldığında menengiçte 5.2 ppm miyrisetin bulunduğu görülmektedir.

Şekil 4.59' daki menengiğin MS spektrumuna bakıldığında SCAN taramada miyrisetine ait olan karakteristik pik grubu spektrumda görülmektedir.

Kuşburnunda miyrisetin tayini için elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri Şekil 4.65' te birlikte verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi standart ekleme metodunun eğiminin 20.095, kalibrasyon grafiği eğiminin 20.415 olduğu ve bu değerlerin birbirine yakın olmakla birlikte farklı oldukları anlaşılmaktadır. Böylece kuşburnu için standart ekleme metoduyla elde edilen konsantrasyon değeri grafikten 0.035 ppm olarak okundu. Gerekli hesaplamalar yapıldığında kuşburnunda 0.63 ppm miyrisetin bulunduğu görülmektedir.

Şekil 4.68' de kuşburnunun MS spektrumuna bakıldığında SIM tarama m/z 319 değerinin olduğu ve SCAN taramada ise miyrisetine ait olan karakteristik pik grubu spektrumda görülmektedir.

Semizotunda kuersetin tayinine ilişkin standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri Şekil 4.67' de birlikte verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi standart ekleme metodunun eğiminin 10.934, kalibrasyon grafiği eğiminin 10.013 olduğu ve bu değerlerin birbirine yakın olmadıkları görülmektedir. Bu nedenle semizotunda kuersetin tayininde kimyasal girişim olduğu kolaylıkla söylenebilir. Böylece semizotunda kuersetin tayini için standart ekleme metoduyla elde edilen konsantrasyon değeri grafikten 4.4 ppm olarak okundu. Gerekli hesaplamalar yapıldığında semizotunda 39 ppm kuersetin bulunduğu görülmektedir. Şekil 4.69' da semizotunun kuersetin

MS spektrumuna bakıldığında SIM tarama m/z 303 değerinin olduğu ve SCAN taramada ise kuersetine ait olan karakteristik pik grubu spektrumda görülmektedir.

Isırgan otunda kuersetin tayinine ilişkin standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri Şekil 4.73' te birlikte verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi standart ekleme metodunun eğiminin 23.369, kalibrasyon grafiği eğiminin 22.186 olduğu ve bu değerlerin birbirine yakın olmakla birlikte farklı oldukları anlaşılmaktadır. Böylece ısırgan otunda kuersetin tayini için standart ekleme metoduyla elde edilen konsantrasyon değeri grafikten 0.49 ppm olarak okundu. Gerekli hesaplamalar yapıldığında ısırgan otunda kuersetin konsantrasyonunun 18 ppm bulunduğu görülmektedir. Isırgan otunun kuersetin MS spektrumuna bakıldığında (Şekil 4.71) SIM tarama m/z 303 değerinin olduğu ve SCAN taramada ise kuersetine ait olan karakteristik pik grubu spektrumda görülmektedir.

Menengiçte kuersetin tayini için Şekil 4.74' teki kromatogramdaki alan olan 13.985 değeri, Şekil 4.70' deki şartlardaki kromatogramlardan elde edilen kalibrasyon doğru denkleminde yerine konulmuş ve gerekli hesaplamalar yapıldığında menengiçte 9.0 ppm kuersetin bulunduğu görülmüştür. Menengiçin kuersetin MS spektrumuna bakıldığında Şekil 4.75' te SCAN taramada kuersetine ait olan karakteristik pik grubu spektrumda görülmektedir.

Kuşburnu-kuersetin için Şekil 4.78' deki MS spektrumuna bakıldığında SIM tarama m/z 303 değerinin olduğu ve SCAN taramada ise kuersetine ait olan karakteristik pik grubu spektrumda görülmektedir.

Kuşburnu-kuersetin için 10 ve 5 gramlık örneklerle elde edilen Şekil 4.76-4.77' deki kromatogramların alan değerleri Şekil 4.67' deki doğru denkleminde yerine konulduğunda ve gerekli hesaplamalar yapıldığında kuşburnunda kuersetin sırasıyla 29 ve 27 ppm bulunduğu görülmektedir.

