

**KAYISI (*Prunus armeniaca* L.) VE KAYISI ÇEKİRDEĞİNDE
KUERSETİNİN HPLC-MS İLE TAYİNİ**

Emine CENGİZ

**Yüksek Lisans Tezi
Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Prof.Dr. Mehmet YAMAN
HAZİRAN-2011**

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KAYISI (*Prunus armeniaca* L.) VE KAYISI ÇEKİRDEĞİNDE
KUERSETİNİN HPLC-MS İLE TAYİNİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Emine CENGİZ
(Enstitü No)

Anabilim Dalı: Kimya
Programı: Analitik Kimya

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet YAMAN

ELAZIĞ-2011

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KAYISI (*Prunus armeniaca* L.) VE KAYISI ÇEKİRDEĞİNDE
KUERSETİNİN HPLC-MS İLE TAYİNİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Emine CENGİZ

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 15.06.2011

Tezin Savunulduğu Tarih: 05.07.2011

Tez Danışmanı:	Prof. Dr. Mehmet YAMAN
Diğer Jüri Üyeleri:	Prof. Dr. Ali ÖLÇÜCÜ
Diğer Jüri Üyeleri:	Prof. Dr. Şemsettin CİVELEK

TEMMUZ-2011

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezi olarak sunulan bu çalışmada, Elazığ yöresinden toplanan kayısı örneklerinde ve bu örneklerin çekirdek kısımlarında kuersetin tayini yapıldı. Çalışmanın ilk aşamasında kayısı örneklerinde kuersetin tayini yapmak için ekstraksiyon koşulları optimize edildi. Ayrıca kuersetinin standart çözeltileri için Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi (HPLC-MS) cihazında optimum koşullar belirlenip aynı koşullar ekstrakte edilen örneklerle uygulandı.

Çalışmalarım süresince büyük ilgi, anlayış ve tecrübelerini esirgemeyen Sayın Hocam Prof. Dr. Mehmet YAMAN' a çok teşekkür ediyorum.

Çalışmalarım esnasında benden her türlü desteğini esirgemeyen ailem, dostlarım ve çalışma arkadaşlarım Tülin BAL, Çiğdem ER, Nagihan M. KARAASLAN, Şükran AKKUŞ' a teşekkür ederim.

EMİNE CENGİZ

ELAZIĞ-2011

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER	III
ÖZET	V
SUMMARY	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ	VII
TABLolar LİSTESİ	VII
KISALTMALAR.....	IX
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Bitkilerde Bulunan Bazı Polifenoller ve Fonksiyonları.....	3
2.2. Flavanoidler ve Özellikleri	4
2.2.1. Flavonoller	6
2.2.1.1. Kuersetin	7
2.3. Kayısı Meyvesi ve Tohumunun Özellikleri.....	8
2.3.1. Kayısı Meyvesi Türleri	8
2.3.2. Kimyasal Bileşimi	9
2.4. Kuersetinin Ekstraksiyonu ve Tayini	11
2.5. ANALİZ YÖNTEMLERİ	14
2.5.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	14
2.5.1.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Cihazı	15
2.5.1.2. Pompa Sistemleri	17
2.5.1.3. Numune Enjeksiyon Sistemleri	18
2.5.1.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Kolonları	19
2.5.1.5. Kolon Dolgu Maddelerinin Tipleri.....	20
2.5.1.6. Dedektörler	20
2.5.2. HPLC Dedektörü Olarak Kütle Spektrometresi.....	22
2.5.2.1. Moleküler Kütle Spektrometride İyon Kaynakları.....	22
2.5.2.1.1. Gaz Fazı İyon Kaynakları	23
2.5.2.1.1.1. Elektron İmpakt Kaynağı.....	23
2.5.2.1.1.2 Elektrosprey İyonlaştırma	25
2.5.2.2. Kütle Ayırıcıları	26
2.5.2.3. Kütle Spektrumlarının Karşılaştırılması ile Bileşiğin Tespit Edilmesi.....	29
2.5.2.4. Moleküler Kütle Spektrometresinin Uygulamaları	33
2.5.3. Literatürde bitki örneklerinde Kuersetin tayini ile İlgili Yapılan Bazı Çalışmalar.....	33
2.5.4. Bazı Analitik Terimler.....	39
3. MATERYAL METOT	42
3.1. Kullanılan Cihazlar ve Cam Malzemeler	41
3.2. Kullanılan Standart Çözeltiler ve Reaktiflerin Hazırlanması	41
3.3. Örneklerin Temini	42
3.4. Kayısı Meyvesi ve Çekirdeği Örneklerinin Ekstraksiyonu.....	42
3.5. Kuersetin için Optimum Koşullarının Tayini	43
4. BULGULAR.....	51
4.1. Akış Hızı ile İlgili Bulunan Sonuçlar	51

4.5. Ölçümlerle İlgili Elde Edilen Optimum Şartlar	52
4.6. Çalışılan Örneklerde Bulunan Kuersetine Ait Elde Edilen Kromatogramlar	53
5. SONUÇ VE TARTIŞMA	58
6. ÖNERİLER	60
KAYNAKLAR	61
ÖZGEÇMİŞ.....	68

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi KAYISI (*Prunus armeniaca* L.) VE KAYISI ÇEKİRDEĞİNDE KUERSETİNİN HPLC-MS İLE TAYİNİ

Emine CENGİZ

Fırat Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet YAMAN

Yıl: 2011, Sayfa:67

Kuersetin flavonoidlerin alt grubunda yer alan flavonol grubunun bir bileşiğidir. Kuersetin bileşiği antioksidan ve antikanserojen özelliklere sahiptir. Son zamanlarda, sentetik ilaçlardan ziyade doğal örneklerdeki kuersetinin daha avantajlı olması nedeniyle, meyve ve sebzelerdeki kuersetin konsantrasyonunun tayinine büyük bir ilgi vardır. Özellikle Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ve Kütle Spektrometresi (MS) cihazlarının birleştirilmesiyle oluşan HPLC-MS sisteminin yaygınlaşması, bu bileşiğin geniş bir gıda çeşidi örneklerindeki derişimlerinin tayinine imkan vermektedir.

Bu çalışmada, doğru, kesin ve duyarlı sonuçlar elde etmek için fragmentor (parçalayıcı) voltajı, enjeksiyon hacmi, kolon sıcaklığı, mobil faz akış hızı gibi parametreler 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 mL/dk, kolon sıcaklığı için 30 °C ve fragmentor voltajı için 140 V değerleri bulundu. Gözlenen bu optimum şartlar, Elazığ yöresinden temin edilen kayısı meyvesi ve kayısı çekirdeği örneklerinde kuersetin tayini için uygulandı. Örneklerden kuersetinin ekstraksiyonu için, metanol/askorbik asit/HCl karışımı kullanıldı.. Berrak ekstraksiyon çözeltilerindeki kuersetin HPLC-MS ile tayini yapıldı. Bulunan sonuçlardan, en büyük ve en küçük kuersetin konsantrasyonlarının, yaş esasa göre kayısı meyvesinde <t.s.-12.9 ppm aralığında ve kayısı meyvesi çekirdeğinde tayin sınırından küçük bulundu.

Anahtar kelimeler: Kayısı, kuersetin, HPLC-MS, ekstraksiyon,

SUMMARY
MSc Thesis
DETERMINATION OF QUERCETINE IN APRICOT (PRUNUS ARMENIACA
L.) AND ITS SEED BY HPLC-MS
Emine CENGİZ
Firat University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry
Supervisor: Prof. Dr. Mehmet YAMAN
Year: 2011, Page:67

Quercetin is a compound of flavonol group that is subgroup of flavonoids. It has antioxidant and anticancer properties. Recently, there is an interest in the determination of quercetin concentrations in fruits and vegetables due to more advantages of its antioxidant compounds in natural samples than in synthetic drugs. Particularly, widespread use of HPLC-MS system combining from high performance liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry (MS) allows to the determination of this compound in wide kinds of food samples.

In this study, the parameters such as fragmentor potential, injection volume, column temperature, flow rate of mobile phase were optimized to obtain accurate, precise and sensitive results. The mixture of water/methanol/acetonitrile/formic acid was used as mobile phase. The optimum conditions were found to be injection volume: 5.0 μ L, flow rate of mobile phase: 0.6 mL/min, column temperature: 30 $^{\circ}$ C and fragmentor potential: 140 V. The optimum parameters observed were applied to the determination of quercetin in apricot fruit and apricot seed samples grown in vicinity of Elazig city. The mixture of methanol/ascorbic acid/HCl was used to extract quercetin from the samples. Quercetin concentrations in the clear extracts were determined by using HPLC-MS. From the obtained results, the highest and the lowest concentrations for quercetin were found to be in the range of < LOQ- 12.9 ppm on wet weight basis. Quercetin concentration in apricot seeds was found lower than LOQ.

Keywords: Apricot, quercetin, HPLC-MS, extraction.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Bir flavonoidin genel yapısı.	5
Şekil 2.2. Bazı flavonoid bileşikleri.	6
Şekil 2.3. Bazı flavonol bileşiklerinin molekül yapıları.	6
Şekil 2.4. Derim zamanında kayısı meyvesi.	8
Şekil 2.5. Bir HPLC cihazı şeması	16
Şekil 2.6. Gradient elüsyon uyumlu bir HPLC cihazının şeması	17
Şekil 2.7. HPLC için bir pistonlu pompa	18
Şekil 2.8. Yüksek hızlı izokratik ayırma.	19
Şekil 2.9. Duyarlılık, en düşük tayin sınırı, doğrusal çalışma bölgesi.	21
Şekil 2.10. Gürültü ve en düşük tayin sınırı.	21
Şekil 2.11. Elektron-impakt kaynağının yapısı	24
Şekil 2.12. Dekanol'ün (a) sert bir kaynakla ve (b) yumuşak bir kaynakla alınmış kütle spektrumları	25
Şekil 2.13. Dört kutuplu (Kuadropol) bir kütle ayırıcısı.	29
Şekil 2.14. n-Heptanal'in elektron impakt spektrumu.	30
Şekil 2.15. LC/MS hareketli bant ara faz sistemi.	32
Şekil 3.1. Ekstraksiyon yönteminin basamakları.	43
Şekil 3.2. HPLC-MS ile kuersetin tayini için en uygun akış hızının bulunması.	45
Şekil 3.3. HPLC-MS ile kuersetin tayini için optimum fragmentorün bulunması.	45
Şekil 3.4. HPLC-MS ile kuersetin tayini için fragmentor-alan değişimi grafiği.	46
Şekil 3.5. HPLC-MS ile kuersetin tayini için optimum enjeksiyon hacminin bulunması.	47
Şekil 3.6. HPLC-MS ile kuersetin tayini için en uygun kolon sıcaklığının bulunması ..	48
Şekil 3.7. HPLC-MS ile kuersetin için kalibrasyon çözeltilerinin kromatogramları.	49
Şekil 3.8. HPLC-MS ile kuersetinin 0.5-10 ppm aralığına ait kalibrasyon eğrisi.	49
Şekil 3.9. Kuersetinin HPLC-MS ile optimum şartlarda elde edilen kütle spektrumu. ...	50
Şekil 4.1. Kayısı meyvesinde kuersetin tayini için uygulanan standart ekleme metoduyla elde edilen HPLC-MS kromatogramları.	53
Şekil 4.2. Kayısı meyvesinde kuersetin tayini için elde edilen standart ekleme eğrileri.	54
Şekil 4.3. Kayısı meyvesinde kuersetin tayinine ilişkin HPLC-MS kromatogramı.	54
Şekil 4.4. Kayısı meyvesi çekirdeğinde kuersetin tayinine ilişkin HPLC-MS kromatogramı.	55
Şekil 4.5. Kayısı meyvesinde kuersetin optimum koşullar altındaki MS spekturumu ...	55

TABLolar LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1. Polifenollerin sınıflandırılması.....	4
Tablo 2.2. Kuersetinin genel özellikleri.	7
Tablo 2.3. Kayısı Meyvesinde Element ve Besin Değerleri.....	10
Tablo 2.4. Gaz ve Sıvı Kromatografilerinin Karşılaştırılması	15
Tablo 2.5. Moleküler kütle spektroskopide kullanılan iyon kaynakları	23
Tablo 2.6. Bir elektron impakt kaynağındaki bazı tipik reaksiyonlar	26
Tablo 2.7. Bazı LC/MS Ara Faz Sistemlerinin Karakteristikleri.....	32
Tablo 2.8. Moleküler Kütle Spektrometrinin Uygulamaları	33
Tablo 2.9. Literatürde bitki ekstraktlarında yapılan polifenol tayini çalışmaları.....	38
Tablo 3.1. MS parametreleri için uygulanan şartlar.....	41
Tablo 4.1. Kuersetinin optimum tayin koşulları.	52
Tablo 4.2. Kayısı meyvesi ve çekirdeği örneklerinde bulunan kuersetin konsantrasyonları.	56

KISALTMALAR

HPLC-MS: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi

GC-MS: Gaz Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi

HPLC: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

MS: Kütle Spektroskopisi

UV-Vis: Ultraviyole-Görünür bölge spektroskopisi

ppm: mg/kg, mg/L, µg/mL, µg/g

µg: Mikrogram

mg: Miligram

kg: Kilogram

t.s: Tayin sınırı

FAB: Sürekli Akışlı Hızlı Atom Bombardmanı Sistemi

APCI: Atmosferik Basınçta Kimyasal İyonlaştırma Sistemi

LOD: Gözlenebilme Sınırı

LOQ: Tayin sınırı

ACN: Asetonitril

Q: Kuersetin

mL: Mililitre

µm: Mikrometre

GLC: gaz-sıvı kromatografisi

LDL: Kötü huylu kolesterol

TLC: ince tabaka kromatografisi

1. GİRİŞ

Bitki kökenli gıdalar antimikrobiyal, antioksidan, antimutajen, antikanserojen, antidepresan vb. etkiye sahip birçok kimyasal maddenin doğal kaynaklarıdır. Bu maddelerden, polifenol grubunda yer alan özellikle flavonoidler, fenolik asitler, lignanlar ve stilbenler gibi bileşik alt grupları daha çok etkili oldukları belirtilmektedir [1, 2]. Flavonoidler, bir C₁₅ flavon iskelet yapısında olan iki fenil halkası ve bir heterosiklik halkadan oluşmuşlardır [3]. Flavonol, flavan-3-ol, flavonon ve antosiyanidinler ise flavonoidlerin alt grubunda yer almaktadırlar. Flavonoller ise kuersetin, miyrisetin, kamferol ve benzeri bileşikleri kapsamaktadır.

Kanser hastalarının için milyarlarca dolar harcama yapıldığı dikkate alındığında, kanseri önleyici ve tedavi edici maddelerin bulunmasıyla ilgili çalışmaların önemi daha iyi anlaşılmaktadır. Flavonoidlerin antioksidan özellikleri, hücrelere zarar veren radikallerle etkileşerek radikalleri zararsız hale getirmeleri şeklinde açıklanmıştır. Aynı zamanda flavonoidler, vücut içinde önemli olan enzimlerin aktivitelerini düzenleyerek kanserli hücrelerin çoğalmasını engellerler. Flavonoid grubu arasında kuersetinin antioksidan özelliği daha fazladır. Bu tür bileşiklerin doğru ve kesin olarak tayini ise ayrı bir öneme sahiptir. Bu amaçla, Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopisi (UV-Vis), Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC), Gaz Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi (GC-MS), Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi (HPLC-MS) kullanılmaktadır. Ancak bunlardan GC-MS ve HPLC-MS in hem duyarlılık hem de doğru tayin yönünden diğer metodlardan üstünlüğü vardır. Doğal örnekler milyonlarca organik bileşik içerebildiğinden kromatografik yöntemler kullanılarak bunların birbirinden ayrılmasıyla daha güvenilir sonuçlar elde edilebilmektedir. Literatürde bu konuda çalışmalar yapılmış ise de [1–11], daha çok meyve ve sebzelerin bu amaçla çalışılmasının yararlı olacağı açıktır.

Bu çalışmada, bölgemizde çok üretilip yurtdışına da ihraç edilen kayısı meyvesi ve kayısı meyvesi çekirdeğindeki kuersetin bileşiğinin tayini yapılmıştır. Tayin için örneklerdeki kuersetin; metanol, kloroform, hidroklorik asit, askorbik asit gibi farklı çözücülerle ekstrakte edilerek ölçüme hazırlanmış ve ölçüm için HPLC-MS kullanılmıştır.

Nicel analizden önce HPLC-MS için optimum parametreler belirlendi. Bu parametrelerden kuersetin için enjeksiyon hacmi 5 µL, kolon sıcaklığı 30 °C, fragmentör parametresi 140 V, akış hızı ise 0.6 mL/dk optimum değerler olarak bulundu.

Bitki örneklerinin eksatraksiyonu için metanol/1.2 M HCl/askorbik asit karışımı kullanıldı. Yukarıda verilen optimum şartlar uygulanarak kayısı meyvesi ve kayısı meyvesi çekirdeği ekstraktlarına uygulandı. HPLC-MS cihazı ile bu örneklerdeki kuersetin bileşiği analiz edildi.

Bulunan sonuçlardan, en düşük kuersetin konsantrasyonun tayin sınırından küçük ve en yüksek konsantrasyonun ise 12.9 ppm olduğu bulundu.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bitkilerde Bulunan Bazı Polifenoller ve Fonksiyonları

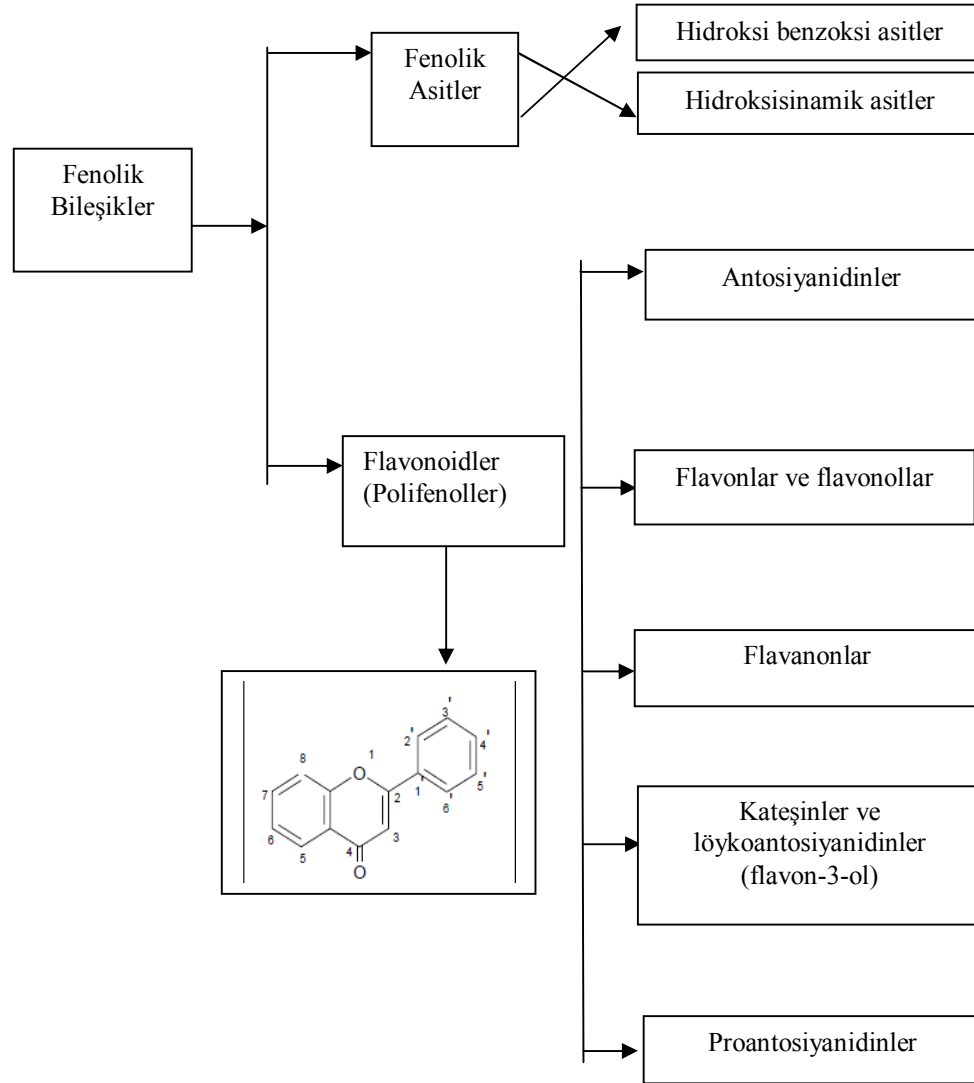
Polifenoller, yapılarında hidroksil veya karboksil grupları taşıyan halkalı organik yapılardır. Bitkilerde bulunan en önemli ve en kalabalık bileşenler olup günümüzde 8000' den fazla polifenol olduğu tespit edilmiştir. Bitkilerde özellikle de bitkisel çaylarda bol miktarda bulunan polifenoller biyolojik açıdan oldukça aktif yapılardır [12].

