

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HPLC-MS İLE ELAZIĞ-ÖKÜZ GÖZÜ ÜZÜMLERİNDE FLAVONOİDLERİN
TAYİNİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tayfun POLAT

(Enstitü No)

Anabilim Dalı: Kimya

Programı: Analitik Kimya

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet YAMAN

ELAZIĞ-2017

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HPLC-MS İLE ELAZIĞ-ÖKÜZ GÖZÜ ÜZÜMLERİNDE FLAVONOİDLERİN
TAYİNİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kim. Tayfun POLAT

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih:

Tezin Savunulduğu Tarih:

Tez Danışmanı:	Prof. Dr. Mehmet YAMAN
Diğer Jüri Üyeleri:	Prof. Dr. Habibe ÖZMEN
Diğer Jüri Üyeleri:	Doç. Dr. Selim ERDOĞAN

KASIM-2017

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezi olarak sunulan bu çalışmada, Elazığ yöresinden toplanan Öküzgözü üzümü örneklerinde kuersetin ve mirisetin tayini yapıldı. Çalışmanın ilk aşamasında üzüm örneklerinde kuersetin ve mirisetin tayini yapmak için ekstraksiyon işlemi uygulandı. Ayrıca kuersetin ve mirisetinin standart çözeltileri için Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (HPLC-MS) cihazında optimum koşullarda kalibrasyon grafikleri elde edildi. Aynı koşullarda ekstrakte edilen örnekler de HPLC-MS ile analiz edildi.

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, Maruf H. DEMİREL, Ayşe ŞAP' a teşekkür ederim.

Tayfun POLAT
ELAZIĞ-2017

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER	III
ÖZET	V
SUMMARY	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ	VII
TABLolar LİSTESİ	VIII
KISALTMALAR	IX
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Flavonoidlerin Bitkilerde Varlığı ve Fonksiyonları.....	3
2.2. Flavonollerin özellikleri.....	6
2.2.1. Kuersetin.....	6
2.2.2. Mirisetin.....	7
2.3. Öküzgözü Üzümü ve Özellikleri.....	8
2.4. Kuersetin ve Mirisetinin Özütleme ve Tayini	11
2.5. ANALİZ YÖNTEMLERİ	12
2.5.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	12
2.5.1.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Cihazı	13
2.5.1.2. Pompa Sistemleri	15
2.5.1.3. Numune Enjeksiyon Sistemleri.....	16
2.5.1.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Kolonları.....	16
2.5.1.5. Kolon Dolgu Maddelerinin	17
2.5.1.6. HPLC de Dedektörler	17
2.5.2. HPLC dedektörü olarak Kütle Spektrometresi.....	17
2.5.2.1. Moleküler Kütle Spektrometride İyon Kaynakları.....	18
2.5.2.1.1. Gaz Fazı İyon Kaynakları.....	19
2.5.2.1.1.1. Elektron İmpakt Kaynağı	19
2.5.2.1.1.2 Elektrosprey İyonlaştırma	21
2.5.2.2. Kütle Ayırıcıları	21
2.5.2.3. Kütle Spektrumlarının Karşılaştırılması ile Bileşiğin Tespit Edilmesi	25
2.5.2.4. Moleküler Kütle Spektrometrinin Uygulamaları	25
2.5.3. Literatürde Üzüm ve benzeri meyve örneklerinde fenolik madde tayini ile İlgili Yapılan Bazı Çalışmalar	26

3. MATERYAL METOT	32
3.1. Kullanılan Cihazlar ve Cam Malzemeler	32
3.2. Kullanılan Standart Çözeltiler ve Reaktiflerin Hazırlanması	32
3.3. Örneklerin Temini	33
3.4. Üzüm Örneklerinin Ekstraksiyonu	34
3.5. Kuersetin ve Mirisetin için Optimum Koşulların Tayini	35
4. BULGULAR	40
4.1. Üzümde Kuersetin ve Mirisetin Konsantrasyonları için bulunan sonuçlar	40
5. SONUÇ VE TARTIŞMA	42
6. ÖNERİLER	44
KAYNAKLAR	45
ÖZGEÇMİŞ	51

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi HPLC-MS İLE ELAZIĞ-ÖKÜZ GÖZÜ ÜZÜMLERİNDE FLAVONOİDLERİN TAYİNİ

Tayfun POLAT

Fırat Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet YAMAN

Yıl: 2017, Sayfa:

Bu çalışmada, Elazığ yöresine özgü olan öküz gözü üzümünde, antioksidan özellikleri bakımından önemli olanlardan kuersetin ve mirisetin bileşiklerinin tayini hedeflendi. Bu amaçla, üzüm örneklerinde kuersetin ve mirisetin bileşiklerinin tayini için metanol-askorbik asit-HCl çözücü karışımıyla ekstraksiyon yapıldı. Elde edilen ekstraktlardaki kuersetin ve mirisetin bileşikleri HPLC-MS yöntemiyle tayin edildi. HPLC-MS ile tayinde, enjeksiyon hacmi, akış hızı, fragmentasyon voltajı ve kolon sıcaklığı gibi parametrelerin optimum şartları uygulandı. 0.2-2 ppm aralığında farklı derişimlerdeki kuersetin ve mirisetin çözeltilerinin HPLC-MS ile analizi sonucu kalibrasyon grafikleri elde edildi. Gerekli hesaplamalar da yapılarak üzümde kuersetin ve mirisetin derişimleri hesaplandı.

Sonuç olarak, 10 farklı noktadan toplanan üzümde kuersetin ve mirisetin bileşiklerinin miktarları sırasıyla 0.7-2.3 ve 0.5-1.1 ppm aralığında bulundu.

Anahtar kelimeler: Öküzgözü Üzüm, Kuersetin, Mirisetin, HPLC-MS.

SUMMARY
MSc Thesis
DETERMINATION OF FLAVONOIDS IN ELAZIĞ-OKUZGOZU GRAPE BY
HPLC-MS
Tayfun POLAT
Fırat University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry
Supervisor: Prof. Dr. Mehmet YAMAN
Year: 2017, Page:

In this study, the determine of quercetin and myristine compounds in Okuzgozu grape being unique to Elazığ region were aimed, these components have high importance with regard to the antioxidant properties. For this purpose, the solvent mixture of methanol-ascorbic acid-HCl was used for the extraction of quercetin and myristicine compounds in grape samples. For for determination of quercetin and myristicine compounds in the obtained extracts, HPLC-MS device was used. In HPLC-MS determinations, the optimum conditions of parameters such as injection volume, flow rate, fragmentation voltage and column temperature were applied. Calibration graphs were obtained by analysis of quercetin and myristine solutions at different concentrations in range of 0.2-2.0 ppm, by HPLC-MS. quercetin and myristine concentrations in grapes were calculated from results of extractions and calibration graphs.

As a result, the amounts of quercetin and myristate in the grapes collected from 10 different locations were found in range of 0.7-2.3 and 0.5-1.1 ppm, respectively.

Keywords: Okuzgozu grape, Quersetine, Myrisetin, HPLC-MS.

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Bir flavonoidin genel yapısı	4
Şekil 2.2. Bazı flavonoid bileşikleri	5
Şekil 2.3. Bazı flavonol bileşiklerinin molekül yapıları	6
Şekil 2.4. Toplanma zamanında Öküzgözü üzümü	9
Şekil 2.5. Bir HPLC cihazı şeması.	14
Şekil 2.6. Gradient elüsyon uyumlu bir HPLC cihazının şeması	14
Şekil 2.7. HPLC için bir pistonlu pompa.....	15
Şekil 2.8. Elektron-impakt kaynağının yapısı.	20
Şekil 2.9. Dört kutuplu (Kuadropol) bir kütle ayırıcısı	25
Şekil 3.1. Öküzgözü üzümünün alındığı yerleri gösteren harita	33
Şekil 3.2. Ekstraksiyon yönteminin basamakları.....	34
Şekil 3.3. HPLC-MS ile kuersetinin SIM ve SCAN modundaki kromatogramları	37
Şekil 3.4. HPLC-MS ile kuersetinin 0,4-2,0 ppm aralığına ait kalibrasyon eğrisi	38
Şekil 3.5. HPLC-MS ile mirisetinin 0,2-2,0 ppm aralığına ait kalibrasyon eğrisi	38
Şekil 3.6. Kuersetinin HPLC-MS ile optimum şartlarda elde edilen kütle spektrumu ..	39
Şekil 3.7. Mirisetinin HPLC-MS ile optimum şartlarda elde edilen kütle spektrumu ...	39

TABLÖLER LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1. Polifenollerin ayrıntılı sınıflandırılması.....	4
Tablo 2.2. Kuersetin ve Mirisetinin bileşiklerinin genel özellikleri	7
Tablo 2.3. Öküzgözü üzümünün morfolojik özellikleri.....	8
Tablo 2.4. Literatürde, Elazığ bölgesi Öküzgözü üzümlerinin fermantasyonu süresince çözünen fenol bileşikleri konsantrasyonları, mg/l [26]	10
Tablo 2.5. Moleküler kütle spektroskopide kullanılan iyon kaynakları.....	19
Tablo 2.6. Bir elektron impakt kaynağındaki bazı tipik reaksiyonlar.....	21
Tablo 2.7. Moleküler Kütle Spektrometrinin Uygulamaları.....	26
Tablo 2.8. Literatürde bitki ekstraktlarında yapılan polifenol tayini çalışmaları.....	31
Tablo 3.1. MS parametreleri için uygulanan şartlar.....	32
Tablo 4.1. Kuersetin ve Mirisetinin tayini için HPLC-MS ile optimize edilen parametreleri	40
Tablo 4.2. Üzüm meyvesi örneklerinde bulunan kuersetin ve mirisetin konsantrasyonları, yaş esasa göre.....	41

KISALTMALAR

HPLC-MS: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi

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/gr

t.s: Tayin sınırı

ESI: Elektron bombardımanlı iyonlaştırıcı

APCI: Atmosferik Basınçta Kimyasal İyonlaştırma Sistemi

1. GİRİŞ

Bitki kökenli gıdalar antimikrobiyal, antioksidan, antitümör, antikanser, 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, mirisetin, kamferol ve benzeri bileşikleridir.

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 ve mirisetinin antioksidan özellikleri daha fazladır. Bu tür bileşiklerin doğru ve kesin olarak tayini ise ayrı bir öneme sahiptir. Bu amaçla, en çok kullanılan metod, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ve Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi (HPLC-MS) kullanılmaktadır. Bu iki metodun hem duyarlılık hem de doğruluk yönünden daha önce kullanılan diğer metodlardan üstün olması kaçınılmazdır. 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 öküzgözü üzümünde kuersetin ve mirisetin bileşiklerinin tayini yapılmıştır. Örnekleri tayin basamağına hazırlamak için, metanol-HCl-askorbik asit çözücü karışımı ekstraksiyon aracı olarak kullanılmış ve ölçümler HPLC-MS ile yapılmıştır.

HPLC-MS ile nicel analizden önce optimum parametreler belirlendi. Bu parametrelerden kuersetin ve mirisetin için enjeksiyon hacmi 5 mikrolitre, kolon

sıcaklığı 30 °C, fragmentör parametresi 140 V, akış hızı ise 0.6 mL/dk optimum değerler olarak belirlendi.

Bulunan sonuçlardan, en düşük kuersetin konsantrasyonu 0.7 ve en yüksek konsantrasyonun ise 2,3 mg/kg olduğu bulundu. Mirisetin için bulunan sonuçlar ise 0.5 ile 1.1 mg/kg aralığındadır.



