



***CAMPANULA PROPINQUA* EKSTRELERİNDEN LUTEOLİN-7-GLİKOZİT VE
RUTİN TAYİNİ İÇİN SIVI KÜTLE SPEKTROMETRİSİ YÖNTEMİ
GELİŞTİRİLMESİ**

Turkan CELİLOVA

Yüksek Lisans Tezi

Eskişehir 2023

**CAMPANULA PROPINQUA EKSTRELERİNDEN LUTEOLİN-7-GLİKOZİT VE
RUTİN TAYİNİ İÇİN SIVI KÜTLE SPEKTROMETRİSİ YÖNTEMİ
GELİŞTİRİLMESİ**

Turkan CELİLOVA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Erol ŞENER

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

2023

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Turkan CELİLOVA'nın “*Campanula propinqua* Ekstrelerinden Luteolin-7-Glikozit ve Rutin Tayini için Sıvı Kütle Spektrometrisi Yöntemi Geliştirilmesi” başlıklı tezi 20/01/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek “Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca, Analitik Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	: Doç. Dr. Erol ŞENER	
Üye	: Doç. Dr. Elif Mine ÖNCÜ KAYA	
Üye	: Prof. Dr. Duygu YENİCELİ UĞUR	

Prof. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ

Enstitü Müdürü

ÖZET

CAMPANULA PROPINQUA EKSTRELERİNDEN LUTEOLİN-7-GLİKOZİT VE RUTİN TAYİNİ İÇİN SIVI KÜTLE SPEKTROMETRİSİ YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ

Turkan CELİLOVA

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, .../01/2023

Danışman: Doç. Dr. Erol ŞENER

Bu çalışmada Rutin (RU) ve Luteolin-7-glikozit (Lut-7G) tayini için yeni bir SK-KS/KS yöntemi geliştirilmiştir. Çalışmalar zamanı 3,5 µm iç çapı olan Zorbax C18 kolunu kullanılmıştır. Optimum koşullar, 100.0 voltaj, 30°C kolon sıcaklığı, ve A hareketli faz olarak % 0,5 formik asit, B hareketli faz olarak su:asetonitril:formik asit (50:50:0,5, h/h/h) doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

Yöntem ICH kılavuzuna göre valide edilmiştir. Ağırlıklı regresyon uygulanmıştır. Rutin için 0,975-1950 ppb derişim aralığında, lut-7G içinse 0,6-1200 ppb derişim aralığında iyi bir doğrusallık belirlenmiştir. Tayin sınırı ve saptama sınırı rutin için sırasıyla 2,12 ppb ve 0,64 ppb, lut-7G içinse 0,44 ppb ve 0,13 ppb olarak bulunmuştur. Rutin için gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik çalışmaları için geri kazanım % 98,2-99,4 aralığında, lut-7G içinse % 98,6-100,4 aralığında ve % BSS ise 2'den az olması tatmin edici bulunmuştur. Geliştirilen yöntem *Campanula propinqua* bitkisinin yaprak ve çiçek ekstresine uygulanmıştır. Bitkinin yaprak ve çiçek ekstraktında sırasıyla 46,87 µg/mg ve 4,07 µg/mg rutin bulunmuştur. Lut-7G ise yalnız bitkinin çiçek ekstraktında 4,57 µg/mg olarak tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Rutin, Luteolin-7-glikozit, Sıvı kromatografisi-Kütle Spektrometrisi, *Campanula propinqua*

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF LIQUID CHROMATOGRAPHY MASS SPECTROMETRY METHOD FOR THE DETERMINATION OF LUTEOLIN-7-GLUCOSIDE AND RUTIN IN CAMPANULA PROPINQUA EXTRACTS

Turkan JALILOVA

Department of Analytical Chemistry

Anadolu University, Institute of Health Sciences, .../01/2023

Supervisor: Doç. Dr. Erol ŞENER

In this study, a new LC-MS/MS method was developed for the determination of Rutin (RU) and Luteolin-7-glycoside (Lut-7G). During the studies, Zorbax C18 with an inner diameter of 3,5 µm was used. Optimum conditions were 100.0 V voltage, 30°C column temperature and used a mobile phase A, % 0,5 formic acid and B water:acetonitrile:formic acid (50:50:0,5 v/v/v).