Polifenoller, antioksidan özelliklerinden dolayı serbest radikal oluşumunu engelleyerek kanser oluşumunda koruyucu rol oynarlar. Son derece aktif bileşikler olan serbest radikaller, denetim altına alınmazlarsa hücrenin yapısal ve fonksiyonel unsurlarıyla (membranlar, lipoproteinler, proteinler, kötü huylu kolesterol (LDL), karbohidratlar, DNA, RNA vb) reaksiyona girerek onları tahrip ederler.

Polifenollerin fizyolojik etkileri olumlu ya da olumsuz yönde olabilmektedir. Okside olmamış polifenoller, "**biyoflavonoidler**" olarak bilinmektedirler [13].

Biyoflavonoidlerin kılcal kan damarlarının dayanıklılığını arttırdığı üzerinde durulmuş ve bunlar "vitamin P" olarak tanımlanmıştır. Biyoflavonoidlerin radyoaktif Sr 90' ı uzaklaştırarak kemik iliğinde birikimini engellediği, dolayısıyla radyasyondan kaynaklanan lösemi de koruyucu olduğu bildirilmiştir [13]. Polifenollerin ayrıntılı olarak sınıflandırılmış hali Tablo 2.1' de verilmiştir.

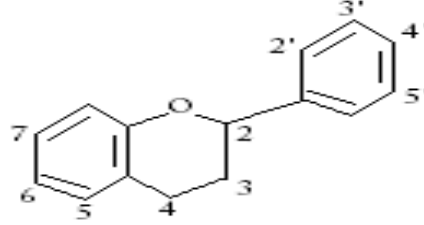
Tablo 2.1. Polifenollerin sınıflandırılması



2.2. Flavanoidler ve Özellikleri

Flavanoidler, özellikle bitkisel orijinli gıdalarda yaygın olarak bulunan bir C₁₅ flavon iskelet yapısında olan iki fenil halkası ve bir heterosiklik halkadan oluşan fenolik bileşiklerdir [6]. Bu 15 karbon atomu C₆–C₃–C₆ konfigürasyonunda düzenlenmiştir. Üç karbonlu propan zincirinin üçüncü bir halka oluşturması, farklı şekiller alması veya fenil gruplarının farklı pozisyonlarda bağlanması sonucu flavanoidlerin farklı sınıfları oluşur. Genellikle bu bileşikler sarı renkli bitkisel pigmentlerdir ve bitkilerde glikozitleri halinde bulunurlar. Flavanoidlerin HPLC ile tayini ilk kez 1976 yılında

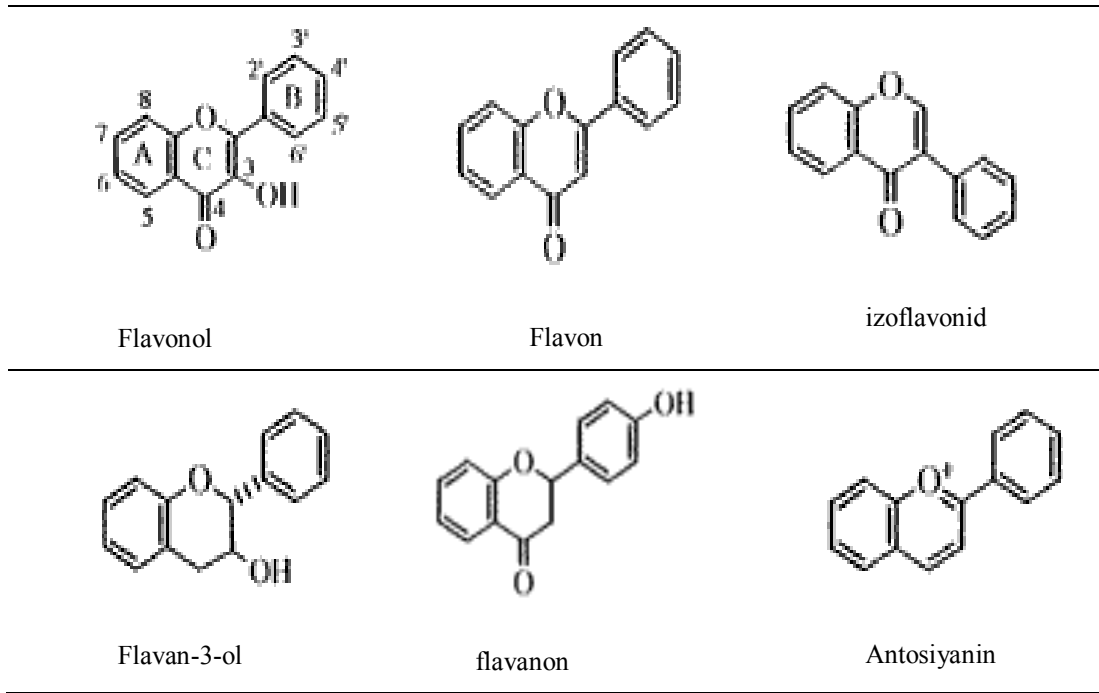
Fisher ve Wheaton tarafından yapılmıştır [14]. Şekil 2.1’ de bir flavonoidin genel yapısı verilmiştir.



Şekil 2.1. Bir flavonoidin genel yapısı.

Flavonoidler, antioksidan özellikleri ile hücelere zarar veren radikallerle etkileşerek radikalleri zararsız hale getirirler, antibiyotik etkisi göstererek virüs ve bakterilerin aktivitelerini engellerler. Bağışıklık sistemini güçlendirip C vitamininin 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 hücelerin çoğalmasını engellerler [1, 6, 14, 15].

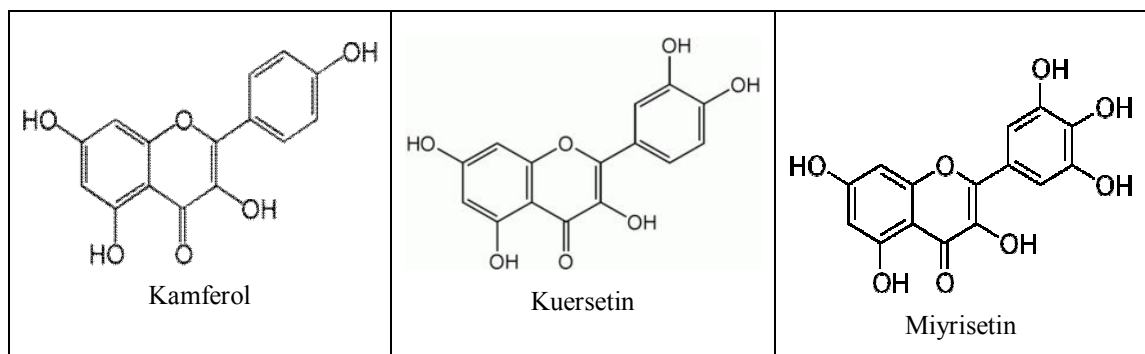
Holman ve arkadaşları flavonol ve flavonların günlük alımını 23 mg olarak rapor etmişlerdir [16]. Bununla birlikte Hollanda’ da kuersetin flavonolünün günlük kullanımının 16 mg olduğu rapor edilmiştir [16]. Ortalama yiyeceklerle flavonoid alımının 26 mg/gün [16] olduğu belirlenirken, baskın olarak bulunan flavonoidin kuersetin olduğu saptanmıştır [16, 17]. Şekil 2.2’ de bazı flavonoid bileşiklerin yapısı görülmektedir.



Şekil 2.2. Bazı flavonoid bileşikleri.

2.2.1. Flavonoller

Flavonoid alt sınıfından olan flavonoller 3-OH içeren flavonoidlerdir. Flavonollere örnek olarak kamferol, kuersetin, miyrisetin ve isorhamnetin gibi bileşikler verilebilir. Bazı flavonol bileşiklerinin molekül yapıları Şekil 2.3' te gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Bazı flavonol bileşiklerinin molekül yapıları.

2.2.1.1. Kuersetin

Kuersetin, flavonol grubundan olan, rutin ve kuersitrin glikozitlerinin aglikonlarını oluşturan, oldukça özel bir flavonoid bileşimidir. Kuersetin bileşiğinin genel özellikleri Tablo 2.2’ de görülmektedir. Kuersetin kapari, kayısı, elma, çay, soğan, özellikle kırmızı soğan, kırmızı üzüm, domates, brokoli ve diğer yeşil sebzeler, çilek türleri, meyve kabukları vb. bitkilerde bol miktarda bulunmaktadır [3, 7-11, 18-21]. Serbest radikalleri yakalama özelliğinden dolayı güçlü bir antioksidandır. Bu özelliğiyle kardiyovasküler (kalp ve damarlarla ilgili) hastalıklardan koruduğu bilinmektedir [18]. 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 yavaşlatığı bilinmektedir. [19]. Ayrıca, vitamin C gibi sitrat döngüsüne katılarak antioksidan özellik gösterir. Antikanser özellikte olup, akut semptomlar için de kullanılmaktadır. LDL kolesterol oksidasyonunu azaltarak kalp hastalıklarından koruyucu özelliği araştırılmaktadır [3, 7-11, 18-23].

Tablo 2.2. 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- 4 <i>H</i> - chromen- 4-one

2.3. Kayısı Meyvesi ve Tohumunun Özellikleri

Kayısı sert çekirdekli meyveler grubuna girmektedir. Meyve görünüş olarak sırt, karın, uç ve sap kısımlarından ve anatomik olarak en dış kısmında kabuk, meyve eti, çekirdek boşluğu ve çekirdekten oluşmuştur.

Kayısı (*Prunus armeniaca* L.) Rosales takımının Rosaceae familyasının Prunoideae alt familyasının *Prunus* cinsine girer. Dünyada kayısının 6 türü bulunmaktadır. Bu türlerden *Prunus armeniaca*'ya yakın türler ıslah açısından önemlidir. Bu türler; *Prunus brigiantica* (Briancon kayısı- Alperigi), *Prunus mume* (japon kayısı), *Prunus mandshurica* (Mançurya kayısı), *Prunus holosericea* (Tibet kayısı), *Prunus dasycarpa* (siyah ve mor kayısı) halinde çoğaltılan bir kültür tipidir. Kayısı meyvesi; açık sarıdan turuncu rengine kadar geniş bir renk varyasyonu (açık sarı, sarı, turuncu, koyu turuncu, kırmızı ve yeşil) sahiptir. Meyve oval, yuvarlak, eliptik, kalp veya oblang (sobü) şekilli olup 20-80 g civarındadır [24]. Şekil 2.4' de derim zamanı kayısı meyvesi görülmektedir.



Şekil 2.4. Derim zamanında kayısı meyvesi

2.3.1. Kayısı Meyvesi Türleri

Bilimsel araştırmalara göre kayısının anavatanı Orta Asya'dan Batı Çin'e doğru uzanmaktadır. Kayısı meyvesinin bilimsel adı *Prunus armeniaca* L. olarak geçmektedir. Dünyada yetiştiriciliği yapılan kayısı meyvesi türü *Prunus armeniaca* L.'nin, Çin'in dağlık alanlarında ortaya çıktığına inanılmaktadır. Yabani kayısı ağaçlarının meyvesi yendikten sonra ağızda acı bir tat bırakır. Çekirdek meyve etine yapışık ve sert haldedir. Meyve ağırlığı 25-60 g arasında değişmekte olup, nadiren 100 g'ın üzerine çıkmaktadır.

Prunus mume (Japon kayısı) çeşidi Orta Çin bölgesinde dağlık alanlarında bulunmuştur. Meyve yenilebilir durumda olmasına rağmen büyük bir çoğunluğu reçel veya konserve yapımında kullanılmayacak derecede asit içeriğine sahiptir. Meyve yuvarlak şekilde, meyve eti yeşil veya sarı renkte olup çekirdek meyve etine yapışık ve tatlıdır.

Prunus sibirica (Sibiry kayısı) L. türünün yetiştirildiği bölgeler; Baykal gölü, Kuzey Kore, Moğolistan dağlarından Kuzey Çin'e kadar uzanır. Bu tür kayısı meyvesi, yuvarlak şekilli, meyve eti sert dokuludur ve ekşi olarak çoğu yenilmez durumdadır.

Bugünlerde Dünyada 1750' nin üzerinde kayısı meyvesi çeşidi bulunmaktadır ve Türkiye, Dünya yaş ve kuru kayısı üretiminde birinci sırada yer almaktadır. Ülkemiz gerek kayısı meyvesi gen kaynakları ve gerekse ekolojik şartlar nedeniyle büyük bir potansiyele sahiptir. Ülkenin en önemli kayısı meyvesi üretim bölgesi Malatya'dır. Adını Hititler döneminde "Meyve Bahçesi" anlamına gelen "Melitue, Maldiya, Melita" kelimelerinden almıştır. Kayısı meyvesi üretilen diğer iller; Kayseri, Erzincan, Elazığ, İçel, Konya, Ankara, Sivas Nevşehir ve Kahramanmaraş'dır [24].

2.3.2. Kimyasal Bileşimi

İnsan sağlığı bakımından önemli bir yere sahip olan kayısı meyvesi diğer meyveler gibi günlük enerji ve protein gereksinmesine çok az katkıda bulunur. Yapısının büyük bir kısmı sudan oluşan kayısı meyvesinin karakteristik aromasını; miyrisetin, kuersetin, limonin, terpinolin, trans-2- hexanal, linalul, kaproik asit, laktonlar ve benzil alkol gibi gibi uçucu bileşikler oluşturmaktadır. Meyveler olgunlaştıkça asit miktarı azalmakta, şeker miktarı artmaktadır. Kayısıda meyvesinde glukoz, fruktoz gibi kolayca metabolize edilen şekerlerle, pentozlar ve pektinler başlıca karbonhidrat bileşikleridir. Meyvelerin protein içeriklerinin % 60 kadarı serbest aminoasit halindedir. Özellikle gerekli aminoasitlerden lizin, lösin aminoasitleri bulunmaktadır [24-27]. Bunun yanında bol miktarda A, C, E vitamini ve fenolik maddeler bakımından oldukça zengindir. Önemli bir A vitamini ve beta karoten kaynağı olarak bilinmektedir. Kayısı meyvesinin ilk çağlara (yeşil, olgunlaşmamış kayısı) dönemlerinde yüksek bir oranda bulunan C vitamini ise olgunlaşma ile azalmaktadır. Kayısı yaş meyve iken %85 su ihtiva etmektedir. Kurutulduğu zaman su oranı % 20-25 seviyesine inmektedir. Yaş meyvedeki şeker oranı 11-12 g/100g meyve, ham selüloz 1.2 g/100 g, potasyum 290 mg

/100g, vitamin A 2616 IU/ 100g, sodyum 1.3 mg/ 100g bulunur. Kuru kayısı meyvesi şeker 61 g/100g, ham selüloz 2.95 g /100 g, potasyum 1000 mg / 100g, 10000 IU Vitamin A, sodyum 20 mg/100 g içermektedir. Ağırlığında suda çözünebilir kuru madde miktarı (SÇKM) % 10-28 oranında, pH 3-5, asitlik % 0. 20 - % 1. 5 arasında değişmektedir [24, 28].

Yücecan (1994) ve Açkurt (1998) tarafından kayısı örneklerindeki element ve besin değerlerinin düzeyleri özetlenmiş ve içerikleri Tablo 2.3’ de verilmiştir [29, 30].

Tablo 2.3. Kayısı Meyvesinde Element ve Besin Değerleri (100 g taze kayısı meyvesinde)

	Besinler	Yaş kayısı
	Su (%)	84.33±1.56
Ana bileşenler	Enerji(kcal)	61.14±10.30
	Protein (g)	0.78±0.16
	Yağ (g)	0.38±0.14
	Karbonhidrat(g)	14.9±2.23
	Posa (g)	0.65±0.20
	Kül (g)	0.70±0.075
	Selüloz (g)	1.28±0.14
	Total asitlik (g)	0.47±0.06
Mineraller	Demir (mg)	0.68±0.036
	Bakır (mg)	0.35±0.046
	Çinko(mg)	0.31±0.08
	Kalsiyum(mg)	12.5±3.0
	Magnezyum(mg)	9.80±1.20
	Potasyum(mg)	267±32
	Sodyum(mg)	1.60±0.15
	Fosfor(mg)	24±3.60
Vitaminler	B- Karoten(IU)	2600±110
	B1 Vitamini(mg)	0.03±0.002
	B2 vitamini(mg)	0.04±0.003
	B3 vitamini(mg)	0.58±0.16
	C vitamini(mg)	8.40 ±3.30

Ayrıca sağlıklı beslenmede büyük önem taşıyan kuru kayısı meyvesinin selüloz yönünden de zengin bir besin olduğu belirlenmiştir. B grubu vitaminlerinin düşük düzeylerde içeren kuru kayısı meyvesi önemli bir β-karoten kaynağıdır. Kuru kayısı meyvesinin mineral madde bileşiminin ise çok zengin olduğu dikkat çekmiştir. Düşük sodyum düzeyine karşın yüksek oranlarda potasyum içermektedir. Bu özelliğiyle kuru kayısı meyvesi sağlıklı beslenmede önemli yer tutmaktadır. Ayrıca demir düzeyi 0.55 mg/100g, bakır düzeyi 0.52 mg/100g, çinko düzeyi 0.61 mg/100g, kalsiyum ve magnezyum düzeyleri sırasıyla 13.0 ve 10.08 mg/100g bulunmuştur [25, 31, 32, 33]. Gıdalarda ve özellikle de kayısı meyvesinde bol miktarda bulunan ve antioksidatif etkisi nedeniyle yoğun araştırmalara konu olan karotenoidler ve antosiyaninler, kimyasal

olarak doğal pigment gruplarındandır. Bu gruptan β -karotenin antioksidan özelliğinin yanı sıra, yüksek provitamin A aktivitesi ve sarıdan kırmızıya kadar renklendirici özelliği nedeniyle, gıda endüstrisindeki önemi giderek artmaktadır [34, 35, 36, 37].

Kayısı meyvesinde yüksek miktarda potasyum ve düşük sodyum oranı olması sebebi ile kan basıncının düzenlenmesi, yüksek tansiyonun kontrolünde önemlidir. Potasyumun ayrıca sinir sisteminin normal gelişmesi, kalp atışlarının düzenli olması vücudun elektrolit dengesi, beyin hücrelerinin sağlığı ve kas dokusu için gerekli olması bazı özel diyetlerin düzenlenmesinde yardımcı olabilir. Kayısı meyvesi, sodyumu kısıtlanmış diyetlerde, örneğin konjestif kalp yetmezliğinde, böbrek hastalıklarında, asit toplanması gösteren hepatit sirozda, hamilelik toksemisinde ve uzun süre kortikosteroit tedavisi gören kişilerde kolaylıkla kullanılabilir. Bunun yanında böbrek bozukluğunda, diyabetik asidoziz, yanıklar, diüretikler ve steroid gibi ilaçlarla tedavi sırasında görülen potasyum yetersizliği durumlarında ise diyetle potasyumca zengin olan kayısı arttırılabilir [33,38]. Kayısı meyvesi çok farklı miktarda fenolik bileşikler de içerir. Bunlardan en yoğunluklu olarak hidrosinnamik asitler (kafeik asit, ferulik asit, p-coumarik asit ve diğer esterler) bulunur. Kayısı meyvesinde klorogenik asit ise baskın olan türler arasındadır. Neoklorogenik asit, kateşin ve epikateşin de yoğun bir şekilde bulunan diğer fenolik bileşiklerdir. Kayısı meyvesinde bulunan flavanoller ise glikozitleri halinde bulunurlar. Bunlara örnek olarak kamferol ve kuersetin baskın olan türlerdendir [39, 40]. Bazı kayısı meyvesi çeşitlerinde ise aeskuletin, kumarin ve skopoletin de düşük miktarlarda da olsa olduğu belirlenmiştir [41].