2. GENEL BİLGİLER

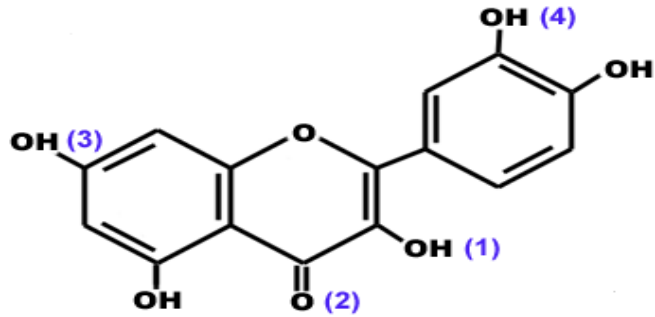
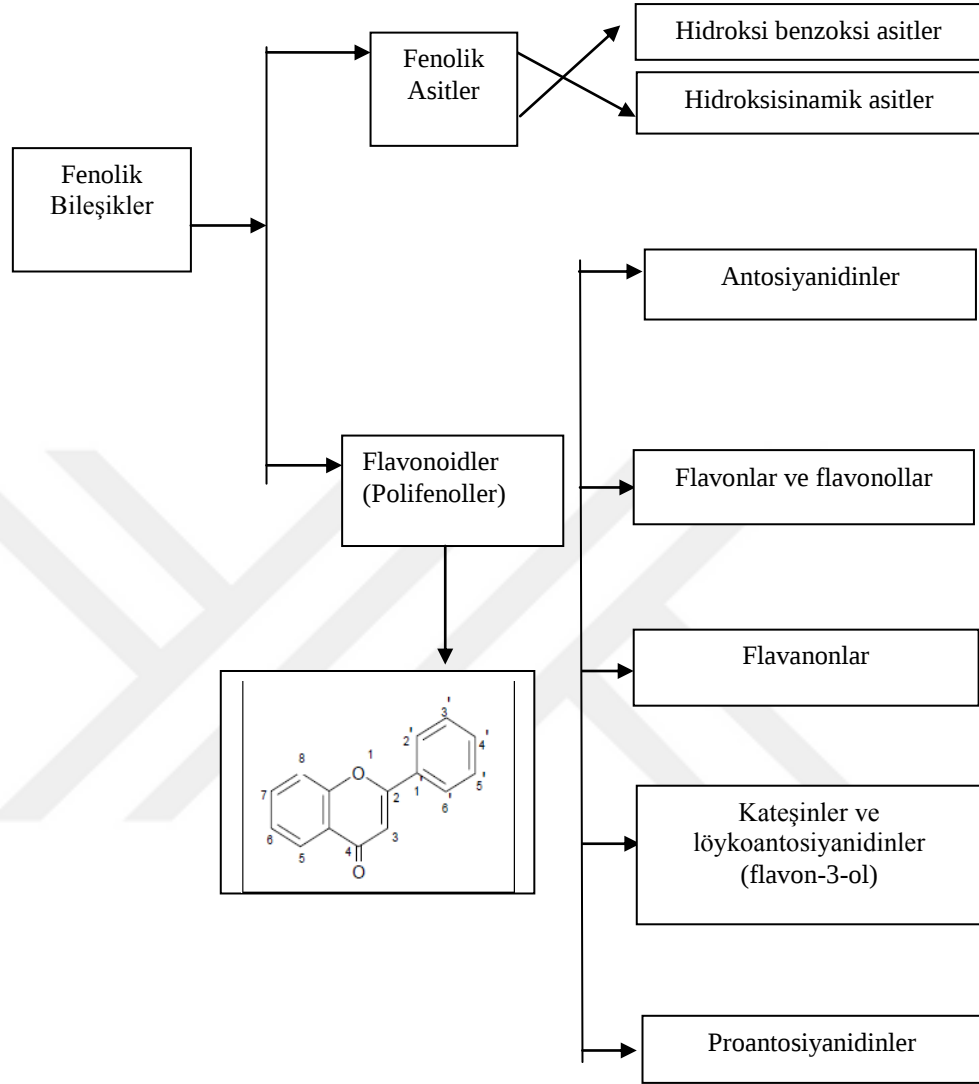
2.1. Flavonoidlerin Bitkilerde Varlığı ve Fonksiyonları

Bitkilerde bulunan ve sayıları 8000 den daha fazla olduğu rapor edilen polifenoller, antioksidan özelliklerinden dolayı serbest radikal oluşumunu engelleyerek kanser oluşumunda koruyucu rol oynarlar[12]. Oldukça aktif bileşikler olan serbest radikaller, denetim altına alınmazlarsa hücrenin membranlar, lipoproteinler, proteinler, kötü huylu kolesterol (LDL), karbohidratlar, DNA, RNA gibi yapısal ve fonksiyonel unsurlarıyla reaksiyona girerek onları tahrip ederler.

Biyoflavonoidler, yapılan çalışmalarda kılcal kan damarlarının dayanıklılığını arttırdığı görülmekle birlikte biyoflavonoidlere “vitamin P” adı verilmiştir [13]. Biyoflavonoidler radyasyondan kaynaklı oluşabilecek lösemi hastalığında koruyucu görevini üstlenmiştir. Bunu da radyoaktif olan Sr 90’ı uzaklaştırarak kemik iliğinde birikmesini engelleyerek yapmıştır [13]. Tablo 2.1’ de, polifenollerin ayrıntılı sınıflandırılması yapılmıştır.

Flavanoidler ya da diğer adıyla flavon türevlerinin özellikle bitkisel gıdalarda bulunan yapısında C₆–C₃–C₆ (difenilpropan) formunda iki benzen halkası vardır. Bunlar 2-fenil kromon (flavonlar ve flavonoller) ya da 2-fenil kromanon (flavononlar ve flavononoller) çekirdeğinin oksitlenmesiyle oluşan benzen halkasıyla bağlanmış fenolik bileşiklerdir [6]. Flavonoidler, doymamışlık derecesi, hidroksil grubu sayısı ve üçlü karbon atomunun oksidasyon derecesine bağlı olarak farklılık göstermektedir. Bu bileşikler bitkilerde glikozitleri halinde bulunan sarı renkli bitkisel pigmentlerdir. Flavonoidlerin tayinini HPLC ile ilk kez 1976 yılında Fisher ve Wheaton tarafından yapılmıştır [14]. Bir flavonoidin genel yapısı Şekil 2.1’ de verilmiştir.

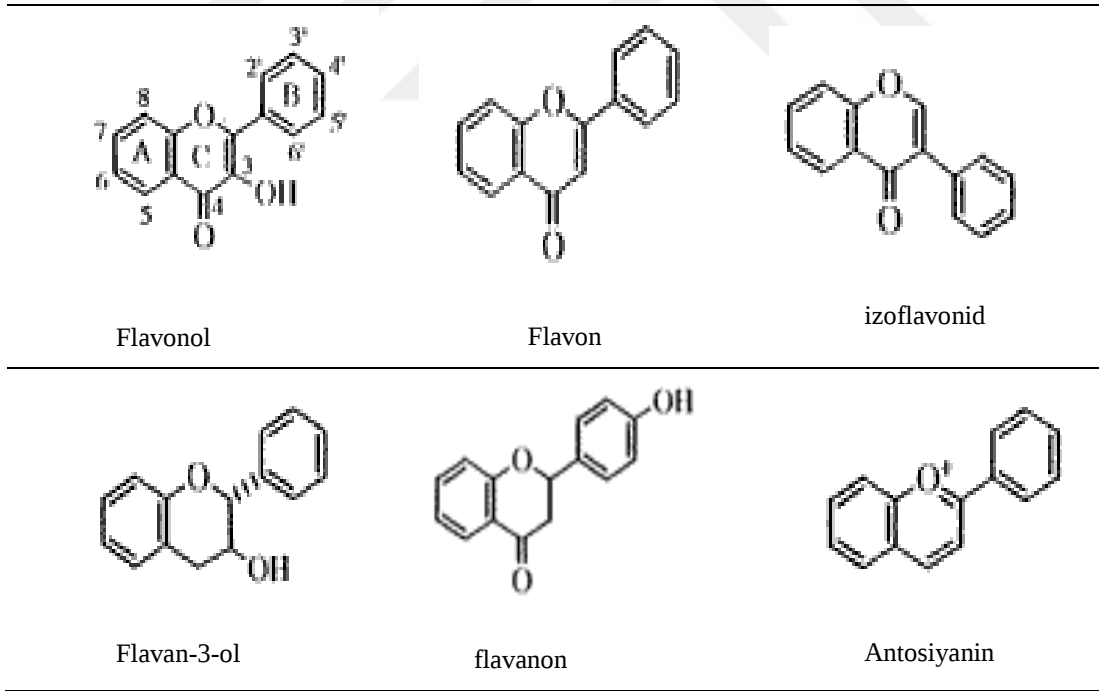
Tablo 2.1. Polifenollerin ayrıntılı sınıflandırılması



Şekil 2.1. Bir flavonoidin genel yapısı

Flavonoidler, hücrelere zarar veren radikallerle etkileşerek gösterdikleri antioksidan özellikleri sayesinde radikalleri etkisiz hale getirirler. Aynı zamanda antibiyotik etkisi göstererek virüs ve bakterilerin aktifliklerini engellerler. C vitamininin vücut tarafından kullanımına yardımcı olan flavonoidler bağışıklık sistemini güçlendirip ülser ve ishal gibi hastalıklara karşı direnç sağlayarak romatizmal hastalıklarda ilaç gibi davranırlar. Vücut içerisinde alerjik reaksiyonların önlenmesinde etkili olurlar. Ayrıca kanserli hücrelerin çoğalmasını engelleyerek vücut için önemli olan enzimlerin aktivitelerini düzenlerler. [1, 6, 14, 15].

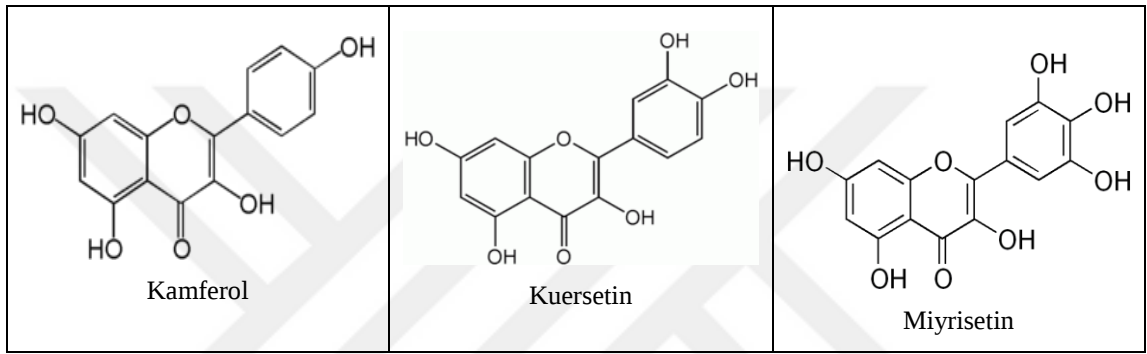
Holman ve arkadaşları günlük olarak flavonol ve flavonların 23 mg alınması gerektiğini söylemiştir [16]. Aynı zamanda Hollanda’ da kuersetin flavonolünün günlük kullanımının 16 mg olduğunu söylemiştir [16]. Ortalama olarak yiyeceklerle flavonoid alımının günde 26 mg [16] olduğu belirlenirken, kırmızı soğan, domates v.b. kırmızı ve sarı parlak renkli yiyeceklerde yüksek olarak bulunan flavonoidin kuersetin olduğu bulunmuştur [16, 17]. Bazı flavonoid alt türlerinin yapıları Şekil 2.2’ de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Bazı flavonoid bileşikleri

2.2. Flavonollerin özellikleri

Flavonoidlerin alt grubunda yer alan flavonoller 3 adet hidroksil grubu içeren flavonoidlerdir. Kamferol, kuersetin, miyrisetin ve isorhamnetin gibi bileşikler flavonollere örnek olarak verilebilir. Şekil 2.3'te bazı flavonol bileşiklerinin molekül yapıları verilmiştir.



