

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**ASPARAGUS LYCICUS (LİKYA KUŞKONMAZI) TÜRÜNDE BULUNAN
ASPARAJİN ETKEN MADDESİNİN YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI
KROMATOĞRAFİSİ (HPLC) YÖNTEMİ İLE TAYİNİ İÇİN METOT
OPTİMİZASYONU, VALİDASYONU VE ASPARAGUS LYCICUS BİTKİSİNİN
FİTOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU**

Orçun ÇINAR

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZİRAN 2019

ANTALYA

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

**ASPARAGUS LYCICUS (LİKYA KUŞKONMAZI) TÜRÜNDE BULUNAN
ASPARAJİN ETKEN MADDESİNİN YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI
KROMATOĞRAFİSİ (HPLC) YÖNTEMİ İLE TAYİNİ İÇİN METOT
OPTİMİZASYONU, VALİDASYONU VE ASPARAGUS LYCICUS BİTKİSİNİN
FİTOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU**

**Orçun ÇINAR
KİMYA
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından FYL-2018-3119 nolu proje ile desteklenmiştir**

HAZİRAN 2019

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ASPARAGUS LYCICUS (LİKYA KUŞKONMAZI) TÜRÜNDE BULUNAN
ASPARAJİN ETKEN MADDESİNİN YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI
KROMATOĞRAFİSİ (HPLC) YÖNTEMİ İLE TAYİNİ İÇİN METOT
OPTİMİZASYONU, VALİDASYONU VE ASPARAGUS LYCICUS BİTKİSİNİN
FİTOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU**

Orçun ÇINAR

KİMYA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 28/06/2019 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Sibel TUNÇ (Danışman)

Prof. Dr. Erol AYRANCI

Doç. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY



ÖZET

ASPARAGUS LYCICUS (LİKYA KUŞKONMAZI) TÜRÜNDE BULUNAN ASPARAJİN ETKEN MADDESİNİN YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC) YÖNTEMİ İLE TAYİNİ İÇİN METOT OPTİMİZASYONU, VALİDASYONU VE ASPARAGUS LYCICUS BİTKİSİNİN FİTOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU

Orçun ÇINAR

Yüksek Lisans Tezi, Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Sibel TUNÇ

Haziran 2019; 65 sayfa

Bu çalışmada, ülkemize özgü endemik bir bitki olan *Asparagus lycicus* (Likya Kuşkonmazı) bitkisinde bulunan asparajin etken maddesinin yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ile tayini için metot optimizasyonu ve validasyonu gerçekleştirilmiştir. Ayrıca; bitkide toplam fenolik ve flavanoid madde, fenolik ve flavanoid madde bileşenleri, toplam antioksidan aktivite, C vitamini, organik asit bileşenleri, şeker bileşenleri, toplam antosiyanin madde, toplam yağ ve yağ asidi bileşenleri miktarları belirlenerek bitkinin fitokimyasal karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Farklı mobil faz bileşiminde, akış hızında, kolon sıcaklığında ve enjeksiyon hacminde çalışılarak optimum metot koşulları belirlenmiştir. Sonuçta, mobil faz bileşimi su:metanol:formik asit karışımı (hacimce 95:5:0,1 oranında); akış hızı 0,3 mL/dk; kolon sıcaklığı 35 °C ve enjeksiyon hacmi 3 µL olarak belirlenmiştir.

Metot validasyonunun gerçekleştirilmesi için doğrusalılık, doğruluk, kesinlik, gözlenebilme sınırı (LOD), tayin sınırı (LOQ) ve seçicilik parametreleri saptanmıştır. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,28 mg/L ve 0,92 mg/L olarak hesaplanmıştır.

Asparagus lycicus bitkisinin fitokimyasal karakterizasyonunu belirlemek amacıyla biyokimyasal içerik analizleri yapılmıştır. Asparajin içeriği 6,14 mg/g bitki olarak belirlenmiştir. Toplam fenolik ve toplam flavonoid içerikleri sırasıyla 13,22 mg GAE/g bitki ve 3,24 mg CE/g bitki olarak bulunmuştur. Fenolik ve flavonoid bileşen analizlerinde, rosmarinik asit, ferulik asit, klorojenik asit, o-kumarik asit, p-kumarik asit ve sinapik asit miktarları sırasıyla 28,8; 109,2; 531,2; 2,8; 17,6 ve 6,0 mg/kg bitki olarak tespit edilmiştir. Toplam antioksidan aktivite 13,2 mg/mg DPPH olarak bulunmuştur. C vitamini miktarı 234,6 mg/kg bitki olarak elde edilmiştir. Organik asit bileşen analizinde malik asit miktarı 2,9 mg/kg bitki olarak belirlenmiştir. Fruktöz ve glikoz miktarları sırasıyla 25,15 g/kg bitki ve 18,25 g/kg bitki olarak elde edilmiştir. Toplam antosiyanin içeriği 5,15 mg/kg bitki olarak belirlenmiştir. Yağ analizinde, toplam yağ içeriği % 9,65 olarak bulunmuştur. Ana yağ asidi bileşenleri olarak oleik asit (% 55,36), linoleik asit (% 32,01) ve palmitik asit (% 7,61) tespit edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: Asparagus, Asparajin, Yüksek performanslı sıvı kromatografisi, Metot optimizasyonu, Metot validasyonu, Fitokimyasal karakterizasyon

JÜRİ: Prof. Dr. Sibel TUNÇ

Prof. Dr. Erol AYRANCI

Doç. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY



ABSTRACT

THE METHOD OPTIMIZATION AND VALIDATION FOR THE DETERMINATION OF ASPARAGINE ACTIVE INGREDIENT IN *ASPARAGUS LYCICUS* (LİKYA ASPARAGUS) SPECIE BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC) METHOD AND PHYTOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF *ASPARAGUS LYCICUS* PLANT

Orçun ÇINAR

MSc Thesis in Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Sibel TUNÇ

June, 2019; 65 pages

In this study, the method optimization and validation of the asparagine in *Asparagus lycicus* plant which is an endemic specie of Turkey, were realized with high performance liquid chromatography (HPLC) method. Also, the phytochemical characterization of the plant was obtained by determining the total phenolic and flavonoid content, phenolic and flavonoid components, total antioxidant activity, vitamin C, organic acid components, sugar components, total anthocyanin content, total oil and fatty oil components.

The optimum method conditions were determined as water:methanol:formic acid mixture (95:5:0.1 by volume) for mobile phase, as 0,3 mL/min for flow rate, as 35 °C for column temperature and as 3 µL for injection volume by studying different mobile phase, flow rate, column temperature and injection volume trials.

The linearity, accuracy, precision, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ) and selectivity parameters were obtained for performing the method validation. LOD and LOQ values were calculated as 0.28 mg/L and 0.92 mg/L, respectively.

The biochemical content analyses were made to determine the phytochemical characterization of *Asparagus lycicus* plant. The asparagine content was determined as 6.14 mg/g plant. The total phenolic and total flavanoid contents were found to be 13.22 mg GAE/g plant and 3.24 mg CE/g plant, respectively. The amount of rosmarinic acid, ferulic acid, chlorogenic acid, o-coumaric acid, p-coumaric acid and sinapic acid were detected as 28.8, 109.2, 531.2, 2.8, 17.6 and 6.0 mg/kg plant, respectively in the phenolic and flavanoid component analyses. The total antioxidant activity was found to be 13.2 mg/mg DPPH. Vitamin C content was obtained as 234.6 mg/kg plant. The amount of malic acid was determined as 2.9 mg/kg plant in the organic acid component analysis. The quantity of fructose and glucose were obtained as 25.15 g/kg plant and 18.25 g/kg plant, respectively. The total anthocyanin content was determined as 5.15 mg/kg plant. In the oil analysis, the total oil content was found to be 9.65%. The main fatty acid components were detected as oleic acid (55.36%), linoleic acid (32.01%) and palmitic acid (7.61%).

KEYWORDS: Asparagus, Asparagine, High performance liquid chromatography, Method optimization, Method validation, Phytochemical characterization

COMMITTEE: Prof. Dr. Sibel TUNÇ

Prof. Dr. Erol AYRANCI

Assoc. Prof. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY



ÖNSÖZ

Asparajin, proteinlerin yapısında bulunan bir amino asit olup baklagillerin fidanlarında ve kuşkonmaz bitkisinde bulunmaktadır. Asparajin maddesi bazı ilaçlarda bulunan ilaç etken maddelerinden birisidir. Kuşkonmazın bazı türlerinde yapılan araştırmalarda değişik etken bileşiklere rastlanmıştır. Bu etken madde grupları flavonoid ve antosiyaninler, organik asitler, amino asitler, kükürtlü bileşikler, vitaminler, şeker türevleri, alkaloidler, yağ asitleri ve mineral elementlerdir.

Asparagus bitkisiyle ilgili değişik türlerde birçok çalışma bulunmasına rağmen Türkiye’de yetişen ve sadece Türkiye’ye özgü endemik bir tür olan *Asparagus lycicus* ile ilgili kimyasal içerik bakımından hiçbir çalışma bulunmamaktadır. Bu sebepten dolayı bu çalışmada *Asparagus lycicus* bitkisinde bulunan asparajin etken maddesinin HPLC yöntemi ile tayini için metot optimizasyonu ile metot validasyonunu gerçekleştirmek amaçlanmıştır. Ayrıca; bitkinin fitokimyasal karakterizasyonunu ortaya koymak amacıyla bitkide toplam fenolik ve flavanoid madde, fenolik ve flavanoid madde bileşenleri, organik asit bileşenleri, C vitamini, şeker bileşenleri, toplam antosiyanin, toplam yağ, yağ asidi bileşenleri miktar analizleri yapılmıştır. Bu yüksek lisans tezi kapsamında geliştirilen metodun ve *Asparagus lycicus* bitkisinin fitokimyasal karakterizasyonunun ilk kez gerçekleştirilmiş olmasının bu bitki ile ileride çalışma yapacak olan araştırmacılar için önemli bir veri kaynağı olacağı ve literatüre önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

Tez çalışması, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi’ne “*Asparagus lycicus* (Likya Kuşkonmazı) Türünde Bulunan Asparajin Etken Maddesinin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Yöntemi ile Tayini İçin Metot Optimizasyonu, Validasyonu ve *Asparagus lycicus* Bitkisinin Fitokimyasal Karakterizasyonu” başlığı ile sunulmuş ve aynı birim tarafından FYL-2018-3119 no’lu proje ile desteklenmiştir.

Tez çalışmam süresince, beni yönlendiren ve desteğini esirgemeyen, bilgisi, deneyimi ve hoşgörüsü ile her türlü konuda bana yol gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Sibel TUNÇ’a (Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi Kimya Bölümü), tez çalışmamda katkıları olan Sayın Prof. Dr. Osman DUMAN’a (Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi Kimya Bölümü), Dr. Ahu ÇINAR’a, Tuba SEÇMEN’e, Dr. Demet YILDIZ TURGUT’a, tez çalışmam süresince bana inanan, destekleyen ve moral veren aileme ve çalışma arkadaşlarıma ve FYL-2018-3119 nolu proje ile tez çalışmama destek veren Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi’ne teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
AKADEMİK BEYAN	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tıbbi Bitkiler.....	1
1.2. Kuşkonmaz Türleri ve Kullanımı.....	2
1.3. Kuşkonmazın Üretimi ve Pazarlanması.....	2
1.4. Kuşkonmazın Besin Değerleri ve Kimyasal İçeriği.....	3
1.5. Asparajin	5
1.6. Sıvı Kromatografisi ve Metot Optimizasyonu	6
1.7. Metot Validasyonu	7
1.8. Validasyon Parametreleri	7
1.9. Tıbbi Bitkilerin Fitokimyasal İçerikleri	8
1.10. Çalışmanın Amacı.....	11
2. KAYNAK TARAMASI	12
3. MATERYAL VE METOT	15
3.1. Materyal	15
3.2. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar ve Reaktifler.....	15
3.3. Metot	15
3.3.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan asparajin ana ve ara standart stok çözeltilerinin hazırlanması	15
3.3.2. Asparajin analizi için metot optimizasyonu.....	15
3.3.2.1. Optimum mobil faz bileşiminin belirlenmesi	15
3.3.2.2. Optimum akış hızının belirlenmesi	16
3.3.2.3. Optimum kolon sıcaklığının belirlenmesi	16
3.3.2.4. Optimum enjeksiyon hacminin belirlenmesi	17
3.3.3. Metot validasyonu	17
3.3.3.1. Doğrusallık parametresinin belirlenmesi	17
3.3.3.2. Doğruluk parametresinin belirlenmesi	17

3.3.3.3. Kesinlik parametresinin belirlenmesi.....	17
3.3.3.4. LOD ve LOQ değerlerinin hesaplanması.....	17
3.3.3.5. Seçicilik parametresinin belirlenmesi	18
3.3.4. <i>Asparagus lycicus</i> bitkisinin fitokimyasal karakterizasyonu	18
3.3.4.1. Materyalin toplanması.....	18
3.3.4.2. Ekstraksiyon işlemi.....	18
3.3.4.3. Asparajin miktar tayini.....	19
3.3.4.4. Toplam fenolik madde miktarı.....	19
3.3.4.5. Toplam flavanoid madde miktarı	19
3.3.4.6. Fenolik ve flavanoid bileşen miktarı.....	19
3.3.4.7. Toplam antioksidan aktivite miktarı	20
3.3.4.8. C vitamini miktarı	20
3.3.4.9. Organik asit bileşen miktarı	21
3.3.4.10. Şeker bileşenleri miktarı	21
3.3.4.11. Toplam antosiyanin madde miktarı.....	22
3.3.4.12. Toplam yağ miktarı	22
3.3.4.13. Yağ asidi bileşenleri miktarı	22
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	24
4.1. Asparajin İçin Metot Optimizasyonu	24
4.1.1. Optimum dalga boyunun belirlenmesi	24
4.1.2. Optimum mobil faz bileşiminin belirlenmesi	24
4.1.3. Optimum akış hızının belirlenmesi	31
4.1.4. Optimum kolon sıcaklığının belirlenmesi	35
4.1.5. Optimum enjeksiyon hacminin belirlenmesi	37
4.2. Metot Validasyonu	41
4.2.1. Doğrusallık parametresinin belirlenmesi	41
4.2.2. Doğruluk parametresinin belirlenmesi	41
4.2.3. Kesinlik parametresinin belirlenmesi.....	42
4.2.4. LOD ve LOQ değerlerinin belirlenmesi	46
4.2.5. Seçicilik parametresinin belirlenmesi	46
4.3. <i>Asparagus lycicus</i> Bitkisinin Fitokimyasal Karakterizasyonu.....	48
4.3.1. Asparajin miktar tayini.....	48
4.3.2. Toplam fenolik madde miktarı.....	48
4.3.3. Toplam flavanoid madde miktarı	49

4.3.4. Fenolik ve flavanoid bileşen miktarı.....	50
4.3.5. Toplam antioksidan aktivite miktarı	55
4.3.6. C vitamini miktarı	55
4.3.7. Organik asit bileşen miktarı	55
4.3.8. Şeker bileşenleri miktarı	56
4.3.9. Toplam antosiyanin madde miktarı.....	58
4.3.10. Toplam yağ miktarı	58
4.3.11. Yağ asidi bileşenleri miktarı	58
5. SONUÇLAR	60
6. KAYNAKLAR	61
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Asparagus lycicus* (Likya Kuşkonmazı) Türünde Bulunan Asparajin Etken Maddesinin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Yöntemi ile Tayini İçin Metot Optimizasyonu, Validasyonu ve *Asparagus lycicus* Bitkisinin Fitokimyasal Karakterizasyonu” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

28/06/2019

Orçun ÇINAR

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	: Yüzde
μg	: Mikrogram, kütle birimi
μL	: Mikrolitre, hacim birimi
μM	: Mikromolar, konsantrasyon birimi
μm	: Mikrometre, uzunluk birimi
μmol	: Mikromol
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat derece, sıcaklık birimi
α	: Alfa
ϵ	: Molar absorptivite
ω	: Omega
A	: Absorbans
A_{DPPH}	: 0,1 mL metanol ve 3,9 mL DPPH içeren çözeltinin absorbans değeri
A_{ekstrakt}	: Ekstraktların 30 dk sonundaki absorbans değeri
$\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3$	: Asparajin
Dk	: Dakika, zaman birimi
EC_{50}	: DPPH'ın etkinliğini %50 oranında düşüren etkili konsantrasyon
eV	: Elektrovolt
f	: Pikin başlangıcı ile pikin en yüksek olduğu nokta arasındaki uzaklık
g	: Gram, kütle birimi
H	: Teorik tabak yüksekliği
Ha	: Hektar, alan birimi
Kg	: Kilogram, kütle birimi
L	: Kolon uzunluğu

L	: Litre, hacim birimi
M	: Molarite, konsantrasyon birimi
<i>m</i>	: Kalibrasyon doğrusunun eğimi
m	: Metre, uzunluk birimi
mg	: Miligram, kütle birimi
mL	: Mililitre, hacim birimi
mM	: Milimolar, konsantrasyon birimi
mm	: Milimetre, uzunluk birimi
mmol	: Milimol
m/z	: Kütle/yük oranı
<i>N</i>	: Teorik tabaka sayısı
<i>n</i>	: Çalışılan standart sayısı
nm	: Nanometre, uzunluk birimi
nmol	: Nanomol
o-Fosforik asit: Ortofosforik asit	
o-Kumarik asit: Ortokumarik asit	
p-Kumarik asit: Parakumarik asit	
pH	: H^+ iyonu konsantrasyonunun eksi logaritması
pK _a	: Asit iyonlaşma sabitinin eksi logaritması
pK _b	: Baz iyonlaşma sabitinin eksi logaritması
ppm	: Milyonda bir, konsantrasyon birimi
R ²	: Korelasyon katsayısı
TF	: Asimetri faktörü
t _r	: Alıkonma zamanı
V:V:V	: Hacim:hacim:hacim oranı
W _{0,005}	: % 5 pik yüksekliğinde ölçülen pik genişliği

W_b	: Pik taban genişliği
y_{den}	: Deneysel elde edilen pik alanı
y_{teo}	: Kalibrasyon eşitliğinden hesaplanan pik alanı

Kısaltmalar

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ACN	: Asetonitril
AOAC	: Resmi Analitik Kimyagerler Derneği
C18	: Karbon 18
CE	: Kateşin eşdeğeri
DF	: Seyreltme faktörü
DPPH	: 2,2-Difenil-1-pikril hidrazil
FA	: Formik asit
FID	: Alev iyonizasyon dedektörü
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
GAE	: Gallik asit eşdeğeri
IUPAC	: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
ISO/IEC	: Uluslararası Standartlar Örgütü/Uluslararası Elektroteknik Komisyonu
LOD	: Gözlenebilme sınırı
LOQ	: Tayin sınırı
MeOH	: Metanol
MW	: Moleküler ağırlık
RE	: Rutin eşdeğeri
Rpm	: Dönüş/devir sayısı
RSD	: Bağlı standart sapma
SD	: Standart sapma

TEAC	: Troloks eşdeğerliği antioksidan kapasite yöntemi
TS	: Türk Standartları
US EPA	: Birleşik Devletler Çevre Koruma Ajansı
US FDA	: Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi
USP	: Amerikan Farmakopesi
UV	: Ultraviyole
vb.	: Ve benzeri
vd.	: Ve diğeri
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. Asparajin için 219 nm, 230 nm ve 240 nm dalga boylarında kaydedilen kromatogramlar	24
Şekil 4.2. 1 no'lu mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram.....	26
Şekil 4.3. 2 no'lu mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram.....	26
Şekil 4.4. 3 no'lu mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram.....	26
Şekil 4.5. 4 no'lu mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram.....	26
Şekil 4.6. 5 no'lu mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram.....	27
Şekil 4.7. 6 no'lu mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram.....	27
Şekil 4.8. 7 no'lu mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram.....	27
Şekil 4.9. 8 no'lu mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram.....	27
Şekil 4.10. 9 no'lu mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram.....	28
Şekil 4.11. 10 no'lu mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram.....	28
Şekil 4.12. 11 no'lu mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram.....	28
Şekil 4.13. 12 no'lu mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram.....	28
Şekil 4.14. 13 no'lu mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram.....	29
Şekil 4.15. 14 no'lu mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram.....	29
Şekil 4.16. 15 no'lu mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram.....	29
Şekil 4.17. 0,10 mL/dk akış hızı kullanıldığında elde edilen kromatogram	31
Şekil 4.18. 0,15 mL/dk akış hızı kullanıldığında elde edilen kromatogram	31
Şekil 4.19. 0,20 mL/dk akış hızı kullanıldığında elde edilen kromatogram	31
Şekil 4.20. 0,25 mL/dk akış hızı kullanıldığında elde edilen kromatogram	31
Şekil 4.21. 0,30 mL/dk akış hızı kullanıldığında elde edilen kromatogram	32
Şekil 4.22. 0,35 mL/dk akış hızı kullanıldığında elde edilen kromatogram	32
Şekil 4.23. 0,40 mL/dk akış hızı kullanıldığında elde edilen kromatogram	32
Şekil 4.24. 0,50 mL/dk akış hızı kullanıldığında elde edilen kromatogram	32

Şekil 4.25. 0,60 mL/dk akış hızı kullanıldığında elde edilen kromatogram	33
Şekil 4.26. 0,75 mL/dk akış hızı kullanıldığında elde edilen kromatogram	33
Şekil 4.27. 1,00 mL/dk akış hızı kullanıldığında elde edilen kromatogram	33
Şekil 4.28. Van Deemter eğrisi	34
Şekil 4.29. 25 °C kolon sıcaklığı kullanıldığında elde edilen kromatogram	35
Şekil 4.30. 30 °C kolon sıcaklığı kullanıldığında elde edilen kromatogram	35
Şekil 4.31. 35 °C kolon sıcaklığı kullanıldığında elde edilen kromatogram	35
Şekil 4.32. 40 °C kolon sıcaklığı kullanıldığında elde edilen kromatogram	35
Şekil 4.33. 50 °C kolon sıcaklığı kullanıldığında elde edilen kromatogram	36
Şekil 4.34. 60 °C kolon sıcaklığı kullanıldığında elde edilen kromatogram	36
Şekil 4.35. 80 °C kolon sıcaklığı kullanıldığında elde edilen kromatogram	36
Şekil 4.36. 100 °C kolon sıcaklığı kullanıldığında elde edilen kromatogram	36
Şekil 4.37. 1 µL enjeksiyon hacmi kullanıldığında elde edilen kromatogram	38
Şekil 4.38. 2 µL enjeksiyon hacmi kullanıldığında elde edilen kromatogram	38
Şekil 4.39. 3 µL enjeksiyon hacmi kullanıldığında elde edilen kromatogram	38
Şekil 4.40. 4 µL enjeksiyon hacmi kullanıldığında elde edilen kromatogram	38
Şekil 4.41. 5 µL enjeksiyon hacmi kullanıldığında elde edilen kromatogram	39
Şekil 4.42. 6 µL enjeksiyon hacmi kullanıldığında elde edilen kromatogram	39
Şekil 4.43. 7 µL enjeksiyon hacmi kullanıldığında elde edilen kromatogram	39
Şekil 4.44. 8 µL enjeksiyon hacmi kullanıldığında elde edilen kromatogram	39
Şekil 4.45. 9 µL enjeksiyon hacmi kullanıldığında elde edilen kromatogram	39
Şekil 4.46. 10 µL enjeksiyon hacmi kullanıldığında elde edilen kromatogram	40
Şekil 4.47. Asparajin tayini için hazırlanmış kalibrasyon grafiği.....	41
Şekil 4.48. Asparajin ve arjinin maddeleri kullanılarak elde edilen kromatogram	46
Şekil 4.49. Toplam fenolik madde tayini için hazırlanmış kalibrasyon grafiği.....	49
Şekil 4.50. Toplam flavanoid madde tayini için hazırlanmış kalibrasyon grafiği	50

Şekil 4.51. Rosmarinik asit tayini için hazırlanmış kalibrasyon grafiği	51
Şekil 4.52. Ferulik asit tayini için hazırlanmış kalibrasyon grafiği	51
Şekil 4.53. Klorojenik asit tayini için hazırlanmış kalibrasyon grafiği	52
Şekil 4.54. o-Kumarik asit tayini için hazırlanmış kalibrasyon grafiği	52
Şekil 4.55. p-Kumarik asit tayini için hazırlanmış kalibrasyon grafiği	53
Şekil 4.56. Sinapik asit tayini için hazırlanmış kalibrasyon grafiği	53
Şekil 4.57. C vitamini tayini için hazırlanmış kalibrasyon grafiği	55
Şekil 4.58. Malik asit tayini için hazırlanmış kalibrasyon grafiği	56
Şekil 4.59. Fruktoz tayini için hazırlanmış kalibrasyon grafiği	57
Şekil 4.60. Glikoz tayini için hazırlanmış kalibrasyon grafiği	57

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Yüksek miktarda kuşkonmaz üretimi yapan bazı ülkelerin kuşkonmaz üretim alanları	3
Çizelge 1.2. 100 g çiğ kuşkonmaz sürgününün besin değerleri.....	4
Çizelge 1.3. Asparajın maddesinin bazı kimyasal ve fiziksel özellikleri	5
Çizelge 3.1. Kullanılan mobil faz bileşimleri	16
Çizelge 4.1. Kullanılan farklı mobil faz bileşimleri (V:V:V) ve elde edilen sonuçlar	25
Çizelge 4.2. Kullanılan mobil fazlara göre hesaplanan USP kuyruklanma faktörü değerleri	30
Çizelge 4.3. Çalışılan farklı kolon sıcaklıklarında hesaplanan USP kuyruklanma faktörü değerleri	37
Çizelge 4.4. Kullanılan enjeksiyon hacimlerine göre hesaplanan USP kuyruklanma faktörü değerleri	40
Çizelge 4.5. Doğruluk parametresi verileri.....	42
Çizelge 4.6. Kesinlik parametresi verileri (Gün içi)	43
Çizelge 4.7. Kesinlik parametresi verileri (Günler arası)	44
Çizelge 4.8. Kesinlik parametresi verileri (Günler arası)	45
Çizelge 4.9. Seçicilik parametresi verileri	47
Çizelge 4.10. <i>Asparagus lycicus</i> bitkisinin fenolik ve flavanoid bileşenleri	54
Çizelge 4.11. Kuşkonmazın yağ asidi bileşenleri ve relatif yüzdeleri	59

1. GİRİŞ

1.1. Tıbbi Bitkiler

Bitkiler yıllar boyunca tıbbi tedavilerin kaynağı olarak kullanılmıştır. Bitkiler, tedavi edici ve koruyucu etkilerinden dolayı yıllardır geleneksel ilaç olarak kullanılırlar. Koruyucu etkilerinden dolayı kullanıldığında tıbbi bitkiler fonksiyonel gıda ve/veya nutrasötik olarak adlandırılırlar (Sezer ve Uysal 2018). Son yıllarda geleneksel ilaç olarak tedavi amacıyla bitkilerin kullanımı insanlar için büyük bir değer kazanmıştır. Geleneksel tıbbi bitkiler Türkiye’de önemli bir rol oynamaktadır. Son yıllarda tıbbi bitkilerle ilgili birçok çalışma yayımlanmıştır (Yılmaz 2018). İnsanlar doğal olarak yetişen bu bitkileri bir çok farklı amaçla kullanmaktadırlar. Dünya üzerinde kullanımı olan tıbbi ve aromatik bitkilerin net olarak sayısı bilinmemektedir; bununla birlikte dünya üzerinde tahminen 20.000 ile 70.000 arasında tıbbi bitki olduğu bilinmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), açıkladığı verilere göre kullanımı olan ve ticari olarak kullanılan bitki kaynaklı ilaçların sayısı 1900’dür. Dünya nüfusunun yaklaşık olarak %80’i ve Afrika nüfusunun yaklaşık olarak %95’i tıbbi bitkiler kullanılarak geliştirilmiş olan tedavi yöntemlerini kullanmaktadırlar (Güneş 2018).

1900’lü yılların başlarında kullanılan ilaçların yaklaşık olarak % 40’tan fazlası bitkisel kaynaklardan elde edilmekte iken, 1970’lerin ortalarına doğru bu sayı % 5’lerin altına kadar azalmıştır. Diğer yandan 1980’ler ile 1990’lı yılların arasında sağlık konusunda tüketici farkındalığının artmasıyla beraber organik ve doğal olarak yetişen tıbbi ve aromatik bitkilere olan talep artmıştır. 2000’li yıllarda, genetik çeşitliliğin korunması ve tıbbi ve aromatik bitkilerden elde edilen uçucu yağ standardizasyonu önem kazanmıştır. Bu amaçla, öncelikle gelişmiş ülkeler bitkisel ilaçlar ile ilgili kanunlar ve düzenlemeler yapmaya başlamışlardır. Alternatif tedavi metodlarının önem kazandığı ve resmi olarak kullanıldığı Almanya, Fransa, İsviçre ve İtalya gibi ülkelerde bu ürünlerin yol açabileceği olası problemleri en aza indirmek için tedavi ve ilaç kullanımıyla ilgili bilimsel bulgular kullanılarak gerekli önlemler alınmıştır. Türkiye’de bitkisel ürünlerin hazırlanması ve pazarlanmasıyla ilgili düzenlemeler Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından yapılmaktadır. Türkiye’nin 10.000’in üzerinde bitki çeşitliliğini içeren zengin bir florası vardır. Günümüzde, aktarlarda yaklaşık 300 farklı bitkinin satışı yapılmaktadır ve bunların 70-100 kadarı ihraç edilmektedir. Ülkemizde yetiştirilip ihracı olan en önemli tıbbi ve aromatik bitkiler arasında kekik, defne yaprağı ve kimyon tohumu olmak üzere adaçayı yaprağı, anason tohumu, keçiboynuzu meyvesi, rezene yaprağı, sumak ve biberiye bulunmaktadır (Esetlili vd. 2014).