Semizotunda kamferol tayinine ilişkin standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri Şekil 4.80' de birlikte verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi standart ekleme metodunun eğiminin 47.571, kalibrasyon grafiği eğiminin 45.577 olduğu ve bu değerlerin birbirine yakın olmakla birlikte farklı oldukları anlaşılmaktadır. Böylece gerekli hesaplamalar yapıldığında semizotunda 3.6 ppm kamferol bulunduğu görülmektedir. Ayrıca Şekil 4.81' de semizotunun kamferol MS spektrumuna bakıldığında SIM tarama m/z 287 değerinin olduğu ve SCAN taramada ise kamferole ait olan karakteristik pik grubu spektrumda görülmektedir.

Isırgan otunda kamferol tayinine ilişkin standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri Şekil 4.83' te birlikte verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi standart ekleme metodunun eğiminin 48.495, kalibrasyon grafiği eğiminin 49.835 olduğu ve bu değerlerin birbirine yakın olmakla birlikte farklı oldukları anlaşılmaktadır. Böylece standart ekleme metoduyla gerekli hesaplamalar yapıldığında ısırgan otunda 7.7 ppm kamferol bulunduğu görülmektedir. Şekil

4.84' teki ısırgan otuna ait kamferolün MS spektrumuna bakıldığında SIM tarama m/z 287 değerinin olduğu ve SCAN taramada ise kamferole ait olan karakteristik pik grubu spektrumda görülmektedir.

Şekil 4.85-4.86' daki menengiçe ait HPLC-MS kromatogramındaki alan kalibrasyon denkleminde yerine konulduğunda ve gerekli hesaplamalar yapıldığında menengiçte 5.34 ppm kamferol bulunduğu görülmüştür. Şekil 4.87' deki menengiçe ait MS spektrumuna bakıldığında SİM tarama m/z 287 değerinin olduğu ve SCAN taramada ise kamferole ait olan karakteristik pik grubu spektrumda görülmektedir. Yine Şekil 4.92' de kuşburnunda kamferol tayinine ilişkin MS spektrumuna bakıldığında SIM tarama m/z 287 değerinin olduğu ve SCAN taramada ise kamferole ait olan karakteristik pik grubu spektrumda görülmektedir.

Kuşburnunda kamferol tayinine ilişkin Şekil 4.94' te standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri birlikte verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi standart ekleme metodunun eğiminin 56.032, kalibrasyon grafiği eğiminin 49.835 olduğu ve bu değerlerin birbirine yakın olmakla birlikte farklı oldukları anlaşılmaktadır. Gerekli hesaplamalar yapıldığında kuşburnunda 4.0 ppm kamferol bulunduğu görülmektedir.

Bulunan sonuçlardan, en yüksek ve en düşük kuersetin konsantrasyonunun sırasıyla semizotu (39 ppm) ve menengiç (< t.s) bitkisinde bulundu. En yüksek ve en düşük kamferolün ise ısırgan otu (7.7 ppm) ve menengiç (< t.s) bitkisinde, ve en yüksek ve en düşük miyrisetininin ise semizotu (47 ppm) ve kuşburnu (0.63 ppm) bitkisinde bulunduğu gözlemlendi (Tablo 4.3).

6. KAYNAKLAR

- [1] M. de Souza L., 2008, HPLC/ESI-MS and NMR analysis of flavonoids and tannins in bioactive extract from leaves of *Maytenus ilicifoli*, J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Article in press.
- [2] Merken H.M. ve Beecher, G. R., 2000, Measurement of food flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography: A Review, J. Agric. Food Chem., , 48 (3), 577-599
- [3] <http://lpi.oregonstate.edu/f-w00/flavonoid.html>
- [4] Spencer P. E. J., 2007, Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research, British J. of Nutrition, 1-11.
- [5] Karakaya S. ve El S.N., 1999, Quercetin, luteolin, apigenin and kaempferol contents of some foods, Food Chem., 66, 289-292.
- [6] Burak M. ve ÇİMEN Y., 1999, Flavonoidler ve Antioksidan Özellikleri, Türkiye Klinikleri J Med Sci, 19, 296-304
- [7] Jungbluth G. ve Ternes W., 2000, HPLC separation of flavonols, flavones and oxidized flavonols with UV-, DAD-, electrochemical and ESI-ion trap MS detection, Fresenius J Anal Chem., 367, 661–666”
- [8] <http://en.wikipedia.org/wiki/Flavonol>
- [9] Bonaccorsi P., 2008, Flavonol glucosides in Allium species: A comparative study by means of HPLC–DAD–ESI-MS–MS, Food Chemistry, 1668–1673.
- [10] <http://www.thefreelibrary.com/Quercetin-%2BA%2BFlavonol-a01073822223>
- [11] Volpi N., 2006, Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry, J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 354-361.
- [12] Llorach R., 2008, Characterisation of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole, Food Chemistry, 1028–1038.
- [13] Häkkinen S., 1999, Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries, Food Research International, 345-353.
- [14] Häkkinen S. ve Auriola S., 1998, High-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry and diode array ultraviolet detection in the identification of flavonol aglycones and glycosides in berries, J. of Chromat. A, 91-100.
- [15] H. Häkkinen S. ve A. Törrönen R., 2000, Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique, Food Research International, 517-524.
- [16] Sultana B. ve Anwar F., 2008, Flavonols (kaempferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal plants, Food Chemistry, 879-884.