Şekil 2.3. Bazı flavonol bileşiklerinin molekül yapıları

2.2.1. Kuersetin

Kuersetin, bitkisel yiyecek ve meyvelerde en bol bulunan flavonoiddir. Flavonoid ailesine mensup kuersetin 3 halka ve 5 hidroksil grubundan oluşur. Kuersetin aynı zamanda diğer flavonoidlerin yapı taşıdır. Kuersetin yiyeceklerde glukozla birleşmiş olarak bulunur. Alınan kuersetinin ancak küçük bir bölümü kana karışır. Aynı zamanda flavonol grubundan olan, rutin ve kuersitrin glikozitlerinin aglikonlarını oluşturan, oldukça önemli bir flavonoid bileşiğidir. Tablo 2.2' de kuersetin bileşiğinin genel özellikleri verilmiştir. Kuersetin elma, çay, soğan, kuruyemiş, dutgiller, karnabahar, lahana, kapari, kayısı, 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 bağlama özelliğinden dolayı güçlü bir antioksidandır. Bu özelliğiyle kalp ve damarlarla ilgili hastalıklardan koruduğu

bilinmektedir [18]. Kuersetin iltihaplanmayı hemen engelleme durumundan dolayı önemli bir iltihap önleyici aktiviteye sahip olduğu kanıtlanmıştır. Kuersetin, histamine ve diğer alerjik/iltihaplanmanın hem üretimi hem de serbest bırakılmasını yavaşlattığı örnek olarak gösterilebilir [19]. Ayrıca, vitamin C gibi sitrat döngüsüne katılarak antioksidan özellik gösterir. Kanseri önleyici özellikte olup, akut semptomlar için de kullanılmaktadır. LDL kolesterol oksidasyonunu azaltıp kalp hastalıklarından koruyucu özelliği araştırılmaya devam etmektedir [3, 7-11, 18-20].

2.2.2. Mirisetin

Flavonoid grubundan olan miyrisetin doğal olarak bulunan bir flavonoldür. Genel olarak meyvelerde ve özellikle de üzüm ve çilek gibi kabuksuz meyvelerde, şifalı bitkiler ve diğer bitkilerde bulunmaktadır [7-9,11]. Bunlara ek olarak ceviz de zengin bir miyrisetin kaynağıdır. Miyrisetin antioksidan özellik göstermektedir ve bitkilerinde yapısında genel olarak glikozitleri halinde bulunur. Araştırmacıların yapmış oldukları çalışmalar neticesinde fazla miktarda miyrisetin tüketiminin prostat kanserinde azalma ile bağlantılı olduğu görülmüştür. Bunun dışında hücre içi ile alakalı olarak yapılan çalışmalarda da LDL kolesterolünü düşürebilmek için yüksek derişimdeki miyrisetin önerilmiştir [13]. Tablo 2.2' de mirisetin bileşiminin genel özellikleri verilmiştir.

Tablo 2.2. Kuersetin ve Mirisetinin bileşiklerinin genel özellikleri

	Kuersetin	Mirisetin
Molekül formülü	$C_{15}H_{10}O_7$	$C_{15}H_{10}O_8$
Molekül ağırlığı	302 g/mol	318 g/mol
Faz	Katı	Katı
Erime noktası	316 °C	-
Kaynama noktası	-	-
Diğer çözücülerde çözünürlükleri	Su: çok az çözünür Metanol, etanol, dietileter gibi organik çözücülerde iyi çözünür.	Su: çok az çözünür Metanol, etanol, dietileter gibi organik çözücülerde iyi çözünür.
Görünüşü	Sarı renk	Sarı renk
IUPAC adı	2-(3,4- dihydroxyphenyl)- 3,5,7-trihydroxy- 4H- chromen- 4-one	3,5,7-Trihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)- 4-chromenone

2.3. Öküzgözü Üzümü ve Özellikleri

Üzüm, bitkiler âleminde Viteceae familyasının *Vitis vinifera* L. türüne bağlı, *Vitis vinifera sitiva* adı verilen kültür asmasının salkım durumunda bulunan meyvesidir. Asma hemen hemen her çeşit toprakta yetişen çok yıllık bir bitkidir. Avrupa, Asya ve Amerika kıtasına yayılmış birçok türü vardır. Binlerce yıl boyunca oluşan mutasyonlar ve insanların müdahaleleri sonucu birçok asma kültür çeşidi oluşmuştur. Bu kültür çeşidi üzümlerinin şekil ve rengine, yaprakların şekil ve büyüklüğüne ve diğer niteliklerine göre birbirlerinden ayrılırlar [21-25] Tablo 2.3’ te Öküzgözü üzümünün morfolojik yapı özellikleri verilmiştir [22, 23].

Tablo 2.3. Öküzgözü üzümünün morfolojik özellikleri.

Tane Özelliği	
Renk	Gri puslu siyah
Şekil	Eliptik
Büyüklik	İri, 6-7 g
Çekirdek	2-3
Tad	Çeşide özgü tat
Salkım Özelliği	
Şekil	Kanatlı Konik
Büyüklik	İri, 400-500 g
Sıklık	Dolgun
Budama	Yarı-uzun/Kısa
Yöre	Elazığ, Malatya



Şekil 2.4. Toplanma zamanında Öküzgözü üzümü

Tablo 2.4. Literatürde, Elazığ bölgesi Öküzgözü üzümlerinin fermentasyonu süresince çözünen fenol bileşikleri konsantrasyonları, mg/l [26]

Bileşikler	Maserasyon Süresi (Gün)								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Flavanoller									
(+)-kateşin	3,57	3,61	5,37	11,90	19,46	32,57	45,41	49,54	55,96
(-)-epikateşin	0,85	1,84	3,39	4,85	8,05	13,92	20,29	21,77	22,02
Prosiyanidin B3	0,04	0,54	0,90	1,61	1,82	2,64	3,85	4,15	6,88
Prosiyanidin B1	0,24	0,95	2,12	4,94	6,76	12,96	15,90	22,49	25,21
Prosiyanidin B4	0,01	0,62	0,88	0,98	1,03	1,48	1,94	2,15	2,65
Prosiyanidin B2	0,39	0,74	1,41	3,69	4,73	7,69	10,12	11,59	15,16
Fenol Asitleri									
Gallik Asit	0,49	0,74	1,60	2,31	3,39	6,60	10,81	11,22	13,67
Protokatesik Asit	0,13	0,13	0,19	0,34	0,41	0,49	0,70	0,91	1,44
Vanilik Asit	0,03	0,09	0,15	0,25	0,35	0,47	0,60	0,66	1,08
Sirinjik Asit	0,07	0,11	0,18	0,27	0,53	0,89	1,54	2,10	2,88
cis-Kaftarik Asit	0,56	0,62	0,97	1,13	1,36	2,01	2,69	3,13	3,41
trans-Kaftarik Asit	13,77	20,26	24,33	29,03	31,03	43,79	54,86	62,61	64,16
cis-Kutarik Asit	0,78	1,30	1,73	1,81	2,06	2,43	3,12	3,48	3,96
trans-Kutarik Asit	10,68	11,11	15,37	14,80	15,43	22,61	31,16	35,83	38,88
Kafeik Asit	0,15	0,33	0,51	0,57	0,63	0,86	1,23	1,52	2,31
Para-Kumarik Asit	0,04	0,05	0,10	0,14	0,17	0,25	0,41	0,45	0,61
Ferulik Asit	0,01	0,03	0,06	0,18	0,22	0,29	0,38	0,44	0,64
Sinapik Asit	0,01	0,03	0,08	0,19	0,19	0,29	0,45	0,54	0,72
Flavonoller									
Mirisetin-3-glik	0,11	0,13	0,29	0,39	0,73	1,87	2,50	2,62	3,04
Kuersetin-3-glik	0,01	0,05	0,09	0,18	0,40	0,85	1,51	1,64	2,00
Mirisetin	0,05	0,05	0,15	0,21	0,23	0,29	0,38	0,54	0,64
Kaemferol-3-glik	0,00	0,00	0,05	0,08	0,10	0,12	0,14	0,17	0,25
İzoramnetin-3-glik	0,07	0,07	0,15	0,15	0,17	0,24	0,39	0,52	0,79
Kuersetin	0,00	0,02	0,14	0,27	0,34	0,46	0,8	0,79	1,47
Kaemferol	0,00	0,00	0,00	0,01	0,02	0,06	0,09	0,15	0,27
Toplam	32,05	43,41	60,18	80,28	99,60	156,12	211,13	241,02	270,10

2.4. Kuersetin ve Mirisetinin Özütlenmesi ve Tayini

Bitkisel merkezli fenolik bileşikler içeren gıdalardan çeşitli çözücü/çözücü karışımları kullanılarak katı-sıvı özütlemesi ile kuersetin ekstrakte edilmektedir. Ancak polifenollerin sayısı çok fazla olduğundan elde edilen ekstraktları saflaştırmak ve fenolik olmayan bileşiklerden ayırmak gereklidir. Ekstraksiyon için etanol, metanol, aseton ve etilasetatin kullanıldığı organik çözücüler ve bu çözücülerin sulu karışımları kullanılmaktadır [27]. Özütleme kesikli ve sürekli olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır.

Kesikli özütleme 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.

Özütleme hızı küçük partikül boyutunda artmaktadır. Ortalama partikül boyutunun 0,01-0,1 mm arasında olması genellikle ekstraksiyon hızını artırmaktadır [27]. Sıcaklığın artması çözücü vizkozitesini düşüreceğinden, çözücünün bitkisel materyale difüzyon hızını ve fenolik bileşenin çözünürlüğünü artırmaktadır. Ancak 80-100 °C' nin üzerindeki sıcaklıklarda polifenollerin yapılarını değiştirebileceği bildirilmiştir [27].

Ekstraksiyon süresi polifenol geri kazanımını etkileyen diğer bir faktördür. Ekstraksiyon süresi 1 dakikadan 24 saate kadar değişmektedir [27]. Uzun süreli ekstraksiyon çözücü sistemine koruyucu koyulmadığında, fenoliklerin oksitlenme olasılığını arttırmaktadır. Polifenollerin gıda ürünlerinden geri kazanımı ayrıca örneğin çözücüye oranından da etkilenmektedir. Organik yapılar için örnek hazırlama işleminin temelini ekstraksiyon basamağı oluşturur. Çözünabilen 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.

2.5. ANALİZ YÖNTEMLERİ

Bitkisel örneklerdeki polifenollerin toplam miktarının tayini yapılmak isteniyorsa spektrofotometrik bir teknik olan Folin-Ciocalteau 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. HPLC metodunda dedektör olarak UV, floresans, iletkenlik dedektörleri kullanılabilmekle birlikte gerek duyarlık ve gerekse doğruluk yönünden yüksek performansa sahip olan kütle dedektörlü HPLC dir (HPLC-MS).

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 [29-30].