Farmasötik, gıda ve yem endüstrilerinde zararlı sentetik katkı kullanımının artması doğal ürünler olan aromatik bitkiler ile bunların ekstraktları ve uçucu yağlarının kullanımına olan talebi arttırmıştır. İlgili sektörler etkili, güvenli ve uygun maliyetli hammaddeler aramaktadırlar. Bitki kaynaklı bileşenler bu talepleri karşılayabilecek potansiyele sahiptirler. Birçok bitki ve baharat dünya üzerinde bulunmaktadır. Biberiye, kekik, adaçayı, nane ve sarımsak gibi birçok bitki Akdeniz Bölgesi kaynaklıdır. Bunlar doğal veya kültürel olarak yetişmektedir. Polifenoller, kinonlar, flavanol/flavanoidler, alkaloidler, polipeptidler ve oksijenli bileşikler gibi kimyasal maddeler içermektedirler. Bu maddelerin bazıları sinerjik etki gösterebilirler ve bu sayede biyoaktiviteleri artış gösterir. Bazı biyoaktif bileşiklerin antioksidan ve antiseptik aktiviteleri gibi terapötik özellikleri vardır. Bu sebeple, kanser ve kardiyovasküler hastalıkların riskini

azaltabilirler ve solunum yolu hastalıkları, mide ve iltihap rahatsızlıklarında tedavi amacıyla uygulamaları bulunabilmektedir. Genel olarak aromatik bitkilerdeki biyoaktif bileşenler indüklenen oksidatif stresin yol açtığı zararlardan vücudu koruma yeteneğine sahiptirler. Ayrıca; bitkiler ve baharatlar, oksidatif bozulmayı önleyebilir ve bazı ürünlerde istenmeyen lezzet oluşumlarını geciktirebilir. Aynı zamanda, özellikle atıştırmalık gıdalarda ve et ürünlerinde, oluşan mikrobiyal oluşumları yavaşlatan antimikrobiyal bileşenler içerirler (Christaki vd. 2012).

Çok sayıda aromatik, baharat, tıbbi ve diğer bitkiler antioksidan özellik gösteren kimyasal bileşikler içerirler. Gıda, kozmetik ve diğer uygulamalar için doğal antioksidan formülasyonlarında biberiye, adaçayı ve kekik gibi bir çok bitki için çalışmalar yürütülmüştür. Aromatik ve tıbbi bitkilerin kimyasal ve biyolojik çeşitliliği yetiştirilme alanı, iklim özellikleri, vejetasyon safhası, genetik değişiklikler ve coğrafi alana göre değişim göstermektedir (Miliauskas vd. 2004).

1.2. Kuşkonmaz Türleri ve Kullanımı

Dünya üzerinde yaklaşık olarak 300 türü olan *Asparagus Liliaceae* (*Asparagus L.*) cinsinin bazı türlerinin gıda sektörü (*Asparagus officinalis*), süs bitkisi olarak kullanımı (*Asparagus asparagoides*, *Asparagus medeloides*, *Asparagus plumosus*, *Asparagus sandens*, *Asparagus setaceus*, *Asparagus sprengeri*) ve eczacılık açısından önemli olduğu düşünülmektedir. Ülkemizde 11 kuşkonmaz (*Asparagus*) türü ve 12 taksonun doğal olarak yetiştiği bilinmektedir (Güvenç ve Koyuncu 1999).

Asparagus L. cinsi, botanik sınıflandırma açısından Monocotyledones sınıfı ve Liliaceae familyasında bulunmaktadır. Ana yetiştirme bölgesi Akdeniz Bölgesi'dir. *Asparagus* türleri iklimsel olarak ılıman özellik gösteren yerlerde, Güney Avrupa, Anadolu, Asya ve Afrika'da yaygın olarak yetişmektedirler. Kuşkonmazın, sürgün kısımlarının gıda amacıyla tüketimi bulunmaktadır ve bu nedenden dolayı, 2000 yıldan uzun süredir *A. officinalis*'in kültürel üretimi gerçekleştirilmektedir. İlk önce eski Mısırlılar kültüre alma çalışmaları yapmış ve daha sonra bitki Romalılar tarafından Avrupa kıtasına götürülmüştür. *A. officinalis*'in kök ve rizom kısımları infüzyon ve dekoksasyon yapılmak suretiyle idrar söktürme amacıyla değerlendirilmiştir. Hindistan'da geleneksel olarak kullanımı olan tedavi metotlarından biri olan Ayur Veda'nın önemli ilaçlarından birisi olan "Şatavari" yerel ismi ile bilinen tür *Asparagus racemosus*'tur. Bu tür, içermiş olduğu steroid yapıdaki saponozit maddelerden ve bünyesinde yer alan alkaloid maddelerden dolayı çokça kullanılmaktadır. Çin'de Radix Asparagi olarak bilinen *Asparagus adscendens*, *Asparagus cochinchinensis*, *Asparagus curillus* ve *A. racemosus*'un kök kısımlarının yıllardır değişik hastalıkların tedavisi amacıyla kullanımı bulunmaktadır. *A. racemosus* türü Zaire Farmakopesi'nde yer alan 48 bitki kaynaklı ilaçtan birisidir (Güvenç 1997).

1.3. Kuşkonmazın Üretimi ve Pazarlanması

Kuşkonmaz çok değerli, çok yıllık ve gıda sektöründe yüksek oranda kullanımı olan bir bitkidir. Kuşkonmazın beyaz ve yeşil renkte olan sürgün kısımları çiğ olarak satıldığı gibi, konserve ve dondurulmuş ürün gibi işlenmesi bulunan bir sebzedir. Kuşkonmaz bitkisi ana yetiştirme bölgesinin Ön Asya olduğu bir çok araştırmacı tarafından kabul görmüştür. Ülkemizin büyük bir kısmında kuşkonmazın yabani

türlerinden çokça bulunmaktadır. Ön Asya’da ve Avrupa’da yaklaşık olarak 100 civarında doğal olarak yetişen türü bulunmaktadır (Vural vd., 2000). Özellikle, İzmir ve civarında, Aydın, Muğla ve Manisa’da yabancı türleri yer almaktadır ve ilkbahar mevsiminde sebze olarak kullanımı olan doğal bitkilerle birlikte yerel pazarlarda satılmaktadır. Kuşkonmazın tarımı ülkemizde eski yıllardan beri yapılmasına karşın, bir türlü yaygınlaşamamıştır. Ülkemizde Batı Anadolu Bölgesi kuşkonmaz bitkisinin ana yetiştirme bölgesi olmasına ve 1970’li yılların ilk kısımlarında kültürel olarak kuşkonmaz üretimi yapılmış olmasına karşın, kuşkonmazın üretimi ve tüketimi fazla yaygınlaşma imkanı bulamamıştır. Yurtdışına oranla ülkemizde fazla bir değer bulamamış bir sebze olan kuşkonmazın üretim miktarları, son yıllarda hem iç tüketimdeki talepten dolayı, hem de dış kaynaklı şirketlerin yurtdışına yaptıkları ihracattan dolayı artmıştır. Ülke genelinde belli yerlerde az miktarda üretimi yapılmaktadır. Dünyada kuşkonmazın üretimi 2012 yılında 1.496.685 ha alanda 8.301.482 ton olarak gerçekleşmiştir (Eren 2014). Yüksek miktarda kuşkonmaz üretimi yapan bazı ülkelerin kuşkonmaz üretim alanları Çizelge 1.1’de verilmiştir.

Çizelge 1.1. Yüksek miktarda kuşkonmaz üretimi yapan bazı ülkelerin kuşkonmaz üretim alanları (Eren 2014)

Ülkeler	Üretim Alanı (ha)					
	2007 Yılı	2008 Yılı	2009 Yılı	2010 Yılı	2011 Yılı	2012 Yılı
Peru	23.547	29.758	29.467	30.896	33.144	33.063
Meksika	13.900	15.800	17.000	20.700	21.400	16.233
İtalya	6.588	5.615	6.607	6.307	5.226	4.881
Çin	1.250.733	1.265.685	1.270.635	1.280.576	1.320.585	1.350.600
Fransa	5.525	5.365	5.005	4.879	4.817	4.560
İspanya	11.012	10.243	10.387	10.178	11.047	10.700
Arjantin	1.800	2.255	2.232	2.332	2.527	2.650
ABD	15.621	13.030	11.820	11.330	11.050	10.240
Dünya	1.397.710	1.412.166	1.418.183	1.432.078	1.471.920	1.496.685

1.4. Kuşkonmazın Besin Değeri ve Kimyasal İçeriği

Kuşkonmaz bitkisinin besin içeriği konusunda ve sağlık yönünden olumlu olarak katkısıyla ilgili bilinçlenmiş olan halkımızın bu sebzeye ilgisi son yıllarda artış göstermektedir. Çiğ kuşkonmaz bitkisinin sürgün kısmının 100 g’ında yer alan besin içeriği Çizelge 1.2’de verilmiştir.

Çizelge 1.2. Çiğ kuşkonmaz bitkisinin sürgün kısmının 100 g'ında yer alan besin içeriği (Eren 2014)

Besin elementi	100 g çiğ kuşkonmaz
Kalori	13-16
Protein (g)	2,2
Karbonhidrat (g)	3,6
Kolesterol	0
Yağ (g)	0,2
Lif (g)	0,7
Fosfor (mg)	50
Kalsiyum (mg)	21
Demir (mg)	0,6
Sodyum (mg)	1
Potasyum (mg)	110
B1 vitamini (mg)	0,16
B2 vitamini (mg)	0,15
B3 vitamini (mg)	1,4
C vitamini (mg)	26
E vitamini (mg)	0,56

Bunların yanında antioksidan içeriği bakımından oldukça zengin olan kuşkonmaz bitkisinde lutein, zeaksantin, karoten maddeler ve kriptoksantin maddesi bulunmaktadır. Folik asit açısından da zengin durumda bulunan kuşkonmaz bitkisinin sürgün kısımlarının yaklaşık olarak 100 g'ında 54 µg folik asit bulunmaktadır (Eren 2014).

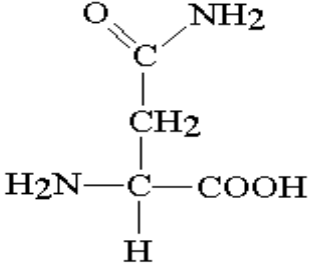
Asparagus officinalis L. besleyici değeri ve yüksek miktarda biyoaktif fenolik bileşikler içermesinden dolayı dünya çapında popüler bir sebze olmuştur (Zhang vd. 2019).

Çok yıllık bir bitki olan kuşkonmaz, besin içeriği yönünden en iyi dengelenmiş sebzelerden biridir. Temel mineraller, vitaminler, amino asitler ve besinsel lif bakımından iyi bir kaynaktır. *Asparagus officinalis* L. kültüre alınmış olan tek kuşkonmaz türüdür, ancak diğer doğal yetişen türler tüketilebilir ve yüzyıllardır geleneksel yemeklerde kullanılmaktadır. Flavanoidler, lignanlar ve stereoid saponinler gibi biyoaktif bileşenler kuşkonmaz sürgünlerinde tespit edilmiştir. Ayrıca; farmakolojik çalışmalar anti-enflamatuvar, antitümör ve antifungal aktiviteleri olduğunu göstermektedir (Slatnar vd. 2018).

1.5. Asparajin

Asparajin doğal kaynağından izole edilen ilk amino asittir. 1806 yılında Pierre Jean Robiquet ve Louis-Nicolas Vauquelin tarafından asparajin, kuşkonmaz suyundan izole edilmiştir. Asparajinin bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri Çizelge 1.3'te verilmiştir.

Çizelge 1.3. Asparajin maddesinin bazı kimyasal ve fiziksel özellikleri (<https://aminoacidsguide.com /Asn.html>)

IUPAC adı	(2S)-2,4-Diamino-4-oksobütanoik asit
Moleküler ağırlık	132,118 g/mol
Moleküler formül	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃
CAS numarası	70-47-3
Erime noktası	235 °C
Suda çözünürlük	20 g/L (20 °C'de)
pK_a	2,02
pK_b	8,80
Kimyasal yapı	

Asparajin, glikoproteinlerin biyosentezindeki kilit rolüyle bilinir. Ayrıca, diğer birçok proteinin sentezi için çok önemli bir maddedir. İnsan sinir sistemi, dengeyi sağlamak açısından bu amino asite ihtiyaç duyar. Asparajin, yorgunluğa karşı direnci

arttırır ve karaciğerin sorunsuz çalışmasına yardımcı olur. Böylece asparajin sinir sistemi sağlığına ve karaciğer korunmasına katkı sağlar. Asparajin 20 temel amino asitten biridir. Bu amino asit nöronik gelişim ve sinir uçları arasındaki iletimde yer alan proteinler için temel bir bileşiktir. Aynı zamanda amino asit dönüşümü için gereklidir. Asparajinin eksikliğinin zayıf metabolizmadan etkilendiği bilinmektedir ve bu da üre üretimi ve salgılamasını zorlaştırır. Bunun sonucunda bazı insanlarda depresyon, karışık ruh hali ve baş ağrısı gibi semptomlar görülebilir. Bu amino asitin en çok yer aldığı besinler et, tavuk, süt ürünleri, deniz ürünleri ve yumurtadır. Ayrıca, bu amino asitten daha fazla yararlanmak için kuşkonmaz, soya ve tam tahıl ürünlerinden tüketmek gerekir (Veena vd. 2014).

1.6. Sıvı Kromatografisi ve Metot Optimizasyonu

Analitik metodolojinin seçimi; analitin kimyasal özellikleri ve konsantrasyonu, örnek matrisi, analiz süresi ve masrafı, kantitatif veya kalitatif ölçüm tipi ve örnek sayısı gibi bir çok değişkene bağlıdır. Bir kalitatif metot, örnekteki kimyasal bileşenlerin varlığı hakkında bilgi verir. Bir kantitatif metot ise örnekteki bir veya birden fazla analitin miktarlarıyla ilgili sayısal bilgiler sağlar. Bir kantitatif analiz gerçekleştirilmeden önce kalitatif bilgi gerekmektedir. Ayırım basamağı genellikle hem kalitatif hem de kantitatif analiz kısmının bir parçasıdır (Lindholm 2004).

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi klasik kolon kromatografisi tekniğinden geliştirilmiştir ve günümüzde analitik kimyanın en önemli araçlarından birisidir. Prensip, bir numune çözeltisinin bir gözenekli materyale (sabit faza) sahip bir kolona enjekte edilmesi ve sıvının (mobil fazın) yüksek basınç altında kolona pompa vasıtasıyla gönderilmesine dayanır. Numunenin ayırımı, sabit ve mobil faz arasındaki numunenin farklı partiyonlarından kaynaklanan kolonu terk etme hızlarındaki farklılıklara dayanmaktadır. Farklı bileşenlerin ayırma davranışlarına bağlı olarak elüsyon farklı zamanlarda gerçekleşir. İstenen ayırımın ve hassasiyetin elde edilebilmesi için deneysel şartların optimize edilmesi gerekir. Mobil faz bileşenleri, oranları ve pH'sı, akış hızı, kolon sıcaklığı, enjeksiyon hacmi ve mobil fazda kullanılan organik çözücünün tipi gibi parametreler üzerinde yapılan planlı veya sistematik denemeler sonucunda optimum deneysel koşullara ulaşılır (Gupta vd. 2012).

İyi bir metot geliştirme planı hızlı ve verimli metot gelişiminin başarılabilmesi için kritiktir. Farmasötik bileşenlerin ayrılması için metot gelişimine genel yaklaşım, mobil fazdaki (organik çözücüler ve pH) farklılıkların ayırım seçiciliğinde kritik bir rol oynadığı şeklindedir. Analitin pK_a bilgisi, HPLC metot gelişimi için çok önemlidir. Ayrıca, pH denemeleri karışımdaki diğer safsızlıkların (sentetik yan ürünler, metabolitler ve bozunma ürünleri gibi) iyonlaşabilir özelliğinin anlaşılmasına yardımcı olur. Son optimizasyon sıcaklık, gradiyent akış ve akış hızının değiştirilmesiyle yapılabilir (Kaushal ve Srivastava 2010).

Kolon sıcaklık kontrolü uzun dönemli metot üretilebilirliği açısından önemlidir. 30-40 °C aralığındaki sıcaklık hedefi iyi bir tekrarlanabilirlik için yeterlidir. Yüksek sıcaklık kullanımı bir çok nedenden dolayı avantajlı olabilir. Çevre şartlarından daha yüksek sıcaklık değeri kullanımı mobil fazın viskozitesini azaltır ve bu da kolon basıncını düşürür. Düşük sistem basıncı, daha hızlı akış hızlarına ve daha hızlı

analizlere imkan verir. Sıcaklık aynı zamanda seçicilik davranışlarını etkileyebilir, çünkü analitler farklı sıcaklıklara değişik tepkiler verebilirler (Riddhiben vd. 2011).

1.7. Metot Validasyonu

Validasyon, bir metodun belirlenmiş olan amaçlara uygun olup olmadığının tarafsız bir şekilde test edilmesi ve yazılı bir şekilde deliller kullanılarak kanıtlanması olarak tanımlanabilir. Bir metodun performansını belirleyebilmek amacıyla bazı değişkenler kullanılarak bazı test ve ölçüm işlemleri yapılması gerekmektedir. Bir çok alanda alınması gerekli olan kararlar, yapılmış olan analiz ölçümlerinin sonucuna göre verilmektedir. Doğru bir karara ulaşılması için analitik ölçüm değerinin doğru ve güvenilir olması gerekmektedir (TS ISO 8402:1994).

Bir metot kullanılarak gerçekleştirilen ölçümlerin sonuçları laboratuvar şartları, kullanılan cihaz, kullanılmış olan kimyasal maddeler, ölçümü gerçekleştiren kişinin tecrübesi gibi bazı faktörlere göre değişkenlik göstermektedir. Bu sebeple, kullanılan metodun ölçüm sonucuna doğrudan etkisi bulunan değişkenleri ayrı ayrı tespit edilerek ölçümleri gerçekleştirilmeli ve bunların ölçümlerinin sonuca olan etkileri tespit edilmelidir (Akdağ 2016)

Bir metot ilk kez çalışılacağında, bir analiz için ilk kez yöntem geliştirileceğinde, sürekli olarak kullanımı olan bir metotta değişiklik yapılmak istendiğinde, validasyonu belirlenmiş olan bir yöntem değişik bir laboratuvar da uygulanacağında veya değişik bir kişi veya değişik bir cihazda uygulama yapılırken, farklı metotları karşılaştırabilmek amacıyla, metodun performans değerlerinde bir değişim gerçekleştiği görüldüğünde metot validasyonu yapılması gerekir. Uluslararası olarak kabul edilmiş olan değişik validasyon parametreleri bulunmaktadır. Uluslararası Standardizasyon Örgütü/Uluslararası Elektroteknik Komisyonu (ISO/IEC), Uluslararası Uyumlaştırma Kongresi (ICH), Birleşik Devletler Çevre Koruma Ajansı (US EPA), Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi (US FDA) ve Amerikan Farmakopesi (USP) gibi kurumlar tarafından belirlenmiş kriterler kullanılmaktadır (Karaman ve Akalın, 2008).

Metot validasyonu, bir analitik yöntemin kullanılan amaç doğrultusunda kabul edilip edilemeyeceğini test etme işlemi olarak da adlandırılabilir. Metotta karşılaşılan problemleri minimuma indirmek için en uygun yöntem, metot geliştirme sırasında ilgili validasyon testlerini yapmaktır. Metot validasyonu; metodun istenen amaç doğrultusunda uygun olup olmadığını kanıtlar (Baltacı ve Gündoğdu 2012).

1.8. Validasyon Parametreleri

Validasyon işleminin gerçekleştirilebilmesi için öncelikle bazı temel validasyon kriterlerinin belirlenmesi gerekmektedir.

- **Kesinlik:** Ölçüm verilerinin birbirlerine olan yakınlık derecesini (tekrarlanabilirliğini) gösteren bir ifadedir. Standart sapma, varyans veya varyasyon katsayısı ile gösterilir (TS 5822-1 ISO 5725-1).

- **Tekrarlanabilirlik:** Aynı laboratuvarında, aynı araştırmacı tarafından ve aynı yöntem kullanılarak en az 5-6 paralel deneme 3 değişik ortam kullanılarak ve en az 2-3 farklı konsantrasyon kullanılarak gerçekleştirilir (TS 5822-1 ISO 5725-1).
- **Doğruluk:** Ölçülmüş olan değer doğru veya doğru kabul edilmesi gereken değere olan yakınlık derecesinin bir ölçüsüdür, mutlak hata veya bağıl hata ile ifade edilir (TS 5822-1 ISO 5725-1).
- **Geri kazanım:** Numunenin yer aldığı ortam içerisindeki analitin analizi ile elde edilmiş olan miktarın, saf analitin yer aldığı çözeltisiye oranla yüzde olarak ne oranda geri alınabildiğinin analizinin yapılması gerekmektedir. Düşük, orta ve yüksek konsantrasyonda miktarı belli olan standart çözeltiler, matrikse eklendikten sonra bir ayırma yöntemi ile geri kazanılıp tayin edilir ve son olarak miktarı belli olan bir örnekle karşılaştırılmak suretiyle elde edilen sonuç yüzde hata cinsinden ifade edilir (SANCO/12495/2011).
- **Gözlenebilme sınırı (LOD):** Analiz yapılan cihazın zemin gürültüsünden farklı olarak tespit edilebilen, ancak miktarsal olarak belirlenememiş olan en düşük analit konsantrasyonudur (SANCO/12495/2011).
- **Tayin sınırı (LOQ):** Uygun bir doğruluk ve kesinlik sonucunda miktarsal olarak ölçülebilen en düşük konsantrasyondur (SANCO/12495/2011).

1.9. Tıbbi Bitkilerin Fitokimyasal İçerikleri

Bitkiler, ikincil ürünler olarak antioksidan şeklinde adlandırılan biyolojik aktiviteye sahip bileşikler sentezlerler. Fenolik bileşikler olarak adlandırılan bu maddeler oksidatif zararı önlemek amacıyla aktif oksijen maddeleriyle mücadele ederek bitki savunma mekanizmalarını harekete geçirirler. Fenolikler, tanen ve ligninler gibi basit yapıda moleküllerden bir aromatik halkaya sahip kompleks yapıda polimerlere kadar değişkenlik gösteren sekonder bitki metabolitleridir (Moran vd. 1997). Büyük ölçüde kimyasal ve biyolojik özellikler içermelerinden dolayı özellikle flavanoid ve tanenler gibi fenolik bileşiklere olan ilgi son yıllarda artmıştır (Hertog vd. 1993). Antioksidan özelliklerine ilave olarak, bu bileşikler kardiyovasküler hastalıkları azaltma ile antikanserojen aktivite, antiallerjenik, antiartrojen, anti-enflamatuvar, antimikrobiyal ve antitrombotik etkiler göstermeleri için aday maddeler olarak gösterildiği ispatlanmıştır (Huxley ve Neil 2003; Andrade vd. 2009; Alim vd. 2009; Ajila vd. 2010). Özellikle fenolik asit, tanen ve flavanoidler olan bitki fenolikleri potansiyel antioksidanlar olarak bilinmektedirler ve sebze, meyve, ceviz, tohum, kök ve ağaç kabuklarında bulunurlar. Fenolikçe zengin olan meyve, bitki, sebze, tahıl ve diğer bitki materyallerinin ekstraktlarının kullanımı gıda endüstrisinde artmaya başlamıştır, çünkü bunlar yağların oksidatif bozunmasını geciktirmekte ve gıdanın kalitesi ile besin değerini arttırmaktadır (Kamath vd. 2015).

Günümüzde kullanılan sentetik antioksidanlar negatif sağlık sorunlarına neden olmaktadır. Bu yüzden, kullanımları için sınırlayıcı önlemler alınmaktadır ve bunların yerine doğal antioksidanların kullanımı artmıştır. Birçok tıbbi bitki, sebze ve baharat yüksek antioksidan aktivite göstermelerinden dolayı çok iyi bir fenolik madde kaynağı olarak görülmektedir (Ahmed vd. 2011).

Antioksidan aktivite gösteren tipik fenolik bileşikler baskın olarak fenolik asitler ve flavanoidlerdir. Kafeik asit, ferulik asit ve vanilik asit gibi fenolik asitler bitkilerde yaygın olarak bulunurlar ve doğal antioksidanlar olarak gösterilirler. En çok bulunan fenolikler aynı karbon atomlu iskelete sahip ve kolayca okside olabilen bileşiklere karşı antioksidan aktivite gösteren flavanoidlerdir. Birçok bitkide ana flavanoid bileşenler kuersetin, mirisetin, kamferol ve bunların glikozitleri olan flavanol aglikonlardır. Genellikle çoklu hidroksil gruplar içeren flavanoidler peroksil radikallere karşı yüksek antioksidan aktivite gösterirler. Bitki dokularında bulunan farklı antioksidan bileşiklerin varlığı antioksidan bileşenlerin kendi başlarına etkisinden daha fazladır. Bu nedenle, birçok çalışmada mevcut antioksidanların maksimum miktarda eldesi için ara ekstraksiyon basamakları uygulanır. Fenolik bileşiklerin antioksidan aktiviteleri genelde redoks özelliklerine göre değişkenlik göstermektedir ve ayrıca, metal şelatlama özellikleri bulunmaktadır (Spiridon vd. 2011).

C vitamini insan sağlığı için çok önemlidir, ancak; bitkilerin önemli besin kaynağı olmasına karşın ürünlerdeki metabolizması hakkında çok az bilgi bilinmektedir. C vitamini, birçok enzimin kofaktörü olarak hücre bölünmesini kontrol eder, hücre genişlemesini etkiler ve bitki olgunlaşmasını düzenler. Bitkilerde C vitamininin biyosentezi D-mannoz/L-galaktoz, D-galakturnat, L-guloz ve miyo-inositolü içeren kompleks bir metabolik ağ sayesinde gerçekleşir (Lisko vd. 2014). C vitamini taze et tüketiminden elde edilebildiği gibi bitki kaynaklarından da sağlanabilir. C vitamini genellikle meyvelerde ve lifli sebzelerde yüksek miktarlarda bulunur, özellikle kuru tahıllarda olmak üzere tahıllarda düşük miktarda yer alır. Özellikle lifli sebzelerde hasat sonrasında C vitamini azalsa da C vitamini varlığı depolanan gıdaların besin kalitesini korumasına yardımcı olur (Gallie 2013). Askorbik asit olarak da bilinen C vitamini, meyve ve sebzelerde önemli miktarda bulunan suda çözünabilir bir antioksidandır ve doku hasarını önlediği kanıtlanmıştır. C vitamininin tayin edilebilmesi için enstrümental metotlar daha yaygın olarak kullanılmaktadır (Ogunlesi vd. 2010).

Organik asitler, birçok değişik meyvede bulunurlar. Örneğin; sitrik asit turunçgillerde baskın olan organik asit bileşeni iken, malik asit elma, armut ve yenedünyada baskın organik asit bileşenidir. Ayrıca, organik asitler meyve renklendirici, taze meyve raf ömrü ve olgunlaşma gibi önemli meyve kalite özelliklerini etkileyen önemli çözünabilir bileşenlerdir. Bu yüzden, tüketici uygunluk indeksi olarak kullanılabilirler. Bunun dışında; organik asitler, koruyucu, antioksidan, asitlik düzenleyici ve ilaç emilimini düzenleyici olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar (Ma vd. 2018). Organik asitler, hücre metabolizmasının tipik ürünleridir. Bütün organik asitler çeşitli sebze ve hayvan substratlarında doğal olarak oluşurlar ve normal biyokimyasal metabolik proses, asitlik düzenleyici olarak harici eklenme, hidroliz veya bakteriyel üremenin sonucunda gıda bileşeni olarak veya daha sonrasında ürünlere doğrudan veya dolaylı olarak katılarak kullanılırlar. Organik asitler biyolojik prosesler için önemlidirler, çünkü ara veya son ürün olarak bitki ve hayvan metabolizmalarının değişik oluşum mekanizmalarında yer alırlar. Meyve, meyve suyu, sebze, günlük ürün, kahve ve şarap gibi değişik gıda ürünlerindeki organik asitlerin analizi gıda endüstrisi için çok önemlidir, çünkü bu bileşenler duysal özelliklerden sorumludurlar ve stabiliteyi etkileyebilirler (Priecina ve Karklina 2015). Organik asitler gıdalardan su veya çözücü ekstraksiyonu, buhar destilasyonu veya kurşun veya diğer elementler ile çöktürme yolu ile ayrıştırılabilir. Günümüzde organik asitlerin meyve ve

sebzelerden ekstrakte edilebilmesi için en çok kullanılan metot, çözücü ekstraksiyonu metodudur. Olgunlaşma süreci ve coğrafi konum farklı meyvelerde bulunan organik asitlerin bileşenlerini ve miktarlarını etkilemektedir. Son zamanlarda birçok meyve ve meyve suyundaki organik asitlerin belirlenmesi üzerine araştırmalar HPLC metotları üzerine yoğunlaşmıştır (Ergönül ve Nergiz 2010).