2.4. Kuersetinin Ekstraksiyonu ve Tayini

Kuersetini de içeren fenolik bileşikler bitkisel orijinli gıdalardan çeşitli çözücü/çözücü karışımları kullanılarak katı-sıvı ekstraksiyonu ile ekstre edilmektedir. Ancak fenolik bileşiklerin gıdalarda basit fenollerden yüksek polimerizasyon derecesine sahip bileşiklere kadar çok değişik kimyasal yapıda olmalarından dolayı, fenolik bileşiklerin tüm sınıflarını veya sadece bir spesifik sınıfı ekstre edebilecek yeterli bir yöntem bulunmamaktadır. Bu nedenle elde edilen ekstreleri saflaştırmak ve fenolik olmayan bileşiklerden ayırmak için ilave bir basamağa ihtiyaç vardır [42]. Ancak genel olarak fenolik bileşikler özellikle etilalkol, metilalkol, aseton ve etilasetatın kullanıldığı organik çözücüler ve bu çözücülerin sulu karışımları ile ekstre edilmektedir [42].

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

Kesikli ekstraksiyon türünde katı bir örnek ve organik bir çözücü deney balonunda mekanik çalkalayıcı ile belirli bir süre karıştırılır. Denge kurulduktan sonra iki faz ayrılmaya bırakılıp, daha sonra süzülerek fazlar birbirinden ayrılır. Çözücünün fazlası buharlaştırılır. Gerekirse istenmeyen türler başka bir reaktif ilavesiyle ortamdan uzaklaştırılabilir.

Ekstraksiyon hızı küçük partikül boyutunda artmaktadır. Ortalama partikül boyutunun 0.01-0.1 mm arasında olması genellikle ekstraksiyon hızını artırmaktadır [42].

Sıcaklığın artması çözücü viskozitesini düşüreğinden, çözücünün bitkisel materyale difüzyon hızını ve fenolik bileşenin çözünürlüğünü artırmaktadır. Ancak 80-100 °C' nin üzerindeki sıcaklıklarda polifenollerin yapılarını değiştirebileceği bildirilmiştir [42].

Ekstraksiyon süresi polifenol geri kazanımını etkileyen diğer bir faktördür. Ekstraksiyon süresi 1 dakikadan 24 saate kadar değişmektedir [42]. Uzun süreli ekstraksiyon çözücü sistemine koruyucu koyulmadığında, fenoliklerin oksitlenme olasılığını artırmaktadır. Polifenollerin gıda ürünlerinden geri kazanımı ayrıca örneğin çözücüye oranından da etkilenmektedir. Örneğin kanoladan kondanse tanenlerin % 70 aseton ile ekstraksiyonunda, katı: sıvı oranı 1:5' den 1:10 arttığında, kondanse tanenin 257.3' den 321.3 mg/100 g madde' ye ve toplam fenolün 773.5' den 805.8 mg/100 g madde' ye arttığı bulunmuştur [42].

Organik yapılar için örnek hazırlama işleminin temelini ekstraksiyon basamağı oluşturur. Çözünebilen organik yapılar dikkate alındığında bu yapılar genellikle su, metanol, etanol ve aseton ile ekstrakte edilirler. Yapılarında bağlı şeker olması durumunda bu yapılar suda ve sulu çözgenlerde daha fazla çözünmektedirler. Öte yandan daha az polar olan yapılar (izoflavonlar, flavanonlar, metoksilenmiş flavonlar, flavanoidler) susuz çözgenlerde daha iyi çözünürler.

Bitkisel örneklerdeki polifenollerin toplam miktarının tayini yapılmak isteniyorsa spektrofotometrik bir teknik olan Folin-Ciocalteu yöntemi (UV-VIS analiz tekniği), her bir polifenolün ayrı ayrı tayini yapılmak isteniyorsa kromatografik yöntemlerden yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), ince tabaka kromatografisi (TLC), gaz-sıvı kromatografisi (GLC) veya elektroforez teknikleri kullanılmaktadır.

Bitkisel örneklerdeki polifenol ve vitaminlerin tayininde en fazla kullanılan teknik yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)' dir. Bu tekniğin tercih edilmesinin başlıca nedenleri, duyarlılığı, kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, uçucu olmayan veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen bileşiklerin ayrılmasına uygunluğudur. HPLC'nin başlıca kullanım alanları:

- Organik, inorganik ve biyolojik bileşenler, polimerler, kiral bileşenler, küçük iyonlar ve makromoleküllerin ayrılması,
- Safsızlık tayini,
- Buharlaştırabilen ve buharlaşmayan yapıların tayini,
- Nötral, iyonik ve çift iyonik türlerin tayini,
- Bileşen izolasyonu ve saflaştırılması,

HPLC'nin yaygın uygulamaları ise;

- Fizyolojik örneklerdeki bazı aminoasit, nükleik asit ve protein miktarlarının tayini,
- İlaç aktif maddelerinin, sentetik biyoürünlerin yada farmasötik ilaçlardaki bozunma ürünlerinin tayini,
- Pestisit ve insektisit ve diğer çevresel örneklerin tayini,
- Karışımlardaki bileşenlerin ayrılması,
- Kalite kontrolü,
- Bir karışımdaki polimerlerin moleküler ağırlık dağılımının belirlenmesidir.

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi tekniğinin düzgün bir şekilde uygulanabilmesi için çalışma koşulları ve parametreleri (kolon dolgu maddesi, kolon boyu ve iç çapı, kolon sıcaklığı ve hareketli fazın akış oranı gibi) oldukça iyi ayarlanmalı ayrıca enjeksiyonun yapılabilmesi için örnekler mutlaka sıvı olmalıdır. Katı örnekler ise durgun ve hareketli faza uyumlu olan bir çözgenle çözüldükten sonra ya da ekstraksiyon işlemi yapıldıktan sonra enjekte edilebilmektedir. Enjeksiyon hacmi ise analit için kullanılan dinamik dedektör aralığına ve duyarlılığına bağlı olarak 1-100 µL arasındadır. Bu teknikte analiz süresi genellikle 5 ile 120 dakika arasında değişmektedir.

Ekstraksiyon solventi olarak yaygın olarak kullanılan solventler; su, etanol, metanol ve bunların sulu çözeltileridir. Söz konusu solventlerin polariteleri farklı olduğundan polaritelerine uygun fenolik bileşikleri ekstrakte edebilmektedir. Diğer taraftan ekstraksiyon sıcaklık ve süresine bağlı olarak fenolik bileşiklerde parçalanmalar meydana gelebilmektedir. Bunların yanı sıra farklı solvent-materyal oranlarının

uygulandığı dikkate alındığında analiz edilen aynı bitki örneğinde farklı sonuçların alınmasına yol açmaktadır ve sonuçlar arasında bir kıyaslama yapılabilmesini neredeyse olanaksız hale getirmektedir. Bu nedenle uygun ekstraksiyon koşullarının seçimi önem kazanmaktadır.

2.5. ANALİZ YÖNTEMLERİ

2.5.1. 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 dağılma 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 2.5-2.6’ da 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 [43]. 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 2.4’ de gaz ve sıvı kromatografi yöntemlerinin genel bir karşılaştırması yapılmıştır.

Sıvı kromatografideki büyük gelişme her şeyden önce sabit faz olarak bilinen çok küçük tanecik çaplı dolgu maddelerinin 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 edilsede, genellikle gaz ve sıvı kromatografilerinin birbirlerinin rakibi değil, birbirlerinin tamamlayıcısı olduğu kabul edilmektedir [44].

Tablo 2.4. Gaz ve Sıvı Kromatografilerinin Karşılaştırılması [44].

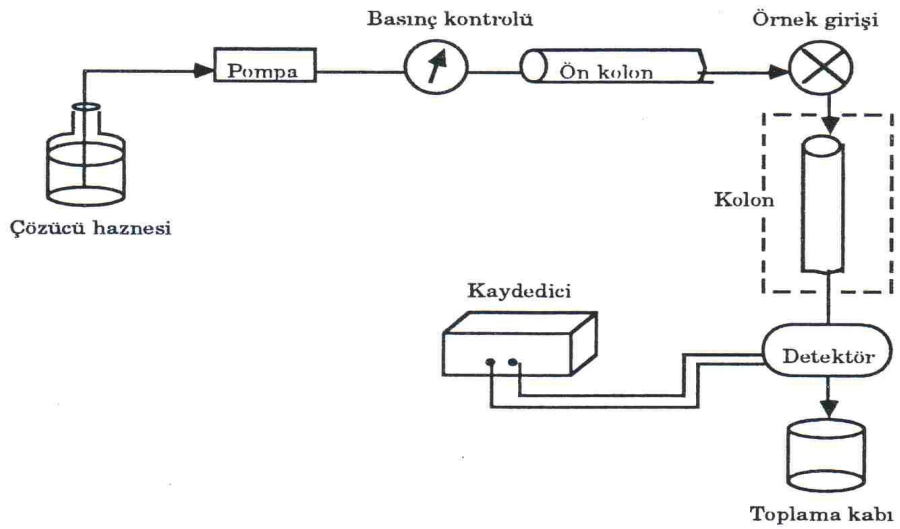
Faktör	Gaz Kromatografisi	Sıvı Kromatografisi
Prensip	Örnek sıvıya dayanıklı,	Örnek uygun bir sıvıda buharlaşabilir.
Örnek türü	Gazlar, sıvılar, katılar	Sıvı ve katılar, iyonlar
molekül ağırlık<500		
Hareketli faz	H ₂ , He, N ₂ ile sınırlı	Tüm organik ve inorg. Sıvılar
Sabit faz	Sınırlı sayıda	Bağlı 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

2.5.1.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Cihazı

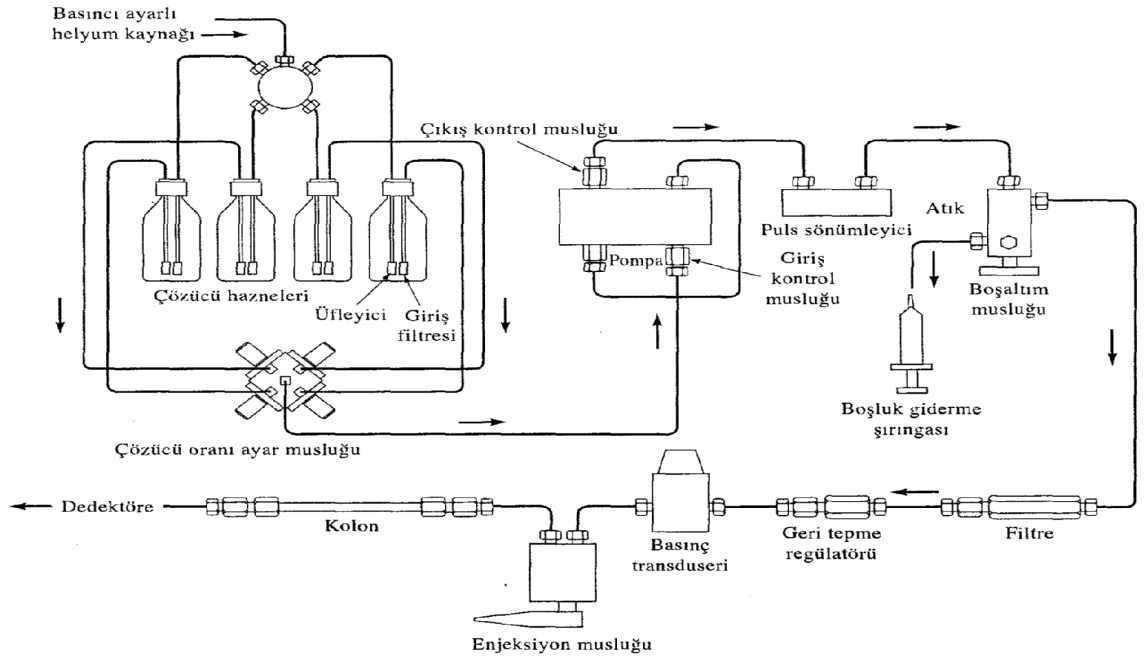
Bir HPLC cihazı her biri 200–1000 mL çözücü içerebilen camdan veya çelikten yapılmış hazne içermektedir. Bazı cihazlarda bu hazneler kolonda ve dedektör sisteminde gaz oluşturarak bozucu etkilere sebep olan çözünmüş gazların (genellikle oksijen ve azot) giderilmesi için bir cihazla donatılmıştır. Bu 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 2.5). 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 hazneden aldığı çözücülerini bir karıştırma odasında sürekli olarak değişen hızlarda bir araya getiren sistemlerle donatılmıştır.



Şekil 2.5. Bir HPLC cihazı şeması [44].



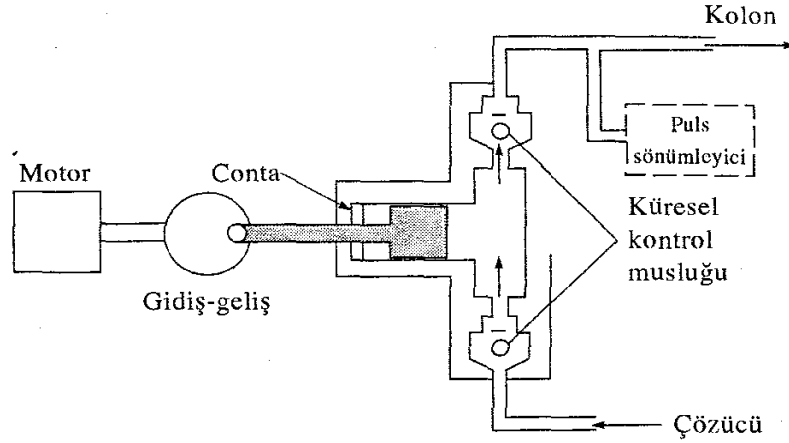
Şekil 2.6. Gradient elüsyon uyumlu bir HPLC cihazının şeması [45].

2.5.1.2. 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 bağlı tekrarlanabilirlikle akış kontrolü, korozyona dayanıklı parçaları içermelidir.

Sıvılar çok fazla sıkıştırılmadığından dolayı HPLC pompaları tarafından üretilen basınç bir patlama tehlikesi oluşturmadığından 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 2.7). Sırasıyla açılıp kapanan iki tane küresel kontrol musluğu, çözücünün silindir içine giriş ve çıkış akışını kontrol eder. Piston çözücü ile doğrudan temas etmektedir.



Şekil 2.7. HPLC için bir pistonlu pompa [45].

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. 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.

2.5.1.3. Numune 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.

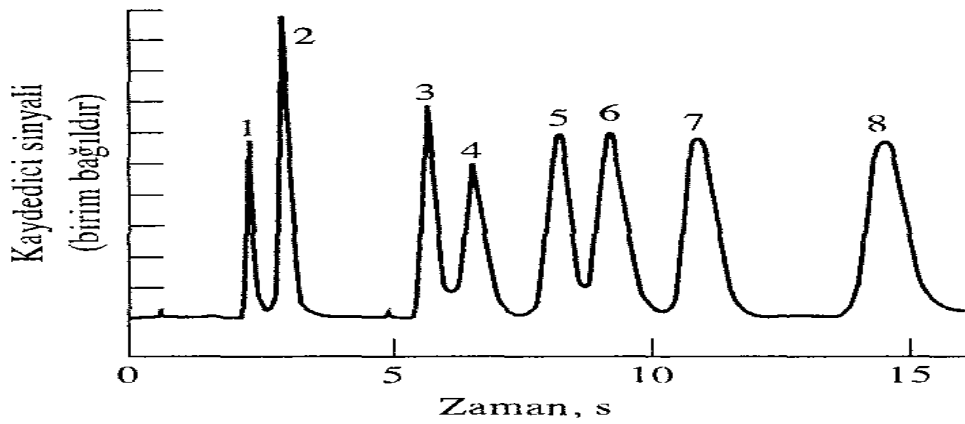
2.5.1.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Kolonları

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 sarfıyatı 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 2.8. 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) dietil ftalat [45].

2.5.1.5. 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.

2.5.1.6. 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.)

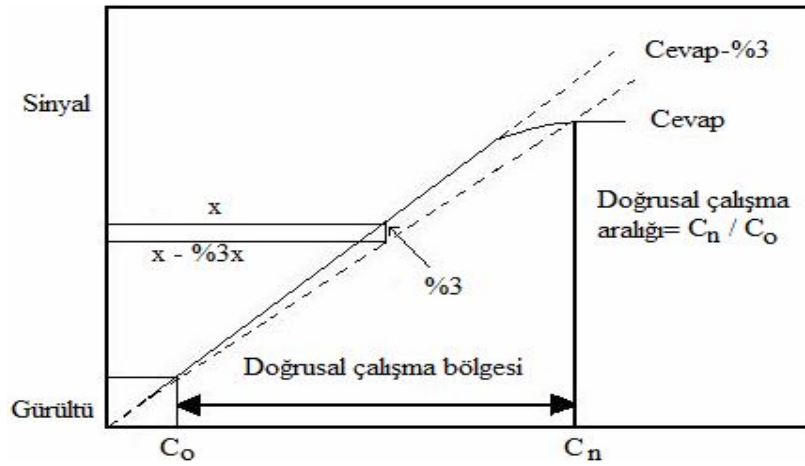
Bu parametrelerden bazıları:

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

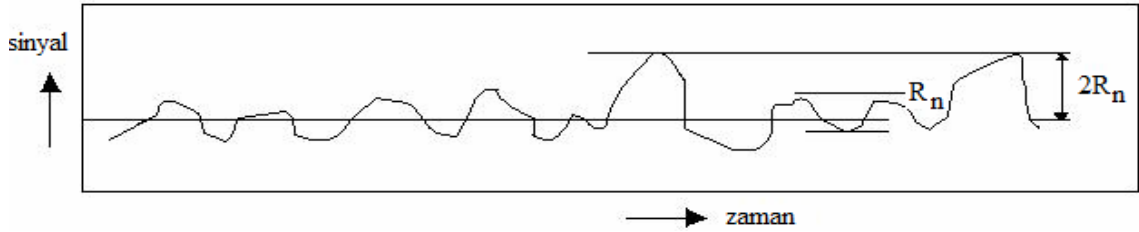
Duyarlık: Madde miktarına karşı dedektörün verdiği sinyalin çizilmesi ile elde edilen **kalibrasyon (çalışma)** eğrisinin eğimi duyarlık olarak tanımlanır. Bir başka

ifadeyle madde miktarındaki değişimin dedektör sinyalinde sebep olduğu değişim demektir (Şekil 2.9).

Tayin Sınırı: Kalibrasyon eğrisinin en alttaki konsantrasyon değeri aynı zamanda en tayin sınırıdır. Ancak bu alt sınırın belirlenmesi dedektörün elektronik gürültüsüne bağlıdır (Şekil 2.10). 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.



Şekil 2.9. Duyarlılık, en düşük tayin sınırı, doğrusal çalışma bölgesi.



Şekil 2.10. Gürültü ve en düşük tayin sınırı.

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 2.9).

HPLC de dedektör olarak UV, DAD, floresans ve kütle spektrometresi dedektörler kullanılmaktadır.

2.5.2. HPLC Dedektörü Olarak 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 [43].

2.5.2.1. Moleküler Kütle Spektrometride İyon Kaynakları

Moleküler kütle spektrometride iyon kaynakları iki bölüme ayrılır (Tablo 2.5):

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 2.5. Moleküler kütle spektroskopide kullanılan iyon kaynakları [45].

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

2.5.2.1.1. Gaz Fazı İyon Kaynakları

2.5.2.1.1.1. Elektron İmpakt Kaynağı

Bu yöntemde, örnek yeterince buharlaşabilecek bir sıcaklığa getirilir ve enerjik elektronlarla bombardıman edilerek iyonlaştırılır. Şekil 2.11' de bir elektron impakt kaynağının yapısı görülmektedir. Elektron impakt kaynağındaki bazı tipik reaksiyonlar Tablo 2.6' da görülmektedir.