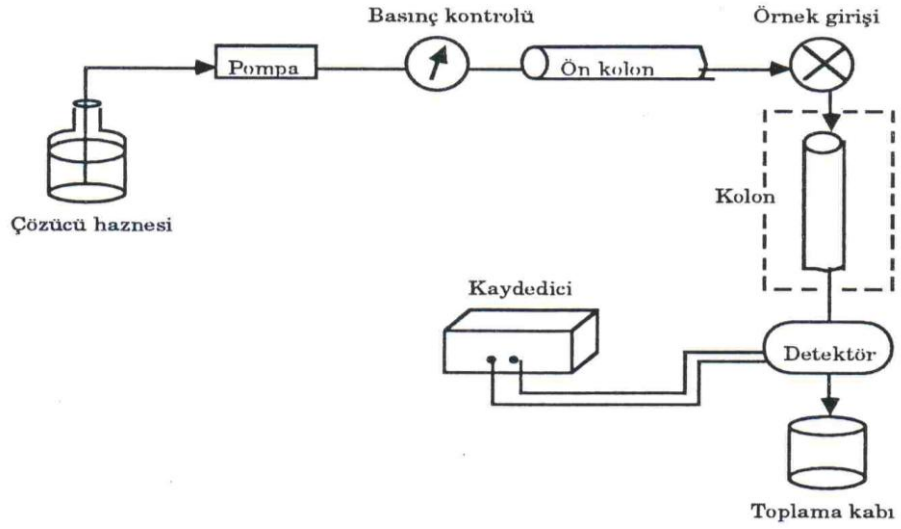
Sıvı kromatografisinde kolon verimi dolgu maddesinde kullanılan tanecik boyutunun küçültülmesi (normalde 100–250 μm ' den 1–15 μm ' ye) ile önemli derecede artmaktadır. Ancak tanecik çapı 3–10 μm ' ye kadar küçük olan dolgu maddeleri 1960' lı yılların son dönemlerinde kullanılmaya başlanmıştır. Tanecik 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 [28]. 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.

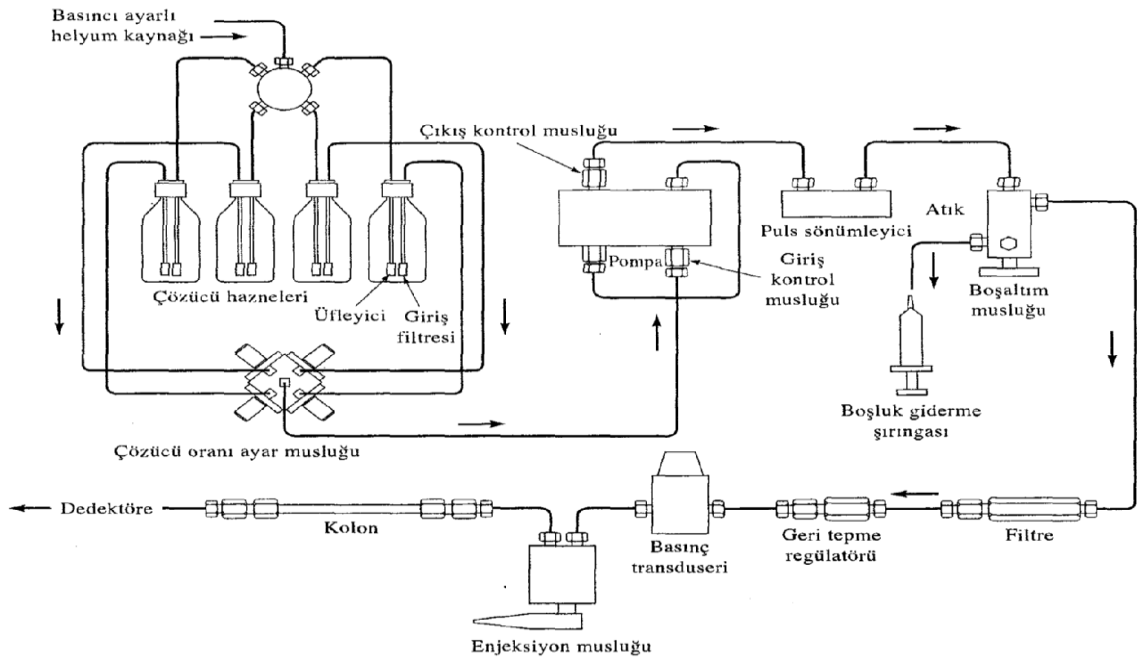
2.5.1.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Cihazı

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.

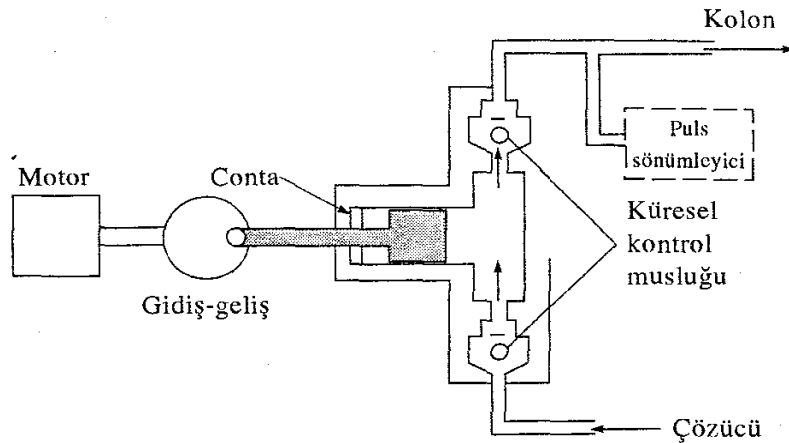


Şekil 2.6. Gradient elüsyon uyumlu bir HPLC cihazının şeması

2.5.1.2. Pompa Sistemleri

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

Sıvılar çok fazla sıkıştırılmadığından dolayı HPLC pompaları tarafından üretilen basınç bir patlama tehlikesi oluşturmadiğından sistemin parçalarından herhangi birinde meydana gelecek bir çatlak, sadece çözücünün dışarı sızmasına neden olur. Ancak sızıntılar bir yangın tehlikesi oluşturabilir. 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) [30]. 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.

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

HPLC de az da olsa kullanılan diğ er pompa türleri Sürgülü ve pnömatik pompalardır. Pnömatik pompalar, gradiyent elüsyona uygun değıldir ve basınçları genellikle 135 atm' den daha düşüktür.

2.5.1.3. Numune Enjeksiyon Sistemleri

Genellikle sıvı kromatografik ölçümlerinin kesinliğıni, numunenin kolon dolgu maddesine taşınmasının tekrarlanabilirliğı belirler. A ır  numune yüklenmiş kolonlarda görülen bant genişlemesi de kesinliğı etkiler. Bu yüzden kullanılan hacim oldukça küçük olmalıdır. Ayrıca, sistemin basıncı d   r lmeden numunenin sisteme girişi sağılanmalıdır.

2.5.1.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Kolonları

Sıvı kromatografisi kolonları normal olarak düzgün i  çaplı paslanmaz  elik borulardan yapılır. Fakat bazen de kalın cidarlı cam borularda kullanılır.

Analitik Kolonlar: Sıvı kromatografisi kolonlarının çoğunun boyu 10–30 cm, iç çapı 4-10 mm ve kolon dolgu maddesinin b y kl ğı 5–10  m arasındadır. Normalde kolonlar düzgündür ve gerektiğı yerlerde kolonların birbirine eklenmesiyle kolonun boyu artırılabilir. Son yıllarda daha küçük boyutlarda yüksek hızlı ve yüksek performanslı kolonlar üretilmektedir. Bu kolonların i  çapı 1–4.6 mm, tanecik b y kl ğı 3–5  m ve boyu 3–7.5 cm arasındadır. Bu kolonlarda çözücü sarfiyatı minimumdur.

Emniyet Kolonları ( n 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 bağılanan bileşenleri tutmaktır. Ayrıca hareketli fazı, durgun faz ile doyurarak analitik kolondaki çözücü kaybını en aza indirmektedir.

2.5.1.5. Kolon Dolgu Maddelerinin

Sıvı kromatografisinde iki tip kolon dolgu maddesi kullanılmaktadır. Bunlar;

- i. Film Dolgular
- ii. Gözenekli Dolgular

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

2.5.1.6. HPLC de 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 başlıca parametreler vardır;

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

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 [28].

2.5.2.1. Moleküler Kütle Spektrometride İyon Kaynakları

Tablo 2.5 te gösterildiği gibi, moleküler kütle spektrometride iyon kaynakları iki bölüme ayrılır [30]:

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.

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 2.8’ de bir elektron impakt kaynağının yapısı görülmektedir [30]. Elektron impakt kaynağındaki bazı tipik reaksiyonlar Tablo 2.6’ da görülmektedir [30].

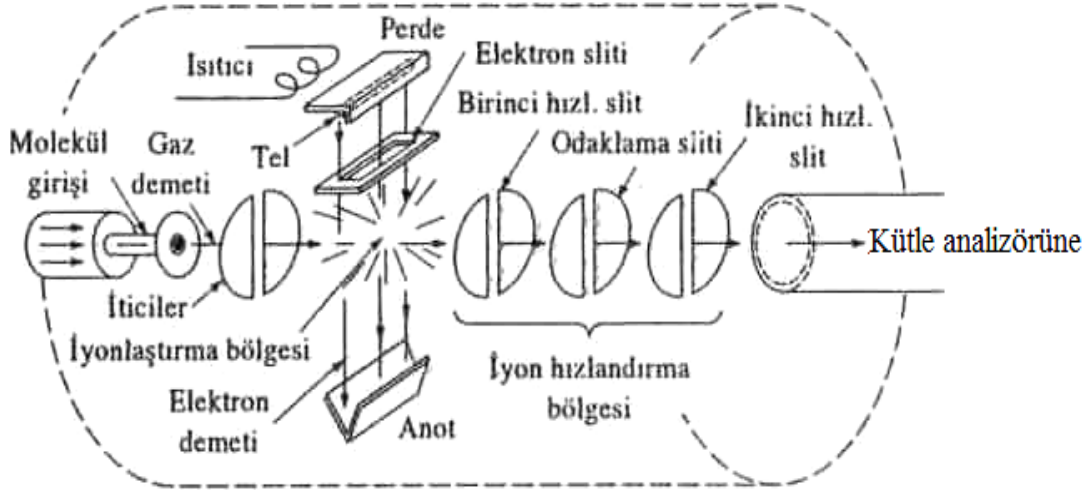
Bu yöntemde;

➤ 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 2.8. Elektron-impakt kaynağının yapısı.

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 hallere 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.

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.

Moleküler iyon oluşumu	
Parçalanma	$ABCD + e^- \rightarrow ABCD^+ + 2e^-$ $ABCD^+ \rightarrow A^+ + BCD^+$ $\begin{array}{l} \rightarrow A^+ + BCD^+ \rightarrow BC^+ + D^+ \\ \rightarrow CD^+ + AB^+ \rightarrow B^+ + A^+ \\ \rightarrow AB^+ + CD^+ \rightarrow D^+ + C^+ \\ \rightarrow C^+ + D^+ \end{array}$
Parçalanmadan sonra yeniden düzenlenme	$ABCD^+ \rightarrow ADBC^+ \rightarrow \begin{array}{l} BC^+ + AD^+ \\ AD^+ + BC^+ \end{array}$
Parçalanmadan sonra çarpışma	$ABCD^+ + ABCD \rightarrow (ABCD)^{2+} \rightarrow BCD^+ + ABCDA^+$

2.5.2.2. Kütle Ayırıcıları

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

Kullanılan kütle ayırıcıları;

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

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 2.9).

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

Bir kütle ayırıcısının ayırıcılığı, R,

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

eşitliğindeki formül ile hesaplanır.