- [17] Zhang J., 2005, Quantitative and qualitative analysis of flavonoids in leaves of *Adinandra nitida* by high performance liquid chromatography with UV and electrospray ionization tandem mass spectrometry detection, *Anal. Chim. Acta*, 97-104.
- [18] Justesen U., 1998, Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection, *J. of Chromat. A*, 101–110.
- [19] http://www.sifalibitkilervedogaltedavi.com/bitki_kimyasallari/Kuersetin.html
- [20] H. Koç, 2002, Bitkilerle sağlıklı yaşama, Ankara, 321-322,
- [21] Eskiöglu, A. N., Anadol, C., 1998, “Şifalı Bitkiler Ansiklopedisi”, vol. 211-314.
- [22] <http://www.mutfakdedisi.com/sifali-bitkiler/semizotu-2.php>
- [23] <http://www.uludagsozluk.com/k/citlembik/&ba=menengic>
- [24] <http://biriz.biz/kuşburnu/kuş3.htm>
- [25] Prof. Dr. Atilla YILDIZ, Prof. Dr. Ömer Genç, Prof. Dr. Sema Bektaş, 1997, Enstrümental Analiz Yöntemleri, Hacettepe Yayınları, 417-422.
- [26] Özçimder M. 2004, Gaz ve Sıvı Kromatografileri, Kırıkkale.
- [27] Skoog, D.A., Holler, F.I., Nieman, T.A., 1998, Enstrümental Analiz İlkeleri, I. Baskı, 498-531, 725-739.
- [28] Koh E., Wimalasiri K. M.S., Chassy A. W., Mitchell A. E., “Content of ascorbic acid, quercetin, kamferol and total phenolics in commercial broccoli”, LFCA, Accepted Manuscript
- [29] Vukics V., 2008, Analysis of heartsease (*Viola tricolor* L.) flavonoid glycosides by micro-liquid chromatography coupled to multistage mass spectrometry, *J. of Chromatography A*, 1206, 11-20.
- [30] Riberio S. M. R., 2008, Phenolic compounds and antioksidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties, *Food Chem.*, 110, 620-626.
- [31] Lacopini P., 2008, Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioksidant activity and interactions, *J. of Food Composition and Analysis*, 21, 589-594.
- [32] Özyürek M., 2009, Measurement of xanthine oxidase inhibition activity of phenolic and flavonoids with a modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method, *Analytica Chimica Acta*, Accepted Manuscript.
- [33] Michalkiewicz A., 2008, Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey, *J. of Chromatography A*, 1187, 18-24.
- [34] Meot-Duros L. ve Magne C., 2009, Antioxidant activity and phenol content of *Crithmum maritimum* L. leaves, *Plant Physiology and Biochemistry*, 47, 37-41.