Serbest şekerler, meyve ve sebzelerin kalitesinin belirlenmesi için en önemli bileşenlerden birisidir. Birçok sebze ve meyvenin serbest şeker bileşimi, metabolizması ve fizyolojisi ile ilgili yapılmış çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Fruktoz, glikoz ve sükroz gibi mono ve disakkaritler en önemli şekerlerdir. Fruktoz ve glikoz elma, hurma, dut ve çilek gibi meyvelerde bulunan temel şeker bileşenleridir. Gilaburu gibi bazı meyvelerde hem glikoz hem de fruktoz baskın şeker bileşeni olarak bulunabilir. Kayısı, mango ve kavun gibi birçok meyve; bünyesinde sükroz veya heksozlar barındırırken, turunçgiller yüksek miktarda sükroz bulundurlar. Böğürtlen gibi meyveler sadece glikoz ve fruktoz içerebilirler, sükroz içermezler, ancak; gilaburu toplam şekerin yaklaşık %10'una kadar sükroz içerebilir (Ayaz vd. 1999).

Yağ asitleri, uzun alifatik zincire sahip karboksilik asitlerdir. Yağ asitleri, yağ asidi zincirindeki doymamış çift bağların varlığına bağlı olarak doymuş ve doymamış asitler olarak ayrılırlar. Temel yağ asitleri çoklu doymamış yağ asitleri olarak tanımlanırlar. Linoleik asit ve α -linolenik asit sırasıyla omega-6 ve omega-3 yağ asitleridir. Vücut tarafından sentezlenememelerinden dolayı insan sağlığı için önemlidirler. Temel yağ asitleri kan basıncını düzenlediklerinden dolayı insan bağışıklık sistemi için çok önemlidirler. ω -3 ve ω -6 yağ asitleri balık, keten tohumu, soya yağı, kanola yağı, haşhaş yağı, çiya tohumu, kabak çekirdeği, ayçiçek yağı, pamuk yağı, lifli sebzeler ve ceviz gibi bazı gıdalarda bulunurlar. Yağ asitleri analizinin önemi besleyici ve sağlık etkilerinden dolayı çok önem kazanmıştır. Analiz için en çok kullanılan yöntem, uçuculuklarını arttırmak için yağ asidi bileşenlerini metil esterleri formuna dönüştürmektir (Kanchanamayoon ve Kanenil 2007). Serbest olarak ve kompleks bir yağın parçası olan yağ asitleri metabolizmada ana metabolik enerji ve gen düzenleyici olarak önemli bir rol oynar. Ayrıca, besinsel yağlar eikosanoidler gibi güçlü lokal olarak etkili metabolitlerin kaynağı olan çoklu doymamış yağ asitlerine sahiptirler. Kompleks yağların bir parçası olarak yağ asitleri termal ve elektriksel yalıtım ve mekanik korunma için önemlidirler. Bununla birlikte, serbest yağ asitleri ve bunların tuzları amfipatik özellikleri ve misel yapıları sayesinde deterjan ve sabunlarda kullanılırlar. Hayvan, bitki ve mikroorganizmalarda en çok bulunan doymuş yağ asitleri palmitik asit ve stearik asittir. 8-10 karbon atomuna sahip kısa zincirli doymuş yağ asitleri sütte ve hindistan cevizinde bulunur. Oleik asit, bitki ve hayvanlarda en yaygın olarak bulunan monoenoik yağ asididir. Ayrıca, mikroorganizmalarda da bulunur. Palmitoleik asit hayvan, bitki ve mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunur ve bazı tohum yağlarının ana bileşenidir. Linoleik asit, bitki yağlarının temel yağ asididir (Rustan ve Drevon 2005). Bitkisel yağlar insan tüketimi ve endüstriyel uygulamalar için önemli makromoleküllerdir. Dünya yağ üretiminin büyük çoğunluğu soya, palm yağı, pamuk, kanola ve ayçiçeği gibi bazı tek yıllık ve çift yıllık bitkilere dayanmaktadır. Dünyadaki yağ tüketiminin %80'i insanlar tarafından gerçekleştirilmektedir. %6'sı hayvan yemi için ve geri kalanı da endüstriyel uygulamalarda kullanılmaktadır. Yağlar için gereken talebi karşılayabilmek adına farklı bitki türleri yüzyıllardır kültüre

alınmaktadır ve yemeklik ve endüstriyel son ürünler için özel olarak yetiştirilmektedir (Tonguç ve Erbaş 2012).

1.10. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada; *Asparagus lycicus* türünde asparajin etken maddesinin kantitatif olarak tayin edilebilmesi için metot optimizasyonunun ve validasyonunun yapılması amaçlanmıştır. İlk kez çalışılacak olan bu bitkide önemli bir amino asit bileşeni olan asparajin miktarının doğru bir şekilde tespit edilmesine çalışılmıştır. Kuşkonmaz bitkisinde var olan değişik etken madde grupları, bitkinin iltihap önleyici, sitotoksik, antimutajenik ve antifungal aktivitelere sahip olmasını sağlamaktadır. Bu sebeple; bitkide toplam fenolik ve flavanoid madde, fenolik ve flavanoid madde bileşenleri, organik asit bileşenleri, C vitamini, şeker bileşenleri, toplam yağ, yağ asidi bileşenleri miktar analizleri yapılmak suretiyle bitkinin fitokimyasal karakterizasyonunun yapılması da çalışmanın bir başka amacıdır.

2. KAYNAK TARAMASI

Cruz vd. (2016), Brezilya'daki insan plazmalarında yer alan amino asitlerin kantitatif tayini için metot validasyonu yapmışlardır. Çalışma, HPLC cihazında C18 kolon kullanılarak yapılmıştır. Kullanılan metot doğrusalılık, LOD, LOQ, kesinlik ve doğruluk açısından iyi sonuç vermiştir. Yapılan çalışmada; asparajinin kalibrasyonunda korelasyon katsayısı (R^2) değeri 0,996, LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 1,67 nmol/mL ve 5 nmol/mL olarak hesaplanmıştır. Asparajinin geri kazanım değerleri % 87,9-107,8 arasında değişim göstermiştir.

Jeong vd. (2018), insan plazmasında yer alan asparajin ve onun bazı türevlerinin tayini için metot geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri metotta mobil faz olarak asetonitril, 25 mM amonyum format ve % 0,5 formik asit kullanmışlardır. Akış hızı olarak 0,5 mL/dk seçilmiştir. Enjeksiyon hacmi olarak 5 µL ve toplam analiz süresi 15 dk olarak belirlenmiştir. Cihazda kolon sıcaklığı 40 °C olarak seçilmiştir. Kalibrasyon grafiğinde 0,995'in üstünde R^2 değerleri tespit edilmiştir. Asparajin için tespit edilen gün içi ve günler arası kesinlik değerleri sırası ile % 89,85-104,8 ile % 93,98-103,5 arasında değişim göstermiştir.

Zhang vd. (2019), yaptıkları çalışmada *Asparagus officinalis* bitkisinde yer alan fitokimyasal bileşenleri incelemişlerdir. Çalışmada akış hızı olarak 0,25 mL/dk kullanılmış ve mobil faz olarak metanol-su karışımı ve % 0,1 formik asit kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı ve enjeksiyon hacmi değerleri sırasıyla 30 °C ve 5 µL olarak seçilmiştir. Çalışma sonucunda kafeik asit, quersetin, apigenin, ferulik asit ve kamferol miktarları sırasıyla 6,0; 3,9; 0,4; 1,0 ve 0,8 mg/g olarak tespit edilmiştir.

Makris ve Rossiter (2001), kuşkonmaz sürgünlerinin gıda amaçlı işlenmesi sonucunda bitkideki flavanol içeriklerinin ve antioksidan aktivitenin değişimini incelemişlerdir. Çalışmada; işleme metotları olarak parçalama, maserasyon ve kaynatma kullanılmıştır. Parçalama işlemi kuşkonmazın rutin içeriğini yaklaşık % 18,5 oranında azaltmıştır. Kaynatma işlemi ise toplam flavanol içeriğini % 43,9 oranında düşürmüştür. Parçalama işlemi antioksidan kapasitede çok fazla bir değişikliğe yol açmazken, kaynatma işlemi önemli değişikliklere sebep olmuştur. Çalışmada kullanılan HPLC cihazında kolon sıcaklığı olarak 40 °C, akış hızı olarak 1 mL/dk, enjeksiyon hacmi olarak 20 µL ve analiz süresi olarak 20 dk seçilmiştir. Flavanol bileşenler arasında en baskın bileşen olarak rutin tespit edilmiştir. İşleme yapılmadan önce kontrol olarak kabul edilen analizlerde kuşkonmazın rutin içeriği 286,5 mg/kg olarak tespit edilmiştir.

Nindo vd. (2003), kuşkonmazı farklı kurutma metotlarıyla kurutup bu metotların kuşkonmazın antioksidan aktivitesine olan etkisini araştırmışlardır. Çalışmada 5 farklı kurutma metodu kullanılmıştır. Bunlar rafta kurutma, akışkan yataklı kurutma, mikrodalga ve akışkan yataklı kurutma, yansıtımlı pencere kurutması ve dondurarak kurutma yöntemleridir. Yansıtımlı pencere kurutma ve dondurarak kurutma yöntemlerinde elde edilen antioksidan aktivite değerleri diğer metotlarla yapılan kurutma denemelerinden elde edilen değerlere göre daha yüksektir. Ayrıca, yansıtımlı pencere kurutması sonucunda kuşkonmazda en yüksek C vitamini değerine ulaşılmıştır. Hammaddede yapılan analizler sonucunda kuşkonmazın antioksidan aktivitesi 65,7 trolks eşdeğeri µmol/g olarak tespit edilmiştir.

Slatnar vd. (2018), farklı kuşkonmaz tiplerinin farklı kısımlarında şeker, organik asit, antosiyanin ve flavanoid bileşenlerdeki değişimlerini ortaya koyan bir çalışma yapmışlardır. En yüksek antosiyanin miktarı pembe renkli çeşitlerde elde edilmiştir. Organik asit ve fenolik bileşen miktarları sürgünün alt kısmından üst kısmına doğru gidildikçe artış göstermiştir. Ancak, antosiyanin ve şeker miktarları ise tam tersine alt kısımda daha yüksek çıkmıştır. Çalışmada HPLC koşulları olarak 25 °C kolon sıcaklığı, saf su (% 0,1 formik asit) ve asetonitril (% 0,1 formik asit) mobil fazları, 20 µL enjeksiyon hacmi ve 0,6 mL/dk akış hızı kullanılmıştır. Toplam organik asit miktarları 2,7-3,5 g/kg arasında değişim göstermiştir. Organik asit bileşenlerinden sitrik asit değerleri 2,0-2,5 g/kg arasında ve malik asit değerleri 0,6-0,9 g/kg arasında tespit edilmiştir. Toplam şeker değerleri 16,09-21,92 g/kg arasında değişim göstermişlerdir. Şeker bileşenlerinden fruktoz 8,8-12,5 g/kg arasında, glikoz ise 7,0-9,4 g/kg arasında bulunmuştur. Toplam antosiyanin miktarı 1,32-66,70 mg/kg arasında değişim göstermiştir. Toplam fenolik madde miktarı ise 445,3-679,2 mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/kg arasında belirlenmiştir.

Kim vd. (2009), kuşkonmazın sürgün ve yaprak kısımlarının amino asit bileşen miktarlarını tespit etmişlerdir. Çalışma sonucunda yapraktaki amino asit miktarı sürgüne göre daha yüksek bulunmuştur. Analizler sonucunda sürgün kısmında yer alan amino asit bileşenleri olan aspartik asit, asparajin, lizin, arginin, sistein miktarları sırasıyla 921,17; 653,68; 40,85; 62,11; 108,19 mg/kg olarak tespit edilmiştir. Yaprak kısmında yer alan amino asit bileşenleri olan aspartik asit, asparajin, lizin, arginin, sistein miktarları sırasıyla 4369,47, 6967,50, 1009,01, 933,21 ve 347,14 mg/kg olarak belirlenmiştir.

Symes vd. (2018), gerçekleştirdikleri çalışmada kuşkonmazın kök kısmını farklı çözücülerle ekstrakte ederek toplam fenolik, toplam flavanoid, antioksidan aktivite ve kafeik asit miktarlarındaki değişimleri incelemişlerdir. Kafeik asit analizi HPLC cihazı kullanılarak yapılmıştır. HPLC koşulları olarak 25 °C kolon sıcaklığı, saf su ve % 0,02 trifloroasetik asit içeren asetonitril mobil fazları kullanılmıştır. Analizler sonucunda en yüksek değerlere kullanılan çözücüler arasından % 90'lık etanol ile yapılan ekstraksiyonlar sonucunda ulaşılmıştır. Toplam fenolik madde miktarı 52,0-91,4 mg GAE/g arasında, toplam flavanoid madde içeriği ise 102,1-134,0 mg rutin eşdeğeri (RE)/g arasında, toplam antioksidan aktivite değerleri ise % 23,6-47 arasında değişim göstermiştir. Kafeik asit miktarları ise 1,7-3,0 mg/g arasında tespit edilmiştir.

Fan vd. (2015), kuşkonmaz atıklarına farklı ekstraksiyon metotları uygulayarak toplam fenolik, toplam flavanoid ve antioksidan aktivite miktarlarındaki değişimleri incelemişlerdir. Toplam fenolik madde miktarı 4,43-12,03 mg GAE /g arasında tespit edilmiştir. Toplam flavanoid madde miktarları 3,84-5,24 mg RE/g arasında değişim göstermiştir. Antioksidan aktivite analizinde 0,030-0,056 mmol TEAC/g arasında değişen değerler elde edilmiştir.

Palfi vd. (2017), doğadan toplanan ve kültüre alınan kuşkonmazın toplam polifenol içeriğini ve antioksidan aktivitesini araştırmışlardır. Toplam polifenol içeriğinde önemli bir değişim gözlemlenmezken, antioksidan aktivite değerlerinde önemli farklılıklar tespit edilmiştir. Kültüre alınan kuşkonmazda doğadan toplanana göre daha yüksek antioksidan aktivite tespit edilmiştir. Yapılan çalışma sonucuna göre kuşkonmaz içindeki polifenol miktarı arttıkça, antioksidan aktivitenin de artış gösterdiği

sonucuna varılmıştır. Toplam polifenol içeriği doğadan toplananda 49,60 mg GAE/g ve kültüre alınanda 50,93 mg GAE/g olarak tespit edilmiştir.

Literatürde şu ana kadar kuşkonmazın farklı türleri ile ilgili kimyasal içerik bakımından çalışmalar yapılmış olmasına rağmen; çalışmamızda kullandığımız tür ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada ilk kez *Asparagus lycicus* türünde bulunan asparajin etken maddesinin metot optimizasyonu ve validasyonu gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, ilk kez *Asparagus lycicus* türünün birçok kimyasal içerik analizi yapılarak bitkinin fitokimyasal karakterizasyonunun yapılması amaçlanmıştır.



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Asparagus lycicus (Likya kuşkonmazı) Elmalı-Korkuteli arasından Elmalı çıkışından yaklaşık olarak 1100 m yükseklikten toplanmıştır. Materyalin gölgede kurutulma işlemi tamamlandıktan sonra analizlerde kullanılmak üzere öğütölme işlemi yapılmıştır.

3.2. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar ve Reaktifler

Çalışmada kullanılan kimyasallar arasında bitki etken maddesi olarak asparajin (Sigma-Aldrich), çözücü olarak metanol (Sigma-Aldrich) ve saf su, mobil faz bileşimi olarak metanol (Sigma-Aldrich), saf su, asetonitril (Sigma-Aldrich) ve formik asit (Fluka) yer almaktadır. Ayrıca; fitokimyasal analizler için hekzan (Sigma-Aldrich), petrol eteri (Sigma-Aldrich), folin (Sigma-Aldrich), sodyum karbonat (Merck), DPPH (2,2-difenil-1-pikril hidrazil) (Sigma-Aldrich), sodyum nitrit (Merck), alüminyum klorür (Merck), sodyum hidroksit (Merck), metafosforik asit (Merck), potasyum klorür (Merck), sodyum asetat (Merck) ve potasyum hidroksit (Merck) kullanılmıştır.

3.3. Metot

3.3.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan asparajin ana ve ara stok çözeltilerinin hazırlanması

Uygun miktardaki asparajin standardı 0,0001 g hassasiyetle hassas terazide tartılarak 100 mL'lik balon jojeye aktarılmış ve saf su içerisinde çözüldükten sonra çözeltilinin toplam hacmi 100 mL oluncaya kadar saf su ilave edilmiştir. Böylelikle 1000 mg/L'lik asparajin stok çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra, 1000 mg/L'lik asparajin ana stok çözeltisinden 100 mg/L'lik ara stok çözeltisi hazırlanmıştır.

3.3.2. Asparajin analizi için metot optimizasyonu

Asparajin analizi için metot optimizasyonu çalışmaları Shimadzu marka LC 20-AT model HPLC cihazı ve ACE C18 (5 µm partikül büyüklüğünde, 250 mm uzunluğunda ve 4,6 mm iç çapında) ters faz sıvı kromatografi kolonu ile sağlanmıştır. HPLC sistemi üzerinde , SIL-20A HT oto örnekleyici, CTO-10AS kolon kompartmanı ve SPD-M20A model diyot dizi (array) dedektörü mevcuttur.

3.3.2.1. Optimum mobil faz bileşiminin belirlenmesi

Optimum mobil faz bileşiminin belirlenmesi için mobil faz olarak metanol (MeOH), asetonitril (ACN) ve su ve ayrıca; pH'ı ayarlamak için de formik asit (FA) kullanılarak çok sayıda mobil faz bileşimi denenmiştir. Hacimce farklı miktarlarda su:MeOH:FA; su:ACN:FA ve MeOH:ACN:FA karışımları kullanılarak hazırlanan mobil faz bileşimleri Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan mobil faz bileşimleri

Sistem no	Kullanılan mobil faz bileşimi (hacimce)
1	Su:MeOH:FA (95:5:0,1)
2	Su:MeOH:FA (70:30:0,1)
3	Su:MeOH:FA (50:50:0,1)
4	Su:MeOH:FA (30:70:0,1)
5	Su:MeOH:FA (5:95:0,1)
6	Su:ACN:FA (95:5:0,1)
7	Su:ACN:FA (70:30:0,1)
8	Su:ACN:FA (50:50:0,1)
9	Su:ACN:FA (30:70:0,1)
10	Su:ACN:FA (5:95:0,1)
11	MeOH:ACN:FA (95:5:0,1)
12	MeOH:ACN:FA (70:30:0,1)
13	MeOH:ACN:FA (50:50:0,1)
14	MeOH:ACN:FA (30:70:0,1)
15	MeOH:ACN:FA (5:95:0,1)

3.3.2.2. Optimum akış hızının belirlenmesi

Optimum akış hızının belirlenmesi için 0,10 mL/dk, 0,15 mL/dk, 0,20 mL/dk, 0,25 mL/dk, 0,30 mL/dk, 0,35 mL/dk, 0,40 mL/dk, 0,50 mL/dk, 0,60 mL/dk, 0,75 mL/dk ve 1,00 mL/dk olmak üzere 11 farklı akış hızı denenmiştir.

3.3.2.3. Optimum kolon sıcaklığının belirlenmesi

Optimum kolon sıcaklığının belirlenmesi için 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 80 °C ve 100 °C olmak üzere 8 farklı kolon sıcaklığı test edilmiştir.

3.3.2.4. Optimum enjeksiyon hacminin belirlenmesi

Optimum enjeksiyon hacminin belirlenmesi için 1 µL, 2 µL, 3 µL, 4 µL, 5 µL, 6 µL, 7 µL, 8 µL, 9 µL ve 10 µL olmak üzere 10 farklı enjeksiyon hacim denemesi yapılmıştır.

3.3.3. Metot validasyonu

Metot validasyonunu yapmak için öncelikle 1000 mg/L'lik asparajin ana stok çözeltisi ve 100 mg/L'lik asparajin ara stok çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra, bu çözeltilerin uygun miktarlarda seyreltilmesiyle 1 mg/L, 2 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L, 50 mg/L ve 100 mg/L'lik konsantrasyonlarda asparajin çözeltileri elde edilmiş ve metot validasyonunda kullanılmıştır. Metot validasyonunun gerçekleştirilmesi için doğrusalılık, doğruluk, kesinlik, LOD, LOQ ve seçicilik parametreleri belirlenmiştir.

3.3.3.1. Doğrusallık parametresinin belirlenmesi

Doğrusallık parametresinin belirlenmesi için 1 mg/L, 2 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L, 50 mg/L ve 100 mg/L olmak üzere 7 farklı asparajin konsantrasyonu kullanılarak kalibrasyon doğrusu çizilmiştir. Bu parametrede yapılan çalışmalar, 10 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.3.3.2. Doğruluk parametresinin belirlenmesi

Doğruluk parametresini belirleyebilmek için hazırlanan 7 farklı konsantrasyondaki asparajin çözeltisi HPLC cihazına enjekte edilmiş ve ortalama pik alanı, ortalama konsantrasyon ve % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır.

3.3.3.3. Kesinlik parametresinin belirlenmesi

Kesinliği belirlemek için elde edilen pik alanları kullanılarak standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Kesinlik parametresi analizleri için düşük, orta ve yüksek konsantrasyon olmak üzere 3 farklı konsantrasyonda numuneler hazırlanmıştır. Her bir analiz 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar günün farklı zamanlarında ve 3 farklı günde gerçekleştirilerek gün içi ve günler arası kesinlik parametresi belirlenmiştir (Açar vd. 2013).

3.3.3.4. LOD ve LOQ değerlerinin hesaplanması

Optimize edilen metodun LOD ve LOQ değerlerinin hesaplanmasında kalibrasyon doğrusu eşitliğinden yararlanılmıştır. Öncelikle kalibrasyon eşitliğinden yararlanılarak çalışılan konsantrasyonlara karşılık gelen y_{teo} değerleri hesaplanmıştır. Daha sonra, hesaplanan y_{teo} değerleri Eşitlik 3.1'de yerine yazılarak standart sapma değeri bulunmuştur. Eşitlik 3.2'den yararlanılarak LOD ve Eşitlik 3.3'ten faydalanılarak LOQ değerleri hesaplanmıştır (Açar vd. 2013).

$$\text{Standart Sapma (SD)} = \sqrt{\frac{\sum(y_{den}-y_{teo})^2}{n-2}} \quad (3.1)$$

$$\text{LOD} = \frac{3 \times \text{SD}}{m} \quad (3.2)$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times \text{SD}}{m} \quad (3.3)$$

y_{den} : Deneysel elde edilen pik alanı,

y_{teo} : Kalibrasyon eşitliğinden hesaplanan pik alanı,

n : Çalışılan standart sayısı,

m : Kalibrasyon doğrusunun eğimi.

3.3.3.5. Seçicilik parametresinin belirlenmesi

Seçicilik çalışması için asparajın ve arjinin standartları kullanılmıştır. Bunun için asparajın ve arjininin kalibrasyon doğruları çizilmiştir. Kuşkonmaz numunesi HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Burada, asparajın ve arjinin miktarları hesaplanmıştır. Daha sonrasında, asparajın ve arjininin standart kalibrasyon çözeltileri bilinen miktarda olmak üzere kuşkonmaz numunesine ayrı ayrı eklenmiştir. Bu karışımlar tekrar HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Daha sonra, eklenen standart çözeltilerin numunede birbirlerinin oranlarını nasıl değiştirdiği kontrol edilmiştir.

3.3.4. *Asparagus lycicus* bitkisinin fitokimyasal karakterizasyonu

3.3.4.1. Materyalin toplanması

Asparagus lycicus (Likya kuşkonmazı) Elmalı-Korkuteli arasından Elmalı çıkışından yaklaşık olarak 1100 m yükseklikten toplanmıştır. Materyalin gölgede kurutulma işlemi tamamlandıktan sonra analizlerde kullanılmak üzere Retsch marka öğütücüde 1000 rpm'de öğütülme işlemi yapılmıştır. Öğütülmüş bitki numunesi, ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilinceye kadar 4 °C'de saklanmıştır.

3.3.4.2. Ekstraksiyon işlemi

Örneklerin ekstraksiyon işlemini gerçekleştirmek için örneklerden 0,1 mg hassasiyette 0,5 g tartılmış, üzerlerine 9,5 mL % 80'lik metanol eklenerek oda koşullarında orbital çalkalayıcıda 300 rpm'de 1 saat ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ekstrakt karışımı +4 °C'de 5000 rpm'de 5 dk süreyle santrifüj işlemi yapılmıştır. Ekstraktın üst fazı olan sıvı kısmı alınmıştır. Daha sonra, kalıntı olarak kalan katı fazın üzerine 10 mL % 80'lik metanol-su karışımı ilave edilerek tekrar orbital çalkalayıcıya konulmuştur. Bu işlem toplam 3 kez tekrar edilmiştir. Alınan üst fazlar birleştirilerek toplam hacim 30 mL oluncaya kadar %80'lik metanol eklenmiştir. Elde edilmiş olan ekstrakt, 0,45 µm'lik membran filtrelerden geçirildikten sonra analize başlanmıştır.

3.3.4.3. Asparajin miktar tayini

Bitkinin içerdiği asparajin miktarı, çalışmanın ilk kısmında optimize edilmiş metot parametreleri kullanılarak hesaplanmıştır. Bunun için ekstrakte edilmiş ve filtreden geçirilmiş örnek, uygun oranlarda seyreltilmiş ve Shimadzu marka HPLC cihazına enjekte edilmiştir.

Analizlerde kolon olarak C18 kolon kullanılmıştır. Mobil faz olarak su:metanol:FA (95:5:0,1) mobil fazı kullanılmıştır. Mobil faz akışı, 0,30 mL/dk akış hızında gradiyent akış ile gerçekleştirilmiştir. Kolon sıcaklığı olarak 35 °C ve enjeksiyon hacmi olarak 3 µL kullanılmıştır

3.3.4.4. Toplam fenolik madde miktarı

Analizlerde toplam fenolik madde miktarını ölçmek amacıyla gallik asit standardı kullanılmıştır. 7 farklı konsantrasyonda metanol içerisinde hazırlanan gallik asit çözeltilerinin Shimadzu marka UV-Visible spektrofotometre cihazı ile absorpsiyon spektrumları kaydedilmiştir. Spektrumlardan gallik asit için maksimum absorpsiyon dalga boyunun 765 nm olduğu saptanmıştır. Standart çözeltilerin 765 nm’de okunan absorbans değerleri ile gallik aside ait kalibrasyon doğrusu çizilmiştir. Daha sonrasında, filtre edilmiş olan ekstraktan 100 µL kadar alınıp üzerine 900 µL saf su, 5 mL 0,2 M Folin-Ciocalteu reaktifi ve 4 mL Na₂CO₃ çözeltisi (75 g/L) eklenerek iyi bir şekilde karışımı sağlanmış ve 1,5 saat karanlık ortamda bekletilmiştir. Daha sonrasında elde edilen karışımın absorbans değerleri Shimadzu marka UV-Visible spektrofotometre cihazında 765 nm dalga boyunda okunmuştur. Toplam fenolik madde miktarı, gallik asit kalibrasyon doğrusu kullanılarak hesaplanmıştır (Spanos ve Wrolstad 1990).

3.3.4.5. Toplam flavanoid madde miktarı

Analizlerde toplam flavanoid madde miktarını ölçmek amacıyla kateşin standardı kullanılmıştır. 5 farklı konsantrasyonda metanol içerisinde hazırlanan kateşin çözeltilisinin Shimadzu marka UV-Visible spektrofotometre cihazı ile absorpsiyon spektrumları kaydedilmiştir. Spektrumlardan kateşin için maksimum absorpsiyon dalga boyunun 510 nm olduğu saptanmıştır. Standart çözeltilerin 510 nm’de okunan absorbans değerleri ile kateşine ait kalibrasyon doğrusu çizilmiştir. Daha sonrasında, 1 mL ekstrakt üzerine 4 mL kadar saf su eklenmiştir. Sonrasında, karışıma 0,3 mL %5’lik NaNO₂ ilave edilip karıştırılmış, 5 dk sonra üzerlerine 5 dk aralıklarla 0,6 mL %10’luk AlCl₃.6H₂O ve 2 mL 1 M’lık NaOH ilave edilmiş ve en sonunda da toplam hacim saf suyla 10 mL oluncaya kadar tamamlanmıştır. İyi bir şekilde karıştırma işlemi gerçekleştirildikten sonra, Shimadzu marka UV-Visible spektrofotometre cihazında 510 nm dalga boyunda okunmuştur. Toplam flavanoid madde miktarı kateşin kalibrasyon doğrusu kullanılarak kateşin eşdeğeri (CE) cinsinden hesaplanmıştır (Karadeniz vd. 2005).