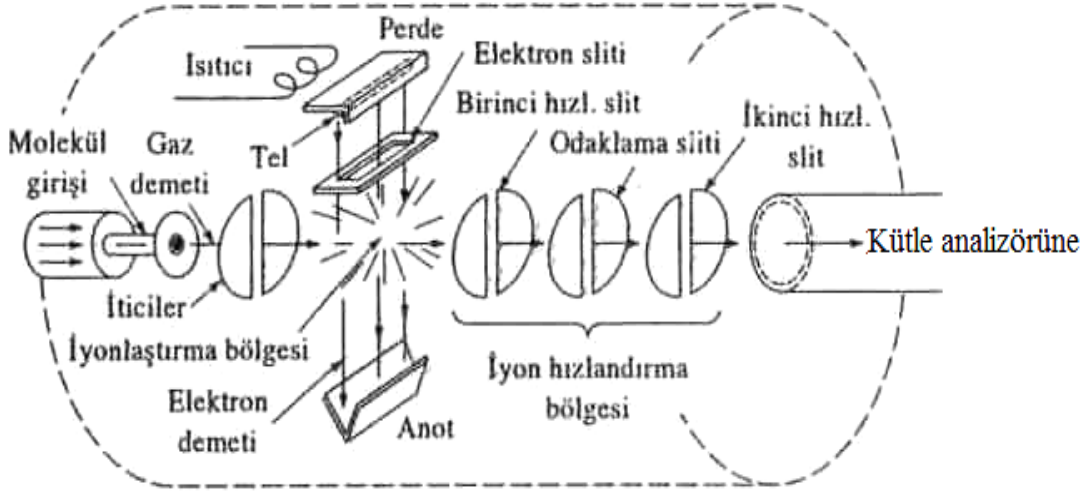
Bu yöntemde;

➤ 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.

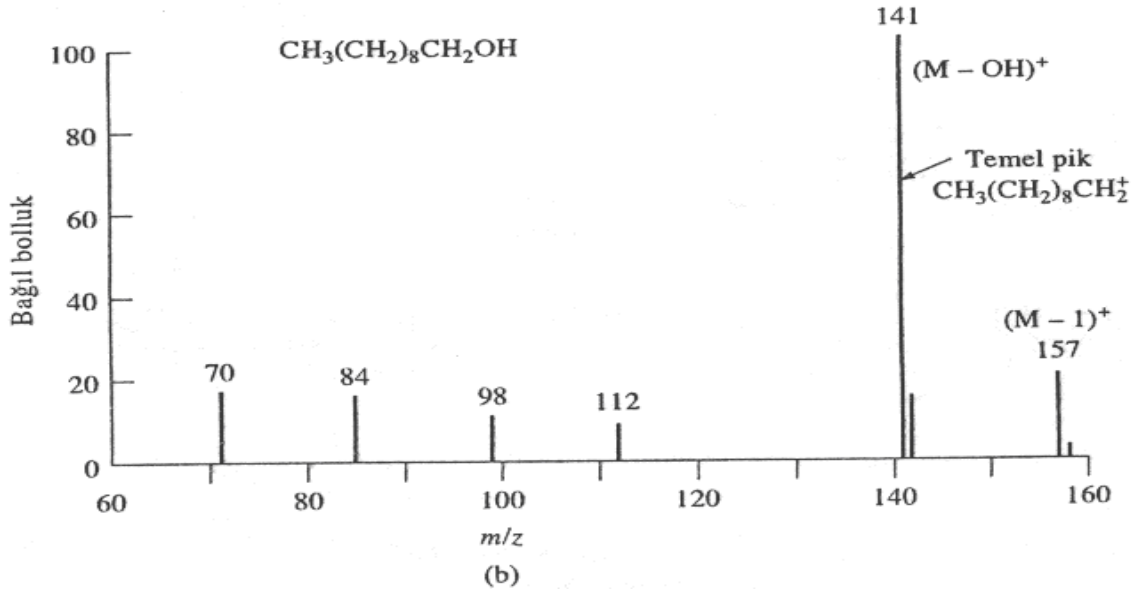
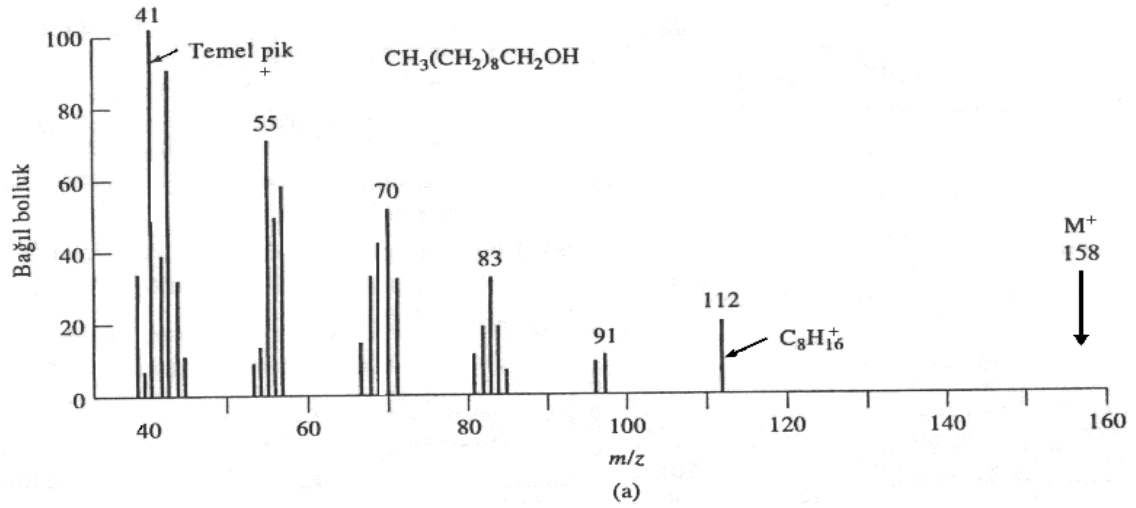
➤ Elektron impakt kaynakları yüksek iyon akımı üretmek için uygundur ve bu nedenle duyarlılıkları iyidir.

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



Şekil 2.11. Elektron-impakt kaynağının yapısı [45].

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 kütlesinden 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 hallerine 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 2.12’ 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.

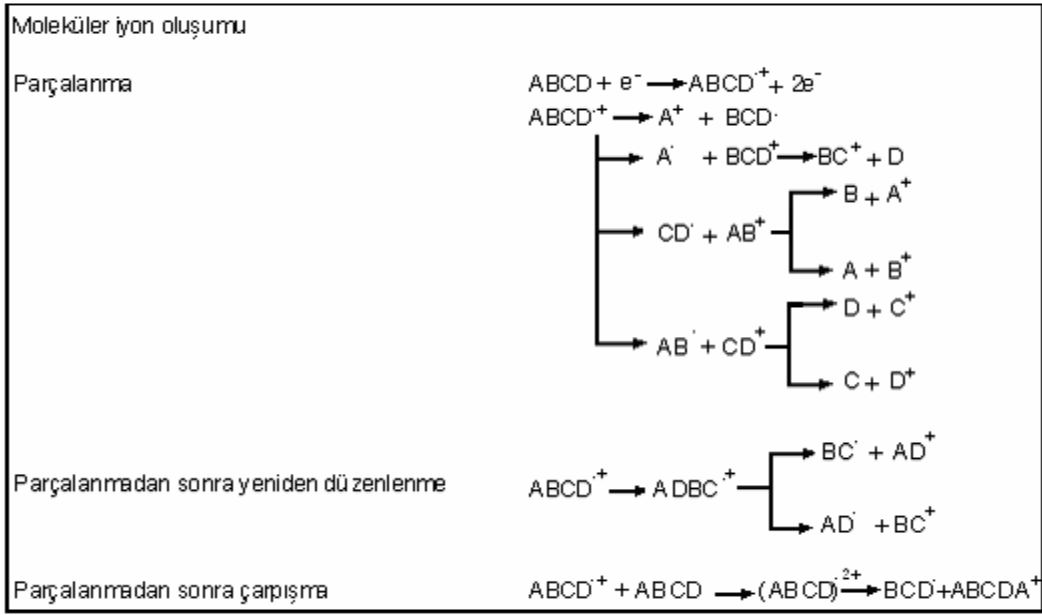


Şekil 2.12. Dekanol'un (a) sert bir kaynakla ve (b) yumuşak bir kaynakla alınmış kütle spektrumları [45].

2.5.2.1.1.2 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 2.6. Bir elektron impakt kaynağındaki bazı tipik reaksiyonlar [45].



2.5.2.2. Kütle Ayırıcıları

Kütle spektrometresinde iyonlaşma bölgesinde elde edilen iyonlar, elektrik yükü 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,

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

gibi bir bağıntı 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

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

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

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

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 2.13).

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 ayrıca sabit bir gerilim uygulayarak önlenir.

Bir kütle ayırıcısının ayırıcılığı, R ,

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

eşitliğindeki formül ile hesaplanır.

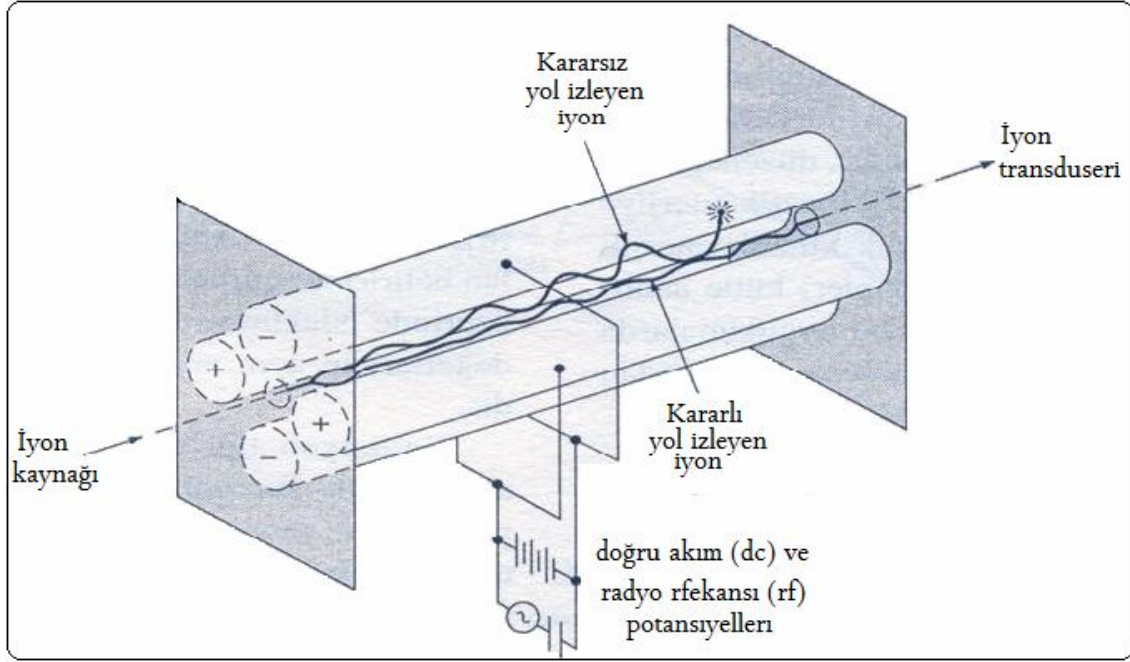
Ayırıcılığı 3000 olan bir ayırıcı, kütlesi 3000 ile 3001 olan iki iyonu pik yüksekliklerinin en çok yüzde 10' u kadar birçok çakışma ile birbirinden ayırıyor demektir.

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 plaklarda oluşan kararma miktarını nicel anlamda ölçmek her zaman hata getiren bir işlemdir.

İyon siklotron rezonans uyarıcısı 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.

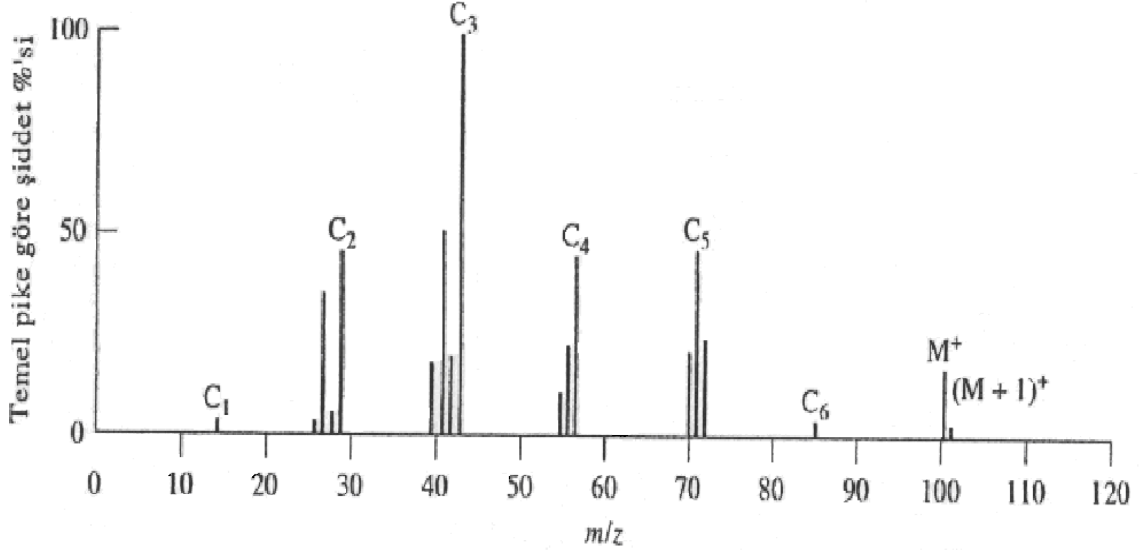


Şekil 2.13. Dört kutuplu (Kuadropol) bir kütle ayırıcısı.

2.5.2.3. 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 2.14' deki 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 2.14. n-Heptanal'in elektron impakt spektrumu. Pikler C₆, C₅, ... C₁'e kadar, CH₂ eksilmeleriyle meydana gelen iyonların pikleridir [45].

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 halkalı), 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 süstituent 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 $C_nH_{2n-1}O_2$ ' 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.

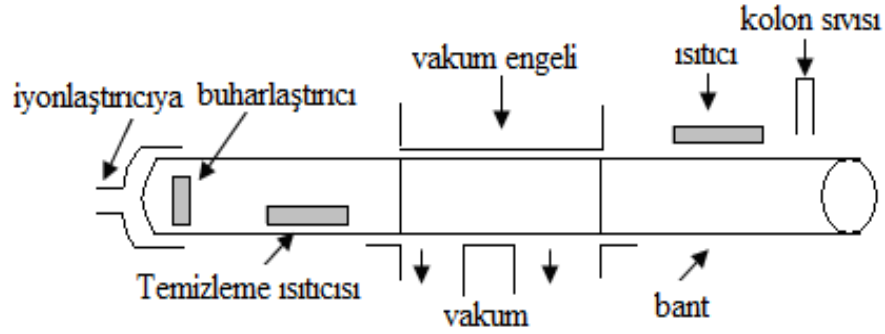
Ayrıca referans bileşiklerin kütle spektrumları varsa, bilinmeyen maddenin kütle spektrumunu, referans maddelerin kütle spektrumları ile karşılaştırılması ile madde tanımlanabilir. Farkı bileşiklerin aynı spektrumu verme olasılığı, spektral pik sayısı arttıkça belirgin şekilde azalır.

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 (Şekil 2.15) aşağıdaki sistemler kullanılmaktadır:

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



Şekil 2.15. LC/MS hareketli bant ara faz sistemi [44].

Tablo 2.7’ de bazı LC/MS ara faz sistemlerinin 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 170⁰C olan maddelere uygulanabilmektedir. Ayrıca hareketli faz sistemi kompleks bir teknik sisteme sahiptir ve kullanılması zordur.

Tablo 2.7. Bazı LC/MS Ara Faz Sistemlerinin Karakteristikleri [44].

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.

2.5.2.4. Moleküler Kütle Spektrometrinin Uygulamaları

Moleküler kütle spektrometrinin uygulamaları çok geniş ve kapsamlıdır. Tablo 2.8’ de, kütle spektrometrinin bu geniş kullanım alanına fikir vermek üzere, bu uygulamalardan bazıları listelenmiştir. Uygulamalardan en çok rastlananlardan bazı önemli olanları verilmiştir.

Tablo 2.8. Moleküler Kütle Spektrometrinin Uygulamaları [44].

- | |
|---|
| <ol style="list-style-type: none">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. |
|---|

2.5.3. Literatürde bitki örneklerinde Kuersetin tayini ile İlgili Yapılan Bazı Çalışmalar

Chapman ve ark. (1991), Fernandez ve ark. (1992), Bowen ve ark, (1997)’nın yapmış olduğu bütün çalışmalarda, bazı yeşil, yarı olgun ve tam olgun meyvelerde yapılan fenolik madde analizleri sonucunda yeşil meyvelerin fenolik madde içeriğinin olgunlaşmaya doğru gidildikçe azaldığı belirlenmiştir [46, 47, 48].

Sharaf, (1989), Uzelag ve ark. (2005), (2007)’nın yapmış olduğu çalışmalarda, kayısı ve elma meyvelerindeki polifenol ve karotenlerin tayini ters fazlı HPLC ile yapılmıştır. Meyve ve çiçeklerde sarıdan kırmızıya doğru bir renk oluşturan karotenoid’lerin önemli bir pigment olduğu ve meyvelerin olgunlaşmaları esnasında polifenoller ve karotenoidlerin, kolayca buharlaşan türün oluşmasında öncülük eden çok

sayıda kompleks biyokimyasal reaksiyonlar içerdği ifade edilmiştir. Meyvedeki bu bileşenlerin tayin edilen miktarlarındaki farklılıklar, güneş ışığı, toprak, meyvenin toplanma sezonu, meyve türü ve olgunluk evreleri gibi farklı parametrelere bağlı olarak oldukça değişmektedir. Örneğin kayısı meyvesinin olgunlaşması evresinde çözünabilir ve çözünmeyen proteinlerin azaldığı kaydedilmiştir. Toplam ve çözünabilir karbonhidratların miktarlarında artış gözlenirken, serbest aminoasitlerin ise olgunlaşma evrelerine göre farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir [49, 50].

Arts (2000), Uzelag (2005), Sturn' nın (1999) yapmış olduğu çalışmalarda, kayısı meyvesi çok farklı miktarda bulunan fenolik bileşiklerinin içeriği HPLC ile analizlenmiştir. Bunlardan en yoğunluklu olarak hidrosinamik asitler (kafeik asit, ferulik asit, p-kumarik asit ve diğer esterler) olduğu ifade edilmiştir. Klorogenik asit, neoklorogenik asit, kateşin ve epikateşinin de bulunduğu diğer fenolik bileşikler olduğu belirlenmiştir. Kayısı meyvesinde bulunan flavanollerin ise glikozitleri halinde bulunduğu ve bunlara örnek olarak kamferol ve kuersetin baskın olan türler olduğu ifade edilmiştir. Yapılan çalışmalarda meyvelerin olgunlaşma süreleri boyunca toplanan örneklerdeki polifenollerini analizlenmiş ve analizlerde olgunlaşma süresi boyunca fenolik madde miktarında düşüş olduğu gözlenmiştir [51, 52, 53].

Bonaccorsi ve arkadaşları (2008) Allium (soğangiller familyası) türlerindeki (dört çeşit kuru soğan, 2 çeşit yeşil soğan ve sarımsak) flavonol glikozidlerini (kuersetin 3, 4 o-glukozit ve kuersetin 40-glukozit) HPLC–DAD–ESI–MS–MS ile karşılaştırmalı olarak çalışmışlardır. Soğan türlerinden beyaz soğanda flavonol içeriğini 7.0 ppm diğer türde ise 600-700 ppm gibi farklı değerler bulmuşlardır. Ayrıca örneklerin 1.0 g/kg' ında kuersetin 3, 4 o-glukozit ve kuersetin 40-glukozit oranlarını da 10:1 olarak bulmuşlardır [18].

Hakkinen ve arkadaşları (2000) 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 [7].

Hakkinen ve arkadaşları (1998) 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 [9].

Sultana ve arkadaşları (2008) 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 [11].

Zhanga ve arkadaşları (2005) *Adinandra nitidanın* 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 [10].