- [35] Riihinen K., 2008, Organ-specific distribution of phenolic compounds in bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and 'northblue' blueberry (*Vaccinium corymbosum* x *V. angustifolium*), *Food Chem.*, 110, 156-160.
- [36] Novak I., 2008, Ultrasound extracted flavonoids from four varieties of Portuguese red grape skins determined by reverse-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *Analytica Chimica Acta*, 630, 107-115.
- [37] Arapitsas P., 2008, Identification and quantification of polyphenolic compounds from okra seeds and skins, *Food Chem.*, 110, 1041-1045.
- [38] Figueirinha A., 2008, *Cymbopogon citratus* leaves: Characterisation of flavonoids by HPLC-PDA-ESI/MS/MS and an approach to their potentiation as a source of bioactive polyphenols, *Food Chem.*, 110, 718-728.
- [39] Simirgiotis M. J., 2009, Identification of phenolic compounds from the fruits of the mountain papaya *vasconcellea pubescens* A. DC. Grown in Chile by liquid chromatography-UV detection-mass spectrometry, *Food Chem.*, 115, 775-784.
- [40] Kahoun D., 2008, Determination of phenolic compounds and hydroxymethylfurfural in meads using high performance liquid chromatography with coulometric-array and UV detection, *J. of Chromatography A*, 1202, 19-33.
- [41] Olsen H., 2009, Characterization and quantification of flavonoids and hydroxycinnamic acids in curly kale (*Brassica oleracea* L. Convar. acephala Var. sabellica) by HPLC-DAD-ESI-MSⁿ, *J. Agric. Food Chem.*, 57, 2816-2825.
- [42] Grzelak K., 2009, Content of quercetin glycosides and fructooligosaccharides in onion stored in a cold room, *European Food Research and Technology*, 228, 1001-1007.
- [43] Huang L., 2008, Purification of quercetin in *Anoectochilu roxburghii* (wall) Lindl using UMAE by high- speed counter-current chromatography and subsequent structure, *Separation and Purification Technology*, 64, 101-107.
- [44] Qian Z. M., 2007, Simultaneous qualitation and quantification of thirteen bioactive compounds in *Flos lonicerae* by high-performance liquid chromatography with diode array detector and mass spectrometry, *Chem. Pharm. Bull.*, 55 (7), 1073-1076.
- [45] Deng S., 2008, Simultaneous characterisation and quantitation of flavonol aglycones in noni leaves using a validated HPLC-UV/MS method, *Food Chem.* 111, 526-529.
- [46] Yang R. Z., 2009, Simultaneous analysis of anthocyanins and flavonols in petals of lotus (*Nelumbo*) cultivars by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization mass spectrometry, *J. of Chromatography A*, 1216, 106-112.
- [47] Barrington R., 2009, Absorption, conjugation and efflux of the flavonoids, kaempferol and galangin, using the intestinal CaCo-2/TC7 cell model, *J. of Functional Foods*, I, 74-87.

- [48] Huang Z., 2007, Phenolic compound profile of selected vegetables frequently consumed by African Americans in the southeast United States, *Food Chem.*, 103, 1395-1402.
- [49] Michodjehoun-Mestres L., 2009, Monomeric phenols of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.), *Food Chem.* 112, 851-857.
- [50] Portet B., 2008, Analysis of minor flavonoids in *Piper hostmannianum* var. *berbicense* using liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *J. of Chromatography A*, 1210, 45-54.
- [51] Masa A. ve Vilanova M., 2008, Flavonoid and aromatic characterisation of cv. Albari'n blanco (*Vitis vinifera* L.) *Food Chemistry* 107, 273–281.
- [52] Safra J., 2007, Determination of selected antioxidants in *Melissae herba* by isotachopheresis and capillary zone electrophoresis in the column-coupling configuration, *Journal of Chromatography A*, 1171, 124–132.
- [53] Luthria D. L., 2008, Influence of experimental conditions on the extraction of phenolic compounds from parsley (*Petroselinum crispum*) flakes using a pressurized liquid extractor, *Food Chemistry* 107, 745–752
- [54] Zhu J., 2007, Comparison of two sample preconcentration strategies for the sensitivity enhancement of flavonoids found in Chinese herbal medicine in micellar electrokinetic chromatography with UV detection, *Journal of Chromatography A*, 1166, 191–200.
- [55] El-Hady D. A. ve El-Maali N. A., 2008, Determination of catechin isomers in human plasma subsequent to green tea ingestion using chiral capillary electrophoresis with a high-sensitivity cell, *Talanta*, 76, 138-145.
- [56] Oliveira I., 2009, Phytochemical characterization and radical scavenging activity of *Portulaca oleraceae* L. leaves and stems, *Microchemical Journal*, Accepted Manuscript.
- [57] Şahin G., Türkiye'den toplanan bazı paeonia türlerinin antibakteriyel Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, 2007.
- [58] Tsimogiannis D., 2007, Characterization of Flavonoid Subgroups and Hydroxy Substitution by HPLC-MS/MS, *Molecules*, 12, 593-606.
- [59] Silva S., 2005, Identification of flavonol glycosides in winemaking by-products by HPLC with different detectors and hphenated with mass spectrometry, *Ciencia Tec. Vitiv.*, 20 (1), 17-33.
- [60] Temraz A. ve El-Tantawy H. W., 2008, Characterization of antioxidant activity of extract from *Artemisia vulgaris*, *Pak. J. Pharm. Sci.*, 21, 321-326.
- [61] Hilal Y. ve Engelhardt U., 2007, Characterisation of white tea – Comparison to green and black tea, *J. Verbr. Lebensm.*, 2, 414 – 421.