The method was validated according to ICH guideline. Applied weighted regression. A good linearity were obtained in the concentration range of 0,975-1950 ppb for the rutin and 0,66-1200 pbb for the lut-7G. LOQ and LOD of the method were found to be 2,12 ppb-0,64 ppb for the rutin and 0,44 ppb-0,13 ppb for the lut-7G. The precision and accuracy of the method were satisfying with intra and interday recovery values of % 98-99,4 for the rutin and % 98,6-100,4 for the lut-7G and RSD values less than % 2. The proposed method was applied to the leaf and flower extract of *Campanula Propinqua*. 46,57 µg/mg ve 4,07 µg/mg of rutin were found in the leaf and flower extract of the plant. Lut-7G was only found in the flower extract of the plant 4,57 µg/mg.

Keywords: Rutin, Luteolin-7-glucoside, Liquid chromatography–mass spectrometry, *Campanula propinqua*

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programıyla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

Turkan CELİLOVA

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren değerli danışman hocam Erol ŞENER'e,

Her zaman bilgi ve önerileriyle desteğini eksik etmeyen, laboratuvar çalışmalarına katkılarından dolayı değerli Kadri GÜLEÇ'e,

Bitki ekstralarını ve fenolik maddeleri temin eden değerli hocalarım Erkan YILMAZ'a ve Fatih GÖGER'e,

Laboratuvar çalışmalarına katkılarından dolayı değerli Emre ODUNCU'ya ve Yasin Darı'ya,

Analitik Kimya Anabilim Dalı'nın değerli hocalarına,

Ve her zaman, her koşulda yanımda olan ve desteğini her zaman hissettiğim değerli arkadaşım Sona Aliyeva'ya,

Bu hayattaki en büyük şansım, sonsuz minnettar olduğum aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KULLANILAN KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK BİLGİSİ.....	3
2.1. Fenolik Maddeler	3
2.1.1. Fenolik asitler	4
2.1.2. Flavonoidler.....	5
2.2. Fenolik Asitlerin Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri.....	8
2.2.1. Luteolin	8
2.2.2. Rutin.....	8
2.3. Rutin ve Luteolin-7-glikozit ile İlgili Yapılmış Diğer Çalışmalar.....	10
2.3.1. Rutin çalışmaları.....	10
2.3.2. Luteolin-7-glukozit çalışmaları.....	12
2.4. Campanula Cinsinin Morfolojik Özellikleri.....	14
2.4.1. <i>Campanula propinqua</i> bitkisinin morfolojik özellikleri	15
2.5. Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi	16
2.5.1. SK-KS sistemleri	16
2.5.2. SK-KS sistemlerinde kullanılan kütle analizörleri	17
2.5.3. SK-KS sisteminde kullanılan dedektörler	18
2.5.4. SK-KS sistemlerinde kullanılan iyonlaştırma yöntemleri	18
3. GEREÇLER.....	19

3.1. Kullanılan Bitkisel Örnekler	19
3.2. Kimyasal Maddeler	19
3.3. Cihazlar ve Diğer Gereçler	20
4. YÖNTEMLER.....	21
4.1. Bitki Numunelerinin Hazırlanması ve Ekstraksiyonu	21
4.2. Ekstakt Numune Çözeltilerinin Hazırlanması	22
4.3. Standart Çözeltilerin Hazırlanması.....	22
4.4. Yöntemin Validasyonu.....	22
4.4.1. Doğrusallık	23
4.4.2. Duyarlılık.....	23
4.4.3. Kesinlik	23
4.4.4. Doğruluk	24
5. BULGU VE TARTIŞMALAR	25
5.1. Yöntem Optimizasyonu	25
5.2. Yöntem Validasyonu	30
5.2.1. Doğrusallık	30
5.2.2. Duyarlılık.....	32
5.2.3. Kesinlik	32
5.2.4. Doğruluk	34
5.3. SK-KS/KS Yönteminin Bitki Ekstrelerine Uygulanması	35
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	37
KAYNAK.....	38