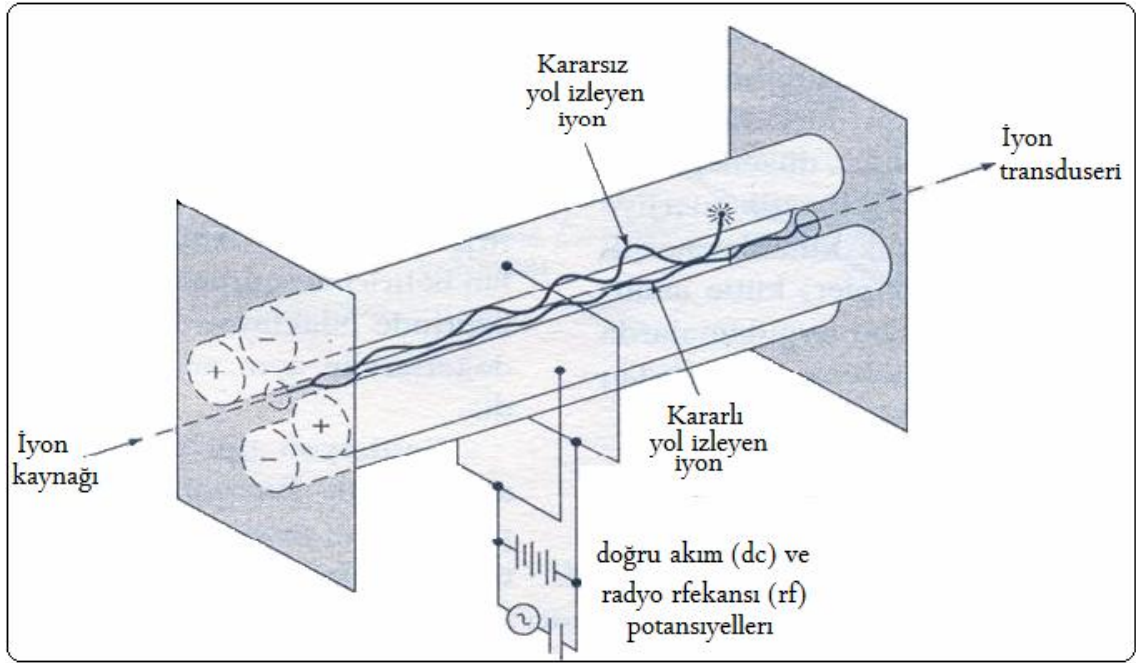
Ayırıcılığı 3000 olan bir ayırıcı, kütlesi 3000 ile 3001 olan iki iyonu pik yüksekliklerinin en çok yüzde 10' u kadar birçok çakışma ile birbirinden ayırıyor demektir.

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 arttırılabilir 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 2.9. 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.

2.5.2.4. Moleküler Kütle Spektrometrinin Uygulamaları

Moleküler kütle spektrometrinin uygulamaları çok geniş ve kapsamlıdır. Tablo 2.7' de, kütle spektrometrinin bu geniş kullanım alanına fikir vermek üzere, bu uygulamalardan bazıları listelenmiştir [29]. Uygulamalardan en çok rastlanılardan bazı önemli olanları verilmiştir.

Tablo 2.7. Moleküler Kütle Spektrometrinin Uygulamaları.

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 yaslarının belirlenmesi.
10. Aerosol oluşturan partiküllerin analizi.
11. Yiyeceklerde pestisit kalıntılarının tayini.
12. Su kaynaklarında uçucu organik maddelerin izlenmesi.

2.5.3. Literatürde Üzüm Ve Benzeri Meyve Örneklerinde Fenolik Madde Tayini İle İlgili Yapılan Bazı Çalışmalar

Chapman ve ark. (1991), Fernandez ve ark. (1992), Bowen ve ark, (1997)'nin 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 [31-33].

Sharaf, (1989), Uzelag ve ark. (2005), (2007)'nin 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 karotenoitlerin, kolayca buharlaşan türün oluşmasında öncülük eden çok sayıda kompleks biyokimyasal reaksiyonlar içerdiği 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 [34-36].

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 polifenollerin analizlenmiş ve analizlerde olgunlaşma süresi boyunca fenolik madde miktarında düşüş olduğu gözlenmiştir [36-38].

Bonaccorsi ve arkadaşları (2008) Allium (soğangiller familyası) türlerindeki (dört çeşit kuru soğan, 2 çeşit yeşil soğan ve sarımsak) flavonol glikosidlerini (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 mg/kg diğer türde ise 600-700 mg/kg 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 [9].

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 [8].

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 µg/lt olarak bulmuşlar. Tarhana ve ısırgan otunda kuersetin içeriği sırasıyla 5.92 ve 0.87 mg/100 gr 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 [39].

Riberio ve arkadaşları (2008) Brezilya mango türlerinin fenolik bileşiklerinin içeriğini ve antioksidan kapasitelerini LC-ESI-MS cihazıyla analiz etmişler [40].

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 [41].

Özyürek ve arkadaşları (2009) modifiye edilmiş CUPRAC yöntemiyle fenolikler ve flavonoidlerin ksantin oksidazın inhibasyon aktivitesini UV-görünür bölge cihazıyla ölçmüşler [42].

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 mg/kg olarak, çalı balında ise yine sırasıyla 1.6, 0.4 ve 0.3 olarak tayin etmişler [43].

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 (antosiyantinler, proantosiyantinler, flavonoller) ve hidroksisinnamik asitlerin dağılımını HPLC-DAD kullanarak analiz etmişler. *Vaccinium corymbosum* ' nin çiçeklerinde kuersetin 1553 µg/gr, meyvenin kabuğunda kuersetin 531 µg/g, meyvenin etli kısmında ve kök gövdesinde kuersetin tayin sınırının altında, yeşil yapraklarda kuersetin 1784 µg/g, kırmızı yapraklarında 3530 µg/g olarak tespit etmişler. Yaban mersininde ise çiçeklerinde kuersetin 130 µg/g, meyvenin kabuğunda kuersetin 159 µg/gr, meyvenin etli kısımlarında kuersetin 12 µg/g, yeşil yapraklarında kuersetin 3369 µg/g, kırmızı yapraklarında ise kuersetin 10369 µg/g olarak tayin etmişler [44].

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/lt, LOQ değerleri sırasıyla 29.1, 21.9 ve 49.8 ng/lt olarak tayin etmişler. Dört farklı üzüm çeşidinde flavonol konsantrasyonları rutin için 29.11-214.4 µg/g, miyrisetin için nd-44.38 µg/g, fesitin için nd-3000 µg/g, kuersetin ve morin için nd (tayin sınırının altında) olduğunun tespit etmişler [45].

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 [46].

Olsen ve arkadaşları (2009) HPLC-DAD-ESI-MS ile karalâhana bitkisinin kıvrık kıvrık olan kısmında kuersetin ve kamferolün glikozitlerini ve p-kumarik asit, ferulik asit, sinopik asit ve kafeik asit türevlerini içeren otuz iki fenolik bileşik sebzedeki fenolik bileşiklerin tümünün bir tanımlamasını içeren eski yayınları deneysel olarak teşhis etmişler. Farklı ekstraksiyon koşullarının etkisini incelemişler. Karalahanadaki toplam flavonol ve hidroksisinnamik asit içerikleri sırasıyla taze ağırlık olarak 646 ve 204 mg/100 g olduğunu bulmuşlar. Yalnız flavonoidlerin içeriği, (kamferol-3-sinapoyl-diglukozit-7-diglukozit (%18.7) ve kuersetin-3-sinapoyl-diglukozit-7-diglukozit(%16.5), 2' den 159 mg/100gr' a kadar değişmekte olduğunu tespit etmişler. Asidik hidrolizden sonra iki flavonol aglikonu karalahanada kuersetin ve kamferol toplam içeriği sırasıyla 44 ve 48 mg/100 g olarak tayin etmişler [47].

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 [48].

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 ^1H 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 [49].

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 [50]. Tablo 2.8 de farklı bitki ekstraktlarında polifenol tayiniyle ilgili literatürde yapılan çalışmalar diğer çalışmalar verilmiştir.

Tablo 2.8. Literatürde bitki ekstraktlarında yapılan polifenol tayini çalışmaları

Bitki	Tayin edilen polifenol	Referans
<i>Vitis vinifera</i> L.)	Dihidro flavonoller, kuersetin türevleri ve kamferol türevleri	51
<i>Melissae herba</i>	Rosmarinik, <i>p</i> -kumarik, ferulik, kaffeik and klorojenik asit, kuersitrin	52
<i>Origanum vulgare</i>	Kuersetin, fisetin, kamferol, luteolin, apigenin, chrysin, eriodiktiyol, hesperetin, taksifolin, kateşin ve epikateşin	53
Beyaz üzüm türleri	Miyrisetin, miyrisetin-3-ramnoz, kamferol, kamferol-3-glukoz, kamferol-3-rutinoz, kuersetin, kuersetin-3-ramnoz, kuersetin-3-glukoz ve gallik asit	54
Propolis	kuersetin, sinnamik asit ve diğer polifenoller	55
<i>Heliotropium pycnophyllum</i> , <i>Heliotropium stenophyllum</i>	Apigenin, luteolin, trisetin, galangin, kamferol, kuersetin, pinosembrin, naringenin, erioditiyol	56
<i>Elma</i>	Antioksidan kapasitesini incelemişler, dihidrokalgonlar, flavan-3-oller, kuersetin	57
<i>Humulus lupulus</i>	Miyrisetin, kuersetin, kamferol	58
Kırmızı şarap	Resveratrol, kuersetin, kateşin epikateşin, rutin	59
<i>Tilia rubra</i> ve <i>Tilia argentea</i>	Astragalin, kuersetin-3-7-dirhamnosid, isokuersitrin, rutin, kamferol-3-7-dirhamnosid	60
<i>Pistacia terebinthus</i>	Apigenin, luteolin, luteolin-7-o-glukosit, kuersetin, kuersetin-3-metil eter-7-o-glukosit,	61
<i>Zizyphus jujuba</i> , <i>Zizyphus spina-christi</i>	Kamferol, kuersetin, ploletin türevleri	62
<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	63
Caco-2 cells	Tangeretin, wogonin, khrisin, apigenin, luteolin, kamferol, kamferid, tamariksetin, kuersetin, miyrisetin, morin, isokuersetrin, rutin, hesperetin, naringin, epikateşin	64
<i>Morus alba</i> L.	Klorojenik asit, kuersetin glikosit, rutin, isokuersitrin, astragalin, kuersetin 3-(6-malonilglukoz), kamferol 3(6-malonilglukozit)	65
<i>Allium cepa</i> L.	Kuersetin, kuersetin-4-glukosit, kuersetin-3,4'-diglukosit	66
<i>Brassicaceae</i>	Gallik asit, kamferol ve kuersetin glikozitleri	67
<i>Eruca vesicaria</i> ve <i>Diplotaxis tenuifolia</i>	Kuersetin türevleri	68
<i>Apocynum venetum</i> L.	Kuersetin glikozitleri	69
<i>Ginko biloba</i>	Kuersetin dihidrat, kamferol, isorhamnetin, rutin	70
Brezilya' daki yazlık ve kışlık sebzeler	Kuersetin, kamferol, apigenin	71
<i>Rheum rhabarbarum</i> L. ve <i>Rheum rhaponticum</i> L.	Resveratrol, rutin, kuersetin-3'-o-b-d-glukopiranosit, kateşin	72

3. MATERYAL METOT

3.1. Kullanılan Cihazlar ve Cam Malzemeler

Bu yüksek lisans tez çalışmasında, Agilent 1200 HPLC ve 6110 quadropol MS dedektörü birlikte kullanılmıştır. Kütle spektrometresi için uygulanan şartlar Tablo 3.1’ de verilmiştir.

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

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. Isıtıcıli Manyetik Karıştırıcı (VELP)
7. Tek kullanımlık şırınga
8. Vial tüp
9. Değişik büyüklükte pipet, beher, balon joje, mezür vb cam malzemeler.