Ulla ve arkadaşları (1998) 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 [21].

Karakaya ve El (1999) 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 ppm olarak bulmuşlar. Tarhana ve ısırgan otunda kuersetin içeriği sırasıyla 5.92 ve 0.87 mg/100 g olarak bulmuşlar [16].

Vukics ve arkadaşları (2008) *Viola tricolor* L.' de ki flavonoid glikozitlerinin sıvı kromatografisi-çift kütle spektrometresi ile analizini yapmışlar. *Viola tricolor*' un metanollü ekstraktlarında flavonol o-glikozit, 9 flavon-C, glikozit ve 3-flavon c,o-glikoziti karakterize etmişler. Ayrıca altı aglikonun, apigenin, chrysoeriol, isorhamnetin, kamferol, luteolin ve kuersetini bulmuşlar [54].

Riberio ve arkadaşları (2008) Brezilya mango türlerinin fenolik bileşiklerinin içeriğini ve antioksidan kapasitelerini LC-ESI-MS cihazıyla analiz etmişler [55].

Lacopini ve arkadaşları (2008) kırmızı üzümde kateşin, epikateşin, kuersetin, rutin ve resveratrol içeriğini HPLC-UV ile analiz edip, bunların hücre içerisindeki (in vitro) antioksidan aktivitelerini ve etkileşimlerini incelemişler [56].

Özyürek ve arkadaşları (2009) modifiye edilmiş CUPRAC yöntemiyle fenolikler ve flavonoidlerin ksantin oksidazın inhibasyon aktivitesini UV-görünür bölge cihazıyla ölçmüşler [57].

Michalkiewicz ve arkadaşları (2008) HPLC cihazıyla, katı faz ekstraksiyonu ile fenolik asitlerin (gallik asit, vanilik asit, p-HBA, kafeik asit p-kumarik asit, syringik asit) ve bazı flavonollerin (kamferol, rutin ve kuersetin) tayinine çalışmışlar. Fenolik bileşikler için % verimi 40-101 arasında bulmuşlar. Ihlamur balı için rutin, kuersetin ve kamferol içeriğini sırasıyla 5.0, 2.3 ve 1.7 ppm olarak, çalı balında ise yine sırasıyla 1.6, 0.4 ve 0.3 ppm olarak tayin etmişler [58].

Riihinen ve arkadaşları (2008) *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 (antosiyanınler, proantosiyanınler, flavonoller) ve hidroksisinnamik asitlerin dağılımını HPLC-DAD kullanarak analiz etmişler. *Vaccinium corymbosum*’ nin çiçeklerinde kuersetin 1553 ppm, meyvenin kabuğunda kuersetin 531 ppm, meyvenin etli kısmında ve kök gövdesinde kuersetin tayin sınırının altında, yeşil yapraklarda kuersetin 1784 ppm, kırmızı yapraklarında 3530 ppm olarak tespit etmişler. Yaban mersininde ise çiçeklerinde kuersetin 130 ppm, meyvenin kabuğunda kuersetin 159 ppm, meyvenin etli kısımlarında kuersetin 12 ppm, yeşil yapraklarında kuersetin 3369 ppm, kırmızı yapraklarında ise kuersetin 10369 ppm olarak tayin etmişler [59].

Novak ve arkadaşları (2008) elektrokimyasal dedektör ile ters-faz yüksek performanslı sıvı kromatografisiyle Portekiz kırmızı üzüm kabuklarının dört çeşidinden flavonoidlerin ultratitreşimle (ultrasound) asidik metanolle 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/L, LOQ değerleri sırasıyla 29.1, 21.9 ve 49.8 ppb olarak tayin etmişler. Dört farklı üzüm çeşidinde flavonol konsantrasyonları rutin için 29.11-214.4 ppm, miyrisetin için nd-44.38 ppm, fesitin için nd-3000 ppm, kuersetin ve morin için nd (tayin sınırının altında) olduğunun tespit etmişler [60].

Simirgiotis ve arkadaşları (2009) HPLC-UV dedektör-kütle spektrometresini kullanarak papaya bitkisinin suyundan fenolik bileşiklerden rutin (kuersetin glikoziti) ve

manghaslini tanımlamışlar. Spektroskopik yöntemleri kullanarak bunların yapılarını karakterize etmişler [61].

Olsen ve arkadaşları (2009) HPLC-DAD-ESI-MS ile karalâhana bitkisinin kıvrır kıvrır 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. Karalahanadaki toplam flavonol ve hidroksisinnamik asit içerikleri sırasıyla taze ağırlık olarak 646 ve 204 mg/100 g olduğunu bulmuşlar. Yalnız flavonoidlerin içeriği, (kamferol-3-sinapoil-diglukozit-7-diglukozit (%18.7) ve kuersetin-3-sinapoil-diglukozit-7-diglukozit (%16.5)), 2' den 159 mg/100 g' a kadar değişmekte olduğunu tespit etmişler. Asidik hidrolizden sonra iki flavonol aglikonu karalahanada kuersetin ve kamferol toplam içeriği sırasıyla 44 ve 48 mg/100 g olarak tayin etmişler [62].

Grzelak ve arkadaşları (2009) soğukta muhafaza edilen soğandaki kuersetin glikozitleri ve fruktooligosakkaritlerin içeriğini HPLC ile tayin etmişler. 2006-2007 yıllarında soğanın üç çeşidinde kuersetin glikozit içeriğini sırasıyla $1,381.6 \pm 123.1$ ve $1,479.4 \pm 125.5$ mg/100 g olduğunu kanıtlamışlar [63].

Huang ve arkadaşları (2008) 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 $^1\text{H-NMR}$ 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 [64].

Huang ve arkadaşları (2007) güneydoğu Amerikadaki Afrikalı Amerikalılar tarafından sıklıkla tüketilen sebzelerin fenolik bileşik içeriğini HPLC-MS cihazıyla incelemişler. Bamya, 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 [65].

HPLC-MS ile bitki ekstraktlarında yapılan antioksidan ve benzeri yapıda polifenollerin tespitiyle ilgili çalışmalar Tablo 2.9' da verilmiştir.

Tablo 2.9. Literatürde bitki ekstraktlarında yapılan polifenol tayini çalışmaları.

Bitki	Tayin edilen polifenol	Referans
<i>Vitis vinifera</i> L.)	Dihidro flavonoller, kuersetin türevleri ve kamferol türevleri	66
<i>Melissae herba</i>	Rosmarinik, <i>p</i> -kumarik, ferulik, kaffeik and klorojenik asit, kuersitrin	67
<i>Origanum vulgare</i>	Kuersetin, fisetin, kamferol, luteolin, apigenin, chrysin, eriodiktiyol, hesperetin, taksifolin, kateşin ve epikateşin	68
Beyaz üzüm türleri	Miyrisetin, miyrisetin-3-ramnoz, kamferol, kamferol-3-glukoz, kamferol-3-rutinoz, kuersetin, kuersetin-3-ramnoz, kuersetin-3-glukoz ve gallik asit	69
Propolis	kuersetin, sinamik asit ve diğer polifenoller	70
<i>Heliotropium pycnophyllum</i> , <i>Heliotropium stenophyllum</i>	Apigenin, luteolin, trisetin, galangin, kamferol, kuersetin, pinosembrin, naringenin, erioditiyol	71
<i>Elma</i>	Antioksidan kapasitesini incelemişler, dihidrokalgonlar, flavan-3-oller, kuersetin	72
<i>Humulus lupulus</i>	Miyrisetin, kuersetin, kamferol	73
Kırmızı şarap	Resveratrol, kuersetin, kateşin epikateşin, rutin	74
<i>Tilia rubra</i> ve <i>Tilia argentea</i>	Astragalin, kuersetin-3-7-dirhamnosid, isokuersitrin, rutin, kamferol-3-7-dirhamnosid	75
<i>Pistacia terebinthus</i>	Apigenin, luteolin, luteolin-7-o-glukosit, kuersetin, kuersetin-3-metil eter-7-o-glukosit,	76
<i>Zizyphus jujuba</i> , <i>Zizyphus spina-christi</i>	Kamferol, kuersetin, ploretin türevleri	77
<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	78
Caco-2 cells	Tangeretin, wogonin, khrisin, apigenin, luteolin, kamferol, kamferid, tamariksetin, kuersetin, miyrisetin, morin, isokuersetrin, rutin, hesperetin, naringin, epikateşin	79
<i>Morus alba</i> L.	Klorojenik asit, kuersetin glikosit, rutin, isokuersitrin, astragalin, kuersetin 3-(6-malonilglukoz), kamferol 3(6-malonilglukozit)	80
<i>Allium cepa</i> L.	Kuersetin, kuersetin-4-glukosit, kuersetin-3,4'-diglukosit	81
<i>Brassicaceae</i>	Gallik asit, kamferol ve quersetin glikozitleri	82
<i>Eruca vesicaria</i> ve	Kuersetin türevleri	83

<i>Diplotaxis tenuifolia</i>		
<i>Apocynum venetum</i> L.	Kuersetin glikozitleri	84
<i>Ginko biloba</i>	Kuersetin dihidrat, kamferol, isorhamnetin, rutin	85
Brezilya’ daki yazlık ve kışlık sebzeler	Kuersetin, kamferol, apigenin	86
<i>Rheum rhabarbarum</i> L. ve <i>Rheum rhaponticum</i> L.	Resveratrol, rutin, kuersetin-3'-o-b-d-glukopiranosit, kateşin	87

2.5.4. Bazı Analitik Terimler

Doğruluk, ölçümlerin gerçek veya kabul edilen değere yakınlığını belirtir. Diğer taraftan, bir büyüklüğün gerçek değeri hiçbir zaman tam olarak bilinmediğinden, doğruluk tam olarak tayin edilemez. Doğru değer yerine doğru kabul edilen değer kullanılmalıdır. Doğruluk, mutlak ya da bağıl hata terimleriyle ifade edilir.

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: Bir X_i büyüklüğünün ölçümündeki mutlak hata $E = X_i - X_t$ eşitliği ile verilir. Buradaki X_t , söz konusu büyüklüğün gerçek değer kabul edilen değeridir.

Bağıl Hata: Genellikle mutlak hatadan daha faydalı bir büyüklüktür. Yüzde (%) bağıl hata şu eşitlikle ifade edilir;

$$E = \frac{(X_i - X_t)}{X_t} \cdot 100$$

Kesinlik ise; ölçümlerin tekrarlanabilirliğini, yani tamamen aynı yolla elde edilen sonuçların yakınlığını gösterir. Genellikle standart sapma ile verilir.

Analiz sayısı 20’ den az olan veriler için kesinliğin bir ölçüsü olan standart sapma; $\bar{X}$ ortalama değer olmak üzere şu eşitlikle verilir;

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2}{N - 1}}$$

Analiz sayısı 20' den fazla olan veriler için standart sapma; yine X ortalama değeri olmak üzere;

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (X_i - X)^2}{N}}$$

eşitliğiyle verilir.

Doğruluk ve kesinlik arasında farklılıklar vardır. Doğruluk, bir sonuç ile gerçek değer arasındaki yakınlığı ölçer. Kesinlik ise aynı yolla ölçülen birçok sonuç arasındaki yakınlığı açıklar.

Gözlenebilme Sınırı (Limit of Detection) (LOD): Kör değerin standart sapmasının 3 katına gözlenebilme sınırı denir. Bu ifade farklı aletlerin performanslarının karşılaştırılmasında kullanılmaktadır.

Tayin sınırı (Limit of Quantification) (LOQ) : Kullanılan alet ile belirlenebilen minimum madde miktarı (veya konsantrasyonu) değeridir. Bu ifade farklı aletlerin performanslarının karşılaştırılmasında kullanılması yanında analiz sonrasında elde edilen sonucun doğruluğunu da yansıtmaktadır. Gözlenebilme sınırı, kör değerin standart sapmasının 3 katı olarak (3S ile) verilse bile çok düşük sinyallerden dolayı bu derişimlere güvenilmez. Bu nedenle, elemente bağlı olarak gözlenebilme sınırının bazen 5 veya 10, hatta bazen de 20 katı derişimler güvenilir olarak kabul edilir. Bu değer tayin sınırı olarak adlandırılır.

3. MATERYAL METOT

3.1. Kullanılan Cihazlar ve Cam Malzemeler

Çalışmada Agilent 1200 HPLC ve 6110 quadropol MS dedektörü birlikte kullanılmıştır. MS için uygulanan şartlar Tablo 3.1’ de verilmiştir. Kullanılan diğer yardımcı malzemeler şunlardır,

1. Ultra saf su cihazı (Millipore, direct-Q)
2. Etüv (M 6040 P Hot Air Sterilizer Laboratoryovan)
3. Elektronik terazi (Gec-Avery)
4. Santrifüj (NF 200 Nüve)
5. Enjeksiyon Filtresi
6. Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı (VELP Multiposition heating magnetik stirrer)
7. Tek kullanımlık şırınga
8. Vial tüp
9. Değişik büyüklükte pipet, beher, balon joje, mezür vb cam malzemeler.

Tablo 3.1. 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

3.2. Kullanılan Standart Çözeltiler ve Reaktiflerin Hazırlanması

Standart çözeltiler; kuersetinin HPLC saflıkta 500 ppm’ lik stok çözeltileri hazırlandı. Bu bileşenlerin hem stok çözeltileri hem de ara stok çözeltileri asetonnitril (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 [6, 8, 9, 11, 10].

6 M HCl' in hazırlanması: % 37' lik yoğunluğu 1.19 g/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 [11].

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

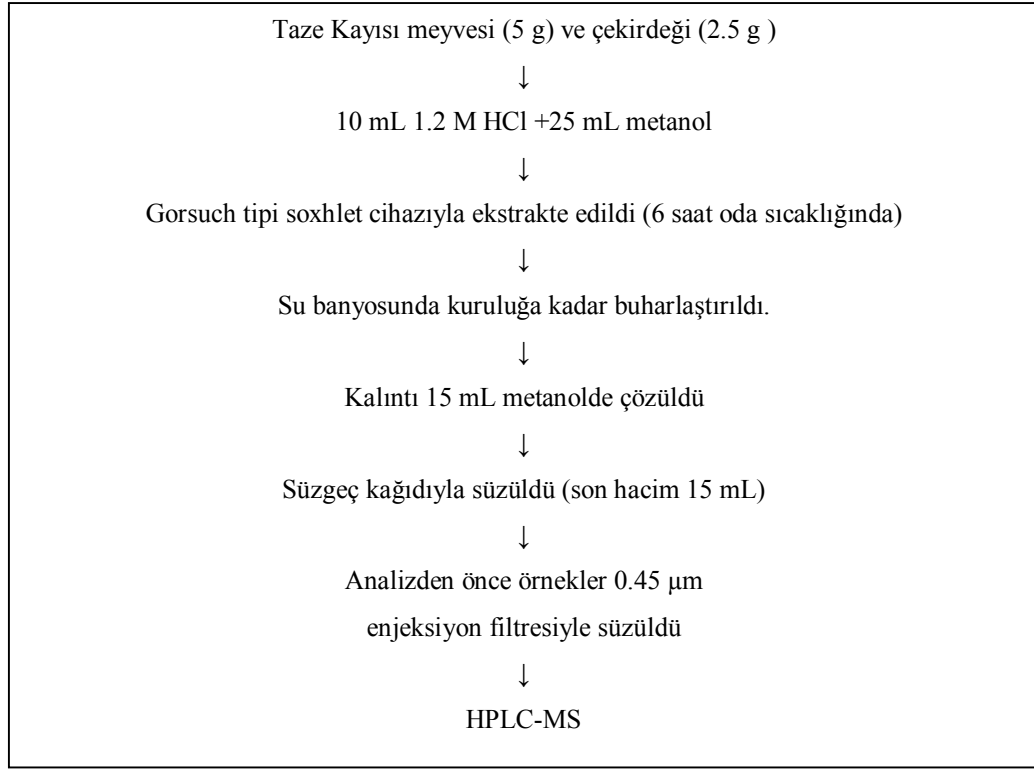
3.3. Örneklerin Temini

Elazığ ve yöresinden toplanmış olan taze kayısı meyvesi örnekleri ve çekirdekleri saf suyla yıkandıktan sonra aynı ağaca ait kayısı meyveleri parçalanarak homojenize edildi. Bu örneklerle analizden önce aşağıdaki ekstraksiyon işlemleri uygulandı.

3.4. Kayısı Meyvesi Ve Çekirdeği Örneklerinin Ekstraksiyonu

En uygun kayısı meyvesi miktarı ve çözücü/kayısı oranının tayini için yapılan ön çalışmalarda, 5 g lık taze kayısı meyvesi ve 2.5 g lık kayısı çekirdeği örneklerinin 15 mL lik son hacimlere alınmasıyla en iyi sonuçlar bulundu. Böylece, homojenize edilmiş olan 5 g lık taze kayısı meyvesi ve 2.5 g lık kayısı çekirdeği örneklerine 1.2 M HCl' den 10 mL, 25 mL metanol, 0.1 g askorbik asit eklenerek 6 saat oda sıcaklığında düzenli karıştırıldı [9, 11]. Daha sonra su banyosunda kuruluğa kadar buharlaştırılıp 15 mL metanol ilave edildi. Süzgeç kağıdıyla süzülen ekstraktlar analiz aşamasına kadar +4 °C' de saklandı (son hacim 15 mL). Analizden önce 0.45 µm enjeksiyon filtresiyle süzülen ekstraktlar HPLC-MS cihazına enjekte edildi [11]. Uygulanan ekstraksiyon basamakları Şekil 3.1' de verilmiştir.

Ekstraksiyon çözücüsü karışımında kullanılan askorbik asit, reaksiyon ortamının stabil kalmasını yani askorbik asitin indirgen özelliğiyle, ışık varlığında kuersetinin oksijene maruz kalması sonucu yükseltgenmesini engellerken, HCl asit ise flavonollerin glikozitlerinin hidrolizini sağlamaktadır [9-12].



Şekil 3.1. Ekstraksiyon yönteminin basamakları.

3.5. 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 3.2) 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 göröldü. Bu nedenle bundan sonraki bütün deneysel çalışmalarda kuersetin için bu akış hızı (0.6 mL/dk) kullanıldı.

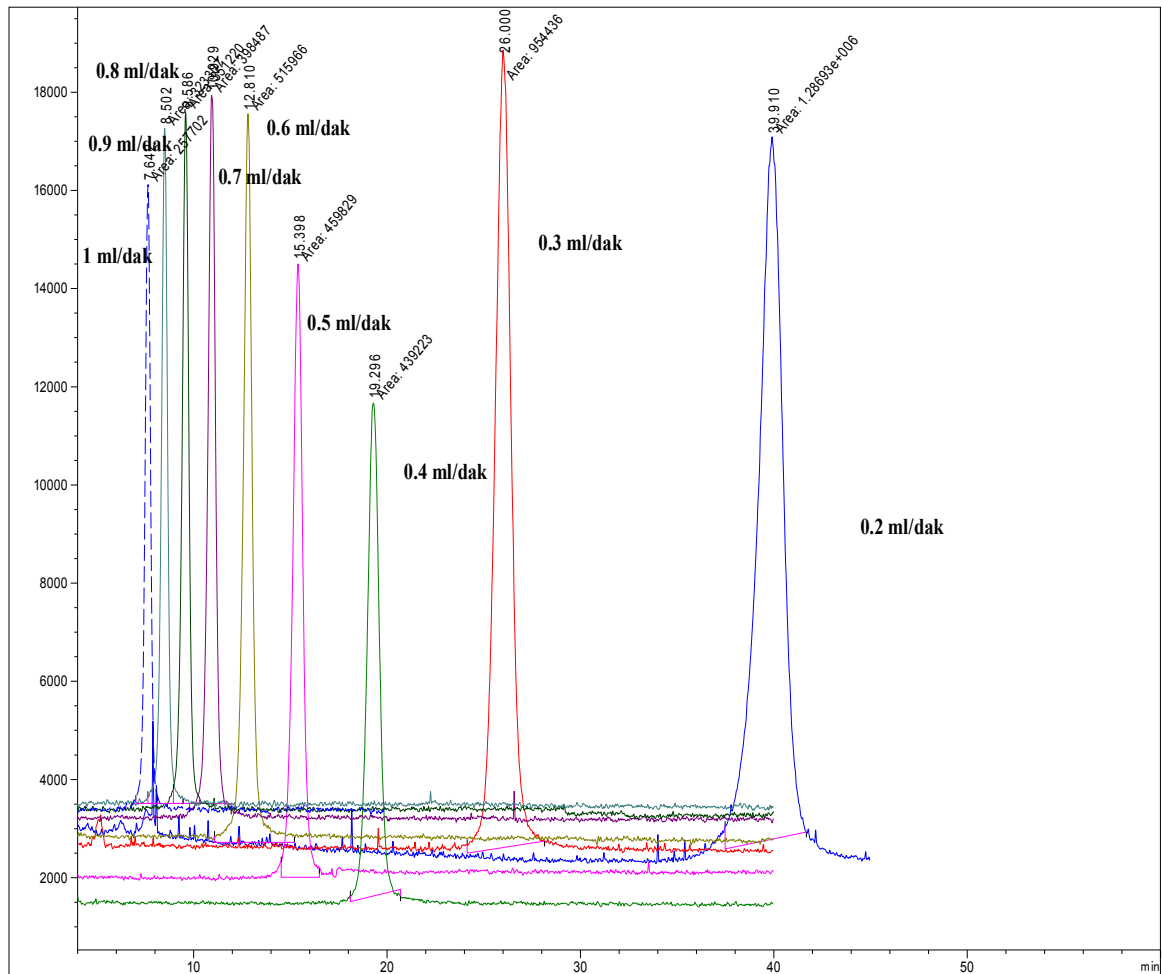
En iyi fragmentor voltajını (parçalayıcı voltaj) belirlemek için yapılan çalışmalarda, 10-200 V aralığında (diğer parametrelerin optimum değerlerinde) yine 25 ppm' lik kuersetin çözeltileri kullanılarak kromatogramlar alındı. Pik simetrisi ve alan dikkate alındığında, en uygun fragmentörün 140 V olduğu sonucuna varıldı (Şekil 3.3).