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Fenolik asitlerin yapıları.....	5
Çizelge 2.2. Flavonoid kaynakları.....	6
Çizelge 2.3. Flavonoid türleri	7
Çizelge 2.4. Campanula propinqua'nın taksonomisi.....	15
Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	19
Çizelge 3.2. Analizlerde kullanılan cihazlar.....	20
Çizelge 5.1. Optimum çalışma koşulları	25
Çizelge 5.2. Fenolik bileşiklerin tayini için uygulanan gradient sistemi.....	25
Çizelge 5.3. Rutin için doğrusallık sonuçları	28
Çizelge 5.4. Lut-7G için ağırlıklı doğrusallık sonuçları	29
Çizelge 5.5. Rutin için kesinlik sonuçları	31
Çizelge 5.6. Luteolin-7-glukozit için kesinlik sonuçları	31
Çizelge 5.7. Rutin için doğruluk değerleri	32
Çizelge 5.8. Lut-7G için doğruluk değerleri.....	32
Çizelge 5.9. Campanula propinqua bitkisinde bulunan bileşik miktarları	33

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Flavonoidleri kimyasal yapısı	6
Şekil 2.2. Luteolin molekülü	8
Şekil 2.3. Rutin molekülü	9
Şekil 2.5 SK-KS Sistemi	16
Şekil.4.1. Campanula propinqua bitkisi.....	21
Şekil.5.1. KS/KS cihazında source parametreleri.....	26
Şekil.5.2. KS/KS cihazında acquisition optimizasyon değerleri	26
Şekil.5.3. Rutin'in 609 m/z ana ürün kromatogramı	27
Şekil.5.4. Rutin'in 609 m/z ana ürün spekturumu	27
Şekil.5.5. Rutinin 301 m/z parçalanma ürün kromatogramı.....	27
Şekil.5.6. Rutin'in Kütle Spektrumu 301 m/z parçalanma ürünü	28
Şekil.5.7. Luteolin-7G'in 447 m/z ana ürün kromatogramı	28
Şekil.5.8. Luteolin - 7G'in 447 m/z ana ürün spekturumu	28
Şekil.5.9. Luteolin-7G'in Kütle Spektrumu 285 m/z parçalanma ürünü.....	29
Şekil.5.10. Luteolin-7G'in 285 m/z parçalanma ürün kromatogramı	29

SİMGELER VE KULLANILAN KISALTMALAR

WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
ROS	: Reaktif Oksijen Türü
RNS	: Reaktif Nitrojen Türü
HBA	: Hidroksibenzoik Asitler
MeOH	: Metanol
mL	: Mililitre
µg	: Mikrogram
UV	: Morötesi (Ultraviyole)
UHPLC	: Ultra Yüksek Sıvı Kromatografisi
HPTLC	: Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi
SİNP	: Suda Çözünür Floresan Silikon Nano Partiküller
NAYKH	: Non-Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı
KS	: Kütle spektrometrisi
YPSK	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
SK-KS/KS	: Sıvı kromatografisi- kütle spektrometresi/kütle spektrometresi
LOQ	: Tayin Sınırı
LOD	: Saptama Sınırı
Lut-7G	: Luteolin-7-glikozit
Ru	: Rutin

1. GİRİŞ

İnsanların bitkilere karşı ilgisi çok uzun zamandır devam etmektedir. Doğa geçmişten beri tıbbi bitkiler kaynağı olmuştur. Tıbbi bitkiler yıllardır insanlar tarafından ilaç, gıda, kozmetik, boya sanayisinde değişik amaçlarla kullanılmaktadır (Altınöz ve Altuner, 2021). Yabani bitkilerin ilk defa ilaç olarak kullanılması Sumer, Akkad ve Asurlara dayanmaktadır (Çoban ve Barışık, 2021).