3.3.4.6. Fenolik ve flavanoid bileşen miktarı

Örneklerin fenolik ve flavanoid bileşimleri standartlar kullanılarak oluşturulmuş kalibrasyon doğruları kullanılarak hesaplanmıştır. Fenolik ve flavanoid madde bileşimi olarak rosmarinik asit, ferulik asit, klorojenik asit, o-kumarik asit, p-

kumarik asit ve sinapik asit maddeleri kullanılmıştır. Bunun için fenolik asit ve flavanoid standartları metanol içerisinde çözülerek 5 farklı konsantrasyonda kalibrasyon çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin HPLC cihazında okumaları yapılarak kalibrasyon doğruları çizilmiştir. Ön denemeler sonucunda tespit edilmiş oranlarda örnekler seyreltikten sonra, Shimadzu marka HPLC cihazına enjekte edilmiş ve kalibrasyon doğruları kullanılarak miktarları hesaplanmıştır.

Analizlerde kolon olarak C18 kolon kullanılmıştır. Mobil fazlar olarak metanol:su (5/95, % 0,01 formik asit ve 5 µM amonyum format içeren) ve metanol (% 0,01 formik asit ve 5 µM amonyum format içeren) mobil fazları kullanılmıştır. Mobil faz akışı olarak 0,25 mL/dk akış hızında gradiyent akış uygulanmıştır. Kolon sıcaklığı olarak 40 °C ve enjeksiyon hacmi olarak 5 µL kullanılmıştır (Fischer vd. 2011).

3.3.4.7. Toplam antioksidan aktivite miktarı

Metanol kullanılarak farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış 0,1 mL ekstrakt üzerine 3,9 mL 2,2-difenil-1-pikril hidrazil (DPPH) (25 mg/L) çözeltisi ilave edildikten sonra vortekste 30 saniye karıştırılmış, daha sonra oda koşullarında ve karanlık bir yerde 30 dakika beklemeye bırakılmıştır. Bu süre sonunda Shimadzu marka UV-Visible spektrofotometre cihazında 515 nm dalga boyunda absorbens değerleri okunmuş ve % inhibisyon değerleri (örneklerin DPPH radikalini süpürücü etkileri) Eşitlik 3.4 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(ADPPH - A_{\text{ekstrakt}}) / ADPPH] \times 100 \quad (3.4)$$

ADPPH: 0,1 mL metanol ve 3,9 mL DPPH çözeltisinin absorbens değeri,

A_{ekstrakt} : Ekstraktların 30 dk sonundaki absorbens değeri,

Sıfırlama çözeltisi: Saf metanol.

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış olan örnekler kullanılarak tespit edilmiş olan % inhibisyon değerleri ile birlikte konsantrasyon değerleri grafiğe aktarılarak her örnek için DPPH'in etkinliğini %50 oranında düşüren etkili konsantrasyon (EC_{50}) değeri hesaplanmıştır (Lafka vd. 2007).

3.3.4.8. C vitamini miktarı

Kuşkonmaz ekstraktının C vitamini miktarını tayin edebilmek amacıyla askorbik asit standardı kullanılmıştır. 7 farklı konsantrasyonda saf su içerisinde hazırlanan askorbik asit çözeltilerinin Shimadzu marka HPLC cihazı ile pik alanları hesaplanmıştır. Pik alanları kullanılarak askorbik aside ait kalibrasyon doğrusu çizilmiştir. Daha sonrasında, ekstraksiyon için uygun miktarda tartımı alınan kuşkonmaz % 6'lık metafosforik asit çözeltisi ile 1:1 oranında karıştırılmış, daha sonra 1 dakika boyunca homojenize edilmiştir. Homojenize edilmiş örneklerin 5000 rpm'de 4 °C'de 10 dakika

boyunca santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Berrak kısım alınarak % 6'lık metafosforik asit ile askorbik asit konsantrasyonuna göre seyreltilmiştir. Seyreltilmiş örnekler 0,45 µm'lik membran filtrelerden geçirildikten sonra Shimadzu marka HPLC cihazına enjekte edilmiştir. C vitamini miktarı askorbik asit kalibrasyon doğrusu kullanılarak hesaplanmıştır (Karhan vd. 2004).

Analizlerde kolon olarak C18 kolon; mobil faz olarak saf su (25 mM KH₂PO₄ (3,40 g/L), pH o-fosforik asit ile 3,0'a ayarlanmış) mobil fazı; mobil faz akışı olarak 0,60 mL/dk akış hızında izokratik akış; kolon sıcaklığı olarak 25 °C ve enjeksiyon hacmi olarak 10 µL kullanılmıştır.

3.3.4.9. Organik asit bileşen miktarı

Kuşkonmaz ekstraktının organik asit bileşen miktarını ölçmek amacıyla malik asit standardı kullanılmıştır. 7 farklı konsantrasyonda saf su içerisinde hazırlanan malik asit çözeltilerinin Shimadzu marka HPLC cihazı ile pik alanları hesaplanmıştır. Pik alanları kullanılarak malik aside ait kalibrasyon doğrusu çizilmiştir. Daha sonra, analizi yapılacak kuşkonmaz örnekleri ultra saf su ile seyreltilmiş ve ardından 5 dk boyunca homojenize edilmiştir. Homojenize edilmiş örnekler 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Berrak kısım alınarak 0,45 µm'lik membran filtrelerden geçirildikten sonra HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Organik asit bileşen miktarı, malik asit kalibrasyon doğrusu kullanılarak hesaplanmıştır (Artık vd. 1997).

Analizler Shimadzu marka HPLC cihazında gerçekleştirilmiştir. Analizlerde C18 kolon; mobil faz olarak saf su (25 mM KH₂PO₄ (3,40 g/L), pH o-fosforik asit ile 2,3'e ayarlanmış) mobil fazı; mobil faz akışı olarak 0,90 mL/dk akış hızında izokratik akış; kolon sıcaklığı olarak 30 °C ve enjeksiyon hacmi olarak 10 µL kullanılmıştır.

3.3.4.10. Şeker bileşenleri miktarı

Analizlerde şeker bileşenleri miktarını ölçmek amacıyla fruktoz ve glikoz standartları kullanılmıştır. 7 farklı konsantrasyonda saf su içerisinde hazırlanan fruktoz ve glikoz çözeltilerinin Shimadzu marka HPLC cihazı ile pik alanları hesaplanmıştır. Pik alanları kullanılarak fruktoz ve glikozu ait kalibrasyon doğruları çizilmiştir. Daha sonra, analizi yapılacak kuşkonmaz örnekleri şeker bileşimi yoğunluğuna göre ultra saf su ile seyreltilmiştir. Ardından, 1 dk boyunca homojenize edilmiştir. Homojenize edilmiş örneklerin 5000 rpm'de 10 dk boyunca santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Berrak kısım alınarak 0,45 µm'lik membran filtrelerden geçirilmiş ve HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Şeker bileşenleri miktarı fruktoz ve glikoz kalibrasyon doğruları kullanılarak hesaplanmıştır (Turhan 2014).

Analizler Shimadzu marka HPLC cihazında gerçekleştirilmiştir. Analizlerde kolon olarak Transgenomic marka amin kolon (300 mm x 7,8 mm x 8µm); mobil faz olarak saf su mobil fazı; mobil faz akışı olarak 0,50 mL/dk akış hızında izokratik akış; kolon sıcaklığı olarak 80 °C ve enjeksiyon hacmi olarak 20 µL kullanılmıştır.

3.3.4.11. Toplam antosiyanin madde miktarı

Deney tüpüne 1 mL ekstrakt aktararak üzerine 24 mL 0,025 M KCl çözeltisi eklenmiş ve HCl kullanılarak pH'ı 1,0'e ayarlanmıştır. Yine aynı şekilde diğer bir tüpe de aynı örnekten 1 mL alınarak, üzerine 24 mL 0,4 M sodyum asetat çözeltisi ilave edilmiş ve NaOH çözeltisi kullanılarak pH'ı 4,5'a ayarlanmıştır. Daha sonra, her iki çözeltinin spektrofotometre cihazında 520 ve 700 nm dalga boylarında absorbans değerleri okunmuştur. Okumalarda kontrol olarak saf su kullanılmıştır (AOAC, 2005).

Toplam antosiyanin madde miktarı Eşitlik 3.5 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Toplam antosiyanin} = \frac{A \times MW \times DF \times 1000}{\epsilon \times l} \quad (3.5)$$

$$A \text{ (absorbans değeri)} = (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 1,0} - (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 4,5}$$

$$MW \text{ (siyanidin-3-glikozitin molekül ağırlığı)} = 449,2 \text{ g/mol}$$

$$DF \text{ (seyreltme faktörü)} = 1$$

$$\epsilon \text{ (siyanidin-3-glikozit için molar absorptivite)} = 26.900 \text{ L.cm}^{-1}.\text{mol}^{-1}$$

3.3.4.12. Toplam yağ miktarı

Sokselet ekstraksiyon işleminde kullanılan cam beherler kurutma fırınında sabit ağırlığa gelinceye kadar kurutulmuş ve beherlerin tara ölçümü alınmıştır. Kurutma işlemi tamamlandıktan sonra, öğütülmüş örnekten yaklaşık olarak 5 g tartılarak sokselet kartuşunun içerisine konulmuştur. Kartuş sokselet ekstraksiyon düzeneğine yerleştirildikten sonra, sokselet ekstraksiyon balonuna 140 mL petrol eteri eklenerek ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon işlemi tamamlandıktan sonra ekstraksiyon balonu 80 °C'de 1 saat kurutma fırınında bekletilmiştir. Kurutma fırınından çıkarılan cam beher desikatörde soğutulduktan sonra tartılarak örnekteki yağ miktarı belirlenmiştir (TS4967).

3.3.4.13. Yağ asiti bileşenleri miktarı

Yaklaşık olarak 0,1 g yağ tartılmış, sonrasında 0,2 mL 2 M metanollü KOH çözeltisi eklenip vortekste karıştırılmıştır. Sonrasında, 2 mL kadar hekzan eklenip vorteks cihazında karışımı sağlandıktan 5 dk kadar sonra hekzanın yer aldığı üst fazdan 1 mL kadar analiz edilmek üzere alınmıştır. Örneğin, gaz kromatografisi (Agilent 7890A) cihazına 1 µL enjeksiyon hacminde 40:1 split oranı ile enjeksiyonu yapılmıştır. Yağ asidi bileşenlerinin ayrılması amacıyla kapiler kolon (HP Innowax Capillary; 60,0 m x 0,25 mm x 0,25 µm) kullanılmıştır. Kolon, bitiş kısmında bir ayraç (splitter) yardımı ile alev iyonizasyon dedektörüne (FID) ve kütle spektrometresi dedektörüne (Agilent 5975C) akış oranı 1:1 olacak şekilde iki kısma ayrılmıştır. Analiz sırasında taşıyıcı gaz olarak helyum 0,8 mL/dk akış hızına sahip olacak şekilde kullanılmıştır. Enjektör sıcaklığı 250 °C'ye sabitlenmiş, kolondaki sıcaklık programı 150 °C'den 200 °C'ye 10 °C/dk (5 dakika), 200 °C'de 5 dakika, 200 °C'den 250 °C'ye 5 °C/dk (10

dakika) ve 250 °C’de 10 dakika toplamda 30 dakika olarak oluşturulmuştur. Kütle dedeksiyonu için tarama aralığı (m/z) 35-450 atomik kütle ünitesi ve elektron bombardımanı iyonizasyon enerjisi 70 eV olacak şekilde ayarlanmıştır. Yağ asitleri bileşenlerini belirleyebilmek amacıyla WILEY kütüphanesi kullanılmıştır. Yağ asidi bileşenlerinin miktarlarını tespit etmek için FID dedektörünün kaydettiği değerler kullanılmıştır.

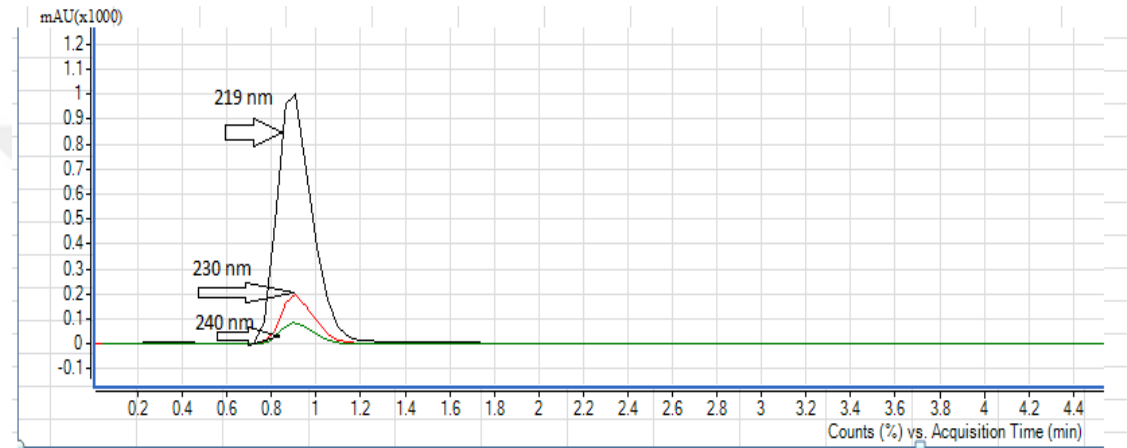


4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Asparajin İçin Metot Optimizasyonu

4.1.1. Optimum dalga boyunun belirlenmesi

Asparajin tayini için optimum dalga boyunun belirlenmesinde 219 nm, 230 nm ve 240 nm olmak üzere 3 farklı dalga boyunda çalışmalar yapılmıştır. Asparajin için 219 nm, 230nm ve 240 nm’de dalga boylarında kaydedilen kromatogramlar Şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1. Asparajin için 219 nm, 230 nm ve 240 nm dalga boylarında kaydedilen kromatogramlar

Elde edilen sonuçlara göre asparajinin maksimum absorplama yaptığı dalga boyu 219 nm olarak tespit edilmiştir.

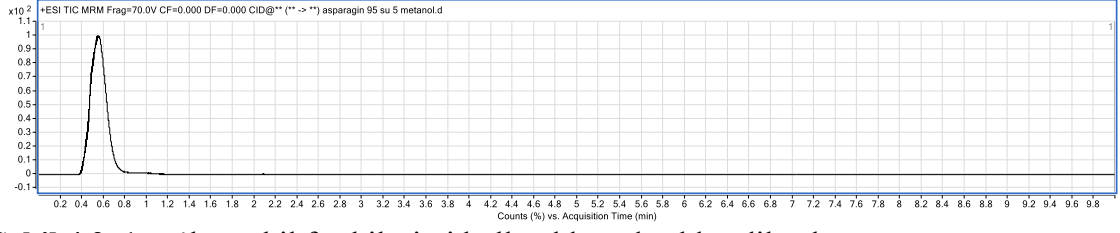
4.1.2. Optimum mobil faz bileşiminin belirlenmesi

Asparajin tayini için en uygun mobil fazın belirlenebilmesi amacıyla mobil faz çözeltileri olarak metanol (MeOH), asetonitril (ACN) ve su ve pH'ı ayarlamak için de formik asit (FA) kullanılarak çok sayıda mobil faz bileşimiyle denemeler yapılmıştır. Kullanılan mobil faz bileşimleri Çizelge 4.1’de verilmiştir.

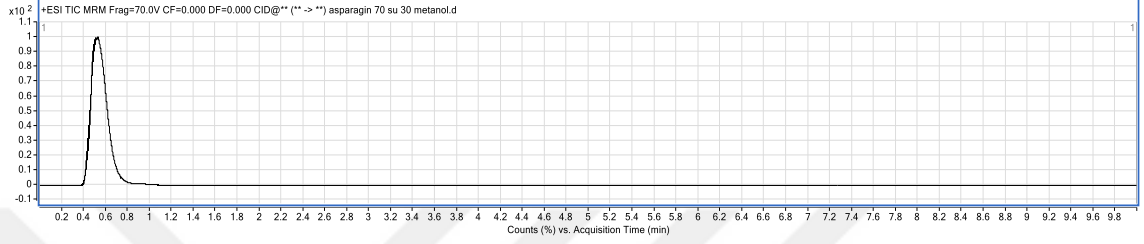
Çizelge 4.1. Kullanılan farklı mobil faz bileşimleri (V:V:V) ve elde edilen sonuçlar

Sistem no	Kullanılan mobil faz bileşimi	Sonuç
1	Su:MeOH:FA (95:5:0,1)	Pik şekli düzgün, analiz süresi kısa, kuyruklanma yok.
2	Su:MeOH:FA (70:30:0,1)	Pik şekli düzgün değil, analiz süresi kısa, kuyruklanma yok.
3	Su:MeOH:FA (50:50:0,1)	Pik şekli düzgün değil, analiz süresi kısa, kuyruklanma yok.
4	Su:MeOH:FA (30:70:0,1)	Pik şekli düzgün değil, analiz süresi kısa, kuyruklanma var.
5	Su:MeOH:FA (5:95:0,1)	Pik şekli düzgün değil, analiz süresi kısa, kuyruklanma var.
6	Su:ACN:FA (95:5:0,1)	Pik şekli düzgün değil, analiz süresi kısa, kuyruklanma yok.
7	Su:ACN:FA (70:30:0,1)	Pik şekli düzgün değil, analiz süresi kısa, kuyruklanma yok.
8	Su:ACN:FA (50:50:0,1)	Pik şekli düzgün değil, analiz süresi kısa, kuyruklanma var.
9	Su:ACN:FA (30:70:0,1)	Pik şekli düzgün değil, analiz süresi kısa, kuyruklanma var.
10	Su:ACN:FA (5:95:0,1)	Pik şekli düzgün değil, kuyruklanma var.
11	MeOH:ACN:FA (95:5:0,1)	Pik şekli düzgün değil, kuyruklanma var.
12	MeOH:ACN:FA (70:30:0,1)	Pik şekli düzgün değil, piklerde bölünme var.
13	MeOH:ACN:FA (50:50:0,1)	Pik şekli düzgün değil, piklerde bölünme var.
14	MeOH:ACN:FA (30:70:0,1)	Pik şekli düzgün değil, kuyruklanma var.
15	MeOH:ACN:FA (5:95:0,1)	Pik şekli düzgün değil, piklerde bölünme var.

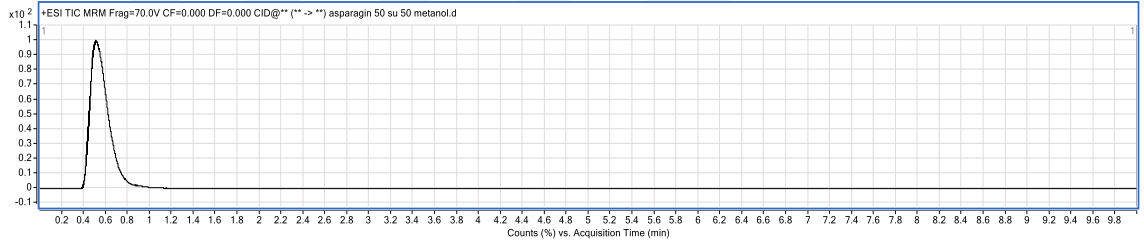
Farklı mobil faz denemelerinde elde edilen kromatogramlar Şekil 4.2-4.16’da gösterilmiştir.



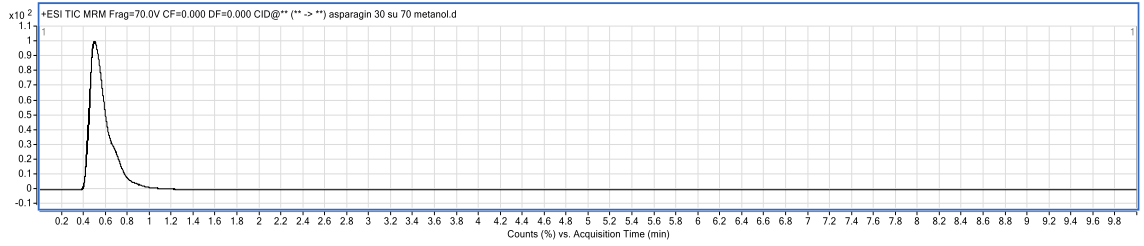
Şekil 4.2. 1 no’lu mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram



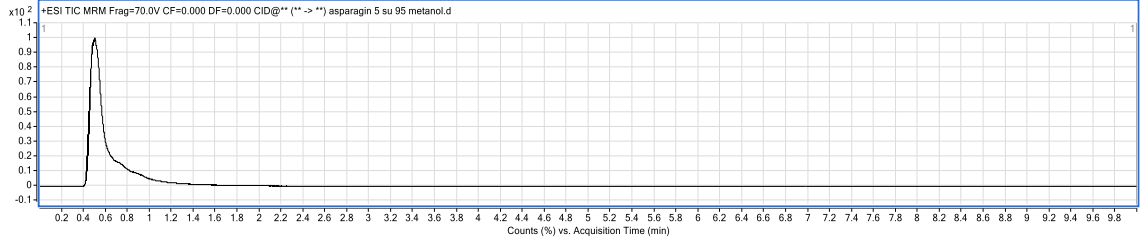
Şekil 4.3. 2 no’lu mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram



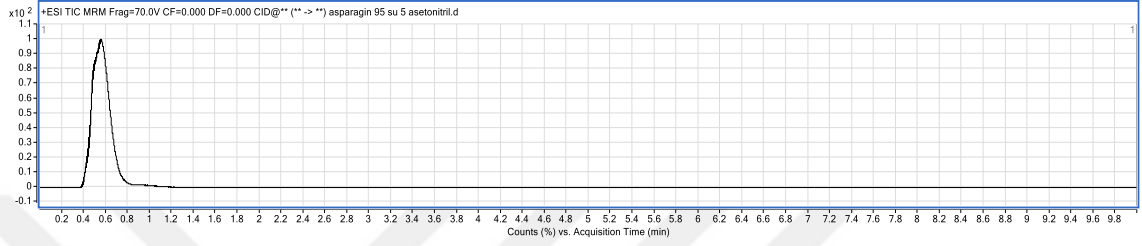
Şekil 4.4. 3 no’lu mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram



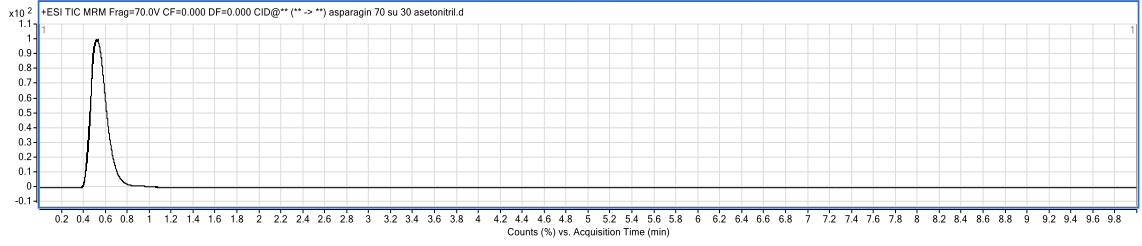
Şekil 4.5. 4 no’lu mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram



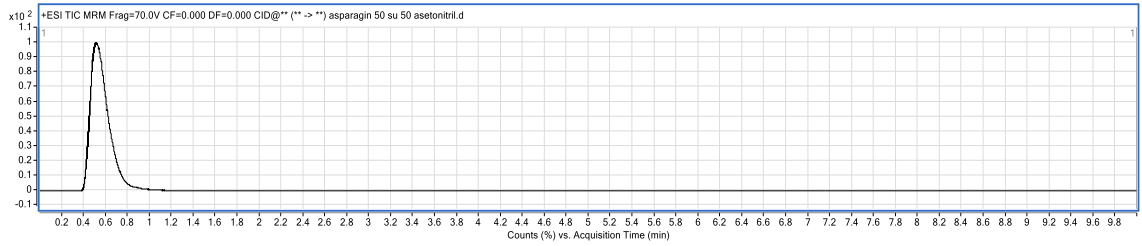
Şekil 4.6. 5 no'lu mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram



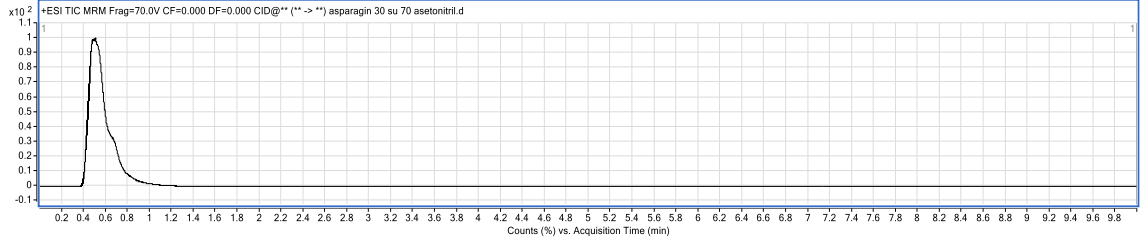
Şekil 4.7. 6 no'lu mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram



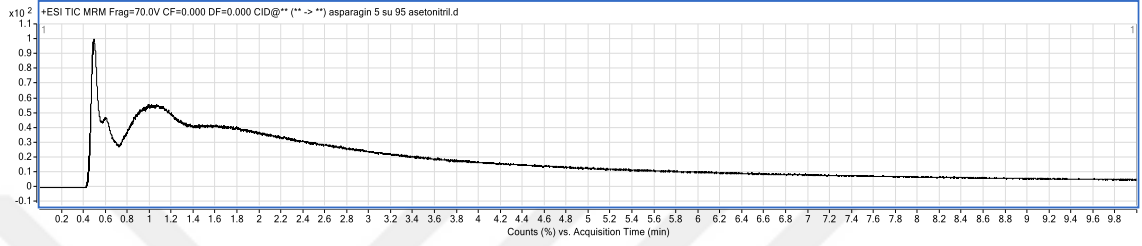
Şekil 4.8. 7 no'lu mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram



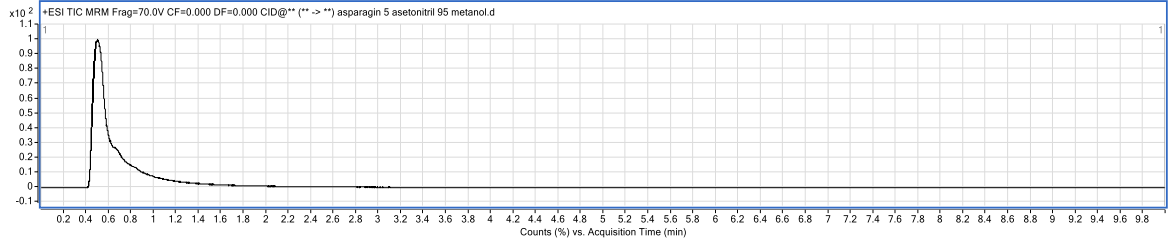
Şekil 4.9. 8 no'lu mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram



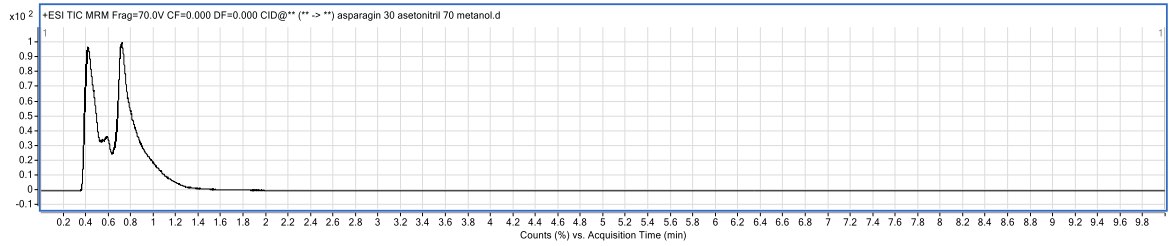
şekil 4.10. 9 no'lu mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram



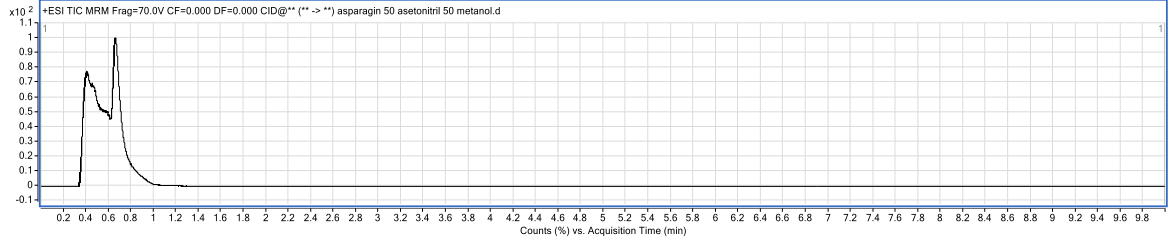
şekil 4.11. 10 no'lu mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram



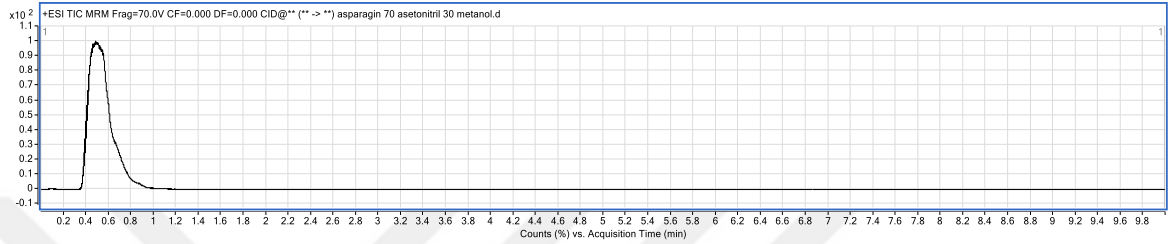
şekil 4.12. 11 no'lu mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram



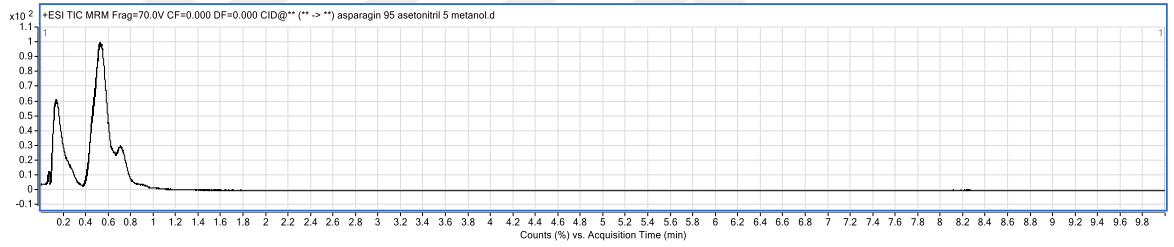
şekil 4.13. 12 no'lu mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram



Şekil 4.14. 13 no’lu mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram



Şekil 4.15. 14 no’lu mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram



Şekil 4.16. 15 no’lu mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram

Farklı mobil faz bileşimleriyle yapılan denemeler sonucunda 4, 5, 8, 9, 10, 11 ve 14 no’lu sistemlerin mobil faz denemelerinde ana piklerde kuyruklanma tespit edilmiştir. 12, 13 ve 15 no’lu sistemlerin mobil faz denemelerinde ise piklerde bölünme görülmüştür. 2, 3, 6 ve 7 no’lu sistem denemelerinde ise pik şeklinde bozukluklar tespit edilmiştir. Ayrıca, en iyi sonuç veren piki tespit edebilmek amacıyla tüm denemelerde piklerin USP kuyruklanma faktörü (TF) değerleri Eşitlik 4.1 kullanılarak hesaplanmıştır (Snyder vd. 1997).

$$TF = W_{0,005} / 2f \quad (4.1)$$

$W_{0,005}$: % 5 pik yüksekliğinde ölçülen pik genişliği,

f : Pikin başlangıç noktası ile pik yüksekliğinin maksimum olduğu noktanın izdüşümü arasındaki uzaklık.