3.2. Kullanılan Standart Çözeltiler ve Reaktiflerin Hazırlanması

Standart çözeltiler; kuersetin ve mirisetinin HPLC saflıkta 500 ppm’ lik stok çözeltileri hazırlandı. Bu bileşenlerin hem stok çözeltileri hem de ara stok çözeltileri

asetonitril (ACN) içinde hazırlandı. Bu çözeltilerden 0.1-10 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 [8, 9, 11, 10].

6 M HCl' in hazırlanması: % 37' lik yoğunluğu 1.19 gr/ml ekstra pure HCl (Merck 100317) ten 49,74 ml alıp 100 ml' ye tamamlanarak 6 M HCl çözeltisi hazırlandı. 6 M HCl' den ise 20 ml alınıp 100 ml' ye tamamlanmasıyla 1,2 M HCl çözeltisi hazırlandı [11].

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

3.3. Örneklerin Temini

Elazığ ve yöresinden toplanmış olan taze üzüm örnekleri saf suyla yıkandıktan sonra analize hazırlanma aşamasına kadar derin dondurucuda saklandı. Örnek hazırlama aşamasında, aynı bitkiye ait üzümler parçalanarak homojenize edildi. Bu örnekler analizden önce aşağıdaki ekstraksiyon işlemlerine tabi tutuldu. Şekil 3.1 deki haritada örneklerin alındığı yerler gösterilmiştir.

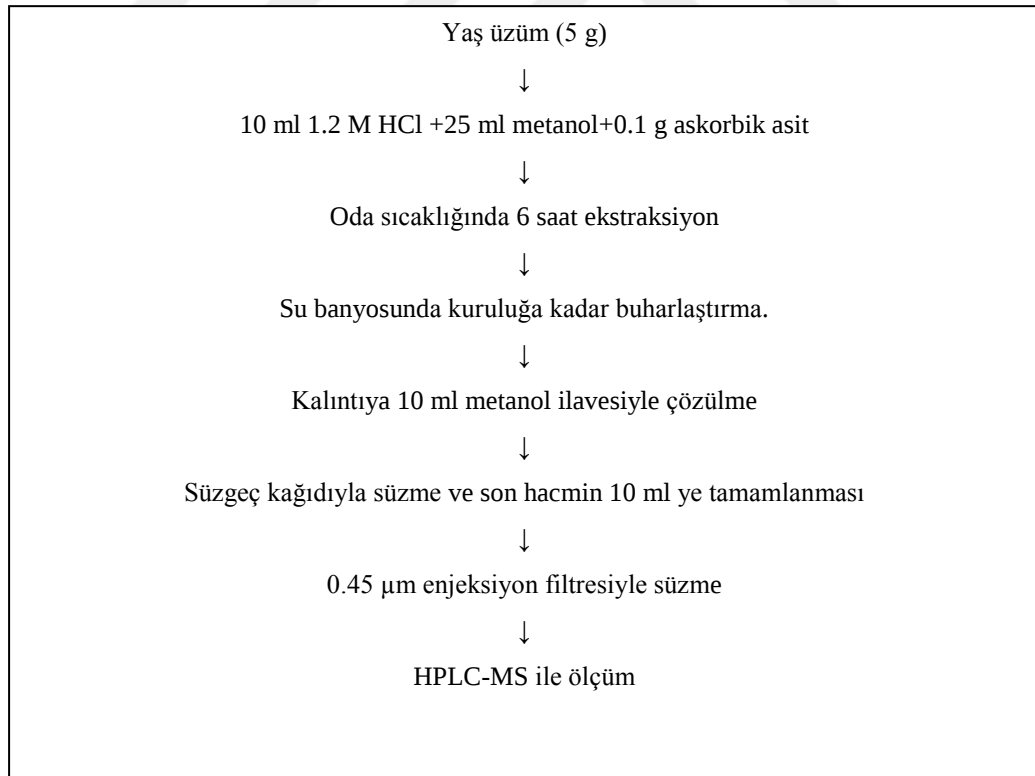


Şekil 3.1. Öküzgözü üzümlerinin alındığı yerleri gösteren harita

3.4. Üzüm Örneklerinin Ekstraksiyonu

Homojenize edilmiş olan 5 g' lık taze üzüm örnekleri sıkılıp suyu çıkarıldıktan sonra elde edilen üzüm suyuna 1.2 M HCl' den 10 ml, 25 ml metanol, 0,1 g askorbik asit eklenerek 6 saat oda sıcaklığında düzenli karıştırıldı [73]. Daha sonra 90-95 °C deki su banyosunda kuruluğa kadar buharlaştırılıp 10 ml metanol ilave edildi. Süzgeç kâğıdıyla süzülen ekstraktların son hacimleri 10 ml ye tamamlandıktan sonra analiz aşamasına kadar +4 °C' de saklandı. Analizden önce 0.45 µm gözenek çaplı enjeksiyon filtresiyle süzülen ekstraktlar HPLC-MS cihazına enjekte edildi. Uygulanan ekstraksiyon basamakları Şekil 3.2' 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 glikositlerinin hidrolizini sağlamaktadır [73].



Şekil 3.2. Ekstraksiyon yönteminin basamakları

3.5. Kuersetin ve Mirisetin için Optimum Koşulların Tayini

Bu tez çalışmasında, ölçüm basamağına ilişkin optimum şartlar aynı cihazla daha önce yapılan çalışmalardan alınmıştır [5, 73]. Özetle, bu çalışmalarda bir parametre değiştirilirken diğer parametrelerin optimum olarak bulunan değerleri kullanıldı. Standart kuersetin ve mirisetin 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 0.6 ml/dk'lık akış hızının optimum olduğu sonucuna varıldı. Ayrıca akış hızına karşılık çizilen alan grafiğinde de aynı akış hızı değerinin en iyi olduğu görüldü. Bu nedenle bundan sonraki bütün deneysel çalışmalarda kuersetin için bu akış hızı (0.6 ml/dk) kullanıldı.

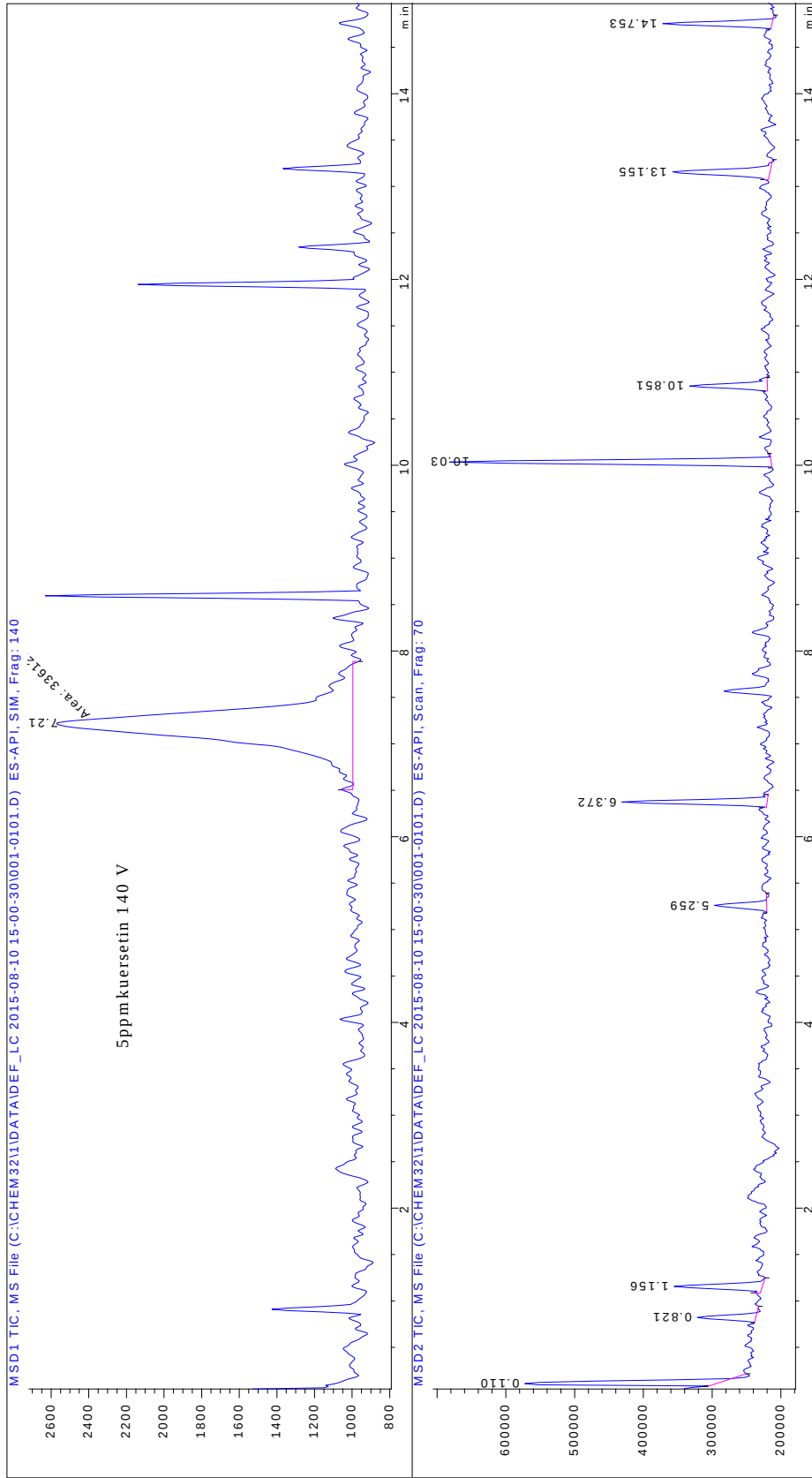
En iyi parçalayıcı (fragmentor) voltajını belirlemek için yapılan çalışmalarda, 10-200 V aralığında (diğer parametrelerin optimum değerlerinde) yine 25 ppm'lik kuersetin ve mirisetin çözeltileri kullanılarak kromatogramlar alındı. Pik simetrisi ve alan dikkate alındığında, en uygun fragmentörün 140 V olduğu anlaşıldığından bundan sonraki bütün deneysel çalışmalarda bu parçalayıcı voltajı kullanıldı.

En iyi enjeksiyon hacmini belirlemek için yapılan çalışmalarda, 5–40 µl aralığında örnek hacimleri denenmiş 5 µl lik enjeksiyon hacmi optimum olarak kabul edilmiştir [5]. Çünkü, 5 µl den daha büyük enjeksiyon hacimlerinde pik belirgin şekilde bozulmaktadır. En uygun kolon sıcaklığının tayini için 20-55 °C aralığında aynı derişimdeki kuersetin ve mirisetin çözeltilerinin kromatogram ve spektrumları değerlendirildiğinde 30 °C' optimum olarak kabul edilmiştir.