Birçok ülke ve medeniyetlerde bitkisel ilaçlar kullanılmaktadır (Hlila vd., 2016). Son yıllarda sentetik ilaçların insanlar üzerindeki olumsuz etkileri ve tahribatı alternatif tıpa ilgiyi oldukça artırmıştır. Alternatif tıp uygulamalarından biri bitkilerle tedavi giderek önem kazanmaya başlamıştır (Altınöz ve Altuner, 2021). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) yaklaşık 20000 bitkinin ilaç olarak kullanıldığını bildirmiştir. 500'e kadar bitki Türkiye'de ilaç olarak kullanılmaktadır (Çoban ve Barışık, 2021).

Bitkiler, insan sağlığına katkıda bulunabilecek biyoaktif bileşikler, özellikle polifenoller açısından zengindir (Hlila vd., 2016). Son yıllarda insan sağlığına olumlu etkilerinden dolayı fenolik bileşiklerin ve fenolik bileşik bazlı bitkilerin araştırılması önemli ölçüde artmıştır. Meyve, sebze, tahıllar ve içecekler gibi birçok gıdada bulunan doğal bileşiklerdir. Epidemiyolojik araştırmalara ve meta-analizlere göre bitki polifenollerini açısından zengin olan gıdaların uzun süreli tüketimi kansere, kardiyovasküler hastalığa, diyabete, osteoporoza ve nörolojik hastalıklara karşı koruma sağlar (Rahman vd., 2022).

Polifenoller, serbest radikallerin oluşumunu ve meydana getirdiği hasarı önleyerek, metal iyonlarını şelatlayarak güçlü antioksidan aktivite gösterirler (Li vd., 2021). Serbest radikaller, eşleşmemiş elektron içeren ve çok reaktif olan atom grubu ve moleküllerdir (Rahman vd., 2022). Reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri (RNS) olmakla 2 tür serbest radikaller vardır. Yüksek konsantrasyonlarda, reaktif türler insanlar, bitkiler ve hayvanlar üzerinde olumsuz etkiye sahiptir (Wang vd., 2020). Reaktif oksijen türleri hücre zarındaki lipidlere, dokulardaki veya enzimlerdeki proteinlere, karbonhidratlara ve DNA'ya saldırarak, zar hasarına, protein modifikasyonuna (enzimler dahil) ve DNA hasarına bağlı olarak hücre ölümlerine neden olmaktadır (Pietta, 2000).

Tıpta ve endüstride kullanılan antioksidanlar doğal ve sentetik olanlar olmak üzere iki gruba ayrılır. En yaygın sentetik antioksidanların insan vücuduna zararlı etkileri gözlemlenmiştir (Olzowy, 2019). Polifenollerle zengin bitkilerden elde edilen doğal antioksidanların düşük toksisite ve daha az yan etkisi onların yaygın kullanılma sebebidir (Li vd., 2021).

Fenolik bileşiklerin kozmetik, tekstil, gıda ve paketleme endüstrileri tarafından renklendirici, antimikrobiyal, antioksidan özelliklerinden yararlanılmaktadır (Albuquerque vd., 2021).

GK-KS ve SK-KS gibi kütle spektrometri ile entegre kromatografik teknikler, aynı anda çok sayıda maddenin analiz edilmesi ve yüksek, hassasiyet, duyarlılık gibi önemli avantajlara sahiptir. (Aybastier, 2016)

Son zamanlarda, fenolik bileşiklerin analizi için SK-KS cihazı kullanılmaktadır. Bu cihazla hızlı, kolay, ucuz, etkili, sağlam, güvenli ve aynı anda birçok analitin analizi yapılabilmektedir (Yin vd., 2021).

Bu tez kapsamında rutin ve luteolin-7-glikozit'in tayini için yeni bir SK-KS/KS yöntemi geliştirilmiştir. Yöntem *Campanula propinqua* bitkisinin yaprak ve çiçek ekstresine uygulanmıştır.