Eşitlik 4.1 kullanılarak hesaplanan USP kuyruklanma faktörü değerleri Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Kullanılan mobil fazlara göre hesaplanan USP kuyruklanma faktörü değerleri

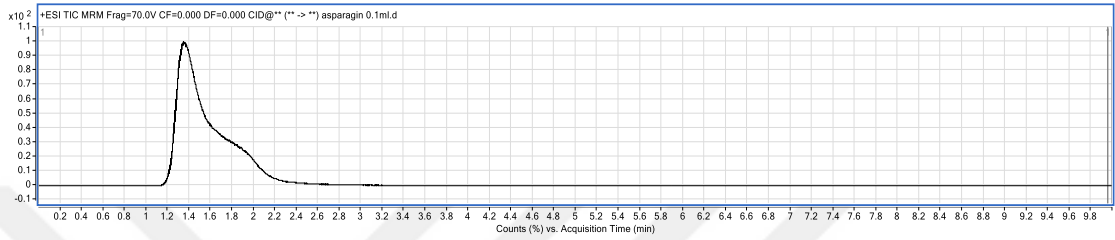
Etken madde	Sistem no	Mobil faz bileşimi	USP kuyruklanma faktörü
Asparajin	1	Su:MeOH:FA (95:5:0,1)	1,16
	2	Su:MeOH:FA (70:30:0,1)	1,27
	3	Su:MeOH:FA (50:50:0,1)	1,18
	4	Su:MeOH:FA (30:70:0,1)	1,28
	5	Su:MeOH:FA (5:95:0,1)	1,20
	6	Su:ACN:FA (95:5:0,1)	1,25
	7	Su:ACN:FA (70:30:0,1)	1,27
	8	Su:ACN:FA (50:50:0,1)	1,29
	9	Su:ACN:FA (30:70:0,1)	1,24
	10	Su:ACN:FA (5:95:0,1)	-
	11	MeOH:ACN:FA (95:5:0,1)	1,18
	12	MeOH:ACN:FA (70:30:0,1)	1,19
	13	MeOH:ACN:FA (50:50:0,1)	-
	14	MeOH:ACN:FA (30:70:0,1)	-
	15	MeOH:ACN:FA (5:95:0,1)	-

Elde edilen bu sonuçlara göre USP kuyruklanma faktörü en düşük olan deneme, en ideal sistem olarak seçilmiştir. Buna göre mobil faz denemeleri sonunda 1 no'lu sistem olan su:MeOH:FA (95/5/0,1) en iyi sonuç veren mobil faz bileşimi olarak seçilmiştir.

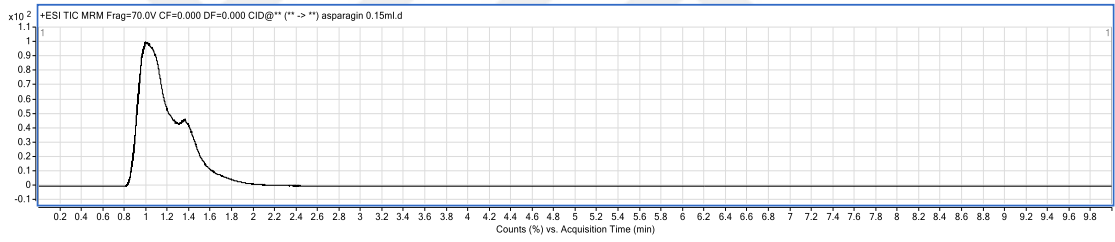
Cruz vd. (2016)'nin yaptıkları çalışmada asparajinin en ideal piki su:MeOH (80:20) mobil faz bileşiminde elde edilmiştir. Bizim elde ettiğimiz mobil faz bileşimi de bu çalışma ile tamamen aynı olmasa da benzerlik göstermektedir.

4.1.3. Optimum akış hızının belirlenmesi

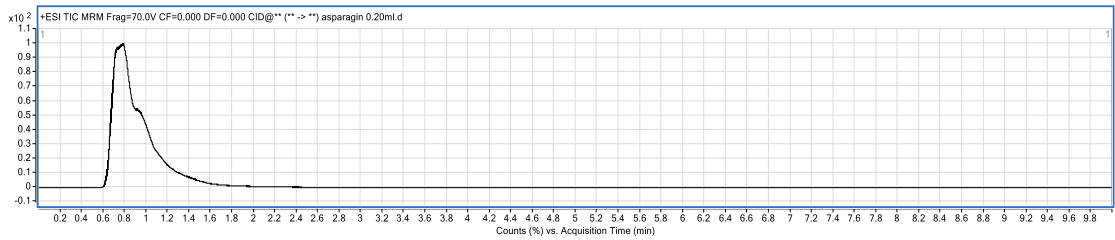
Optimum akış hızının belirlenmesi için 0,10 mL/dk, 0,15 mL/dk, 0,20 mL/dk, 0,25 mL/dk, 0,30 mL/dk, 0,35 mL/dk, 0,40 mL/dk, 0,50 mL/dk, 0,60 mL/dk, 0,75 mL/dk ve 1,00 mL/dk olmak üzere 11 farklı akış hızı denenmiştir. Tüm akış hızı denemelerinde mobil faz olarak bir önceki bölümde seçilen en uygun mobil faz bileşimi olan su:MeOH:FA (95/5/0,1) kullanılmıştır. Farklı akış hızlarında elde edilen kromatogramlar Şekil 4.17-4.27’de gösterilmiştir.



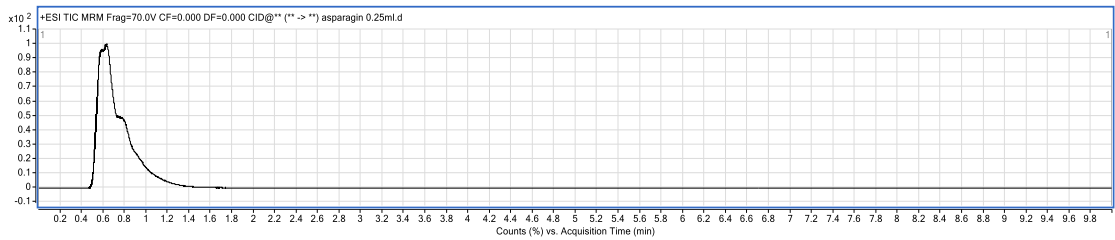
Şekil 4.17. 0,10 mL/dk’lik akış hızı kullanıldığında elde edilen kromatogram



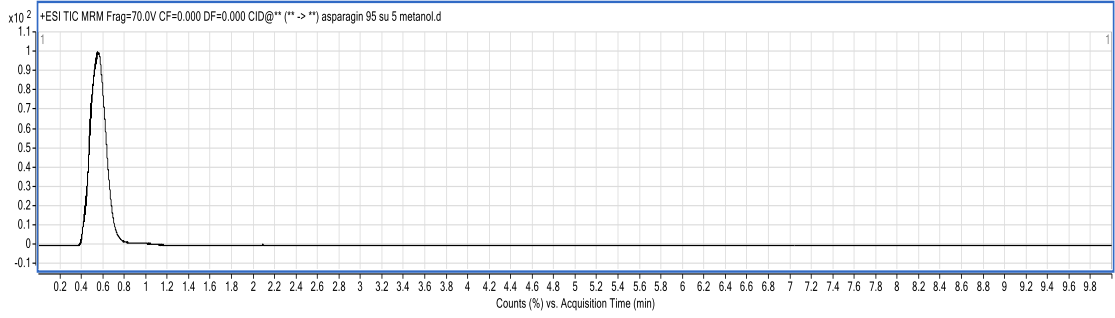
Şekil 4.18. 0,15 mL/dk’lik akış hızı kullanıldığında elde edilen kromatogram



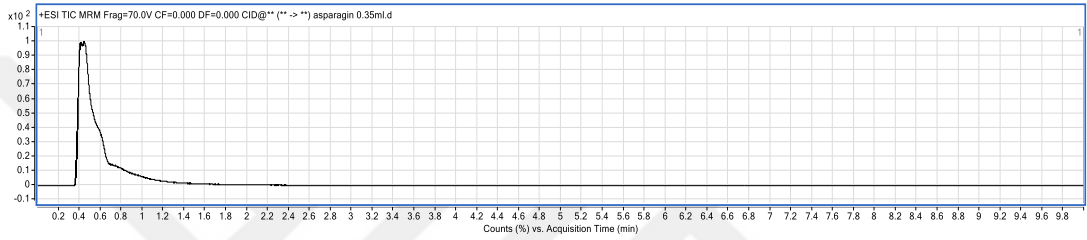
Şekil 4.19. 0,20 mL/dk’lik akış hızı kullanıldığında elde edilen kromatogram



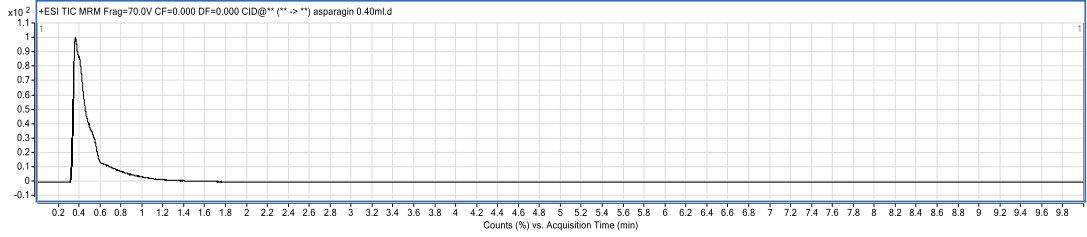
Şekil 4.20. 0,25 mL/dk’lik akış hızı kullanıldığında elde edilen kromatogram



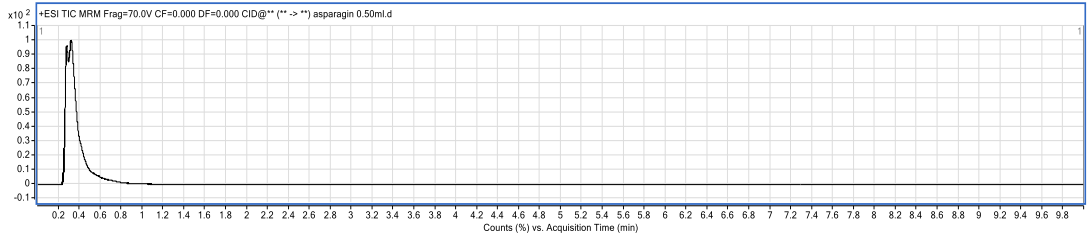
Şekil 4.21. 0,30 mL/dk'lik akış hızı kullanıldığında elde edilen kromatogram



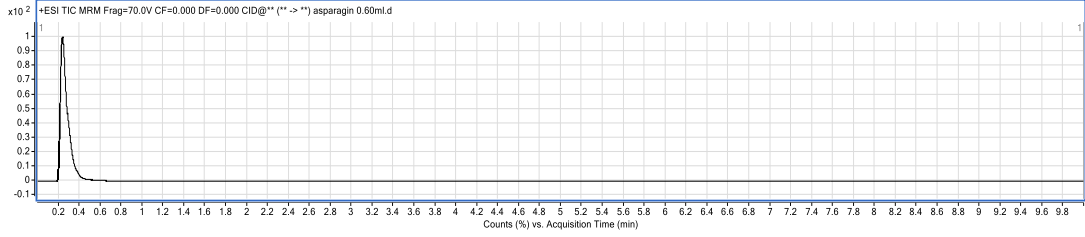
Şekil 4.22. 0,35 mL/dk'lik akış hızı kullanıldığında elde edilen kromatogram



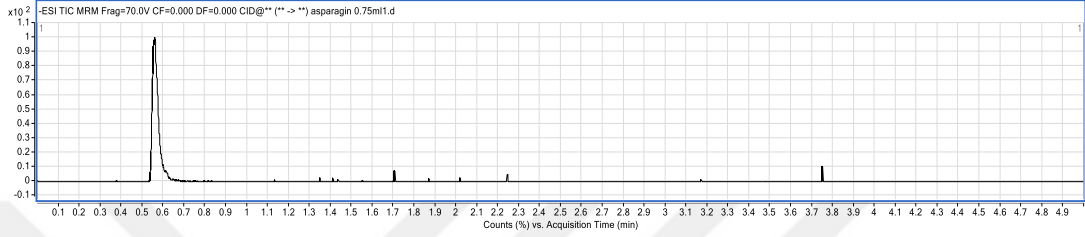
Şekil 4.23. 0,40 mL/dk'lik akış hızı kullanıldığında elde edilen kromatogram



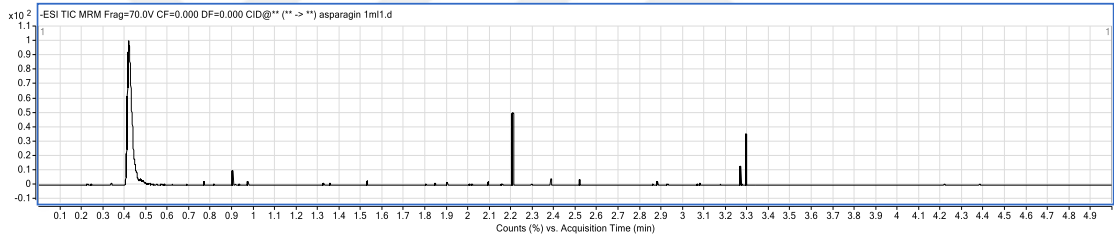
Şekil 4.24. 0,50 mL/dk'lik akış hızı kullanıldığında elde edilen kromatogram



Şekil 4.25. 0,60 mL/dk'lik akış hızı kullanıldığında elde edilen kromatogram



Şekil 4.26. 0,75 mL/dk'lik akış hızı kullanıldığında elde edilen kromatogram



Şekil 4.27. 1,00 mL/dk'lik akış hızı kullanıldığında elde edilen kromatogram

En uygun akış hızını belirleyebilmek için Van Deemter eğrisi çizilmiştir. Bunun için gerekli olan teorik tabaka yüksekliği (H) değerleri aşağıda yer alan Eşitlik 4.2 kullanılarak hesaplanmıştır (Tandoğan, 2012).

$$H = (L/N) \quad (4.2)$$

L: Kullanılan kolonun uzunluğu,

N: Teorik tabaka sayısı.

Teorik tabaka sayısını hesaplamak için de Eşitlik 4.3'ten yararlanılmıştır.

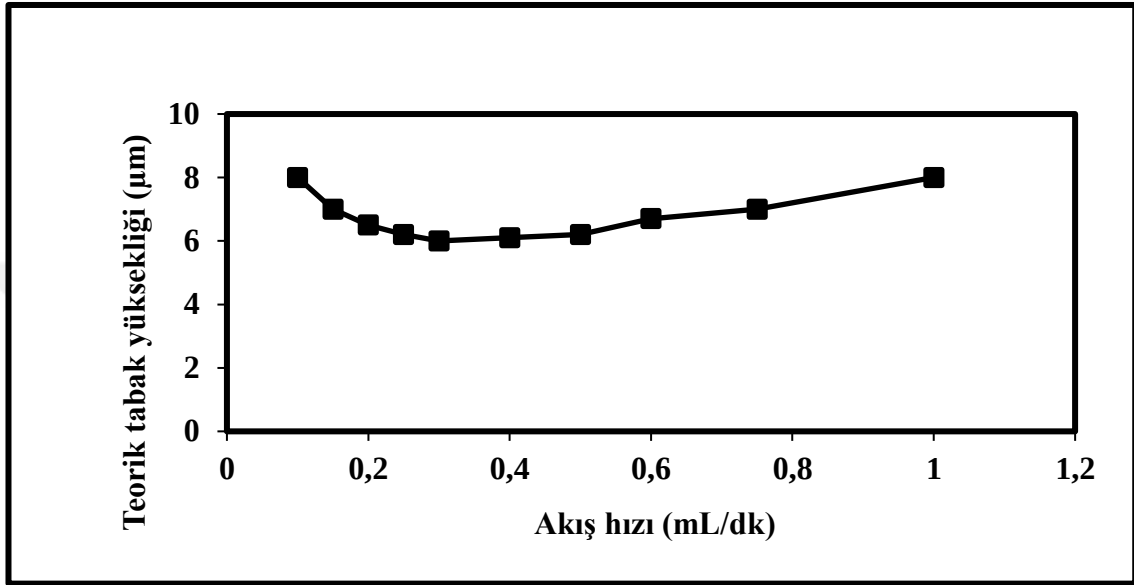
$$N = 16 (t_r/w_b)^2 \quad (4.3)$$

t_r: Alıkonma zamanı,

w_b : Pik taban genişliği,

N: Teorik tabaka sayısı.

Teorik tabaka yüksekliği verilerine karşı akış hızı değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle çizilen Van Deemter eğrisi Şekil 4.28’de sunulmuştur.



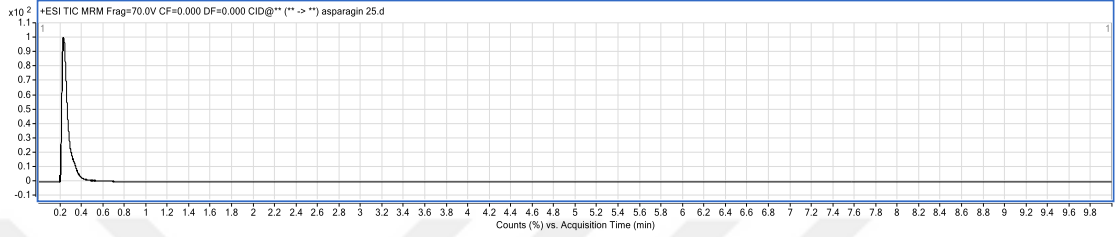
Şekil 4.28. Van Deemter eğrisi

Çizilen Van Deemter eğrisine göre en düşük tabaka yüksekliği esas alınarak saptanan optimum akış hızı değeri, 0,3 mL/dk olarak belirlenmiştir. Şekil 4.28’de yer alan Van Deemter eğrisi incelendiğinde; 0,2 mL/dk, 0,3 mL/dk, 0,4 mL/dk ve 0,5 mL/dk’lik akış hızlarında plaka yükseklikleri arasında ve alıkonma zamanları arasında önemli bir fark gözlemlenmemiştir. Diğer akış hızlarında ise plaka yüksekliklerinde artış olmuştur. Yüksek akış hızlarında analiz süresi çok kısa olmasına rağmen, plaka yüksekliği artmıştır. Sonuç olarak; analiz süresi ve plaka yükseklikleri birlikte incelendiğinde en uygun akış hızının 0,3 mL/dk olduğuna karar verilmiştir.

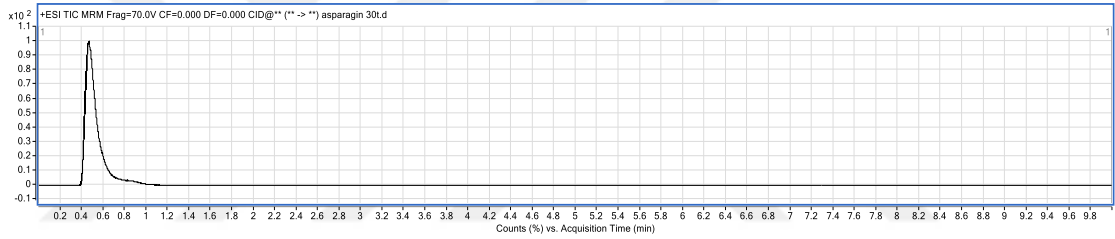
Literatürde asparajınle ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde, en uygun akış hızı olarak farklı değerlerin rapor edildiği görülmektedir. Bai vd. (2007), yaptıkları çalışmada asparajın tayini için akış hızı olarak 0,5 mL/dk’yi seçmişlerdir. Bartolomeo ve Maisano (2006), yaptıkları çalışmada 2 mL/dk akış hızını kullanmışlardır. Tojo vd. (2012), yaptıkları çalışmada akış hızı olarak 0,65 mL/dk’yi seçmişlerdir. Bu tez çalışmasında, Van Deemter eğrisinin kullanılmasıyla optimum akış hızı 0,3 mL/dk olarak belirlenmiştir.

4.1.4. Optimum kolon sıcaklığının belirlenmesi

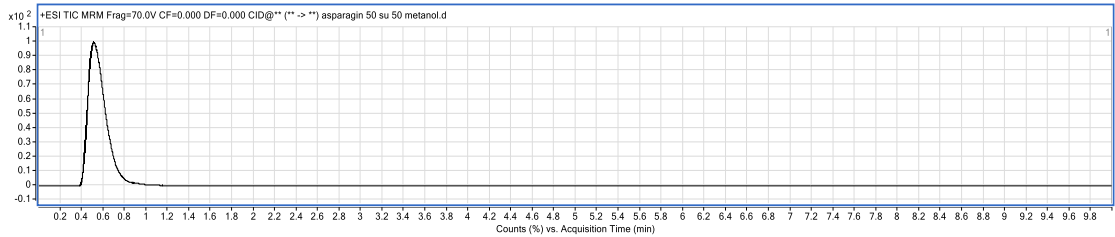
Optimum kolon sıcaklığının belirlenmesi için 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 80 °C ve 100 °C olmak üzere 8 farklı kolon sıcaklığı denenmiştir. Tüm kolon sıcaklığı denemelerinde daha önceki kısımlarda belirlenen en uygun mobil faz (su:MeOH:FA (95:5:0,1)) ve akış hızı (0,3 mL/dk) parametreleri kullanılmıştır. Farklı kolon sıcaklıklarında elde edilen kromatogramlar Şekil 4.29-4.36'da gösterilmiştir.



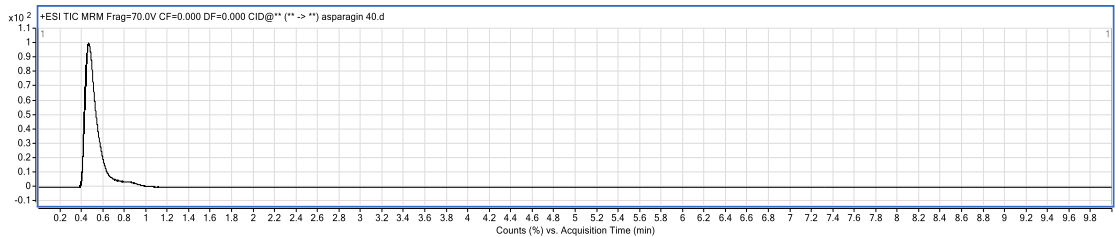
Şekil 4.29. 25 °C kolon sıcaklığı kullanıldığında elde edilen kromatogram



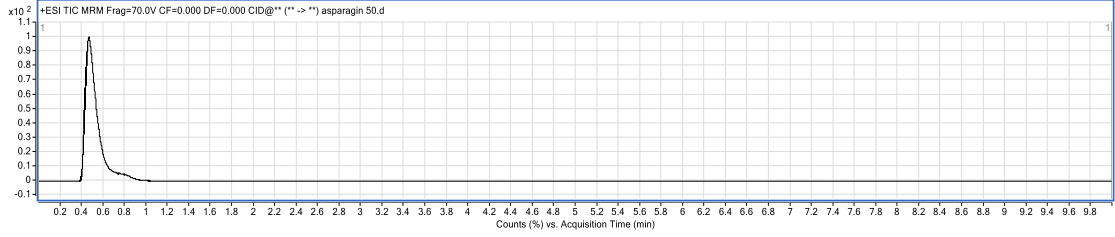
Şekil 4.30. 30 °C kolon sıcaklığı kullanıldığında elde edilen kromatogram



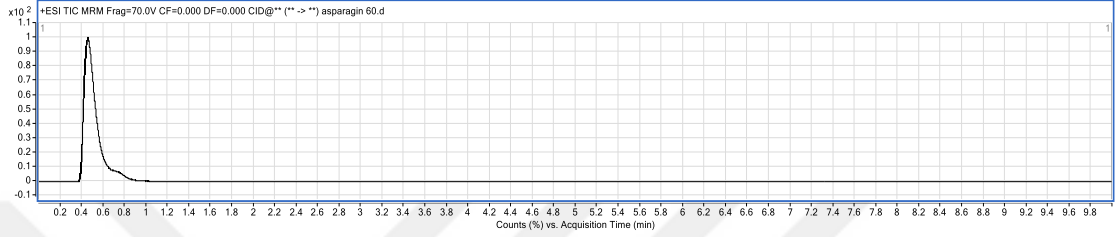
Şekil 4.31. 35 °C kolon sıcaklığı kullanıldığında elde edilen kromatogram



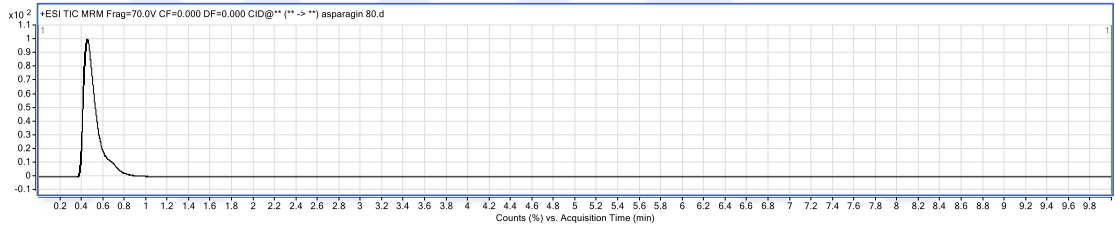
Şekil 4.32. 40 °C kolon sıcaklığı kullanıldığında elde edilen kromatogram



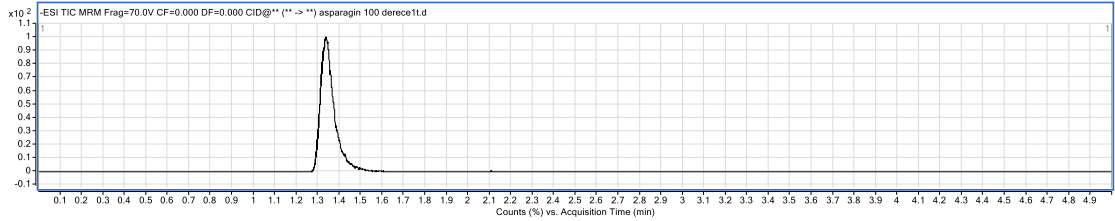
Şekil 4.33. 50 °C kolon sıcaklığı kullanıldığında elde edilen kromatogram



Şekil 4.34. 60 °C kolon sıcaklığı kullanıldığında elde edilen kromatogram



Şekil 4.35. 80 °C kolon sıcaklığı kullanıldığında elde edilen kromatogram



Şekil 4.36. 100 °C kolon sıcaklığı kullanıldığında elde edilen kromatogram

Çalışılan kolon sıcaklıklarında kromatogramlardan elde edilen değerler kullanılarak hesaplanan kuyruklanma faktörü değerleri Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.3. Çalışılan farklı kolon sıcaklıklarında hesaplanan USP kuyruklanma faktörü değerleri

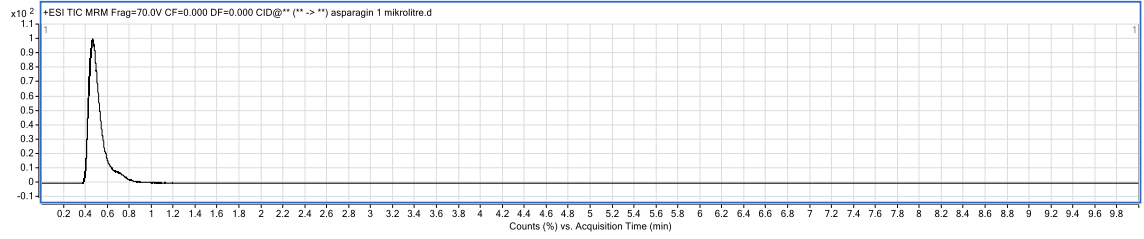
Etken madde	Kolon sıcaklığı (°C)	Pik alanı	USP kuyruklanma faktörü
Asparajin	25	8.318	1,23
	30	9.119	1,11
	35	9.211	1,12
	40	9.190	1,25
	50	9.210	1,22
	60	9.994	1,27
	80	10.138	1,30
	100	9.903	1,29

Çizelge 4.3'te görüldüğü gibi USP kuyruklanma faktörünün en az olduğu sıcaklık 30 °C, en fazla olduğu sıcaklık ise 80 °C'dir. Ayrıca, pik alanının en yüksek ve en düşük olduğu sıcaklık değerleri sırasıyla 80 °C ve 25 °C'dir. Pik alanının yüksek olduğu 60 °C, 80 °C ve 100 °C'de kuyruklanma faktörü değerleri yüksek çıkmıştır. Kuyruklanma faktörü değerleri düşük çıkanlardan pik alanı da daha yüksek olan 35 °C'lik sıcaklık değeri en uygun kolon sıcaklığı olarak seçilmiştir.