- [62] Rauha J. P., The search for biological activity in Finnish plant extracts containing phenolic compounds, akademik tez, 2001.
- [63] Basha S. M., 2004, Compositional differences in the phenolics compounds of muscadine and bunch grape wines, *African Journal of Biotechnology*, 3 (10), 523-528.
- [64] Midorikawa K., 2001, Liquid chromatography–mass spectrometry analysis of propolis, *Phytochem. Anal.* 12, 366–373.
- [65] Wollenweber E., 2003, Externally accumulated flavonoids in three mediterranean *Ononis* species, *Z. Naturforsch.*, 58, 771-775.
- [66] Wollenweber E., 2002, On the occurrence of exudate flavonoids in the borage family (Boraginaceae), *Z. Naturforsch.*, 57, 445-448.
- [67] Kahle K., 2005, Polyphenol profiles of apple juices, *Mol. Nutr. Food Res.*, 49, 797-806.
- [68] McMurrugh I., 1982, Quantitative Analysis of Hop Flavonols Using High-Performance Liquid Chromatography, *J. Agric. Food Chem.*, 30, 1102-1106.
- [69] Taleb-Contini S. H., 2007, Detection of flavonoids in glandular trichomes of *Chromolaena* species (Eupatorieae, Asteraceae) by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *RBCF*, 43, 315-321.
- [70] Downey M. O., ve Rochfort S., 2008, Simultaneous separation by reversed-phase high-performance liquid chromatography and mass spectral identification of anthocyanins and flavonols in Shiraz grape skin, *Journal of Chromatography A*, 1201, 43-47.
- [71] Odaci D., 2007, Determination of phenolic acids using *Trametes versicolor* laccase, *Talanta*, 71, 312-317.
- [72] Anli E., 2006, Trans-resveratrol and other phenolic compounds in Turkish Red Wines with HPLC, *Journal of Wine Research*, 17, 117-125.
- [73] Ayaz F. A., 2005, Separation, Characterization, and Quantitation of Phenolic Acids in a Little-Known Blueberry (*Vaccinium arctostaphylos* L.) Fruit by HPLC-MS, *J. Agric. Food Chem.*, 53, 8116-8122.
- [74] Toker G., 2001, Comparative evaluation of the flavonoid content in officinal *Tiliae flos* and Turkish lime species for quality assessment, *J. of Pharm. and Biomedical Analysis*, 26, 111-121.
- [75] Topçu G., 2007, A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*, *Food Chem.*, 103, 816-822.
- [76] Orak H. H., 2007, Total antioxidant activities, phenolics, anthocyanins, polyphenoloxidase activities of selected red grape cultivars and their correlations, *Scientia Horticulturae*, 111, 235-241.
- [77] Kırmızıbekmez H., 2005, Identification by HPLC-PAD-MS and quantification by HPLC-PAD of phenylethanoid glycosides of five *Phlomis* Species, *Phytochemical Analysis*, 16, 1-6.