Şekil 3.4’ 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.

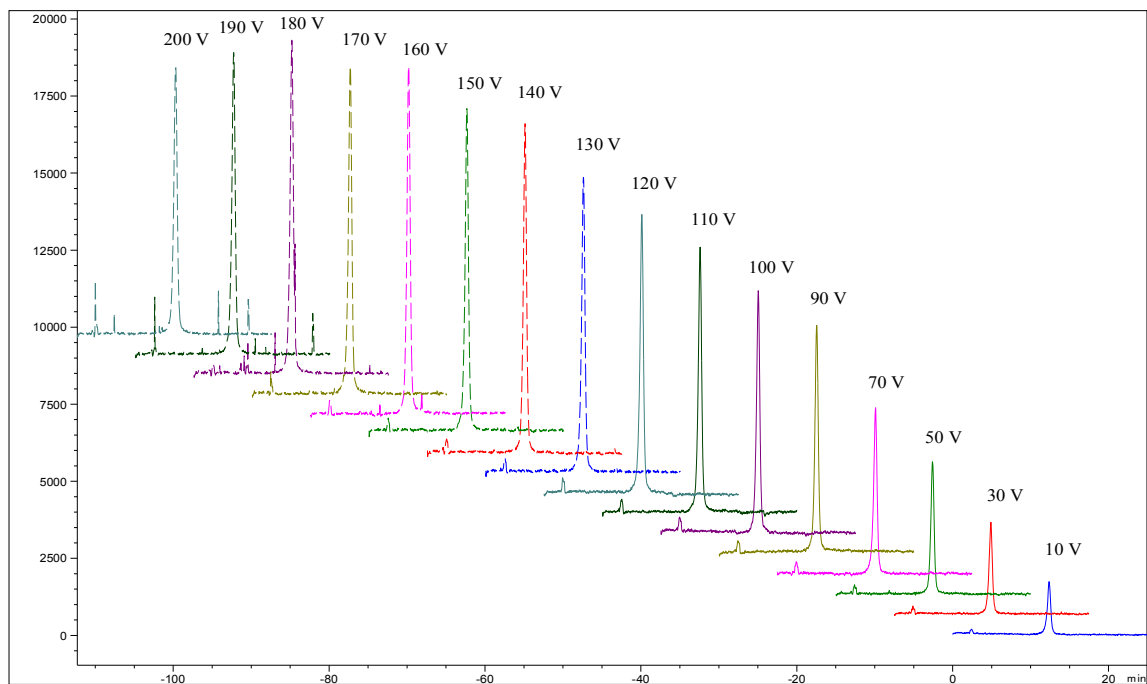
En iyi enjeksiyon hacmini belirlemek için yapılan çalışmada, 5–40 μ L aralığında örnek hacimleri denendi. Enjekte edilen örnek hacminin artmasına bağlı olarak alan pik simetrisinde belirgin bir bozulma gözlemlendiğinden, pik simetrisinin en iyi olduğu 5 μ L enjeksiyon hacmi optimum olarak kabul edildi (Şekil 3.5).

En uygun kolon sıcaklığının tayini için 20-55 $^{\circ}$ C aralığında aynı derişimdeki kuersetin çözeltilerinin kromatogram ve spektrumları alındı (Şekil 3.6). Kolon sıcaklığı artışının pik çıkış süresini azalttığı açıkça görülmektedir. Bu değışimler göz önüne alındığında en iyi olan 30 $^{\circ}$ C’ deki pik optimum olarak kabul edildi.

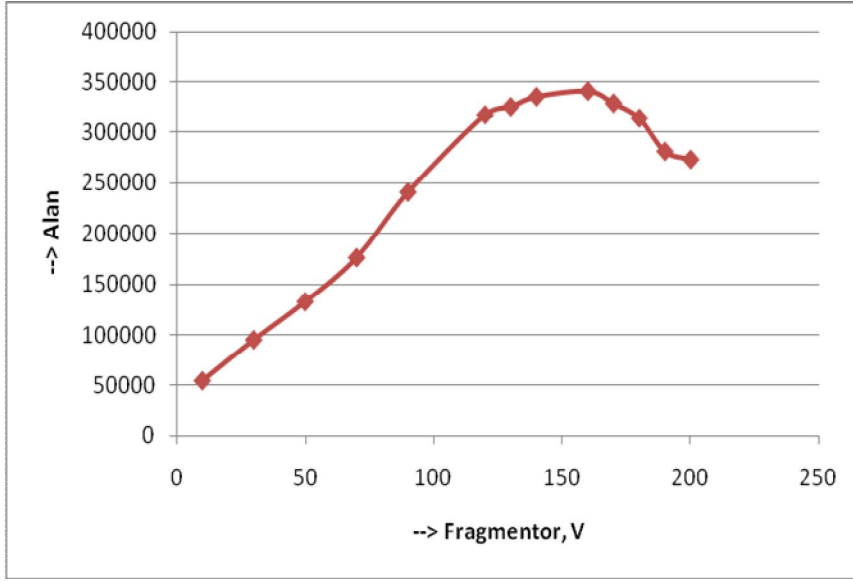
Nicel analizde kullanılmak üzere çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan kuersetin çözeltileri için optimum şartlarda elde edilen kromatogramlar Şekil 3.7’ de verilmiştir. Bu kromatogramlardan da anlaşılacağı gibi standart maddenin konsantrasyonunun artması ile zemindeki gürültülerin bastırıldığı ve piklerin daha sade olduğu görülmektedir. Şekil 3.8 de standartların kalibrasyon grafikleri verildi. Bu şekillerden de görüldüğü gibi 0.5-10 ppm aralığında eğimleri birbirine çok yakın kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir. Şekil 3.9’ da kuersetin standardının MS spektrumu görülmektedir. Bu spektrumdan, kuersetin molekülüne pozitif moda çalışmaya uygun olarak hidrojen iyonlarının bağlanmakta ve dolayısıyla 303 m/z değerinde temel pik görülmektedir.



Şekil 3.2. HPLC-MS ile kuersetin tayini için en uygun akış hızının bulunmasıyla ilgili kromatogramlar.

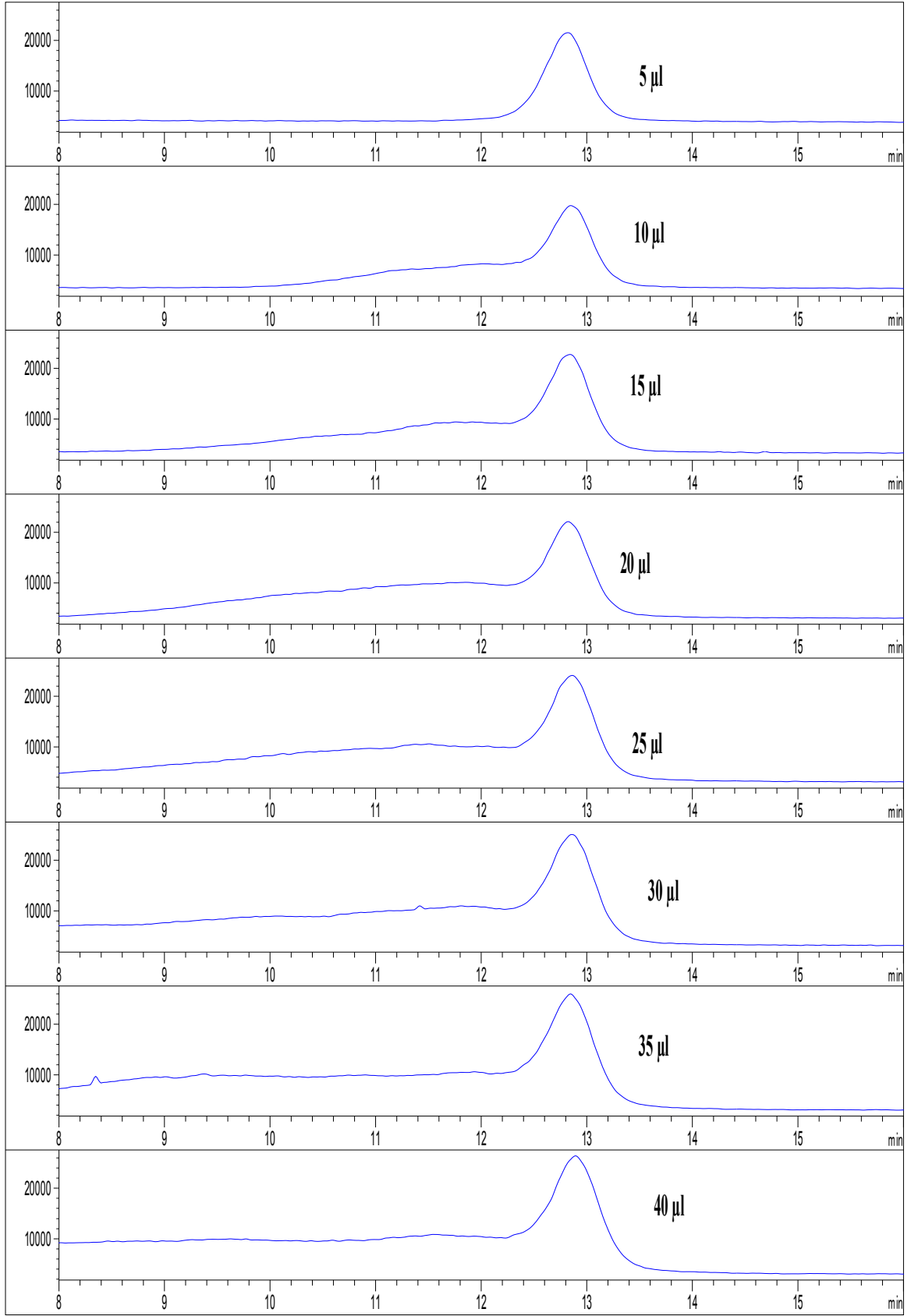


Şekil 3.3. HPLC-MS ile kuersetin tayini için optimum fragmentorün bulunması.

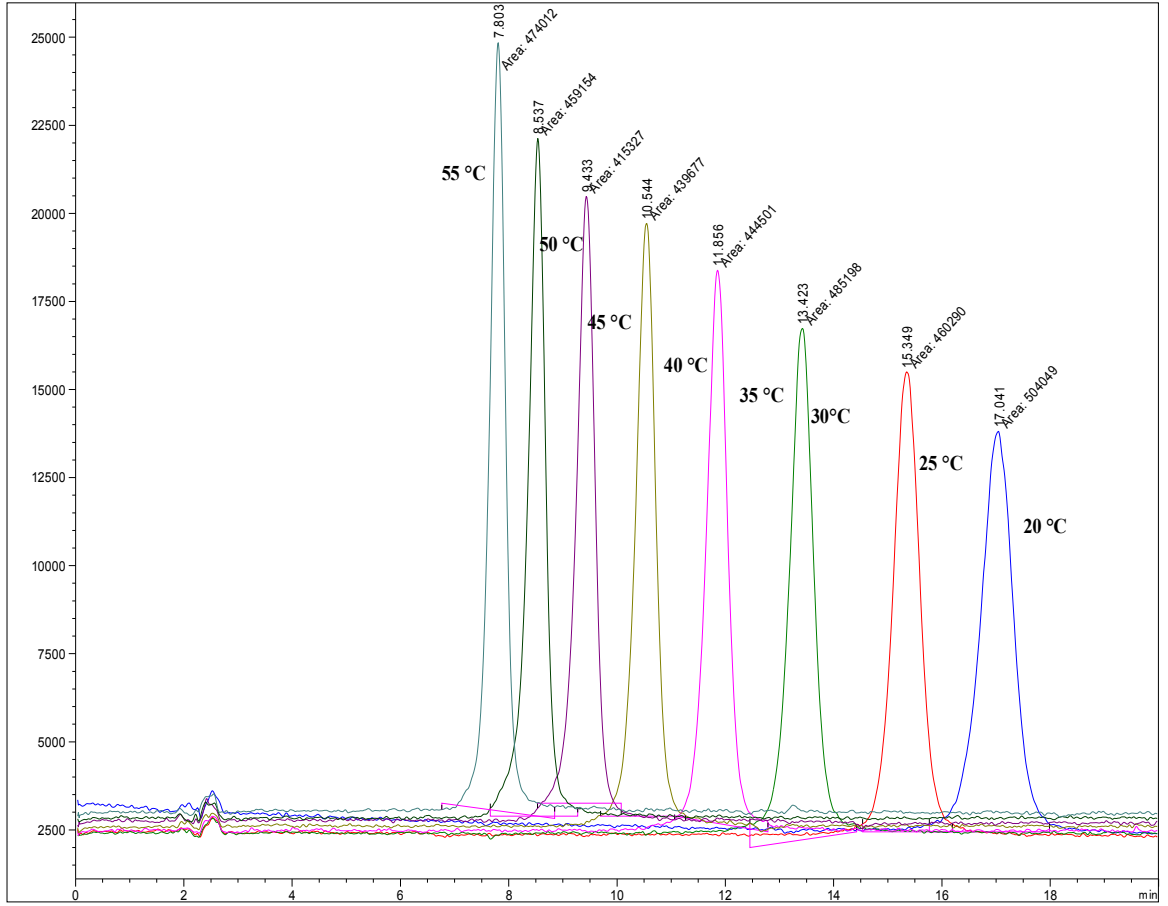


Şekil 3.4. HPLC-MS ile kuersetin tayini için fragmentor-alan değişimi grafiği.

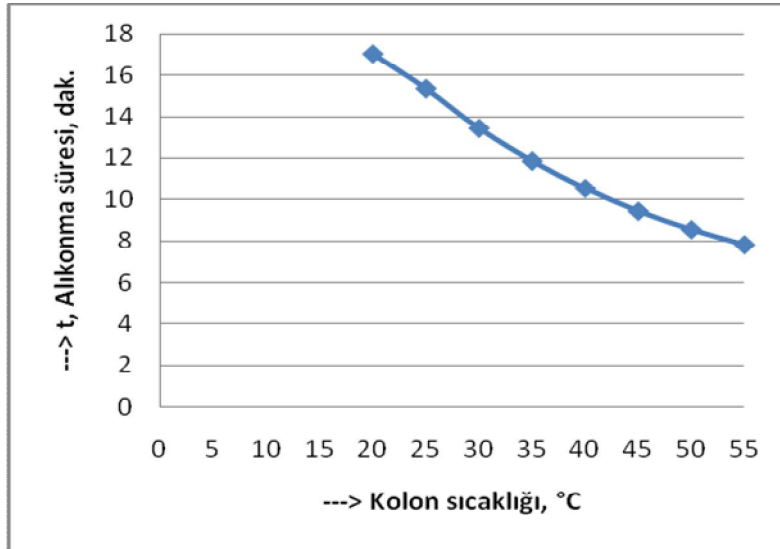
Fragmentor	Alan
10	54169
30	94806
50	132476
70	176151
90	241134
100	252446
110	271837
120	317840
130	320912
140	335798
150	329682
160	341252
170	329376
180	324498
190	281555
200	273637



Şekil 3.5. HPLC-MS ile kuersetin tayini için optimum enjeksiyon hacminin bulunması.



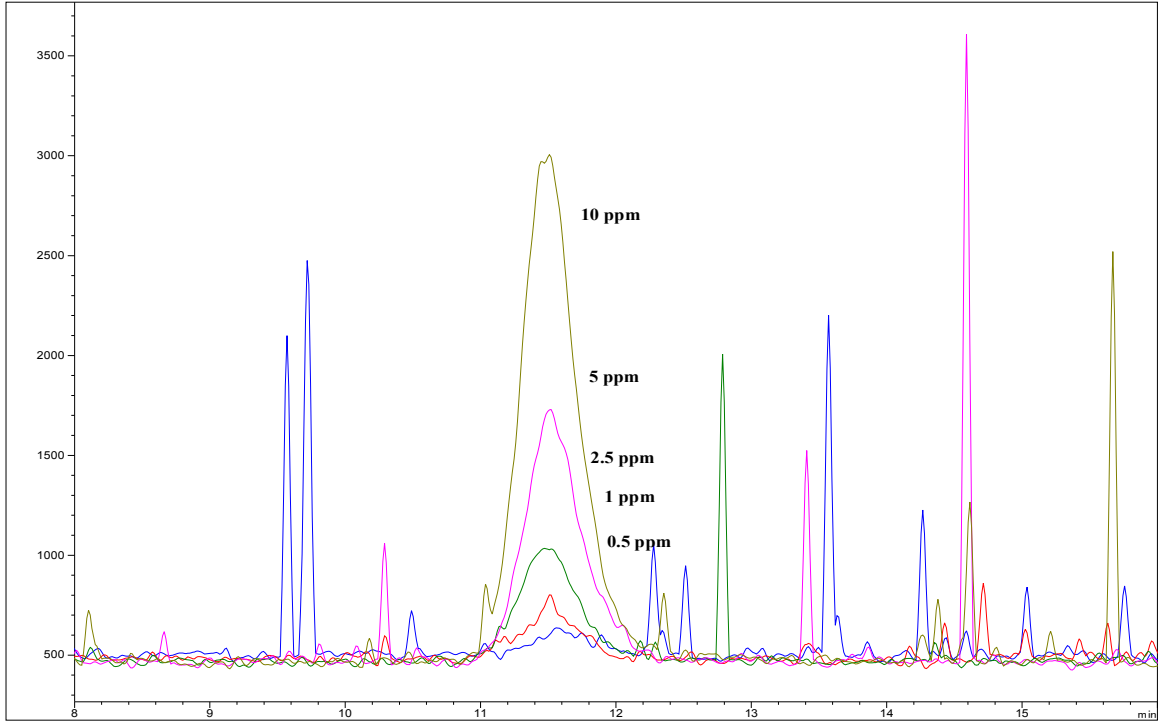
a)



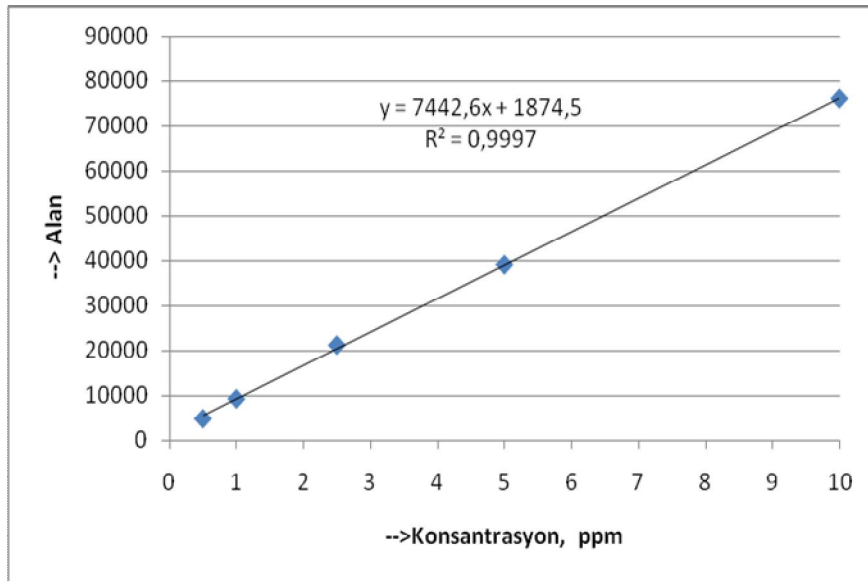
b)

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

Şekil 3.6. HPLC-MS ile kueretin tayini için en uygun kolon sıcaklığının bulunmasıyla ilgili a) kromatogramların gösterilişi ve b) kolon sıcaklığının alıkonma süreleriyle değişimi.