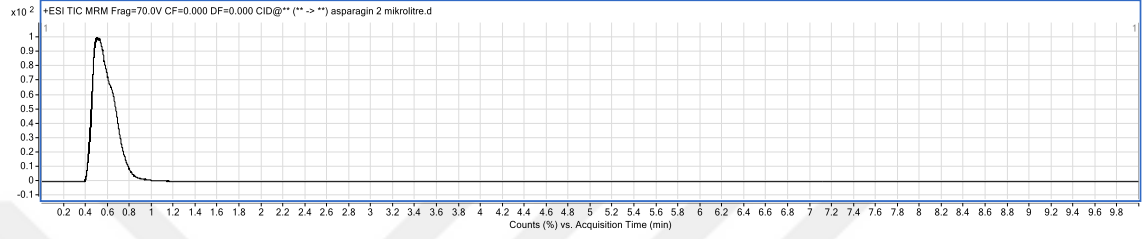
Literatür çalışmalarında asparajin tayini için kolon sıcaklığı olarak genellikle düşük sıcaklıklar tercih edilmiştir. Kolon sıcaklığı olarak Bai vd. (2007) 30 °C'yi, Bartolomeo ve Maisano (2006) 40 °C'yi ve Tojo vd. (2012) 25 °C'yi seçmişlerdir. Çalışma sonucunda belirlenen optimum kolon sıcaklığı değeri, literatürdeki değerlerle birebir aynı olmasa da literatüre yakın değerlerdedir ve literatürle uyumludur.

4.1.5. Optimum enjeksiyon hacminin belirlenmesi

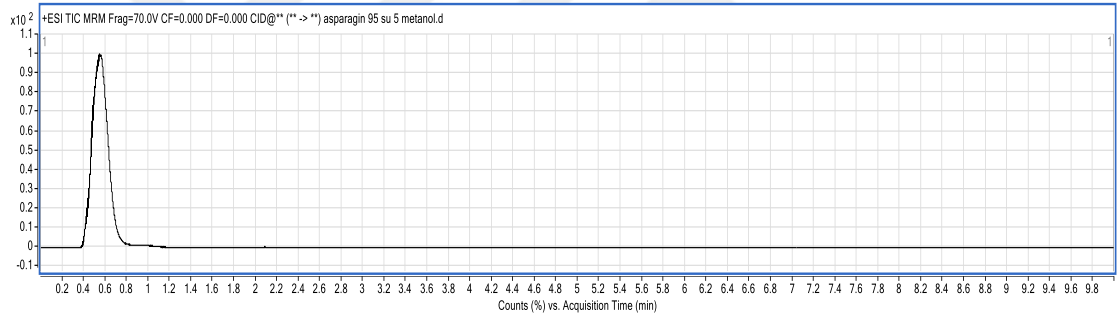
Optimum enjeksiyon hacminin belirlenmesi için 1 µL, 2 µL, 3 µL, 4 µL, 5 µL, 6 µL, 7 µL, 8 µL, 9 µL ve 10 µL olmak üzere 10 farklı enjeksiyon hacmi denenmiştir. Tüm enjeksiyon hacmi denemelerinde daha önceki kısımlarda belirlenen en uygun mobil faz (su:MeOH:FA (95:5:0,1)), akış hızı (0,3 mL/dk) ve kolon sıcaklığı (35 °C) parametreleri kullanılmıştır. Farklı enjeksiyon hacimlerinde elde edilen kromatogramlar Şekil 4.37-4.46'da gösterilmiştir.



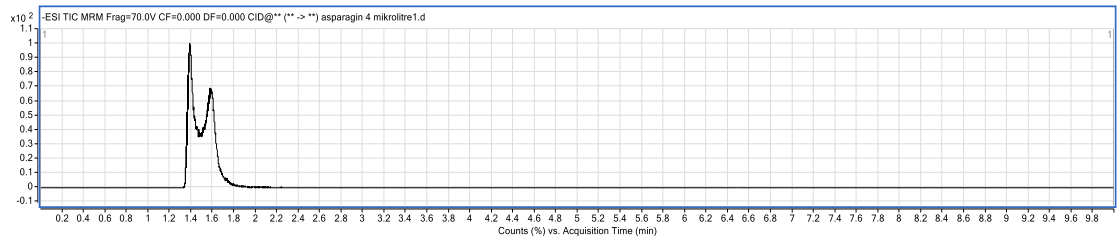
Şekil 4.37. 1 µL’lik enjeksiyon hacmi kullanıldığında elde edilen kromatogram



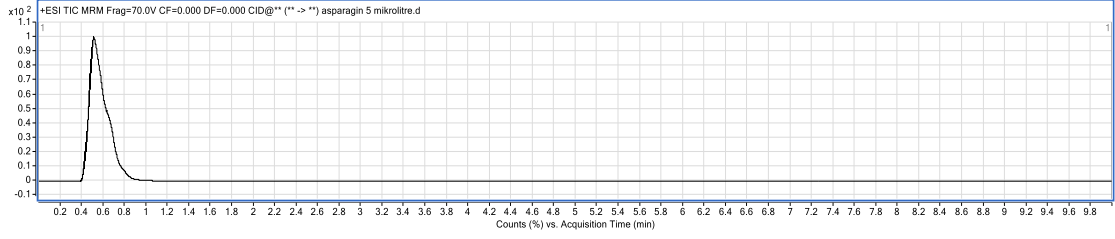
Şekil 4.38. 2 µL’lik enjeksiyon hacmi kullanıldığında elde edilen kromatogram



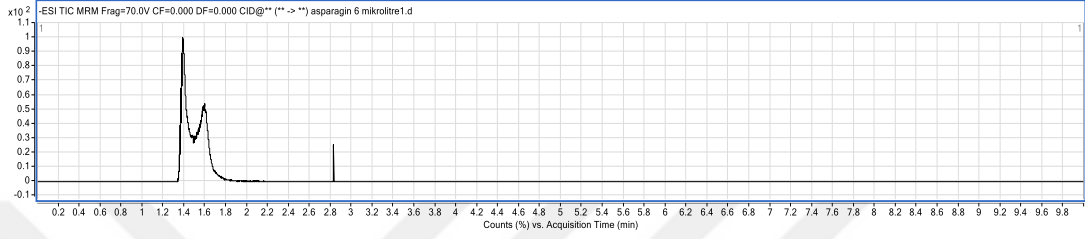
Şekil 4.39. 3 µL’lik enjeksiyon hacmi kullanıldığında elde edilen kromatogram



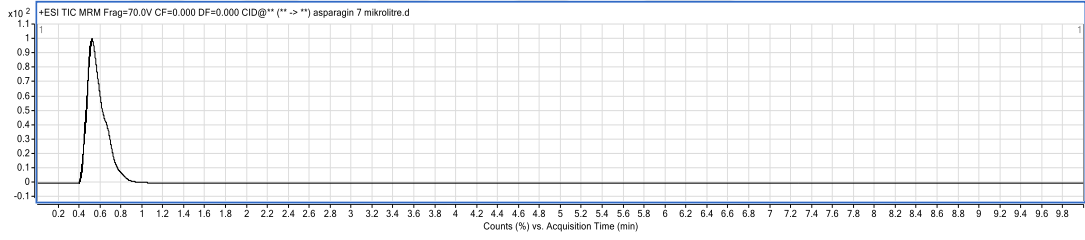
Şekil 4.40. 4 µL’lik enjeksiyon hacmi kullanıldığında elde edilen kromatogram



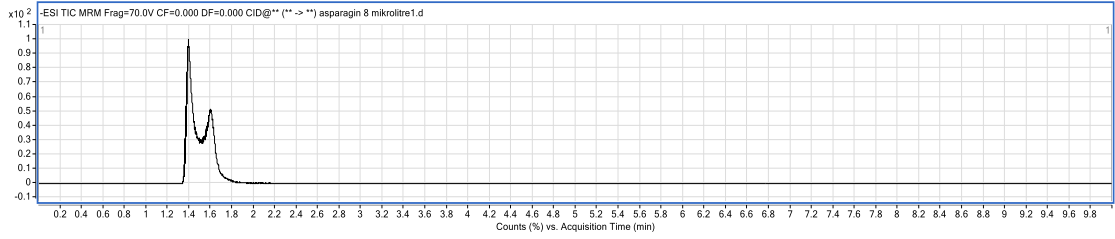
Şekil 4.41. 5 µL’lik enjeksiyon hacmi kullanıldığında elde edilen kromatogram



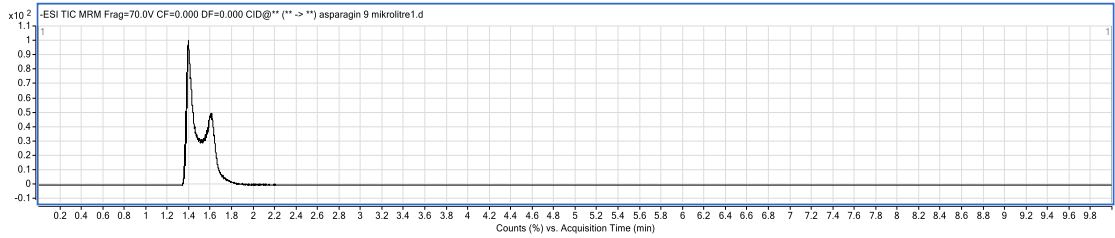
Şekil 4.42. 6 µL’lik enjeksiyon hacmi kullanıldığında elde edilen kromatogram



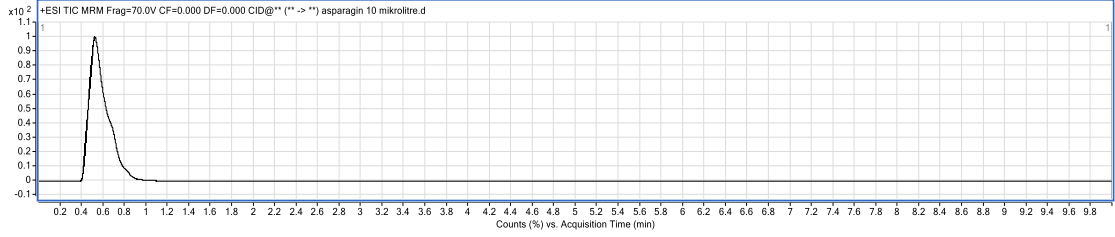
Şekil 4.43. 7 µL’lik enjeksiyon hacmi kullanıldığında elde edilen kromatogram



Şekil 4.44. 8 µL’lik enjeksiyon hacmi kullanıldığında elde edilen kromatogram



Şekil 4.45. 9 µL’lik enjeksiyon hacmi kullanıldığında elde edilen kromatogram



Şekil 4.46. 10 µL’lik enjeksiyon hacmi kullanıldığında elde edilen kromatogram

Şekil 4.37-4.46’da gösterilen farklı enjeksiyon hacimleri için kaydedilmiş kromatogramlardan elde edilen veriler kullanılarak hesaplanan kuyruklanma faktörü değerleri Çizelge 4.4’te verilmiştir.

Çizelge 4.4. Kullanılan enjeksiyon hacimlerine göre hesaplanan USP kuyruklanma faktörü değerleri

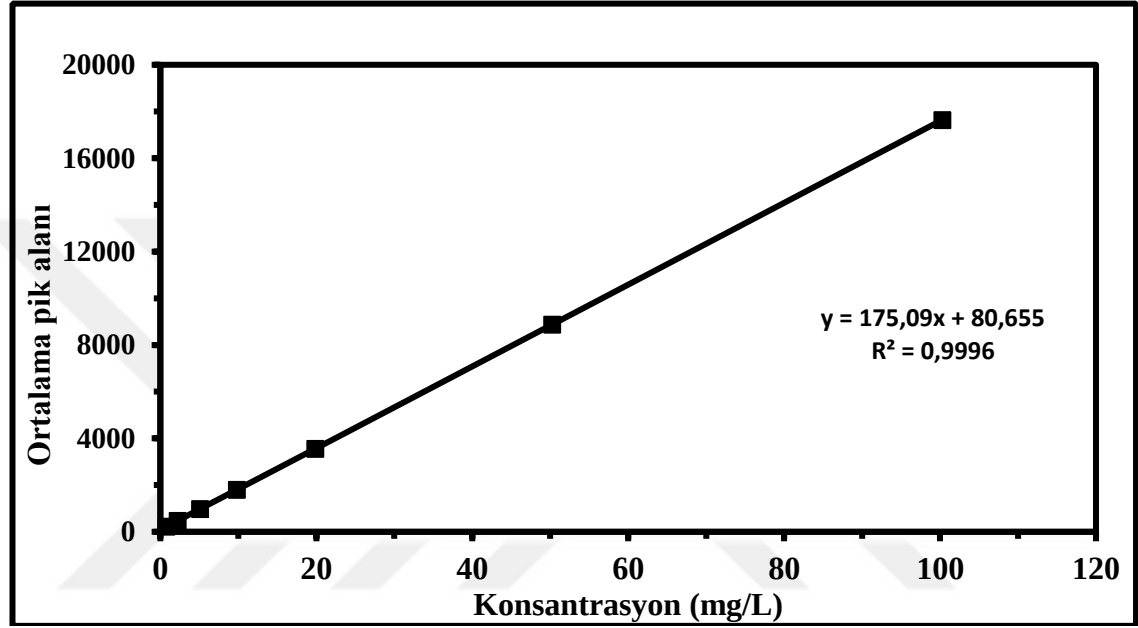
Etken madde	Enjeksiyon hacmi (µL)	USP kuyruklanma faktörü
Asparajin	1	1,22
	2	1,21
	3	1,11
	4	1,43
	5	1,20
	6	1,45
	7	1,27
	8	1,45
	9	1,55
	10	1,29

Yapılan enjeksiyon hacmi denemelerinde 4, 6 ve 9 µL’lik enjeksiyonlarda piklerde bozulmalar ve bölünmeler tespit edilmiştir. Diğer enjeksiyon hacmi denemeleri sonucunda en düşük kuyruklanma faktörü değeri 3 µL’lik enjeksiyon hacminde edilmiştir. Bu nedenle, en uygun enjeksiyon hacmi olarak 3 µL seçilmiştir.

4.2. Metot Validasyonu

4.2.1. Doğrusallık parametresinin belirlenmesi

Asparajinin doğrusallık parametresinin belirlenmesi için 1 mg/L, 2 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L, 50 mg/L ve 100 mg/L olmak üzere 7 farklı konsantrasyon kullanılarak kalibrasyon doğrusu çizilmiştir. Yapılan çalışmalar 10 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kalibrasyon doğrusu Şekil 4.47’de gösterilmiştir.



Şekil 4.47. Asparajin tayini için hazırlanmış kalibrasyon grafiği

Asparajin tayini için çizilmiş olan kalibrasyon grafiğinde oldukça yüksek bir korelasyon katsayısı (R^2) değeri ($R^2 = 0,9996$) elde edilmiştir.

4.2.2. Doğruluk parametresinin belirlenmesi

Doğruluk parametresini belirleyebilmek için hazırlanan 7 farklı konsantrasyondaki çözelti HPLC cihazına enjekte edilmiş ve ortalama pik alanı, ortalama konsantrasyon ve % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen değerler Çizelge 4.5’te listelenmiştir.

Çizelge 4.5. Doğruluk parametresi verileri

Numune	Konsantrasyon (mg/L)	Ortalama pik alanı (n=3)	Bulunan ortalama konsantrasyon (mg/L) (n=3)	% Geri kazanım
1	1	214	0,96	96,20
2	2	465	2,10	105,10
3	5	969	5,07	101,40
4	10	1.792	9,77	97,70
5	20	3.555	19,84	99,20
6	50	8.872	50,21	100,40
7	100	17.635	100,26	100,30
Ortalama (n=7)				100,10
Standart sapma				2,86
%RSD				2,86

Doğruluk parametresi analizleri sonucunda ortalama % geri kazanım değeri 100,10 olarak hesaplanmıştır. İlgili yasal mevzuatta ya da metot performans verilerinde aksi bir durum belirtilmedikçe, geri kazanım değerlerinin %70 ile %120 aralığında değişim göstermesi başarılı bir sonuç olarak kabul edilmektedir (SANCO 2011). Buna göre, geri kazanım değeri açısından bakıldığında başarılı olduğu görülmektedir.

4.2.3. Kesinlik parametresinin belirlenmesi

Kesinlik parametresi analizleri için 3 farklı konsantrasyonda gün içerisinde ve günler arasında olmak üzere analizler yapılmıştır. Analizler sonucunda elde edilen pik alanları ve standart sapma değerleri Çizelgeler 4.6, 4.7 ve 4.8’de verilmiştir.

Çizelge 4.6. Kesinlik parametresi verileri (Gün içi)

1. Gün	Enjeksiyon numarası	Alıkonma zamanı (dk)	Pik alanı
Düşük konsantrasyon (1mg/L)	Enjeksiyon-1	0,611	214,30
	Enjeksiyon-2	0,611	214,50
	Enjeksiyon-3	0,612	214,00
Ortalama (n=3)		0,611	214,30
Standart sapma		0,001	0,25
%RSD		0,164	0,12
Orta konsantrasyon (10 mg/L)	Enjeksiyon-1	0,619	1.792,50
	Enjeksiyon-2	0,618	1.792,40
	Enjeksiyon-3	0,619	1.792,60
Ortalama (n=3)		0,619	1.792,50
Standart sapma		0,001	0,10
%RSD		0,162	0,06
Yüksek konsantrasyon (50 mg/L)	Enjeksiyon-1	0,612	8.872,50
	Enjeksiyon-2	0,613	8.872,10
	Enjeksiyon-3	0,614	8.872,90
Ortalama (n=3)		0,613	8.872,50
Standart sapma		0,001	0,40
%RSD		0,163	0,01

Çizelge 4.7. Kesinlik parametresi verileri (Günler arası)

2. Gün	Enjeksiyon numarası	Alıkonma zamanı (dakika)	Pik alanı
Düşük konsantrasyon (1mg/L)	Enjeksiyon-1	0,613	215,10
	Enjeksiyon-2	0,613	215,80
	Enjeksiyon-3	0,612	215,50
Ortalama (n=3)		0,613	215,50
Standart sapma		0,001	0,35
%RSD		0,163	0,16
Orta konsantrasyon (10 mg/L)	Enjeksiyon-1	0,610	1.793,50
	Enjeksiyon-2	0,608	1.794,00
	Enjeksiyon-3	0,609	1.793,90
Ortalama (n=3)		0,609	1.793,80
Standart sapma		0,001	0,26
%RSD		0,164	0,01
Yüksek konsantrasyon (100 mg/L)	Enjeksiyon-1	0,613	17.635,20
	Enjeksiyon-2	0,614	17.636,80
	Enjeksiyon-3	0,613	17.635,10
Ortalama (n=3)		0,613	17.635,70
Standart sapma		0,001	0,95
%RSD		0,163	0,01

Çizelge 4.8. Kesinlik parametresi verileri (Günler arası)

3. Gün	Enjeksiyon numarası	Alıkonma zamanı (dakika)	Pik alanı
Düşük konsantrasyon (1mg/L)	Enjeksiyon-1	0,615	216,20
	Enjeksiyon-2	0,616	215,10
	Enjeksiyon-3	0,615	215,40
Ortalama (n=3)		0,615	215,57
Standart sapma		0,001	0,57
%RSD		0,163	0,26
Orta konsantrasyon (10 mg/L)	Enjeksiyon-1	0,622	1.795,40
	Enjeksiyon-2	0,621	1.796,90
	Enjeksiyon-3	0,623	1.797,40
Ortalama (n=3)		0,622	1.796,57
Standart sapma		0,001	1,04
%RSD		0,161	0,06
Yüksek konsantrasyon (100 mg/L)	Enjeksiyon-1	0,615	17.636,10
	Enjeksiyon-2	0,614	17.638,20
	Enjeksiyon-3	0,615	17.641,90
Ortalama (n=3)		0,615	17.638,73
Standart sapma		0,001	2,94
%RSD		0,163	0,02

Gün içi ve günler arası kesinliği belirleyebilmek için düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlara sahip numuneler kullanılmıştır. Shabir (2004), % RSD değerinin % 1'in altında olduğu durumlarda analitik metodun iyi bir kesinlik değerine sahip olduğunu belirtmiştir. Hesaplamalar sonucunda %RSD değerlerinin düşük çıkması kullanılan metodun gün içi ve günler arası kesinliğinin yüksek olduğunu göstermektedir.

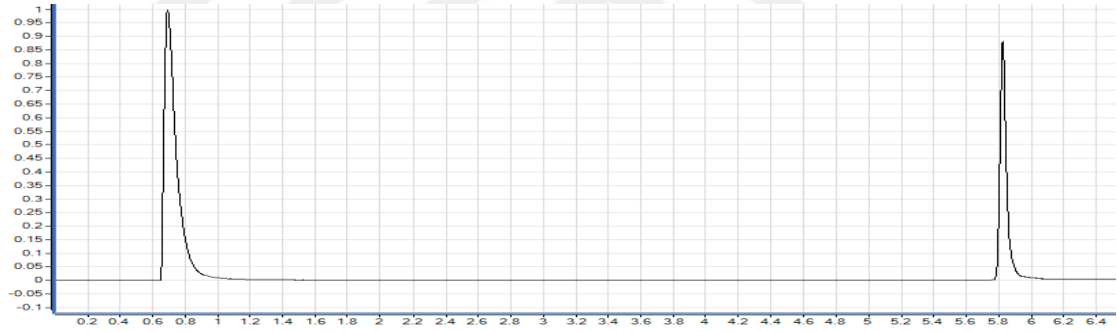
4.2.4. LOD ve LOQ değerlerinin belirlenmesi

LOD ve LOQ değerlerinin hesaplanmasında kalibrasyon doğrusu denkleminde yararlanılmıştır. Hesaplama için öncelikle Eşitlik 3.1 kullanılarak standart sapma değeri hesaplanmıştır. Daha sonra, elde edilen standart sapma değeri ve kalibrasyon doğrusu eğim değeri kullanılarak Eşitlik 3.2 ve 3.3 yardımıyla sırasıyla LOD ve LOQ değerleri elde edilmiştir.

LOD değeri 0,28 mg/L ve LOQ değeri de 0,92 mg/L olarak hesaplanmıştır. Keith vd. (1983) bir analitik metotta kalibrasyon doğrusunda yer alan en düşük konsantrasyonun LOQ değerine yakın olması gerektiğini bildirmişlerdir. Bizim yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz LOQ değerinin (0,92 mg/L) kalibrasyon doğrusundaki en düşük konsantrasyona (1 mg/L) oldukça yakın olduğu görülmektedir.

4.2.5. Seçicilik parametresinin belirlenmesi

Seçicilik parametresi analizinde asparajin ve arjinin maddeleri kullanılarak elde edilen kromatogram Şekil 4.48’de verilmiştir. Elde edilen kromatograma göre asparajinin alıkonma zamanı 0,65 dakika, arjininin alıkonma zamanı ise 5,80 dakika olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.48. Asparajin ve arjinin maddeleri kullanılarak elde edilen kromatogram

Seçicilik parametresinin belirlenmesi amacıyla yapılan analizlerin sonuçları Çizelge 4.9’da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Seçicilik parametresi verileri

Parametre	Asparajin	Arjinin
Konsantrasyon (mg/L)	22,87	2,22
İlave edilen 100 mg/L asparajin		
Konsantrasyon (mg/L)	119,22	2,31
% Geri kazanım	97,03	104,05
İlave edilen 100 mg/L arjinin		
Konsantrasyon (mg/L)	24,03	97,28
% Geri kazanım	95,17	95,17

Bir analitik metodun iyi bir seçiciliğe sahip olması için en az % 80’lik bir geri kazanım oranına sahip olması gerekmektedir (CHMP, 2009). Çizelge 4.8’de görüldüğü gibi her iki maddenin de kuşkonmaz numunesine eklenmesiyle elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, % geri kazanım değerleri yüksek bulunmuştur. Bu sonuç, maddelerin birbirlerinden yüksek oranda etkilenmediğini göstermiştir.

Metod validasyonu kısmının genel bir değerlendirmesi yapıldığında; asparajin maddesinin alıkonma zamanı 0,61 dakika olarak tespit edilmiştir. Literatürde daha önce yapılan çalışmalar incelendiğinde asparajinin alıkonma zamanının 0,67 ile 18,20 arasında olduğu görülmektedir. Bizim yaptığımız çalışmada daha öncekilere kıyasla daha erken bir alıkonma zamanına ulaşıldığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada geliştirilen metodun bu maddenin tayininde hızlı sonuç alınması bakımından önemli olduğu düşünülmektedir. Yaptığımız çalışmada elde edilen % geri kazanım değerlerinin % 96,20 ile % 105,10 arasında olduğu görülmüştür. Daha önce yapılan çalışmalarda % geri kazanım değerlerinin % 100,30 ile % 105,70 arasında değişim gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışmamızda elde edilen geri kazanım değerlerinin literatürle uyumlu olduğu sonucuna varılmıştır. Çalışmamızda yüzde relatif standart sapma değerleri % 0,01 ile % 0,26 arasında değişim göstermiştir. Literatürde yer alan çalışmalar incelendiğinde yüzde relatif standart sapma değerlerinin % 0,10 ile % 4,57 arasında olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda elde edilen relatif standart sapma değerlerinin literatürle uyumlu olduğu sonucuna varılmıştır. Yaptığımız çalışmada LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,28 mg/L ve 0,92 mg/L olarak tespit edilmiştir. Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde LOD değerlerinin 0,12 mg/L ile 1,5 mg/L arasında; LOQ değerlerinin ise 0,36 mg/L ile 4,9 mg/L arasında değişim gösterdiği görülmüştür. Çalışmamızda elde edilen LOD ve LOQ değerlerinin literatürle uyumlu olduğu sonucuna varılmıştır.

4.3. *Asparagus lycicus* Bitkisinin Fitokimyasal Karakterizasyonu

Çalışmanın ikinci kısmı olan bitkinin fitokimyasal karakterizasyonunun gerçekleştirilebilmesi amacıyla bazı analizler yapılmıştır. Bunun için öncelikle bitkiye ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. Daha sonra, 0,45 µm'lik enjektör filtresinden geçirilen örnekler -20 °C'de saklanmış ve analizlerde kullanılmıştır.

4.3.1. Asparajin miktar tayini

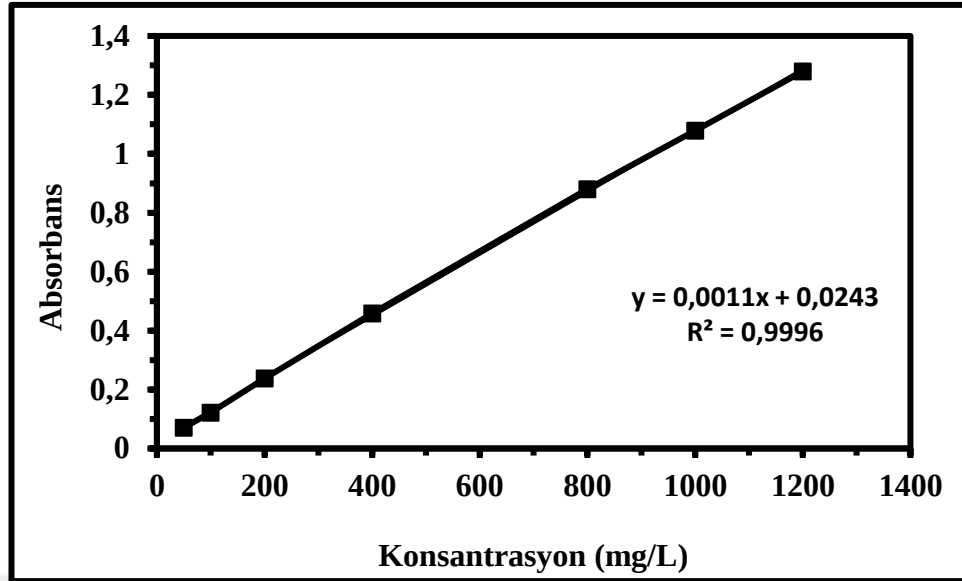
Bitkinin içerdiği asparajin miktarı, çalışmanın ilk kısmında optimize edilmiş metot parametreleri kullanılarak hesaplanmıştır. Bunun için ekstrakte edilmiş ve filtreden geçirilmiş örnek, uygun oranlarda seyreltilmiş ve HPLC cihazına enjekte edilmiştir.