2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Fenolik Maddeler

Polifenoller, bitkiler tarafından diğer organizmalardan korunmak için üretilen ikincil metabolitlerdir (Tsao, 2010). İkincil metabolitler, bitkiler tarafından sentezlenen lakin bitkinin büyüme ve gelişmesinde direkt rolü olmayan organik bileşiklerdir. Son 100 yılda ikincil metabolit ürünleri eczacılıkta, aroma endüstrisinde, gıda ve kimya sanayisinde geniş kullanılmaktadır (Tuncay, 2019). İkincil metabolitlerin bulunduğu bitkilerin çoğu nesli tükenmekte olan bitkilerdir (Şendoğan, 2015). Bu sebeple geniş kullanıma sahip olan ikincil metabolitler bazen birincil metabolitlerden biyosentez yoluyla üretilmektedir (Isah, 2019).

Bütün bitkilerde bulunan fenolik maddeler genellikle onların tat, pigmentasyon, koku, renk ve dayanıklılığı üzerine etkili olan büyük bir gruptur (Şendoğan, 2015). Bu maddeler, bitkinin normal gelişimi sırasında ve ayrıca biyotik ve abiyotik gibi farklı durumlara yanıt olarak sentezlenmektedir (Haminiu, 2012). Fenolik maddeler besinlerin rengini, kalitesini, besin değerini ve kararlılığını etkilemektedir (Robbins, 2003). Bu sebepten düşük dozlarda besinlerin raf ömrünü uzatan koruyucu olarak ve oksidatif bozulmalara karşı kullanılmaktadır (Tsao ve Deng, 2004). Yüksek konsantrasyona sahip fenolik bileşikler ise çökerek oksidatif bozulmalara neden olmaktadır (Shahidi ve Nazck, 1995).

Fenolik maddeler insan organizmasında oksidanlar ve antioksidanlar arasında dengenin korunmasında önemli rol oynamaktadır (Karabulut ve Yemiş, 2019). Hücresel bileşenlerin zarar görmesine sebep olan oksidatif stres, dokularda aşırı üretilen reaktif oksijen türleri (ROS) hücre ölümüne neden olabilmektedir (Ngo vd., 2010). Bitki ve besin maddelerindeki en önemli antioksidanlar olan fenolik bileşikler, reaktif türleri indirgeyerek hücre zarlarının hasar görmesini veya hücre içindeki genetik hasarı önleyebilirler (Jinle vd., 2019).

Fenolik asitlerin antioksidan ve antimikrobiyal etkileri onların aromatik halkaya bağlı olan hidroksil gruplarının sayı ve pozisyonu ile doğrudan ilgilidir. Hidroksil ve metoksi grup sayısı arttıkça fenolik asitlerin antioksidan aktivitesi de artar (Chen vd., 2020). Ekstraksiyonda kullanılan çözücü türüne, bitkinin yetiştirme koşullarına, hasat zamanına ve depolama koşullarına göre fenolik maddelerin antioksidan potansiyeli

değişebilir (Martins, Barros ve Ferreira, 2016; Albuquerque vd., 2021).

Genel olarak fenolik bileşikler, gıda, pestisit, patlayıcı, ilaç, kozmetik ve boya gibi kimyasalları üretmek için çeşitli endüstriyel işlemlerde kullanılmaktadır (Barnaba vd., 2015). Fenolik birleşiklerin gıda üretim zincirinin kalıntılarından ve yan ürünlerinden elde edilmesi, bu bileşiklerin ucuz doğal kaynak olarak geniş kullanımına sebebiyet vermiştir (Albuquerque vd., 2021).