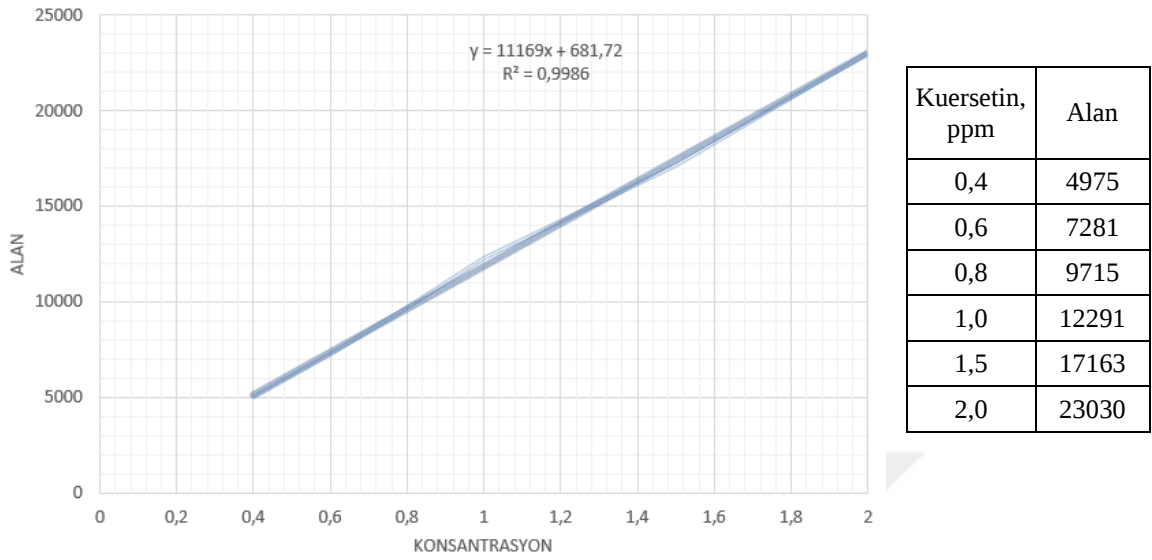
Nicel analizde kullanılmak üzere çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan kuersetin ve mirisetin çözeltileri için optimum şartlarda kromatogramlar elde edildi. Şekil 3.3 te 5 ppm kuersetin çözeltisinin tipik bir SIM ve SCAN modunda kromatogramları görülmektedir. Şekil 3.4 ve 3.5' te de standart çözeltilerin kullanılmasıyla elde edilen kalibrasyon grafikleri verildi. Şekil 3.6' da kuersetin standardının MS spektrumu görülmektedir. Mirisetin standardının MS spektrumu ise Şekil 3.7 de verildi. Bu

spektrumlarından, kuersetin ve mirisetin moleküllerinde pozitif moda çalışmaya uygun olarak hidrojen iyonları bağlanmakta ve dolayısıyla sırasıyla, 303 m/z ve 320 m/z değerlerinde temel pikler görülmektedir.

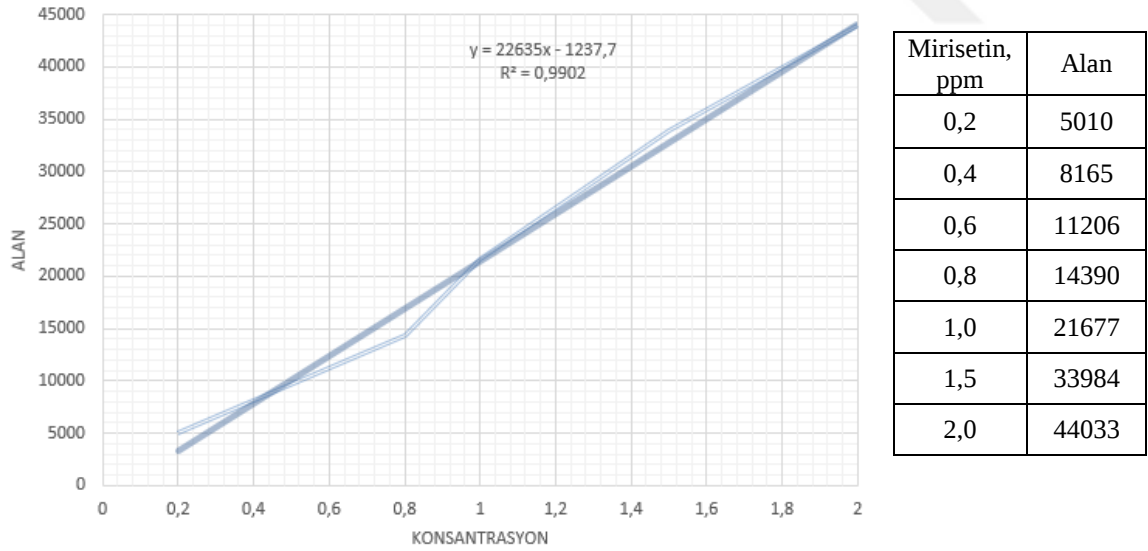




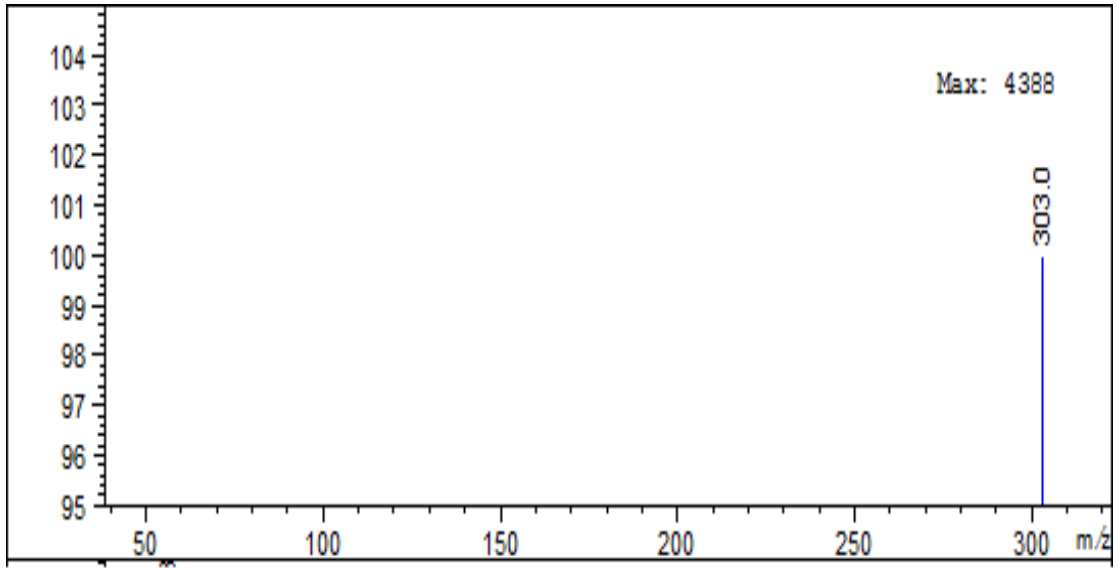
Şekil 3.3. HPLC-MS ile kuersetinin SIM ve SCAN modundaki kromatogramları



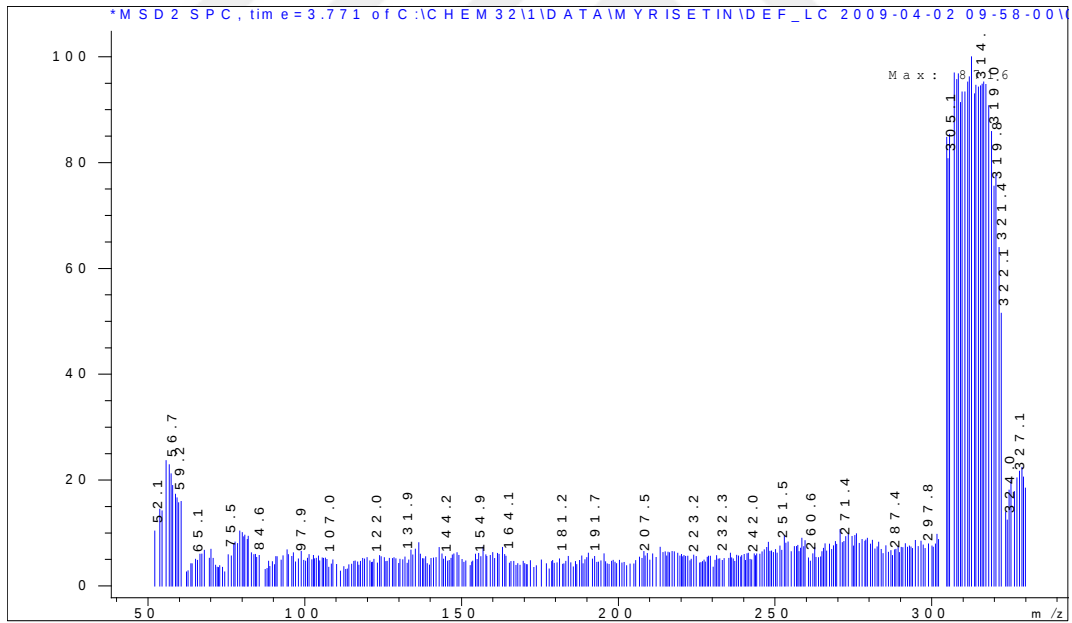
Şekil 3.4. HPLC-MS ile kuersetinin 0,4-2,0 ppm aralığına ait kalibrasyon eğrisi



Şekil 3.5. HPLC-MS ile mirisetinin 0,2-2,0 ppm aralığına ait kalibrasyon eğrisi



Şekil 3.6. Kuersetinin HPLC-MS ile optimum şartlarda elde edilen kütle spektrumu



Şekil 3.7. Mirisetinin HPLC-MS ile optimum şartlarda elde edilen kütle spektrumu

4. BULGULAR

Kuersetin ve mirisetin tayini için daha önce aynı cihazla optimize edilmiş [5, 73] ve bu çalışmada kullanılan optimum HPLC ve MS parametreleri Tablo 4.1 de özetlenmiştir.

Tablo 4.1. Kuersetin ve Mirisetinin tayini için HPLC-MS ile optimize edilen parametreleri

Parametre	Kuersetin	Mirisetin
Akış Hızı, ml/dk	0.6	0.6
Parçalayıcı voltajı, V	140	140
Enjeksiyon Hacmi, µl	5	5
Kolon Sıcaklığı, °C	30	30
t, Alıkonma Süresi, dak.	9.7-11.2	3.8-4.8
Kolon özellikleri	4.6x150 mm, 5 µm ZORBAX Eclipse XDB-C18	4.6x150 mm, 5 µm ZORBAX Eclipse XDB-C18

4.1. Üzümde Kuersetin ve Mirisetin Konsantrasyonları için bulunan sonuçlar

Şekil 3.2’ de açıklandığı gibi ekstrakte edilen üzüm örnekleri için Tablo 4.1’ de verilen optimum şartlar kullanılarak elde edilen HPLC-MS kromatogramları değerlendirilerek Şekil 3.4 ve 3.5 teki kalibrasyon grafikleri yardımıyla derişimler hesaplandı. Kuersetinin molekül ağırlığı 302 g mol^{-1} olup bu çalışmada pozitif mod şartlarında çalışılmıştır. Böylece Şekil 3.6 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. Benzer değerlendirmeler mirisetin için de geçerlidir

Elde edilen optimum şartlar kullanılarak üzümde bulunan kuersetin ve mirisetin konsantrasyonları Tablo 4.2 de verildi.

Tablo 4.2. Üzüm meyvesi örneklerinde bulunan kuersetin ve mirisetin konsantrasyonları, yaş esasa göre.

ÖRNEK	Üzümde kuersetin (mg/kg)	Üzümde Mirisetin (mg/kg)
Üzüm-1	1,32±0.16	0,50±0.10
Üzüm-2	1,57±0.18	0,98±0.11
Üzüm-3	1,96±0.19	0,78±0.11
Üzüm-4	1,46±0.16	1,02±0.12
Üzüm-5	1,78±0.17	0,84±0.10
Üzüm-6	2,00±0.19	0,91±0.11
Üzüm-7	2,17±0.18	1,10±0.13
Üzüm-8	1,39±0.17	0,74±0.10
Üzüm-9	0,65±0.13	0,94±0.11
Üzüm-10	2,30±0.24	0,88±0.10

Tablo 4.2’ te görüldüğü gibi çalışılan üzüm örneklerindeki kuersetin konsantrasyonları en küçük değer 0.65 ppm olarak bulunurken en büyük değer 2.30 ppm olduğu anlaşılmaktadır. Mirisetin için bu değerler 0.5-1.1 ppm aralığındadır. Literatürde [26], Elazığ Sun köyünden alınan öküz gözü üzümlerinden elde edilen şaraplarda kuersetin ve mirisetin konsantrasyonları için bulunan değerler sırasıyla 1.5 ve 0.6 mg/L dir. Bu çalışmada gözlenen 0.65-2.30 ppm aralığındaki kuersetin ve 0.5-1.1 ppm aralığındaki mirisetin konsantrasyonları literatürde değerlerle uyumlu olduğu görülmektedir.