Yapılan analiz sonucunda, bitkide bulunan asparajin miktarı 6,14±0,08 mg/g bitki olarak tespit edilmiştir.

Kim vd. (2009), yaptıkları çalışmada kuşkonmazın sürgün ve yaprak kısımlarının amino asit bileşen miktarlarını incelemişlerdir. Analizler sonucunda sürgün kısmında yer alan amino asit bileşenlerinden olan asparajin miktarı 653,68 mg/kg olarak tespit edilmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada asparajin miktarı daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuca göre; bitkideki asparajin miktarında iklimsel faktörler, bitkinin türü, yetiştiği ortam koşulları, toprak yapısı, hasat zamanı vb. faktörlerin etkili olduğu anlaşılmaktadır.

4.3.2. Toplam fenolik madde miktarı

Toplam fenolik madde analizini gerçekleştirebilmek için önceden ekstraksiyonu yapılmış olan örneğin UV-Visible spektrofotometre cihazında 3 tekrarlı ölçümleri yapılmıştır. Kullanılan kalibrasyon doğrusu Şekil 4.49'da verilmiştir.



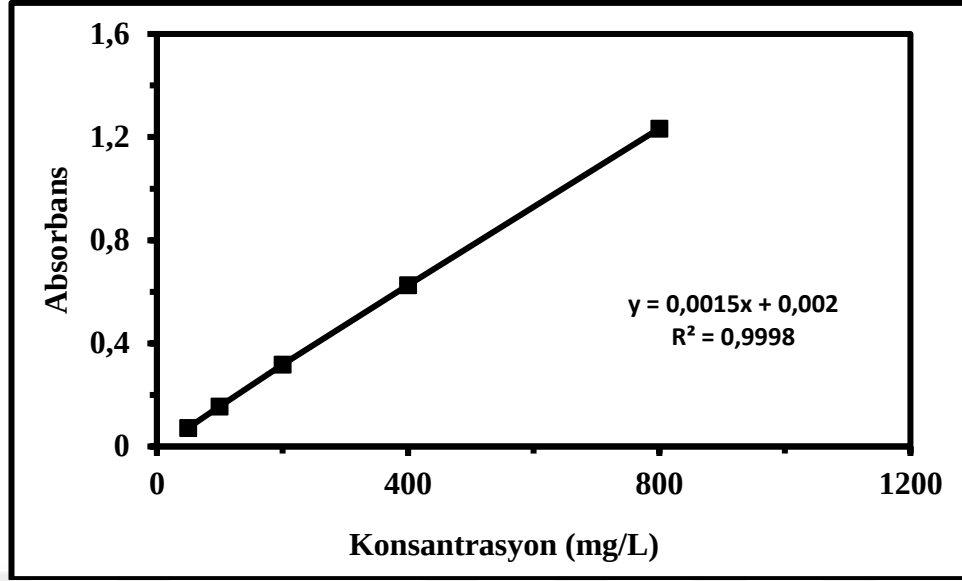
Şekil 4.49. Toplam fenolik madde tayini için hazırlanmış kalibrasyon grafiği

Çalışmada, gallik asit kalibrasyon doğrusu kullanılarak bitkideki toplam fenolik madde miktarı, $13,22 \pm 0,44$ mg GAE/g bitki olarak tespit edilmiştir.

Symes vd. (2018), yaptıkları çalışmada kuşkonmazın kök kısmını farklı çözücülerle ekstrakte ederek toplam fenolik madde miktarlarındaki değişimleri incelemiştir. Toplam fenolik madde miktarı 52,0-91,4 mg GAE/g arasında değişim göstermiştir. Fan vd. (2015), yaptıkları çalışmada kuşkonmaz atıklarına farklı ekstraksiyon metotları uygulayarak, toplam fenolik madde miktarındaki değişimleri araştırmışlardır. Toplam fenolik madde miktarı 4,43-12,03 mg GAE /g arasında değişim göstermiştir. Palfi vd. (2017), yaptıkları çalışmada doğadan toplanan ve kültüre alınan kuşkonmazın toplam polifenol içeriğini incelemiştir. Toplam polifenol içeriği doğadan toplananda 49,60 mg GAE/g ve kültüre alınanda 50,93 mg GAE/g olarak tespit edilmiştir. Literatürdekilerle karşılaştırıldığında, bizim yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz toplam fenolik madde miktarı literatürdekilerden daha düşük çıkmıştır. Bu sonuçta bitkinin türü, yetiştirme ortamı, iklimsel faktörler gibi etkenlerin etkisinin olduğu düşünülmektedir.

4.3.3. Toplam flavonoid madde miktarı

Toplam flavanoid madde analizi için önceden ekstraksiyonu yapılmış olan örneğin UV-Visible spektrofotometre cihazında 3 tekrarlı ölçümleri yapılmıştır. Kullanılan kalibrasyon doğrusu Şekil 4.50’de gösterilmiştir.



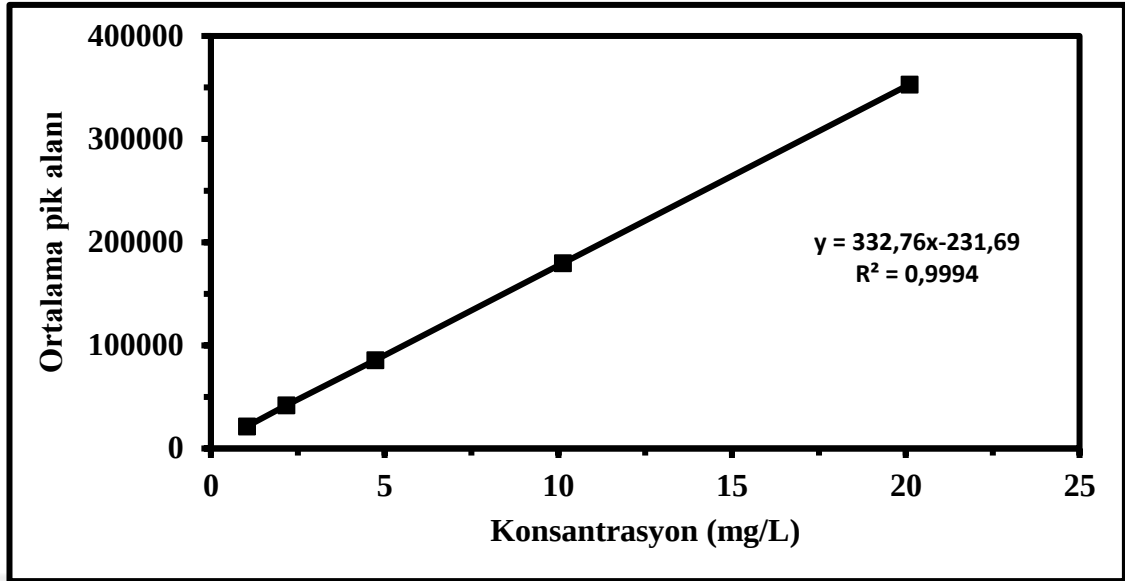
Şekil 4.50. Toplam flavanoid madde tayini için hazırlanmış kalibrasyon grafiği

Kateşin kalibrasyon doğrusu kullanılarak bitkideki toplam flavanoid madde miktarı $3,24 \pm 0,29$ CE/g bitki olarak hesaplanmıştır.

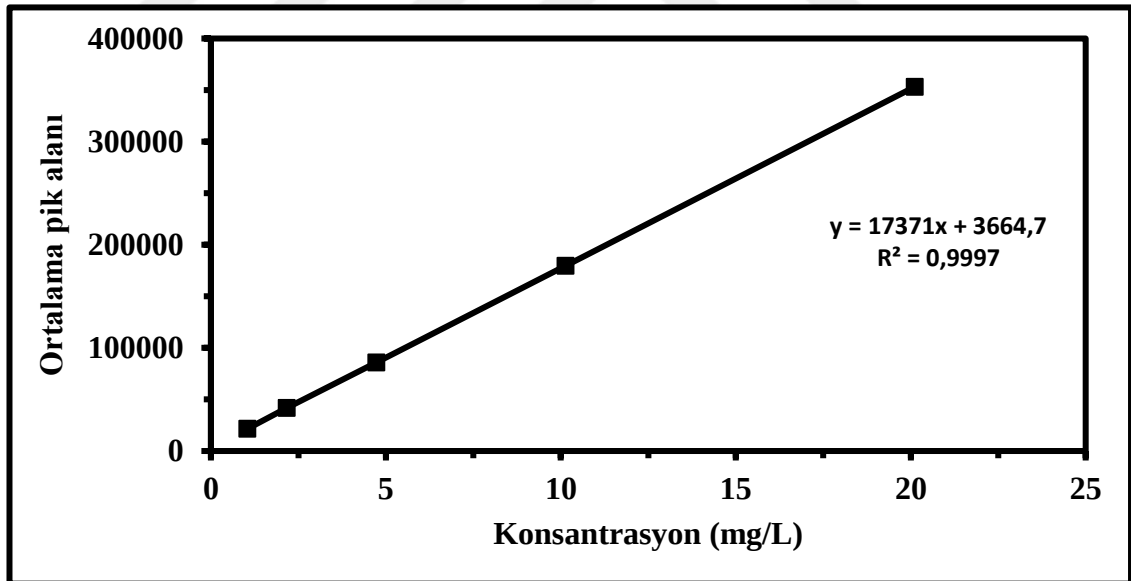
Symes vd. (2018), yaptıkları çalışmada kuşkonmazın kök kısmını farklı çözücülerle ekstrakte ederek toplam flavanoid madde miktarlarındaki değişimleri incelemiştir. Toplam flavanoid madde miktarı 102,1-134,0 mg RE/g arasında değişim göstermiştir. Fan vd. (2015), yaptıkları çalışmada kuşkonmaz atıklarına farklı ekstraksiyon metotları uygulamışlar ve ekstraksiyon metotlarının toplam flavanoid madde miktarlarına olan etkisini incelemiştir. Toplam flavanoid madde miktarları 3,84-5,24 mg RE/g arasında değişim göstermiştir. Literatürdekilerle karşılaştırıldığında, bizim yaptığımız çalışmada bulunan toplam flavanoid madde miktarı literatürdekilerden daha düşük çıkmıştır. Elde edilen sonuçta bitkinin türü, yetiştirme ortamı, iklimsel faktörler gibi etkenlerin etkisinin olduğu düşünülmektedir.

4.3.4. Fenolik ve flavanoid bileşen miktarı

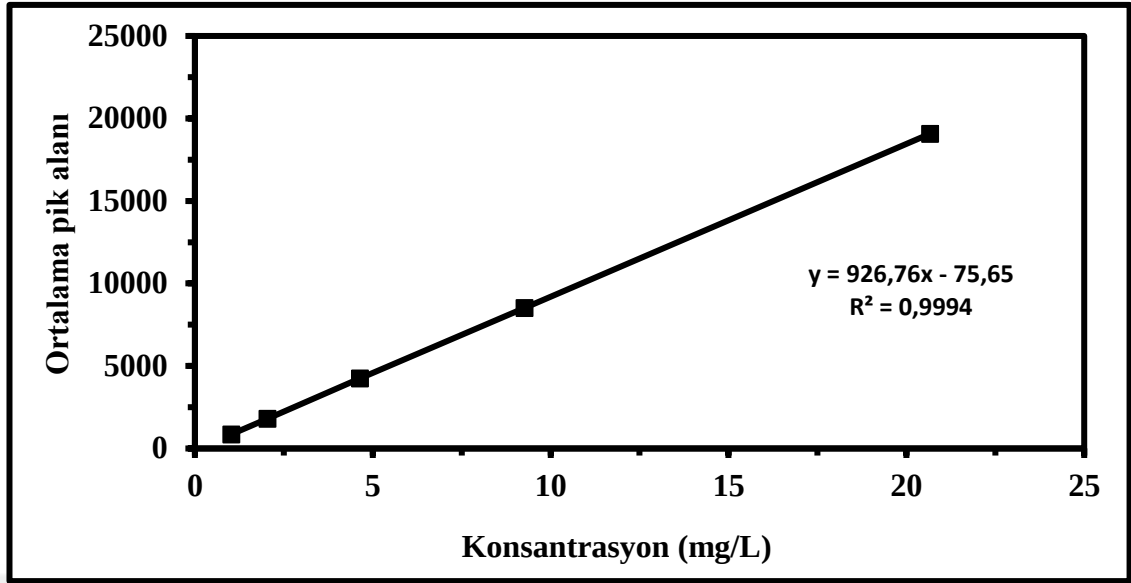
Fenolik ve flavanoid bileşenlerin analizi için önceden ekstraksiyonu yapılmış olan örneğin HPLC cihazında 3 tekrarlı ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Hesaplamalarda kullanılan kalibrasyon doğruları Şekil 4.51-4.56'da verilmiştir.



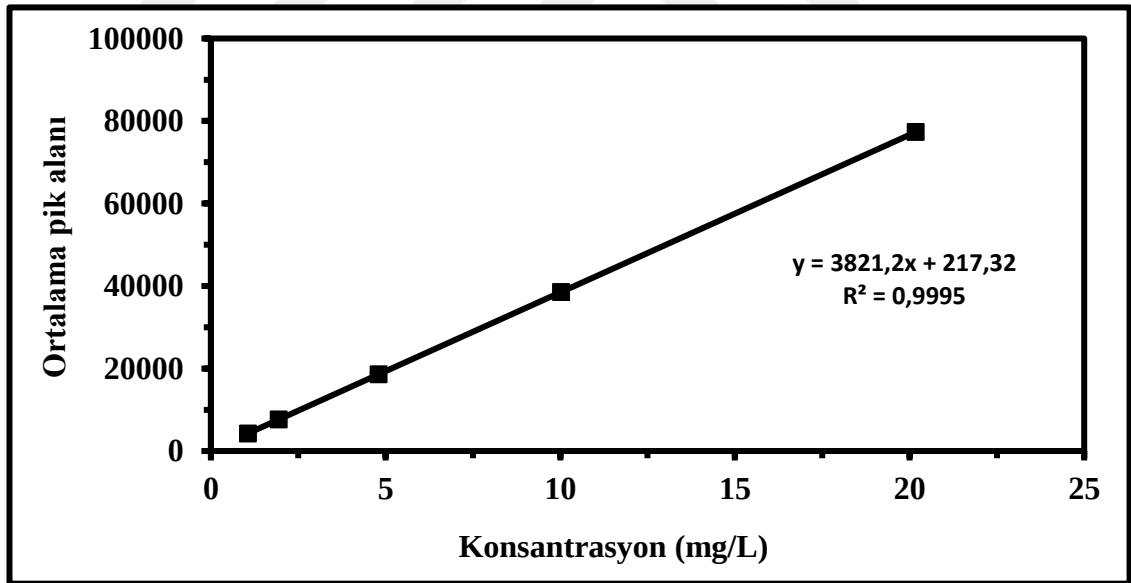
Şekil 4.51. Rosmarinik asit tayini için hazırlanmış kalibrasyon grafiği



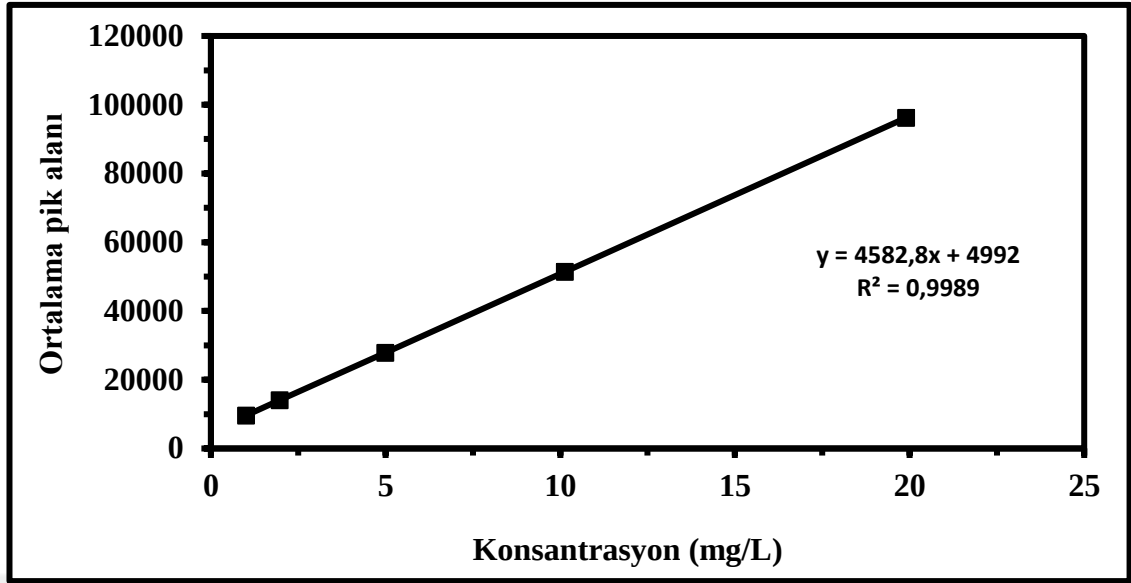
Şekil 4.52. Ferulik asit tayini için hazırlanmış kalibrasyon grafiği



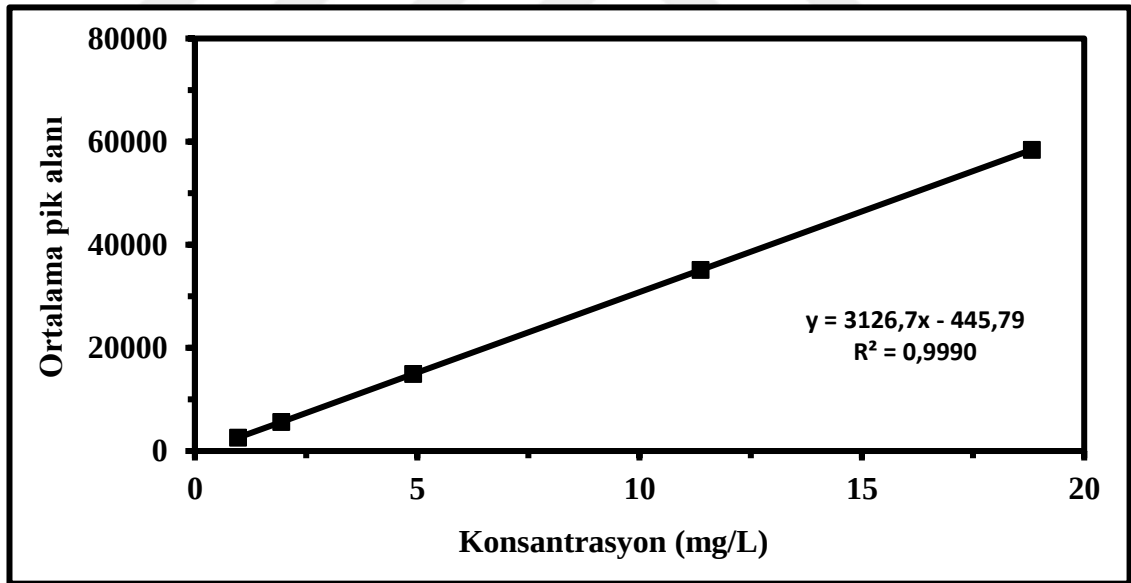
Şekil 4.53. Klorojenik asit tayini için hazırlanmış kalibrasyon grafiği



Şekil 4.54. o-Kumarik asit tayini için hazırlanmış kalibrasyon grafiği



Şekil 4.55. p-Kumarik asit tayini için hazırlanmış kalibrasyon grafiği



Şekil 4.56. Sinapik asit tayini için hazırlanmış kalibrasyon grafiği

Şekil 4.51-4.56'daki kalibrasyon doğruları kullanılarak tespit edilen fenolik ve flavanoid bileşenlerin miktarları Çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.10. *Asparagus lycicus* bitkisinin fenolik ve flavanoid bileşenleri

Bileşen adı	Miktar (mg/kg bitki)
Rosmarinik asit	28,80±0,30
Ferulik asit	109,2±1,57
Klorojenik asit	531,2±5,16
o-Kumarik asit	2,8±0,06
p-Kumarik asit	17,6±0,91
Sinapik asit	6,0±0,56

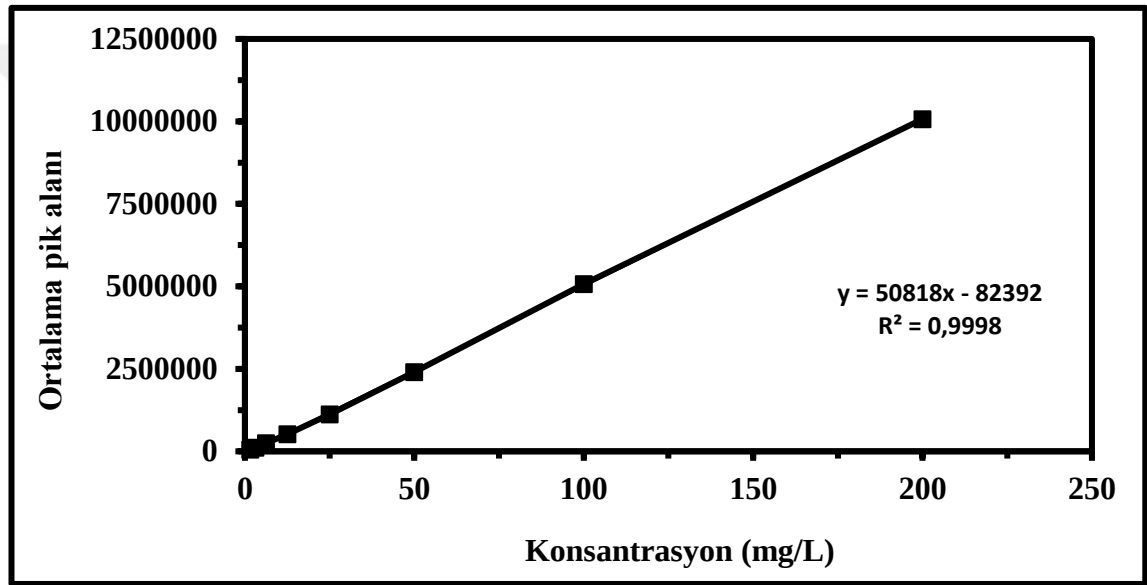
Zhang vd. (2019), yaptıkları çalışmada *Asparagus officinalis* bitkisinde yer alan fitokimyasal bileşenleri incelemişlerdir. Çalışma sonucunda kafeik asit, quersetin, apigenin, ferulik asit ve kamferol miktarları sırasıyla 6,0; 3,9; 0,4; 1,0 ve 0,8 mg/g olarak tespit edilmiştir. Chen vd. (2017), gerçekleştirdikleri çalışmada 5 farklı yeşil kuşkonmaz çeşidinin fenolik bileşenleri arasındaki farklılıkları incelemişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre klorojenik asit miktarı 71,44-93,18 mg/kg, ferulik asit miktarı 31,28-58,17 mg/kg, kumarik asit miktarı 6,43-23,29 mg/kg ve kuersetin miktarı 13,47-23,26 mg/kg arasında değişim göstermiştir. Bizim yaptığımız çalışmada elde edilen fenolik ve flavanoid madde bileşenleri ve bu bileşenlerin miktarları farklılıklar göstermiştir. Miktersal bakımdan en çok benzerlik gösteren bileşen ferulik asit olmuştur.

4.3.5. Toplam antioksidan aktivite miktarı

Toplam antioksidan aktivite analizi için önceden ekstraksiyonu yapılmış olan örneğin UV-Visible spektrofotometre cihazında 3 tekrarlı ölçümleri yapılmıştır. Örneğin antioksidan aktivitesi $13,2 \pm 0,45$ mg/mg DPPH olarak hesaplanmıştır.

4.3.6. C vitamini miktarı

C vitamini miktarı analizi için önceden ekstraksiyonu yapılmış olan örneğin HPLC cihazında 3 tekrarlı ölçümleri gerçekleştirilmiştir. C vitamini hesaplaması için askorbik asit kullanılarak kalibrasyon doğrusu oluşturulmuştur. C vitamininin hesaplanmasında kullanılan askorbik asit kalibrasyon grafiği Şekil 4.57’de verilmiştir.



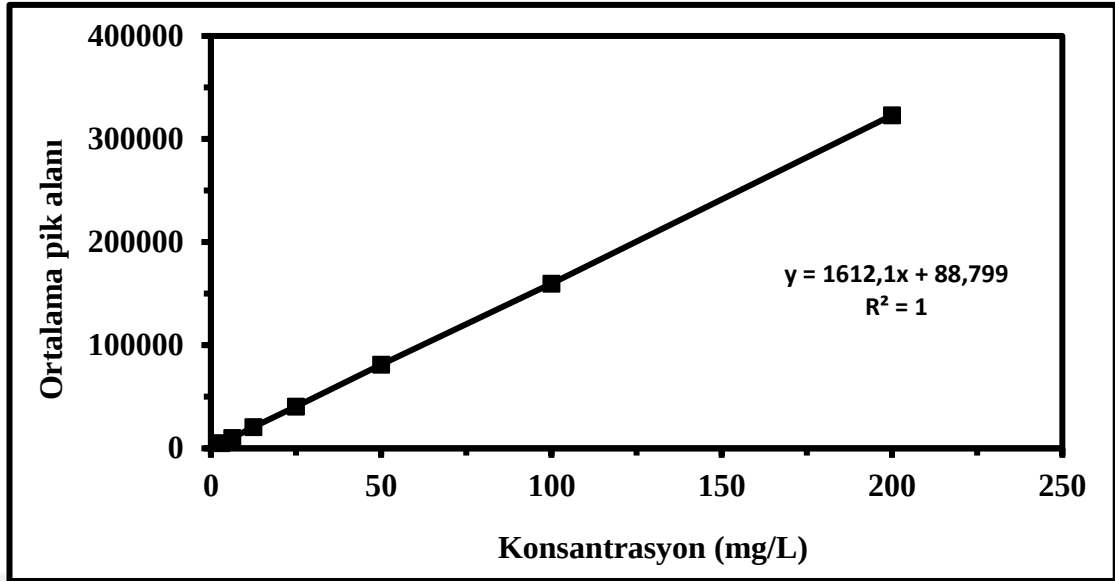
Şekil 4.57. C vitamini tayini için hazırlanmış kalibrasyon grafiği

Örneğin C vitamini değeri $234,6 \pm 4,97$ mg/kg olarak hesaplanmıştır.

4.3.7. Organik asit bileşen miktarı

Organik asit bileşen analizi için önceden ekstraksiyonu yapılmış olan örneğin UV-Visible spektrofotometre cihazında 3 tekrarlı ölçümleri yapılmıştır.

Malik asitin hesaplanmasında kullanılan malik asit kalibrasyon grafiği Şekil 4.58’de verilmiştir.



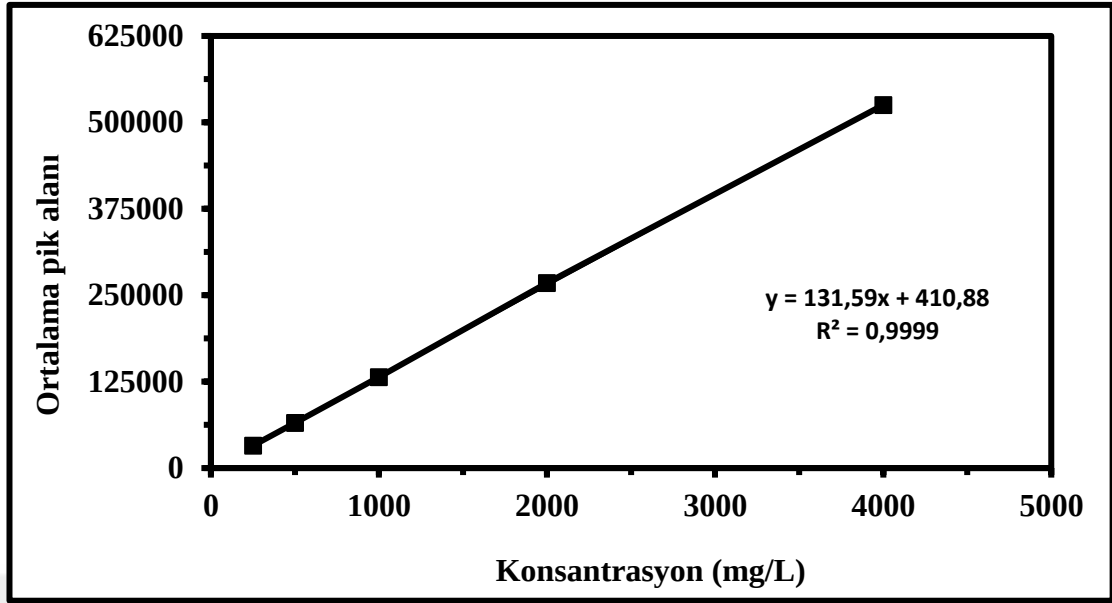
Şekil 4.58. Malik asit tayini için hazırlanmış kalibrasyon grafiği

Örneğin organik asit bileşenlerinden olan malik asit miktarı $2,90 \pm 0,31$ mg/kg olarak hesaplanmıştır.