- [78] Öztürk N., 2007, Determination of phenolic acids by a modified HPLC: Its application to various plant materials, *J. of Liquid Chrom. & Related Tech.*, 30, 587-596.
- [79] Apak R., 2008, Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay, *Microchimica Acta*, 160, 413-419.
- [80] Janes D., 2009, Identification of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) aroma compounds with GC-MS, *Food Chem.*, 112, 120-124.
- [81] Pawlowska A. M., 2009, Flavonoids of *Zizyphus jujuba* L. ve *Zizyphus spina-christi* (L.) Willd (Rhamnaceae) fruits, *Food Chem.*, 112, 858-862.
- [82] Sharififar F., 2009, Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L., *Food Chem.*, 112, 885-888.
- [83] Bystrom L. M., 2008, Characterisation of phenolics by LC-UV/Vis, LC-MS/MS and sugars by GC *Melicoccus bijugatus* Jacq. 'Montgomery' fruits, *Food Chem.*, 111, 1017-1024.
- [84] Barba de la Rosa A. P., 2009, Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) as an alternative crop for sustainable food production: Phenolic acids and flavonoids with potential impact on its nutraceutical quality, *J. of Cereal Science*, 49, 117-121.
- [85] Xu G., 2008, Composition and distribution of phenolic acids in Ponkan (*Citrus poonensis* Hort. Ex Tanaka) and Huyou (*Citrus paradisi* Macf. Changshanhuoyou) during maturity, *J. of Food Composition and Analysis*, 21, 382-389.
- [86] Kumar N., 2009, Antioxidant activity and ultra-performance LC-electrospray ionization-quadrupole time-of-flight mass spectrometry for phenolics-based fingerprinting of Rose species: *Rosa damascena*, *Rosa bourboniana* and *Rosa brunonii*, *Food and Chemical Toxicology*, 47, 361-367.
- [87] Tian X.-J., 2009, Studies of intestinal permeability of 36 flavonoids using Caco-2 cell monolayer model, *International J. of Pharm.*, 367, 58-64.
- [88] Giovanelli G. ve Buratti S., 2009, Comparison polyphenolic composition and antioxidant activity of wild Italian blueberries and some cultivated varieties, *Food Chem.*, 112, 903-908.
- [89] Chirinos R., 2009, HPLC-DAD characterisation of phenolic compounds from Andean oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) tubers and their contribution to the antioxidant capacity, *Food Chem.*, 113, 1243-1251.
- [90] Katsube T., 2009, Effect of air-drying temperature on antioxidant capacity and stability of polyphenolic compounds in mulberry (*Morus alba* L.) leaves, *Food Chem.*, 113, 964-969.
- [91] Orhan I., 2009, Free radical scavenging properties and phenolic characterization of someedible plants, *Food Chem.*, 114, 276-281.
- [92] Roldan-Marin E., 2009, Onion high-pressure processing: Flavonol content and antioxidant activity, *LWT-Food Science and Technology*, 42, 835-841.

- [93] Slusarczyk S., 2009, Antioxidant activity of polyphenols from *Lycopus lucidus* Turcz, Food Chem., 113, 134-138.
- [94] Bolling B. W., 2009, Limited contribution of isoflavones to hepatocellular phase II enzyme-including activity of soybean (*Glycine max*) extracts, Food Chem., 113, 1069-1075.
- [95] Heimler D., 2006, Antiradical activity and polyphenol composition of local *Brassicaceae* edible varieties, Food Chem., 99, 464-469.
- [96] Martinez-Sanchez A., 2007, Identification of new flavonoid glycosides and flavonoid profiles to characterize rocket leafy salads (*Eruca vesicaria* and *Diplotaxis tenuifolia*), J. Agric. Food Chem., 55, 1356-1363.
- [97] Kamata K., 2008, Constituent from leaves of *Apocynum venetum* L., J. Nt. Med., 62, 160-163.
- [98] Ding S., 2006, Determination of active components of *Ginkgo biloba* in human urine by capillary high-performance liquid chromatography/mass spectrometry with on-line column-switching purification, Rapid Commun. Mass Spectrom., 20 3619-3624.
- [99] Huber L. S., 2009, Quantitative variation in Brazilian vegetable sources of flavonols and flavones, Food Chem., 113, 1278-1282.
- [100] Krafczyk N., 2008, Phenolic composition of rhubarb, Eur. Food Res. Technol., 228, 187-196.

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Elazığ’ da doğdum. İlköğrenimimi Elazığ 50. yıl ilkokulunda tamamladıktan sonra öğrenimime beş yıl ara verdim. Ortaokulu dışarıdan bitirme imtihanıyla aldım ve 1994-1995 eğitim-öğrenim yılında Elazığ Fatih Lisesinde öğrenimime kaldığım yerden devam ettim ve 1997 yılında mezun oldum. 1998 yılında Fırat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde Lisans öğrenimime başladım. 2002 yılında bölüm birincisi olarak mezun olduktan sonra aynı yıl Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında (Analitik Kimya) yüksek lisansa başladım, 2005 yüksek lisans eğitimimi “Bazı Tıbbi Bitkilerin Ekstraksiyonu ve Tayini” adlı tez çalışmamı bitirdikten sonra aynı Enstitüde doktora öğrenimime başladım ve çalışmamı “semizotu, ısırgan otu, menengiç ve kuşburnu gibi tıbbi ve aromatik bitkilerde flavonollerin HPLC-MS ile tayini” konulu doktora çalışmama devam etmekteydim. Evli ve bir çocuk annesiyim.