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

En etkili antioksidan bileşiklerden olan kuersetin ve mirisetin bileşiklerinin oksidatif radikalik reaksiyonları engelleyici ve antikanserojen özellikleri literatürde yayınlanmıştır [1-11, 14-20]. Bu nedenle, bütün toplumların ortak sorunu olan kanser ve benzeri hastalıkların önlenmesinde ve/veya tedavisinde katkı sağlayabilecek çalışmaların büyük önemi vardır.

Bu çalışmada, bu iki bileşiğinin üzüm meyvesindeki konsantrasyonlarının tayini hedeflenmiştir. Çalışılan üzüm örnekleri Elazığ merkez köylerinden temin edildi. Kuersetin ve mirisetinin ekstraksiyonu için çözücü olarak metanol/askorbik asit/HCl karışımı kullanıldı. Çözücü karışımındaki hidroklorikasit flavonoid glikozitlerinin hidroliz olmasını sağlamakta ve yükseltgenmesini engellemektir. Benzer şekilde, karışımda kullanılan askorbik asit örneklerdeki analitlerin yükseltgenmesini engeller [9-12].

Böylece Ekstraksiyon çözeltisine alınan kuersetin ve mirisetin tayini için HPLC-MS kullanıldı. Optimizasyon için gerekli ölçüm parametreleri önceki çalışmalardan alındı; enjeksiyon hacmi için 5 µl, akış hızı için 0.6 mL/dk, kolon sıcaklığı için 30 °C ve fragmentor için 140 V değerleri en iyi değer olarak seçildi.

Nicel analizde kullanılmak üzere optimum şartlarda farklı derişimdeki kuersetin ve mirisetin çözeltileri için elde edilen kalibrasyon grafikleri kullanılarak üzüm örneklerindeki analit derişimleri hesaplandı. On üzüm örneği için bulunan sonuçlar Tablo 4.2' de verilmiştir. Bu tablolardaki her bir değer aynı üzüm örneğine ait en az 3 ayrı kısmın konsantrasyonunun ortalama değeridir.

Bulunan sonuçlardan, üzüm için en küçük kuersetin konsantrasyonu 0.65 ve en büyük değer 2.30 ppm olduğu gözlemlendi. Mirisetin konsantrasyonu için en küçük değer 0.50 ve en büyük değer 1.10 ppm olarak bulundu. Bu çalışmada bulunan kuersetin ve mirisetin konsantrasyonlarının daha önce literatürde yayınlanan değerlerle uyduğu görüldü.

Öküz gözü üzümünde kuersetin ve mirisetin konsantrasyonları için literatürde fazla veri olmamakla birlikte Kelebek [26] doktora çalışmasında Elazığ Sun köyünden alınmış öküz gözü üzümlerinden elde edilmiş şarap için 1.5 mg/L kuersetin ve 0.6 mg/L mirisetin bulunmuştur. Bu çalışmada, kuersetin için gözlenen değer 0.65-2.30 ppm aralığında ve mirisetin için gözlenen 0.5-1.1 ppm aralığındaki konsantrasyonların literatürde rapor edilen değerlerle uyumlu olduğu görülmektedir.



6. ÖNERİLER

Bu çalışmada, Elazığ ilinde ekonomik katma değeri yüksek olan üzümdeki kuersetin ve mirisetin bileşiklerinin konsantrasyonları tayin edildi. Üzümdeki antosiyanin gibi diğer antioksidan ve antikanserojen bileşiklerin tayininin yapılması da önemlidir. Ayrıca, üzümün olgunlaşma devrelerini içeren farklı zamanlarda alınacak üzüm yaprağı, koruk, sap, çekirdeği ve kabuk örneklerinin analizlerinden de daha yararlı veriler elde edilebilir.



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, 12-22.
- [2] **Georgiev V ve ark, 2014,** Recent Advances and Uses of Grape Flavonoids as Nutraceuticals. *Nutrients*, 6, 391-415
- [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] **M., De Souza L., 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] **Mutoh, Tatsushi; Mutoh, Tomoko; Taki, Yasuyuki; ve ark. 2016,** Therapeutic Potential of Natural Product-Based Oral Nanomedicines for Stroke Prevention *Journal Of Medicinal Food*, 19(6) 521-527.
- [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] **SHAHIDI, F., NACZK, M., 1995.** Food Phenolic: Sources, Chemistry, Effects. Applications Techonomic Publishing Co, Inc Lancaster.
- [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] **Akpınar, A., 2008.** Öküzgözü Üzümünden Şarap Üretiminde Fermantasyon Şartlarının Antioksidan Aktivite Ve Polifenoller Üzerine Etkisi, *Fen Bilimleri Ens. Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Doktora tezi.*
- [22] **Anlı, R. E., 2004.** “Farklı şarap işleme yöntemlerinin Kalecik Karası şarabının fenol bileşimi ve antioksidan kapasitesi üzerine etkisi”, *Gıda Dergisi*, 29 (6), 451–455.
- [23] **Duran, M., 2003.** Üzüm etüdü, İTO Dış Ticaret Araştırma Servisi.
- [24] **Çelik, H., 2002.** Üzüm Çeşit Kataloğu, Sun Fidan A.Ş., Mesleki Kitaplar Serisi no:2, 137.
- [25] **Tangolar, S., Ergenoğlu, F. ve Gök, S., 1996.** Üzüm Çeşitleri Kataloğu, Çukurova Üniv.Ziraat Fak.Yardımcı Ders Kitapları, No:29, Ç.Ü.Ziraat F.Ofset Atölyesi.
- [26] **Kelebek, H., 2009.** Değişik bölgelerde yetiştirilen öküzgözü, boğazkere ve kalecik üzümünün ve bu üzümlerden elde edilen şarapların fenol bileşikleri profili

üzerinde araştırmalar, Çukurova Ü. Fen Bilimleri Ens. Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Doktora tezi.

- [27] Sedat Velioğlu, 2007, Ekstraksiyon Koşullarının Siyah Çayın Polifenolik Madde Dağılımı Ve Antioksidan Aktivitesi Üzerine Etkileri, Nihal Türkmen, Ferda Sarı, Tübitak Projesi
- [28] **YILDIZ A, Genç Ö, Bektaş S, 1997.** Enstrümental Analiz Yöntemleri, Hacettepe Yayınları, 417-422.
- [29] **Özçimder M., 2004.** Gaz ve Sıvı Kromatografileri, Kırıkkale.
- [30] **Skoog, D.A., Holler, F.I., Nieman, T.A., 1998.** Enstrümental Analiz İlkeleri, I. Baskı, 498-531, 725-739.
- [31] **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.
- [32] **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.
- [33] **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.
- [34] **Sharaf, A., Ahmed, F.A., El-Saadany, S.S., 1989.** Biochemical changes in some fruits at different ripening stages, Food Chemistry, 31, 19-28.
- [35] **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.
- [36] **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.
- [37] **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.
- [38] **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.

- [39] **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.
- [40] **Riberio, S. M. R., 2008.** Phenolic compounds and antioksidant capacity of Brezilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties, *Food Chem.*, 110, 620-626.
- [41] **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.
- [42] **Özyürek, M., 2009.** Measurement of xanthine oxidase inhibition activity of phenolic and flavonoids with a modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method, *Analytica Chimica Acta*, Accepted Manuscript.
- [43] **Michalkiewicz, A., 2008.** Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey, *J. of Chromatography A*, 1187, 18-24.
- [44] **Riikinen, K., 2008.** Organ-specific distribution of phenolic compounds in bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and 'northblue' blueberry (*Vaccinium corymbosum* x *V. angustifolium*), *Food Chem.*, 110, 156-160.
- [45] **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.
- [46] **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.
- [47] **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.
- [48] **Grzelak, K., 2009.** Content of quercetin glycosides and fructooligosaccharides in onion stored in a cold room, *European Food Research and Technology*, 228, 1001-1007.
- [49] **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.

- [50] **Huang, Z., 2007.** Phenolic compound profile of selected vegetables frequently consumed by African Americans in the southeast Unnited States, *Food Chem.*, 103, 1395-1402.
- [51] **Masa, A. ve Vilanova, M., 2008.** Flavonoid and aromatic characterisation of cv. Albari'n blanco (*Vitis vinifera* L.) *Food Chemistry* 107, 273–281.
- [52] **Safra, J., 2007.** Determination of selected antioxidants in *Melissae herba* by isotachophoresis and capillary zone electrophoresis in the column-coupling configuration, *Journal of Chromatography A*, 1171, 124–132.
- [53] **Tsimogiannis D., 2007.** Characterization of Flavonoid Subgroups and Hydroxy Substitution by HPLC-MS/MS, *Molecules*, 12, 593-606.
- [54] **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.
- [55] **Midorikawa, K., 2001.** Liquid chromatography–mass spectrometry analysis of propolis, *Phytochem. Anal.* 12, 366–373.
- [56] **Wollenweber, E., 2002.** On the occurrence of exudate flavonoids in the borage family (Boraginaceae), *Z. Naturforsch.*, 57, 445-448.
- [57] **Kahle, K., 2005.** Polyphenol profiles of apple juices, *Mol. Nutr. Food Res.*, 49, 797-806.
- [58] **McMurrough, I., 1982.** Quantitative Analysis of Hop Flavonols Using High-Performance Liquid Chromatography, *J. Agric. Food Chem.*, 30, 1102-1106.
- [59] **Anli, E., 2006.** Trans-resveratrol and other phenolic compounds in Turkish Red Wines with HPLC, *Journal of Wine Research*, 17, 117-125.
- [60] **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.
- [61] **Topçu, G., 2007.** A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*, *Food Chem.*, 103, 816-822.
- [62] **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.
- [63] **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.
- [64] **Tian, X.-J., 2009.** Studies of intestinal permeability of 36 flavonoids using Caco-2 cell monolayer model, International J. of Pharm., 367, 58-64.
- [65] **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.
- [66] **Roldan-Marin, E., 2009.** Onion high-pressure processing: Flavonol content and antioxidant activity, LWT-Food Science and Technology, 42, 835-841.
- [67] **Heimler, D., 2006.** Antiradical activity and polyphenol composition of local *Brassicaceae* edible varieties, Food Chem., 99, 464-469.
- [68] **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.
- [69] **Kamata, K., 2008.** Constituent from leaves of *Apocynum venetum* L., J. Nt. Med., 62, 160-163.
- [70] **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.
- [71] **Huber, L. S., 2009.** Quantitative variation in Brazilian vegetable sources of flavonols and flavones, Food Chem., 113, 1278-1282.
- [72] **Krafczyk, N., 2008.** Phenolic composition of rhubarb, Eur. Food Res. Technol., 228, 187-196.
- [73] **Cengiz, E., 2011.** Kayısı (*Prunus armeniaca* L.) ve Kayısı Çekirdeğinde Kuersetinin HPLC-MS ile Tayini, Fen Bilimleri Ens. Kimya Anabilim Dalı, Yüksek lisans tezi.

ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Elazığ'da doğdum. İlk ve orta öğrenimini Elazığ'da, tamamladım. 2009 yılında Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya bölümünde lisans öğrenimine başladım. 2013 yılında lisans programından mezun oldum ve 2014 yılında Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'ünde yüksek lisans eğitimine başladım.