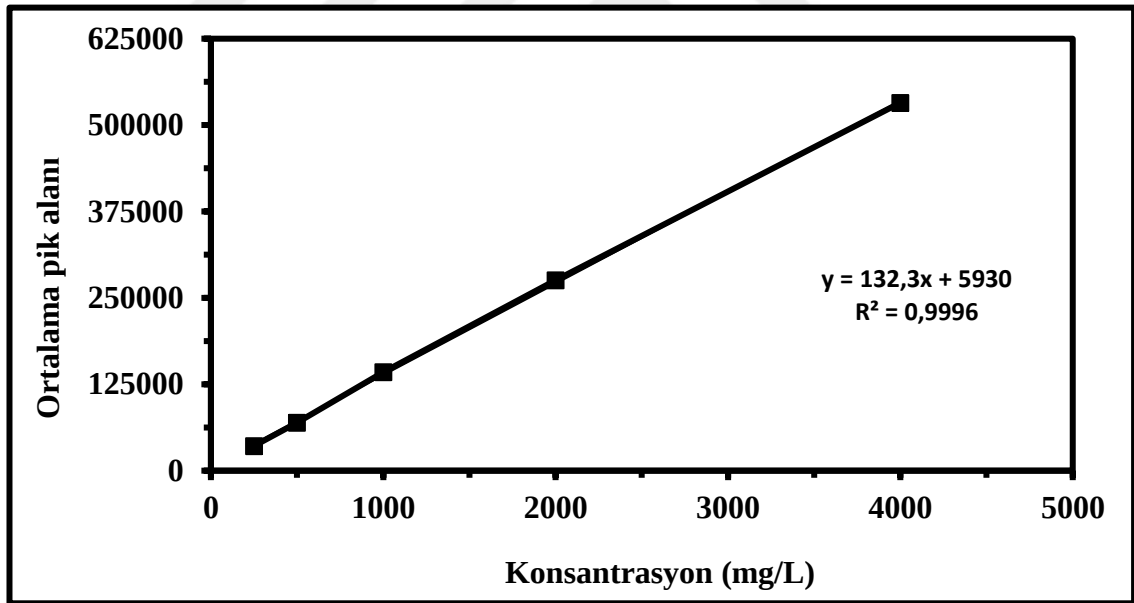
Slatnar vd. (2018), yaptıkları çalışmada farklı kuşkonmaz çeşitlerinin farklı kısımlarında organik asit bileşenlerindeki değişimleri incelemişlerdir. Organik asit bileşenlerinden malik asit değerleri 0,6-0,9 mg/kg arasında değişim göstermiştir.

4.3.8. Şeker bileşenleri miktarı

Şeker bileşenleri analizi için önceden ekstraksiyonu yapılmış olan örneğin HPLC cihazında 3 tekrarlı ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Fruktoz ve glikozun hesaplanmasında kullanılan kalibrasyon doğruları Şekil 4.59 ve Şekil 4.60'da verilmiştir.



Şekil 4.59. Fruktoz tayini için hazırlanmış kalibrasyon grafiği



Şekil 4.60. Glikoz tayini için hazırlanmış kalibrasyon grafiği

Şeker bileşenlerinden olan fruktozun miktarı $25,15 \pm 2,00$ g/kg ve glikozun miktarı $18,25 \pm 1,06$ g/kg olarak tespit edilmiştir.

Slatnar vd. (2018), yaptıkları çalışmada farklı kuşkonmaz çeşitlerinin farklı kısımlarında şeker bileşenlerindeki değişimleri incelemişlerdir. Toplam şeker değerleri 16,09-21,92 g/kg arasında değişim göstermişlerdir. Şeker bileşenlerinden fruktoz 8,8-12,5 g/kg arasında ve glikoz ise 7,0-9,4 g/kg arasında değişim göstermiştir. Bizim yaptığımız çalışmada hem toplam şeker miktarı hem de şeker bileşenlerinden olan fruktoz ve glikoz miktarları daha yüksek olarak tespit edilmiştir.

4.3.9. Toplam antosiyanin madde miktarı

Toplam antosiyanin madde miktarı analizi için önceden ekstraksiyonu yapılmış olan örneğin UV-Visible spektrofotometre cihazında 3 tekrarlı ölçümleri yapılmıştır. Örneğin toplam antosiyanin miktarı $5,15 \pm 0,13$ mg/kg olarak hesaplanmıştır.

Slatnar vd. (2018), yaptıkları çalışmada farklı kuşkonmaz çeşitlerinin farklı kısımlarında antosiyanin miktarındaki değişimleri incelemişlerdir. Toplam antosiyanin miktarı 1,32-66,70 mg/kg arasında değişim göstermiştir. Bizim yaptığımız çalışmada antosiyanin miktarının düşük çıkmasının sebebi, renk olarak sürgününün açık yeşil renkli olmasının yanında bitkinin türü, iklimsel faktörler ve yetiştirme koşulları gibi faktörlerin etkili olduğu düşünülmektedir. Antosiyanin içeriğinin daha çok kırmızı veya mor renkli bitkilerde veya sebzelerde olduğu düşünüldüğünde, bu sonuçların uyumlu olduğu görülmektedir.

4.3.10. Toplam yağ miktarı

Toplam yağ miktarı analizi sokselet yağ ekstraksiyon cihazında gerçekleştirilmiştir. Bunun için 3 tekrarlı ölçümler yapılarak toplam yağ miktarı % cinsinden hesaplanmıştır.

Yapılan analiz sonucunda, toplam yağ miktarı ağırlıkça % $9,65 \pm 1,47$ olarak belirlenmiştir.

4.3.11. Yağ asidi bileşenleri miktarı

Yağ asidi bileşenleri analizi için yağı elde edilmiş örneğin yağ asidi bileşenleri miktarı % cinsinden GC-MS cihazında tespit edilmiştir. Analiz sonucunda elde edilen yağ asidi bileşenleri ve bunların relatif yüzde miktarları Çizelge 4.11’de listelenmiştir.

Çizelge 4.11. Kuşkonmazın yağ asidi bileşenleri ve relatif yüzdeleri

Yağ asidi	Miktar (g yağ asidi/100 g bitki)
Miristik asit	0,08±0,01
Palmitik asit	7,61±0,16
Stearik asit	1,94±0,03
Oleik asit	55,36±0,55
Linoleik asit	32,01±0,29
Linolenik asit	2,67±0,07
Araşidik asit	0,11±0,03
11-Eikosenoik asit	0,24±0,08

Çizelge 4.11’den görüldüğü üzere, bitkinin yağında ana bileşen olarak oleik asit, linoleik asit ve palmitik asit bulunmaktadır.

Fitokimyasal analiz sonuçlarının genel bir değerlendirilmesi yapıldığında; bazı fitokimyasal analizlerde daha önceki çalışmalara göre farklılıkların olduğu görülmektedir. Tıbbi bitkilerin biyokimyasal içerikleri birçok faktöre bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Bu faktörler arasında çalışılan bitkinin türü veya cinsi, yetiştiği ortam koşulları, toprak yapısı, iklimsel faktörler, coğrafi konum, hasat zamanı vb. etkenler bulunmaktadır. Bu tezde çalışılan bitki özellikle tür bakımından karşılaştırılan türlerle farklılık gösterdiği için fitokimyasal içerik analizlerindeki farklılıkların olması gerektiği düşünülmektedir. Ayrıca, bitkinin ilk kez çalışılmasından dolayı diğer faktörler de bu bitkiye has olduğundan dolayı içerik analiz sonuçları değişkenlik göstermiştir.

5. SONUÇLAR

Bu yüksek lisans tez çalışmasında, *Asparagus lycicus* bitkisinde bulunan asparajin etken maddesinin yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ile tayini için metot optimizasyonu ve validasyonu gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, *Asparagus lycicus* bitkisinin fitokimyasal karakterizasyonunu ortaya koymak amacıyla bitkide toplam fenolik ve flavanoid madde, fenolik ve flavanoid madde bileşenleri, toplam antioksidan aktivite, C vitamini, organik asit bileşenleri, şeker bileşenleri, toplam antosiyanin madde, toplam yağ ve yağ asidi bileşenleri miktarları belirlenmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen sonuçlar aşağıda yer almaktadır:

- *Asparagus lycicus* bitkisinde bulunan asparajin etken maddesinin tayini için geliştirilen metotta optimum mobil faz bileşimi su:MeOH:FA karışımı (hacimce 95:5:0,1 oranında); optimum mobil faz akış hızı 0,3 mL/dk, optimum kolon sıcaklığı 35 °C ve optimum enjeksiyon hacmi 3 µL olarak belirlenmiştir.
- Doğrusallık parametresinin belirlenmesi için 1 mg/L ile 100 mg/L konsantrasyon aralığında asparajin kalibrasyon doğrusu oluşturulmuş ve bu doğrunun korelasyon katsayısı 0,9996 olarak bulunmuştur.
- Doğruluk çalışması sonucunda % geri kazanım değerleri % 96,20 - % 105,10 aralığında elde edilmiştir.
- Kesinlik parametresi için % bağıl standart sapma değerleri gün içerisinde 0,005 ile 0,12 aralığında, günler arasında ise 0,01 ile 0,26 aralığında tespit edilmiştir.
- Asparajin analizi için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,28 mg/L ve 0,92 mg/L olarak hesaplanmıştır.
- HPLC cihazı ile optimize edilmiş metot parametreleri kullanılarak *Asparagus lycicus* bitkisinde bulunan asparajin miktarı 6,14 mg/g bitki şeklinde tespit edilmiştir.
- *Asparagus lycicus* bitkisindeki toplam fenolik madde miktarı 13,22 mg GAE/g bitki; flavanoid madde miktarı 3,24 mg CE/g bitki; rosmarinik asit, ferulik asit, klorojenik asit, o-kumarik asit, p-kumarik asit ve sinapik asit miktarları sırasıyla 28,8, 109,2, 531,2, 2,8, 17,6 ve 6,0 mg/kg bitki; toplam antioksidan aktivite değeri 13,2 mg/mg DPPH; antosiyanin madde miktarı 5,15 mg/kg bitki; C vitamini değeri 234,6 mg/kg bitki; organik asit bileşenlerinden malik asit değeri 2,9 mg/kg bitki; şeker bileşenlerinden fruktoz miktarı 25,15 g/kg bitki ve glikoz miktarı 18,25 g/kg bitki ve toplam yağ miktarı ağırlıkça % 9,65 olarak tespit edilmiştir.
- *Asparagus lycicus* bitkisinin yağında majör yağ asidi bileşenleri olarak % 55,36 oranında oleik asit, % 32,01 oranında linoleik asit ve % 7,61 oranında palmitik asit saptanmıştır.

6. KAYNAKLAR

- Açar, Ö.Ç., Kırış, S., Diler, F. ve Avcı, A. 2013. Pestisit analizleri için metot validasyonu ve ölçüm belirsizliği hesaplanması açıklamalı uygulama rehberi. T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı Kalıntı/Pestisit Birimi, Ankara.
- Ahmed, J., Güvenç, A., Küçükboyacı, N., Baldemir, A. and Coşkun, M. 2011. Total phenolic contents and antioxidant activities of *Prangos Lindl.* (Umbelliferae) species growing in Konya province (Turkey). *Turk. J. Biol*, 35:353-360.
- Akdağ, İ. 2016. 3. Ulusal Laboratuvar Akreditasyonu ve Güvenliği Sempozyumu ve Sergisi, İstanbul, Türkiye.
- Anonymous 1: <https://aminoacidsguide.com/Asn.html> [Son erişim tarihi: 26.05.2019].
- Ajila, C.M., Jaganmohan, R. and Prasada, R.U.J.S. 2010. Characterization of bioactive compounds from raw and ripe *Mangifera indica* L. peel extracts. *Food Chem. Toxicol.*, 48(12):3406-3411.
- Alim, A., Goze, I., Goze, H. and Tepe, B. 2009. In vitro antimicrobial and antiviral activities of the essential oil and various extracts of *Salvia cedronella* Boiss. *J. Med. Plants Res.*, 3:413-419
- Andrade, D., Gil, C., Breitenfeld, L., Domingues, F. and Duarte, A. 2009. Bioactive extracts from *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* L. *Ind. Crops. Prod.*, 30(1):165-167.
- AOAC, 2005. Official Methods of Analysis of the A.O.A.C. 16th Ed. Ass. of Official Analysis, Washington.
- Artık, N., Poyrazoğlu, E.S., Özkan, G. and Demirci, T. 1997. Determination of organic acid profile in apple juices of Türkiye. 2nd Mediterranean Basin Conference on Analytical Chemistry, pp. 23-28, Rabat, Morocco.
- Ayaz, F.A., Kadioğlu, A. and Doğru, A. 1999. Soluble sugar composition of *Elaeagnus angustifolia* L. var. *orientalis* (L.) Kuntze (Russian olive) fruits. *Turk. J. Bot.*, 23:349-354.
- Bai, C., Reilly, C.C. and Wood, B.W. 2007. Identification and quantitation of asparagine and citrulline using high-performance liquid chromatography (HPLC). *Anal. Chem. Insights.*, 28(2):31-36.
- Baltacı, C. ve Gündoğdu, A. 2012. Enstrümental Gıda Analizleri. Gümüşhane Üniversitesi Yayınları, Gümüşhane, 94 s.
- Bartolomeo, M.P. and Maisano, F. 2006. Validation of a reversed-phase HPLC method for quantitative amino acid analysis. *J. Biomol. Tech.*, 17:131-137.

- Chen, X.H., Ma, L.H., Dong, Y.W., Song, H., Pu, Y. and Zhou, Q.Y. 2017. Evaluation of the differences in phenolic compounds and antioxidant activities of five green asparagus (*Asparagus officinalis* L.) cultivars. *Qual. Assur. Saf. Crop.*, 9(4):1-10.
- CHMP. 2009. Guideline on bioanalytical method validation. Committee for Medicinal Products for Human Use, Rev.1 Corr.2.
- Christaki, E., Bonos, E., Giannenas, I. and Florou-Paneri, P. 2012. Aromatic plants as a source of bioactive compounds. *Agriculture*, 2: 228-243.
- Cruz, A.F., Barbosa, T.M.C.C., Adelino, T.E.R., Lima, W.P., Mendes, M.O. and Valadares, E.R. 2016. Amino acid reference intervals by high performance liquid chromatography in plasma sample of Brazilian children. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, 52(2):70-77.
- Eren, E. 2014. Kuşkonmaz yetiştiriciliğinde (*Asparagus officinalis* L.) farklı saksı boyları ve harçların fide kalitesine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın, 48 s.
- Ergönül, P.G. and Nergiz, C. 2010. Determination of organic acids in olive fruit by HPLC. *Czech J. Food Sci.*, 28(3):202-205.
- Esetlili, B.Ç., Pekcan, T., Çobanoğlu, Ö., Aydoğdu, E., Turan, S. and Anaç, D. 2014. Essential plant nutrients and heavy metals concentrations of some medicinal and aromatic plants. *J. Agric. Sci.*, 20: 239-247.
- Fan, R., Yuan, F., Wang, N. and Gao, Y. 2015. Extraction and analysis of antioxidant compounds from the residues of *Asparagus officinalis* L. *J. Food. Sci. Technol.*, 52(5):2690-2700.
- Fischer, U.A., Carle, R. and Kammerer, D.R. 2011. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MS. *Food Chem.*, 127(2):807-821.
- Gallie, D.R. 2013. Increasing vitamin C content in plant foods to improve their nutritional value—successes and challenges. *Nutrients*, 5:3424-3446.
- Gölükcü, M., Toker, R., Tokgöz, H. and Çınar, O. 2016. The effect of harvesting time on seed oil content and fatty acid composition of some lemon and mandarin cultivars grown in Turkey. *J. Agric. Sci.*, 22(4):566-575.
- Gupta, V., Jain, A.D.K., Gill, N.S. and Gupta, K. 2012. Development and validation of HPLC method - a review. *Int. Res. J. Pharm. App Sci.*, 2(4):17-25
- Güneş, F. 2018. An Ethnobotany Study in Enez Town from Edirne. *CUPMAP*, 1: 28-35.
- Güvenç, A. 1997. *Asparagus* L. türlerinin taşıdığı etken bileşikler ve kullanılışları. *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, 26(1):52-75.
- Güvenç, A. ve Koyuncu, M. 1999. Türkiye'de yetişen *Asparagus* L. (kuşkonmaz) türlerinin kök anatomisi. *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, 28(1):15-36.

- Hertog, M.G.L., Feskens, E.J.M., Kromhout, D., Hollman, P.C.H. and Katan, M.B. 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*, 342:1007-1011.
- Huxley, R.R. and Neil, H.A. 2003. The relation between dietary flavonol intake and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 57(8):904-908.
- Jeong, H.C., Kim, T., Yang, D.H. and Shin, K.H. 2018. Development of a UPLC-MS/MS method for the therapeutic monitoring of L-asparaginase. *Transl. Clin. Pharmacol.*, 26(3):134-140.
- Kamath, S.D., Arunkumar, D., Avinash, N.G. and Samshuddin, S. 2015. Determination of total phenolic content and total antioxidant activity in locally consumed food stuffs in Moodbidri, Karnataka, India. *Adv. Appl. Sci. Res.*, 6(6):99-102.
- Kanchanamayoon, W. and Kanenil, W. 2007. Determination of some fatty acids in local plant seeds. *Chiang Mai J. Sci.*, 34(2):249-252.
- Karadeniz, F., Burdurlu, H.S., Koca, N. and Soyer, Y. 2005. Antioxidant activity of selected fruits and vegetables grown in Turkey. *Turk. J. Agric. For.*, 29:297-303.
- Karaman, A.D., Akalın, A.S. 2008. Süt teknolojisinde metot validasyonu ve uygulamaları. Türkiye 10. Gıda Kongresi, 749-752, Erzurum, Türkiye.
- Karhan, M., Aksu, M., Tetik, N. and Turhan, I. 2004. Kinetic modeling of anaerobic thermal degradation of ascorbic acid in rose hip (*Rosa canina* L) pulp. *J. Food Quality*, 27:311-319.
- Kaushal, C.K. and Srivastava, B. 2010. A process of method development: A chromatographic approach. *J. Chem. Pharm. Res.*, 2(2): 519-545.
- Keith, L.H., Crummet, W., Deegan, J., Libby, R.A., Taylor, J.K. and Wentler, G. 1983. Principles of environmental analysis, *Anal.Chem*, 55:2210-2218.
- Kim, B.Y., Cui, Z.G., Lee, S.R., Kim, S.J., Kang, H.K., Lee, Y.K. and Park, D.B. 2009. Effects of *Asparagus officinalis* extracts on liver cell toxicity and ethanol metabolism. *J. Food Sci.*, 74(7):204-208.
- Lafka, T.I., Sinanoglou, V. and Lazos, E.S. 2007. On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food Chem.*, 104: 1206-1214.
- Lindholm, J. 2004. Development and validation of HPLC methods for analytical and preparative purposes, Doctora Thesis, Uppsala University, Uppsala, 87 pp.
- Lisko, K.A., Aboobucker, S.I., Torres, R. and Lorence, A. 2014. Engineering Elevated Vitamin C in Plants to Improve their Nutritional Content, Growth, and Tolerance to Abiotic Stress. In: Phytochemicals – Biosynthesis, Function and Application. Springer International Publishing, Switzerland, pp. 109-128.
- Ma, B., Yuan, Y., Gao, M., Li, C., Ogutu, C., Li, M. and Ma, F. 2018. Determination of predominant organic acid components in malus species: correlation with apple domestication. *Metabolites*, 8(74):1-11.

- Makris, D.P. and Rossiter, J.T. 2001. Domestic processing of onion bulbs (*Allium cepa*) and Asparagus spears (*Asparagus officinalis*): effect on flavonol content and antioxidant status. *J. Agric. Food Chem.*, 49:3216-3222.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P.R. and van Beek, T.A. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem.*, 85:231-237.
- Moran, J.F., Klucas, R.V., Grayer, R.J., Abian, J. and Becana, M. 1997. Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: prooxidant and antioxidant properties. *Free Rad. Biol. Med.*, 22(5):861-870
- Nindo, C.I., Sun, T., Wang, S.W., Tang, J. and Powers, J.R. 2003. Evaluation of drying technologies for retention of physical quality and antioxidants in asparagus (*Asparagus officinalis*, L.). *LWT-Food Sci. Technol.*, 36:507-516.
- Ogunlesi, M., Okiei, W., Azeez, L., Obakachi, V., Osunsanmi, M. and Nkenchor, G. 2010. Vitamin C contents of tropical vegetables and foods determined by voltammetric and titrimetric methods and their relevance to the medicinal uses of the plants. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 5:105-115.
- Palfi, M., Jurkovic, Z., Cosic, J., Tomic-Obrdaj, H., Jurkovic, V., Knezevic, N. and Vrandecic, K. 2017. Total polyphenol content and antioxidant activity of wild and cultivated asparagus in Croatia. *Poljoprivreda/Agriculture*, 23(1):56-62.
- Priecina, L. and Karklina, D. 2015. Composition of major organic acids in vegetables and spices. CBU International Conference on Innovation, Technology Transfer and Education, ss. 447-454, March 25-27, 2015, Prague, Czech Republic.
- Riddhiben, M.P., Piyushbhai, P.M. and Natubhai, P.M. 2011. Stability indicating HPLC method development: a review. *Int. Res. J.Pharm.*, 2(5):79-87.
- Rustan, A.C. and Dreven, C.A. 2005. Fatty acids: structures and properties. In: Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons, Ltd., Hoboken, United States, pp. 1-7.
- SANCO/12495/2011. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. National Food Administration, Uppsala, Sweden.
- Sezer, E.N.Ş. and Uysal, T. 2018. The effects of the *Sideritis öztürkii* extract on the expression levels of some apoptotic genes. *CUPMAP*, 1: 8-12.
- Shabir, G.A. 2004. A practical approach to validation of HPLC methods under current good manufacturing practices. *J.Valid. Technol.*, 2:29-37.
- Slatnar, A., Mikulic-Petkovsek, M., Stampar, F., Veberic, R., Horvat, J., Jakse, M. and Sircelj, H. 2018. Game of tones: sugars, organic acids, and phenolics in green and purple asparagus (*Asparagus officinalis* L.) cultivars. *Turk. J. Agric. For.*, 42:55-66
- Snyder, L.R., Kirkland, J.J., and Glajch, J.L. 1997. HPLC Method Development, John Wiley and Sons, New York, 2nd Ed., 180.

- Spanos, G. and Wrolstad, R.E. 1990. Influence of processing and storage on the phenolic composition of Thompson seedless grape juice. *J. Agric. Food. Chem.*, 38:1565-1571.
- Spiridon, I., Bodirlau, R. and Teaca, C.A. 2011. Total phenolic content and antioxidant activity of plants used in traditional Romanian herbal medicine. *Cent. Eur. J. Biol*, 6(3):388-396.
- Symes, A., Shavandi, A., Zhang, H., Ahmed, I.A.M., Al-Juhaimi, F.Y. and Bekhit, A.E.D.A. 2018. Antioxidant activities and caffeic acid content in New Zealand Asparagus (*Asparagus officinalis*) roots extracts. *Antioxidants*, 7(52):1-13.
- Tandoğan, M. 2012. Raloksifen'in biyolojik materyalden ve farmasötik preparattan analizi için gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi yönteminin geliştirilmesi ve valide edilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 116s.
- Tonguç, M. and Erbaş, S. 2012. Evaluation of fatty acid compositions and some seed characters of common wild plant species of Turkey. *Turk. J. Agric. For.*, 36:673-679.
- Tojo, M., Murakami, M. and Nagata, Y. 2012. Simple and low-cost high-performance liquid chromatographic method for determination of D- and L-amino acids. *J. Chromatogr. Sci.*, 50:393-395.
- TS 4967. Tahıl ve tahıl ürünleri- toplam yağ yayını.
- TS 5822-1 ISO 5725-1. Ölçme metodlarının ve sonuçlarının doğruluğu (gerçeklik ve kesinlik) bölüm 1: Genel prensipler ve tarifler
- TS ISO 8402:1994. Kalite yönetimi ve kalite güvencesi
- Turhan, I. 2014. Relationship between sugar profile and D-Pinitol content of pods of wild and cultivated types of Carob Bean (*Ceratonia siliqua* L.). *Int. J. Food Prop.*, 17(2):363-370.
- Veena, N., Arora, S., Kapila, S., Singh, R.R.B., Katara, A., Pandey, M.M., Rastogi, S. and Rawat, A.K.S. 2014. Immunomodulatory and antioxidative potential of milk fortified with *Asparagus racemosus*. *J. Med. Plants Stud.*, 2(6):13-19.
- Vural, H., Eşiyok, D. ve Duman, İ. 2000. Kültür sebzeleri: sebze yetiştirme. Ege Üniversitesi Yayını, 400 s.
- Yılmaz, G. 2018. Some medicinal plants used as folk medicine for dermatological diseases in European Turkey. *CUPMAP*, 1: 48-52.
- Zhang, H., Birch, J., Pei, J., Ahmed, I.A.M., Yang, H., Dias, G., El-Aty, A.M.A. and Bekhit, A.E.D. 2019. Identification of six phytochemical compounds from *Asparagus officinalis* L. root cultivars from New Zealand and China using UAE-SPE-UPLC-MS/MS: effects of extracts on H₂O₂-induced oxidative stress. *Nutrients*, 11(107):1-17.

ÖZGEÇMİŞ

ORÇUN ÇINAR

orcun.cinar@tarimorman.gov.tr



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2016- 2019	Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Antalya
Lisans	Gazi Üniversitesi
2011-2018	Mühendislik-Mimarlık Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Ankara

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Mühendis	Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü
2011-Devam Ediyor	Gıda Teknolojisi ve Tıbbi, Aromatik Bitkileri Bölümü, Antalya

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

- 1- Karık, Ü., Çınar, O., Tunçtürk, M., Şekeroğlu, N., Gezici, S. (2018). Essential oil composition of some sage (Salvia spp.) species cultivated in İzmir (Turkey) ecological conditions, Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research, 52(4), 102-107.
- 2- Duman, E., Çınar, O., Özcan, M.M. (2017). Physico-chemical properties, fatty acid composition, essential oil composition and heavy metal contents of raw and roasted coffee bean and oils, Zeitschrift für Arznei- & Gewürzpflanzen, 22(4), 154-159.

3- Gölükçü, M., Toker, R., Tokgöz, H., Çınar, O. (2016). The effect of harvesting time on seed oil content and fatty acid composition of some lemon and mandarin cultivars grown in Turkey, Journal of Agricultural Sciences, 22, 566-575.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1- Çınar, O., Yüksel, K., Tanriseven, M. (2014). Farklı dönemlerde toplanan *Schinus molle* yapraklarının uçucu yağ bileşimi ve antimikrobiyal aktivitesinin incelenmesi. 21. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı. (Özet Bildiri).

2- Çınar, O., Ayas, F., Yüksel, K. (2014). Gölgede ve fırında kurutmanın *Lavandula angustifolia* bitkisinin uçucu yağ oranı ve uçucu yağ bileşimine etkisinin incelenmesi. II. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu. (Özet Bildiri).

3- Yıldız Turgut, D., Ayas, F., Çınar, O. (2014). Domatesin geleneksel yöntemle reçele işlenmesi ve bazı kimyasal özelliklerinin belirlenmesi. 4. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu (Özet Bildiri).

4- Tuğrul Ay, S., Çınar, O., Ayas, F. (2014). Antalya florasında doğadan toplanan *Sideritis lycia* türünün kalite özelliklerinin belirlenmesi. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu (Özet Bildiri)

5- Çınar, N., Çınar, O., Çınar, A. (2014). Çınar ağacı (*Platanus orientalis* L.) yaprak, kozalak ve gövde kabuğunda fenolik madde ve antioksidan aktivite tayinleri. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu (Özet Bildiri).

6- Tuğrul Ay, S., Çınar, O., Demiray, K., Ayas, F. (2012). Antalya florasında doğadan toplanan *Sideritis congesta* türünün kalite özelliklerinin belirlenmesi. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu. (Özet Bildiri).

7- Tuğrul Ay, S., Çınar, O., Demiray, K., Ayas, F. (2012). Antalya florasında doğadan toplanan *Dorystoechas hastata* türünün kalite özelliklerinin belirlenmesi. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu. (Özet Bildiri).

8- Tuğrul Ay, S., Tanriseven, M., Çınar, O., Demiray, K., Ayas, F. (2012). Antalya florasında doğadan toplanan ve kültüre alınan *Sideritis stricta* türünün kalite özelliklerinin belirlenmesi. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu. (Özet Bildiri).