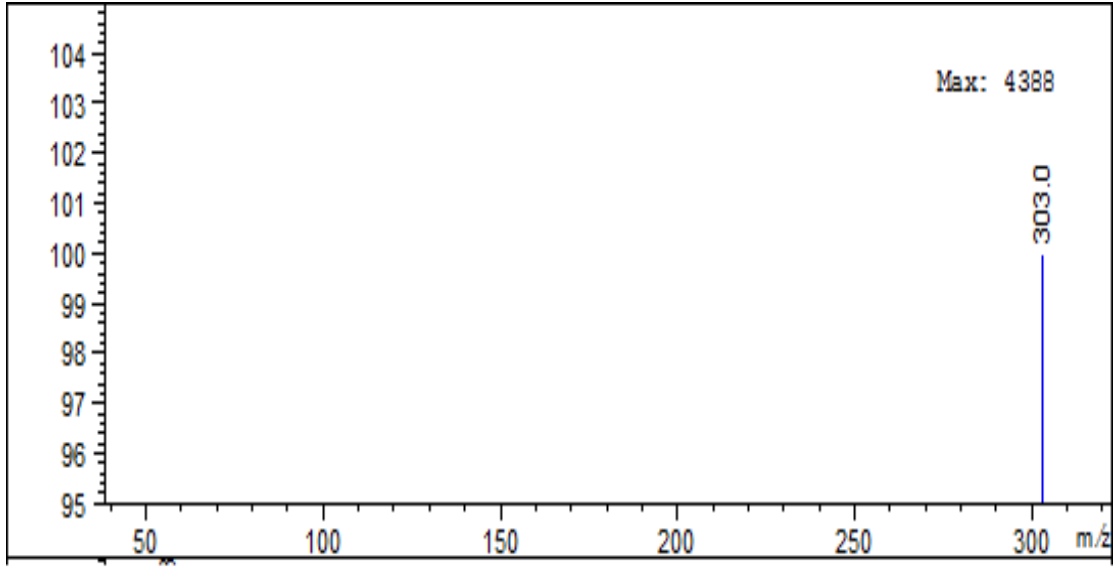


Şekil. 3.7. HPLC-MS ile kuersetin için kalibrasyon çözeltilerinin kromatogramları.



Kuersetin ppm	Alan
0,5	4908
1	9348
2,50	21276
5	39147
10	76104

Şekil 3.8. HPLC-MS ile kuersetinin 0.5-10 ppm aralığına ait kalibrasyon eğrisi.



Şekil 3.9. Kuersetinin HPLC-MS ile optimum şartlarda elde edilen kütle spektrumu.

4. BULGULAR

4.1. Akış Hızı ile İlgili Bulunan Sonuçlar

Şekil 3.2' de görüldüğü gibi, pik simetrilerinin yanında, alıkonma süreleri ve alan değerleri dikkate alındığında en iyi akış hızının; kuersetin için 0.6 mL/dk olduğu gözlemlendi.

4.2. Fragmentor ile İlgili Bulunan Sonuçlar

Şekil 3.3-3.4'te görüldüğü gibi en iyi fragmentor; kuersetin için 140 V fragmentor olarak tespit edildi. Optimum parçalayıcı voltajına karar verirken pik simetrisi düzgün ve kütle spektrumlarının maksimum olduğu voltaj seçildi.

4.3. Enjeksiyon Hacmi ile İlgili Bulunan Sonuçlar

Şekil 3.5' de görüldüğü gibi optimum enjeksiyon hacmi; kuersetin 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.

4.4. Kolon Sıcaklığı ile İlgili Bulunan Sonuçlar

Şekil 3.6' da görüldüğü gibi optimum kolon sıcaklığı kuersetin için 30 °C olduğu yapılan çalışmada 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.

4.5. Ölçümlerle İlgili Elde Edilen Optimum Şartlar

Flavonollerin analizi için optimize edilen HPLC ve MS parametreleri aşağıda tablolar halinde verilmiştir (Tablo 4.1).

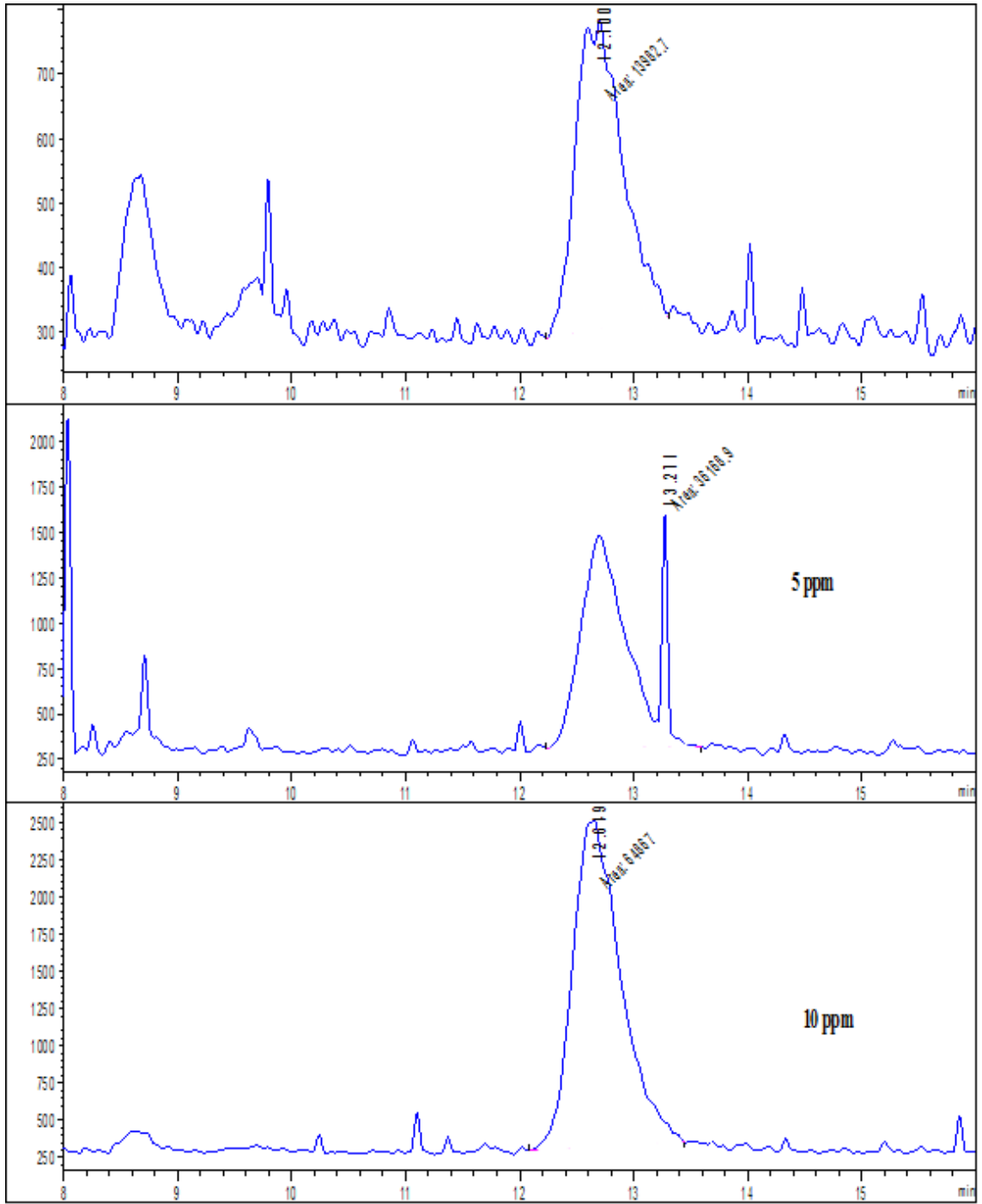
Tablo 4.1. Kuersetinin optimum tayin koşulları.

Şartlar	Kuersetin
Akış hızı (mL/dk)	0.60
Kolon Sıcaklığı (°C)	30
Enj. hacmi (µL)	5
Fragmenter (parçalayıcı voltaj, V)	140
t, alıkonma süresi, dak.	9.9-11.3
Kolon özellikleri	4.6x150 mm, 5 µm ZORBAX Eclipse XDB-C18

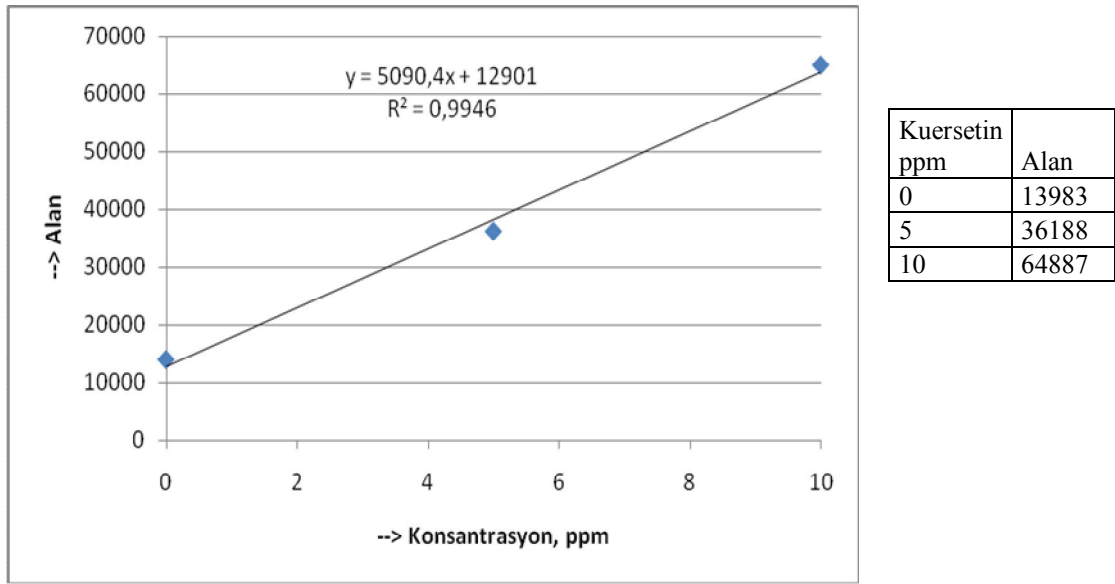
4.6. Çalışılan Örneklerde Bulunan Kuersetine Ait Elde Edilen Kromatogramlar

Şekil 3.1’ de açıklandığı gibi ekstrakte edilen kayısı meyvesi örnekleri için Tablo 4.1’ de verilen optimum şartlar kullanılarak elde edilen HPLC-MS kromatogramları Şekil 4.1-4.3’ de verildi.

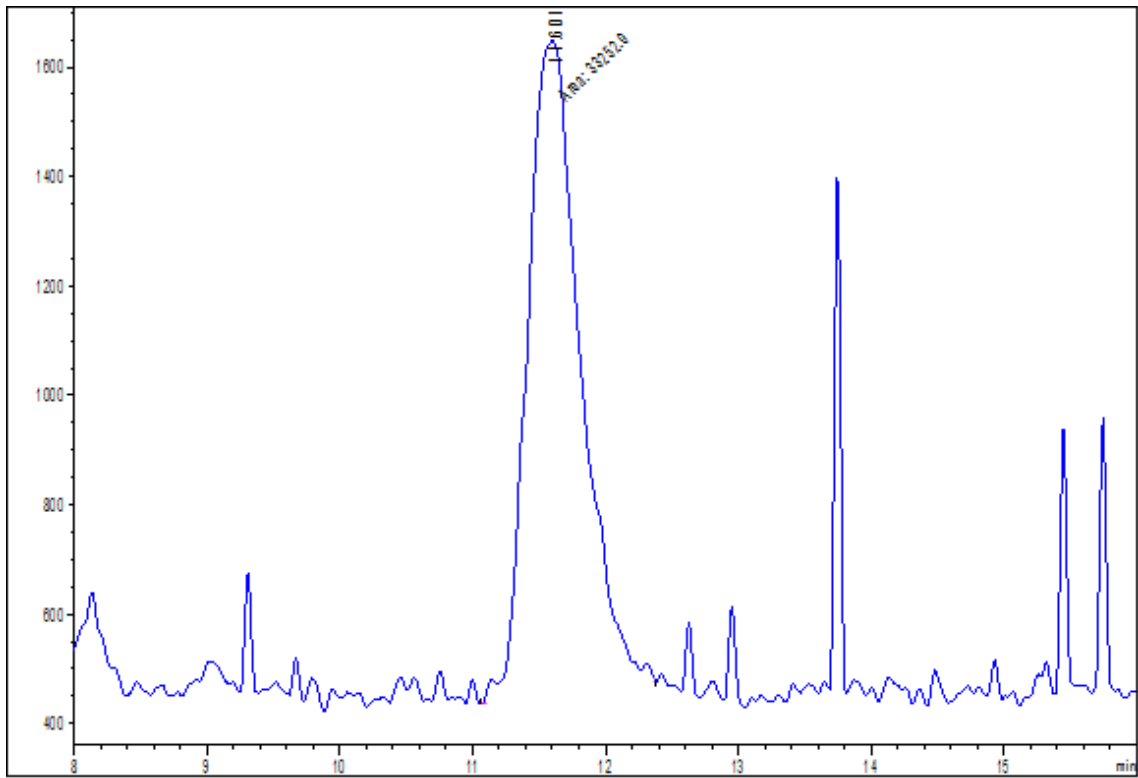
Kayısı çekirdeğinde kuersetin tayini için elde edilen HPLC-MS kromatogramı Şekil 4.4’ de görülmektedir. Şekil 4.5’de ise kayısıdaki kuersetinin optimum koşullar altındaki MS spektrumu görülmektedir.



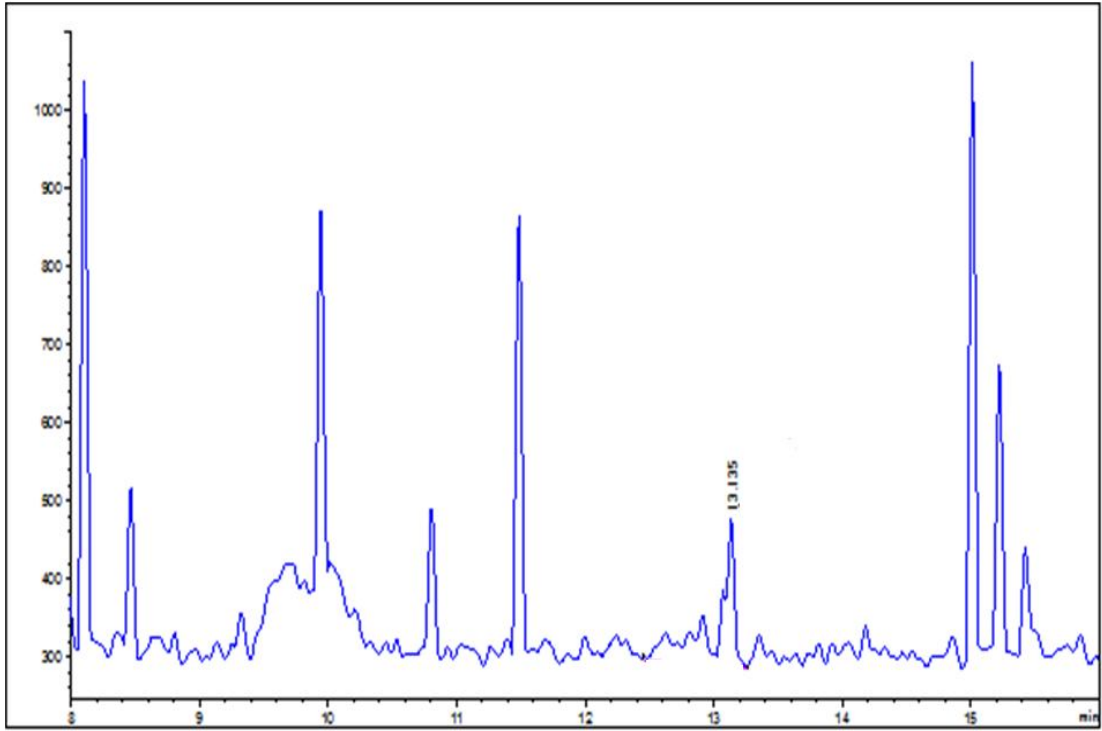
Şekil 4.1. Kayısı meyvesinde kuersetin tayini için uygulanan standart ekleme metoduyla elde edilen HPLC-MS kromatogramları.



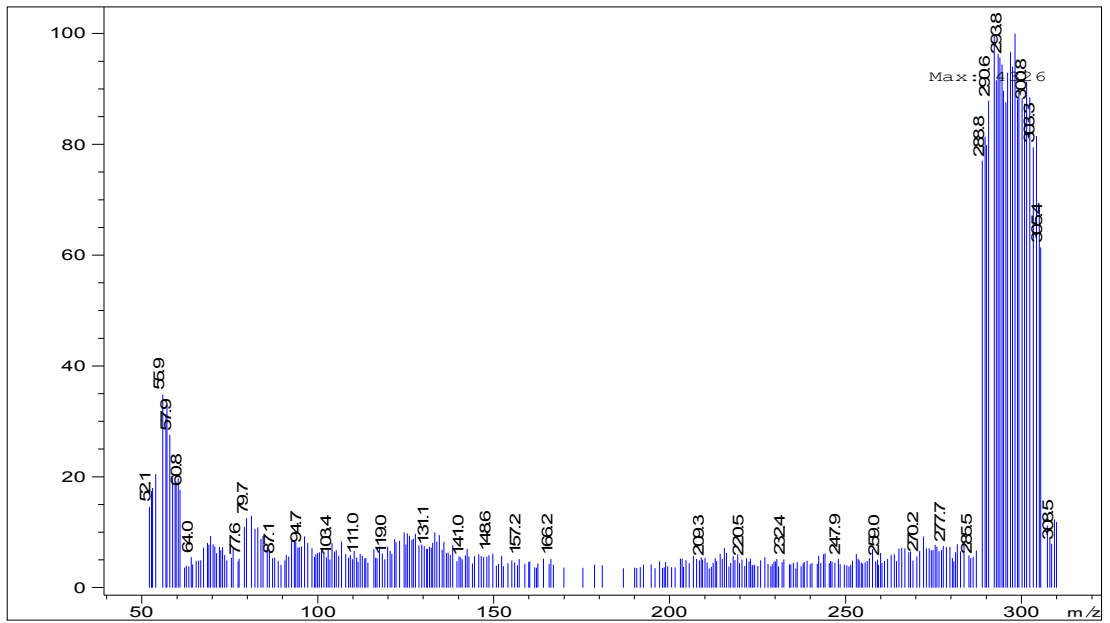
Şekil 4.2. Kayısı meyvesinde kuersetin tayini için elde edilen standart ekleme eğrileri.



Şekil 4.3. Kayısı meyvesinde kuersetin tayinine ilişkin HPLC-MS kromatogramı.



Şekil 4.4. Kayısı meyvesi çekirdeğinde kuersetin tayinine ilişkin HPLC-MS kromatogramı.



Şekil 4.5. Kayısıda meyvesindeki kuersetinin optimum koşullar altındaki MS spektrumu.

Kuersetinin molekül ağırlığı 302 g mol^{-1} olup bu çalışmada pozitif mod şartlarında çalışılmıştır. Böylece Şekil 3.9 da temel pik 303 m/z değerinde

gözlenmektedir. Bu MS spektrumunda görüldüğü gibi, 2 fenil halkası ve 1 heterosiklik halkadan oluşan kuersetin uygulanan parçalayıcı (fragmentor) potansiyelinde parçalanmamaktadır ve temel pik 303 m/z de görülmektedir.

Elde edilen optimum şartlar kullanılarak kayısı meyvesi ve kayısı çekirdeğinde bulunan kuersetin konsantrasyonları Tablo 4.2 verildi.

Tablo 4.2. Kayısı meyvesi ve çekirdeği örneklerinde bulunan kuersetin konsantrasyonları, yaş esasa göre, ppm.

ÖRNEK	Kayısı meyvesinde kuersetin (ppm)	Kayısı meyvesi çekirdeğinde kuersetin (ppm)
Kayısı 1	12,9±2,7	<t.s.
Kayısı 2	4.3±0,9	<t.s.
Kayısı 3	8,8±1,8	<t.s.
Kayısı 4	<t.s.	<t.s.
Kayısı 5	4,7±1,1	<t.s.
Kayısı 6	1,2±0,3	<t.s.
Kayısı 7	<t.s.	<t.s.
Kayısı 8	1,0±0,15	<t.s.
Kayısı 9	4,3±0,9	<t.s.
Kayısı 10	<t.s.	<t.s.

Yapılan çalışmalarda, standart ekleme eğrisi ile kalibrasyon grafiği eğrilerinin eğimlerini aynı olmadığı (Şekil 3.8 ve 4.2) gözlemlendiğinden girişim probleminin olduğu anlaşılmıştır. Bu nedenle Tablo 4.2 de verilen değerler standart ekleme metoduyla bulunan değerlerdir. Tablo 4.2’ te görüldüğü gibi çalışılan kayısı meyvesi örneklerindeki kuersetin konsantrasyonları en küçük değer tayin sınırından küçük bulunurken en büyük değer 12.9 ppm olduğu anlaşılmaktadır. Yine kayısı çekirdeğindeki kuersetin konsantrasyonunun tayin sınırından küçük olduğu Tablo 4.2 den bulunmuştur. Bu bulgulardan, kuersetinin kayısı meyvesinin yenen kısmından çekirdeğine geçmediği anlaşılmaktadır. Erdoğan (2008) yaptığı çalışmada kayısı meyvesi örneklerinde kuersetin konsantrasyonunu 0.24-29.89 ppm aralığında bulmuştur [88]. Justesen ve arkadaşları (1998) yaptığı çalışmada kayısı örneklerinde kuersetin

konsatrasyonunu 2.6 ppm bulmuştur [21]. Bu çalışmada gözlenen kuersetin konsantrasyonlarının bu aralıkta olduğu görülmektedir.

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Literatürde flavonol bileşiklerinden kuersetin bileşiğinin antikanserojen ve oksidatif radikalik reaksiyonları engelleyici özellikleri açıkça belirtilmiştir [1-11, 14-24]. Diğer taraftan, kanser ve benzeri küresel boyutta insanlığı tehdit eden hastalıkların önlenmesinde ve/veya tedavisinde katkı sağlayabilecek çalışmaların önemi açıktır.

Bu çalışmada, flavonol grubundan olan kuersetin bileşiğinin kayısı meyvesi ve kayısı çekirdeğindeki konsantrasyonlarının tayini amaçlanmıştır. Çalışılan kayısı meyvesi ve kayısı çekirdeğindeki kuersetinin ekstrakte edilmesi için çözücü olarak metanol/askorbik asit/HCl çözücü karışımı kullanıldı. Karışımdaki HCl flavonoid glikozitlerinin hidroliz olmasını sağlamakta ve yükseltgenmesini engellemektir. Yine, karışımda kullanılan askorbik asit örneklerdeki bileşiklerin yükseltgenmesini engeller [9-12].

Ekstraksiyon çözeltilerindeki kuersetinin tayini için HPLC-MS kullanıldı. Tayinden önce yapılan optimizasyon çalışmalarında; enjeksiyon hacmi için 5 µL, akış hızı için 0.6 mL/dk, kolon sıcaklığı için 30 °C ve fragmentor için 140 V aralığında değerler en iyi değer olarak bulundu.

HPLC-MS ile yapılan çalışmalarda girişim olup olmadığının tesbiti için taze kayısı meyvesi örneklerine bilinen miktarlarda standart kuersetin çözeltileri eklendi. Böylece elde edilen standart ekleme eğrisi ile kalibrasyon grafiği eğrisinin eğimlerini aynı olmadığı (Şekil 3.8 ve 4.2) gözlemlendi. Böylece, ölçüm basamağında girişim problemlerinin varolduğu sonucuna varılmıştır. Bu nedenle, bütün kayısı meyvesi örneklerine standart ekleme metodu uygulanmış ve Tablo 4.2 de verilen değerler standart ekleme metoduyla bulunan değerlerdir. Kayısı çekirdeği için değerlendirilebilir sinyal alınamadığından standart ekleme yöntemi uygulanmamıştır. Sonuç olarak, kayısı ve kayısı çekirdekleri için bulunan sonuçlar Tablo 4.2' de verilmiştir. Bu tablolardaki her bir değer aynı kayısı meyvesi örneğine ait en az 3 ayrı kısmın konsantrasyonunun ortalama değeridir.

Tablo 4.2 de verilen sonuçlar farklı yerlerden temin edilen ve farklı kayısı meyvesi çeşitlerine ait verilerdir. Herbir kayısı meyvesine ait çekirdek örneklerinde bulunan kuersetin konsantrasyonları da aynı Tabloda verilmiştir. Bulunan sonuçlardan,

kayısı için kuersetin konsantrasyonları en küçük değer tayin sınırından küçük bulunurken en büyük değer 12.9 ppm olduğu gözlendi. Yine kayısı çekirdeğindeki kuersetin konsantrasyonunun tayin sınırından küçük olduğu Tablo 4.2 den bulunmuştur. Bu bulgulardan, kuersetinin kayısı meyvesinin yenen kısmından çekirdeğine geçmediği şeklinde yorumlanabilir. Bu çalışmada bulunan kuersetin konsantrasyonlarının daha önce yapılan çalışmalarda bulunan değerlerle uyuşmaktadır.

6. ÖNERİLER

Doğal gıdalardaki antioksidan ve antikanserojen bileşiklerin konsantrasyonlarının bilinmesi koruyucu tıp için de büyük öneme sahiptir. Bu çalışmada, bölgemizde ekonomik katma değeri yüksek olan kayısı ve çekirdeğindeki kuersetin konsantrasyonu araştırıldı. Kuersetin gibi antioksidan ve antikanserojen özelliklere sahip diğer polifenol bileşiklerinin tayinin yapılması da yararlı olacaktır. Ayrıca, geniş kitleler tarafından kullanılan tıbbi bitkilerin yanısıra ülkemizde yaygın olarak tüketilen meyve ve sebzelerin de kuersetin ve benzeri polifenol konsantrasyonlarının tayini önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] **Spencer, P.E.J., ve arkadaşları, 2007.** Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research, *British J. Nutrition*, 1-11.
- [2] **Pehlivan, M., Güleriyüz G., 2004.** Bahçe, 33 (1-2), 51-57.
- [3] **Volpi, N., ve arkadaşları, 2006.** Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry, *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 354-361.
- [5] **Özcan, C., 2009.** Semizotu, ısırgan otu, menengiç ve kuşburnu gibi tıbbi ve aromatik bitkilerde flavonollerin HPLC-MS ile tayini, Fen Bilimleri Ens. Kimya Anabilim Dalı, Doktora tezi.
- [6] **De Souza LM., ve arkadaşları, 2008.** HPLC/ESI-MS and NMR analysis of flavonoids and tannins in bioactive extract from leaves of *Maytenus ilicifoli*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47(1), 59-67.
- [7] **Hakkinen, S., ve arkadaşları, 1999.** Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries, *Food Research International*, 345-353.
- [8] **Hakkinen, S., 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. Chromat. A*, 91-100.
- [9] **H., Hakkinen, S., 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.
- [10] **Zhang, J., ve arkadaşları, 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.
- [11] **Sultana, B., Anwar, F., 2008.** Flavonols (kaempferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal plants, *Food Chemistry*, 879-884.
- [12] **Wollgast, J., Anklam, E., 2000.** Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health? *Food Research International*, 33, 449-459.

- [13] **Tuğrul, L., 2004.** Sağlıklı Yaşam İçin, İstanbul, 11-13.
- [14] **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.
- [15] <http://lpi.oregonstate.edu/f-w00/flavonoid.html>
- [16] **Karakaya, S. ve El, S.N., 1999.** Quercetin, luteolin, apigenin and kaempferol contents of some foods, Food Chem., 66, 289-292.
- [17] **Burak, M. ve Çimen, Y., 1999.** Flavonoidler ve Antioksidan Özellikleri, Türkiye Klinikleri J Med Sci, 19, 296-304.
- [18] **Bonaccorsi, P., 2008.** Flavonol glucosides in Allium species: A comparative study by means of HPLC–DAD–ESI–MS–MS, Food Chemistry, 1668–1673.
- [19] <http://www.thefreelibrary.com/Quercetin-%2BA%2BFlavonol-a01073822223>
- [20] **Llorach, R., 2008.** Characterisation of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole, Food Chemistry, 1028–1038.
- [21] **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.
- [22] <http://en.wikipedia.org/wiki/Flavonol>.
- [23] http://www.sifalibitkilervedogaltedavi.com/bitki_kimyasallari/Kuersetin.html.
- [24] **Joshi, S., Srivastava, R.K., Dhar, D.N., 1986.** The chemistry of prunus armeniaca, Br. Food Journal, 88:74-78.
- [25] **Asma, B.M., 2000.** Kayısı yetiştiriciliği, İnönü Üniversitesi, Evin matbası, Malatya, 1-65.
- [26] **Cemeroglu, B., Acar, J., 1996.** Fruit and vegetable processing technology., Turkish Association of Food Technologists, Ankara, 508.
- [27] **Cilingir, I., Güner, M., Dursun, E.** Important technical properties such as surface area, projected area, mass, dimensions some apricot varieties cultivated in Malatya region and determination of relations between these properties, Ankara University, Faculty of Agriculture, Ankara, 1239.
- [28] **Cemeroğlu, B., Yemenicioğlu, A., Özkan, M., 2001.** Meyve ve sebzelerin bileşimi, soğukta depolanmaları, Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi, Cilt 1, Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, Ankara, 189-202.

- [29] **Yücecan, S., 1994.** Kayısının beslenmemizdeki yeri ve önemi, Standart Dergisi, 61-63.
- [30] **Açkurt, F., 1998.** Sağlıklı beslenmede kayısının önemi ve yeni kayısı ürünleri, I. Kayısı Şurası, Malatya, Haziran 12-13, 21-29.
- [31] **Conti, A., Fortunato, D., Ortolani, C., Giuffrida, M.G., Pravettoni, V., 2001.** Determination of the primary structure of two lipid transfer proteins from apricot (*Prunus armeniaca*), J. of Chromatography B, 756, 123-129.
- [32] **Katona, F. Z., Sass, P., Molnar-Perl, I., 1999.** Simultaneous determination of sugars, sugar alcohols, acids and aminoacids in apricots by gas chromatography-mass spectrometry, J. of Chrom. A, 847, 91-102.
- [33] **Eksi, A., 1998.** Türkiye’de meyve suyu endüstrisi, Gıda teknolojisi, 2, 84-89.
- [34] **Radi, M., Mahrouz, M., Jaouad, A., 1997.** Phenolic content, browning susceptibility, and carotenoid content of several apricot cultivars at maturity. Horticultural Science, 32, 1087-1091.
- [35] **Fraser, P.D., Bramley, P.M., 2004.** The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids, Progress in Lipid Research, 43, 228-265.
- [36] **Vera, L.A.G., Enayde, A. M., Maria, O. S., Flavia, G. P., Rosimar, S. M., 2005.** Total phenolic and carotenoid contents in acerola genotypes harvested at three ripening stages, Food Chem., 90:4, 565-568.
- [37] **Coşkun, F., 2006.** Gıdalarda bulunan doğal koruyucular, Gıda Teknolojileri Dergisi 2, 27-33.
- [38] **Yen, G.C., Chen, H.W., Duh, P.D., 1998.** Extraction and identification of antioxidative components from Jue Ming Zi (*Cassia tora* L.), J. Agric. Food Chem., 46, 820-824.
- [39] **Garcia, C., Zafrilla, P., Tomas-Barberan, F.A., 1997.** Determination of authenticity of fruit jams by HPLC analysis of anthocyanins, Journal of the Science and Food Agric., 73, 207-213.
- [40] **Savova, S. T., Riborova, F., Gerova, M., 2005.** (+)-Catechin and (-) epicatechin in Bulgarian fruits, J. of Food Composition and Analysis, 18, 691-698.
- [41] **Simon, F., Perez, J., Hernandez, T., 1992.** Importance of phenolic compounds for the characterization of fruit nectars, J. of Agric. And Food Chem., 40, 1531-1535.

- [42] Ekstraksiyon Koşullarının Siyah Çayın Polifenolik Madde Dağılımı Ve Antioksidan Aktivitesi Üzerine Etkileri, Prof. Dr. Sedat Velioğlu, Nihal Türkmen, Ferda Sarı, 2007 Tübitak Projesi
- [43] **Prof. Dr. Atilla YILDIZ, Prof. Dr. Ömer Genç, Prof. Dr. Sema Bektaş, 1997.** Enstrümental Analiz Yöntemleri, Hacettepe Yayınları, 417-422.
- [44] **Özcimder, M., 2004.** Gaz ve Sıvı Kromatografileri, Kırıkkale.
- [45] **Skoog, D.A., Holler, F.I., Nieman, T.A., 1998.** Enstrümental Analiz İlkeleri, I. Baskı, 498-531, 725-739.
- [46] **Chapman, G.W., Horvat, R.J., Forbus, W.R., 1991.** Physical and chemical changes during the maturation of peaches, J. of Agric. Food Chem., 39, 867-870.
- [47] **Fernandez, B., Perez, J., Hernandez, T., Gomez, C., 1992.** Importance of phenolic compound for the characterization of fruit juices, J. of Agric. Food Chem., 40, 1531-1535.
- [48] **Bowen, H.J., Watkins, B.C., 1997.** Fruit maturity, carbohydrate and mineral content relationships with watercore in fuji apple, Postharvest Biology and Technology, 11, 31-38.
- [49] **Sharaf, A., Ahmed, F.A., El-Saadany, S.S., 1989.** Biochemical changes in some fruits at different ripening stages, Food Chemistry, 31, 19-28.
- [50] **Uzelag, V.D., Levaj, B., Mrkic, V., Bursac, D., Boras, M., 2007.** The content of polyphenols and carotenoids in three apricot cultivars depending on stage of maturity and geographical region, Food Chemistry, 102, 966-975.
- [51] **Uzelag, V. D., Pospisil, J., Levaj, B., Delonga, K., 2005.** The study of phenolic profiles of raw apricots and apples and their purees by HPLC for the evaluation of apricot nectars and jams authenticity, Food Chemistry, 91, 373-383.
- [52] **Arts, I. C.W., Van de Putte, B., Hollman, P. C. H., 2000.** Catechin contents of foods commonly consumed in the netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods, J. Agric. Food Chem., 48, 1746-1751.
- [53] **Sturn, K.D., Stampar, F., Usenik, V., 1999.** Evaluation of some quality parameters of different apricot cultivars using HPLC method, Acta Alimentaria, 28, 297-309.
- [54] **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.

- [55] **Riberio, S. M. R., 2008.** Phenolic compounds and antioksidant capacity of Brezilian mango (*Mangifera indica L.*) varieties, Food Chem., 110, 620-626.
- [56] **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.
- [57] **Özyürek, M., 2009.** Measurement of xanthine oxidase inhibition activitiy of phenolic and flavonoids with a modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method, Analytica Chimica Acta, Accepted Manuscript.
- [58] **Michalkiewicz, A., 2008.** Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey, J. of Chromatography A, 1187, 18-24.
- [59] **Riihinen, K., 2008.** Organ-specific distribution of phenolic compounds in bilbery (*Vaccinium myrtillus*) and ‘northblue’ blueberry (*Vaccinium corymbosum x V. angustifolium*), Food Chem., 110, 156-160.
- [60] **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.
- [61] **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.
- [62] **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.
- [63] **Grzelak, K., 2009.** Content of quercetin glycosides and fructooligosaccharides in onion stored in a cold room, European Food Research and Technology, 228, 1001-1007.
- [64] **Huang, L., 2008.** Purification of quercetin in *Anoectochilu roxburghii* (wall) Lindl using UMAE by high- speed counter-current chromatography and subsequent structure, Seperation and Purification Technology, 64, 101-107.
- [65] **Huang, Z., 2007.** Phenolic compound profile of selected vegetables frequently consumed by African Americans in the southeast Unnited States, Food Chem., 103, 1395-1402.

- [66] **Masa, A. ve Vilanova, M., 2008.** Flavonoid and aromatic characterisation of cv. Albari'n blanco (*Vitis vinifera* L.) Food Chemistry 107, 273–281.
- [67] **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.
- [68] **Tsimogiannis D., 2007.** Characterization of Flavonoid Subgroups and Hydroxy Substitution by HPLC-MS/MS, Molecules, 12, 593-606.
- [69] **Silva, S., 2005.** Identification of flavonol glycosides in winemaking by-products by HPLC with different detectors and htphenated with mass spectrometry, Ciencia Tec. Vitiv., 20 (1), 17-33.
- [70] **Midorikawa, K., 2001.** Liquid chromatography–mass spectrometry analysis of propolis, *Phytochem. Anal.* 12, 366–373.
- [71] **Wollenweber, E., 2002.** On the occurrence of exudate flavonoids in the borage family (Boraginaceae), Z. Naturforsch., 57, 445-448.
- [72] **Kahle, K., 2005.** Polyphenol profiles of apple juices, Mol. Nutr. Food Res., 49, 797-806.
- [73] **McMurrough, I., 1982.** Quantitative Analysis of Hop Flavonols Using High-Performance Liquid Chromatography, J. Agric. Food Chem., 30, 1102-1106.
- [74] **Anli, E., 2006.** Trans-resveratrol and other phenolic compounds in Turkish Red Wines with HPLC, Journal of Wine Research, 17, 117-125.
- [75] **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.
- [76] **Topçu, G., 2007.** A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*, Food Chem., 103, 816-822.
- [77] **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.
- [78] **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.

- [79] **Tian, X.-J., 2009.** Studies of intestinal permeability of 36 flavonoids using Caco-2 cell monolayer model, *International J. of Pharm.*, 367, 58-64.
- [80] **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.
- [81] **Roldan-Marin, E., 2009.** Onion high-pressure processing: Flavonol content and antioxidant activity, *LWT-Food Science and Technology*, 42, 835-841.
- [82] **Heimler, D., 2006.** Antiradical activity and polyphenol composition of local *Brassicaceae* edible varieties, *Food Chem.*, 99, 464-469.
- [83] **Martnez-Snchez, 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.
- [84] **Kamata, K., 2008.** Constituent from leaves of *Apocynum venetum* L., *J. Nt. Med.*, 62, 160-163.
- [85] **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.
- [86] **Huber, L. S., 2009.** Quantitative variation in Brazilian vegetable sources of flavonols and flavones, *Food Chem.*, 113, 1278-1282.
- [87] **Krafczyk, N., 2008.** Phenolic composition of rhubarb, *Eur. Food Res. Technol.*, 228, 187-196.
- [88] **Erdoğan, S., 2008.** Çeşitli kayısı örneklerinde bakır spesiasyonu (türlendirme), *Fen Bilimleri Ens. Kimya Anabilim Dalı, Doktora tezi.*

ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Elazığ'da doğdum. İlk ve orta öğrenimini Elazığ'da, tamamladım. 2005 yılında Fırat Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya bölümünde lisans öğrenimine başladım. 2009 yılında lisans programından mezun oldum ve aynı yıl Fırat Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'ünde yüksek lisans eğitime başladım.