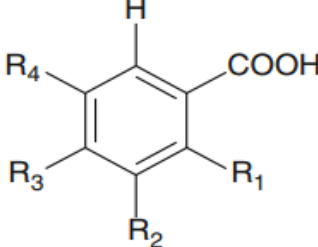
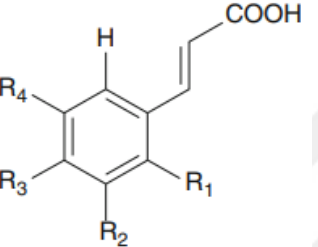
Fenolik bileşikler temelde 2 gruba ayrılmaktadır. Bunlar fenolik asitler ve flavonoidlerdir (Hurtado-Fernández vd., 2010). Fenolik asitler tipik olarak tüketilen toplam fenoliklerin yaklaşık üçte birini oluştururken, flavonoidler kalan üçte ikisini oluşturmaktadır (Rahman vd.,2022)

2.1.1. Fenolik asitler

Fenolik asitler bir aromatik benzen halkasına hidroksil (OH) ve farklı radikal gruplar bağlanarak oluşurlar. Hidroksibenzoik asit ve hidroksisinnamik asit türevleri vardır (Ho, 1991). Hidroksisinnamik asitler C₆-C₃ fenilpropan yapılı ve karboksil grubu benzen halkasına etil grubu ile bağlanan maddelerdir. Hidroksibenzoik asitlerde ise karboksil grubu benzen halkasına doğrudan bağlanır. Bunlar C₆-C₁ fenilmetan yapılı ve düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir (Dykes ve Rooney 2007). Hidroksibenzoik asitler, hidroksisinnamik asitlerden daha polardırlar (Şen, 2020).

Kafeik asit, sinamik asit, p-kumarik asit, o-kumarik asit, ferulik asit, sinapik asit, klorojenik asit, t-sinnamik asitler hidroksisinnamik asit türevleridir (Çizelge 2.1). Hidroksisinnamik asitler HBA'lara göre daha yaygındır. HBA'lar çoğunlukla meyve ve bitkilerde eser miktarda (10 ppm kadar) bulunmakta veya hiç bulunmamaktadır. P-hidroksibenzoik asit, protokateşik asit, gallik asit, salisilik asit, şiringik asit hidroksibenzoik asit türevleridir (Çizelge 2.1) (C.W. I. Haminiu, 2012).

Çizelge 2.1. Fenolik asitlerin yapıları

Hidroksisinnamik asitler					
	Adları	R1	R2	R3	R4
	Sinnamik asit	H	H	H	H
	Ferulik asit	H	OCH ₃	OH	H
	Sinapik asit	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
	Kafeik asit	H	OH	OH	H
Hidroksibenzoik asitler					
	Benzoik asit	H	H	H	H
	Vanilik asit	H	OCH ₃	OH	H
	Salisilik asit	OH	H	H	H
	Gallik asit	H	OH	OH	OH

2.1.2. Flavonoidler

Flavonoidler, hücre fotosentezinde önemli rol oynayan düşük molekül ağırlıklı biyoaktif polifenollerdir. Flavonoidler bitkilerde sentezlenen ikincil metabolitlerdir. Sarı renkli olmaları sebebiyle Latince “sarı” anlamına gelen “flavus” sözünden alınmıştır (Kahraman, Serteser ve Koken, 2002). Flavonoidler tüm bitki organlarında (kök, gövde, yaprak, meyve, çiçek, tohum vb.) bulunmaktadır (Bayır, 2011). Bu bileşikler bitkileri oksidatif stresten, mikrobiyal enfeksiyondan, sıcaktan, soğuktan, kuraklıktan da korur (Puupponen-Piimä vd., 2000). Bitkilerde flavonoid konsantrasyonu sıcaklık, ultraviyole (UV) radyasyonu, mevsim, kuraklık ve tuzluluk stresi, ışık gibi doğal faktörlerden etkilenir (Chagas, 2021).

Flavonoidler, bitkilerdeki fizyolojik özelliklerinin yanı sıra insan beslenmesinde önemli bileşenlerdir (Pietta, 2000). Flavonoidler insan vücudunda sentezlenmezler. Bu sebepten günlük flavonoid miktarının besinlerle temin edilmesi gerekmektedir (Çizelge 2.2) (Bayır, 2011). Sebze ve meyveler ile flavonoid alımı birçok hastalık riskini ve

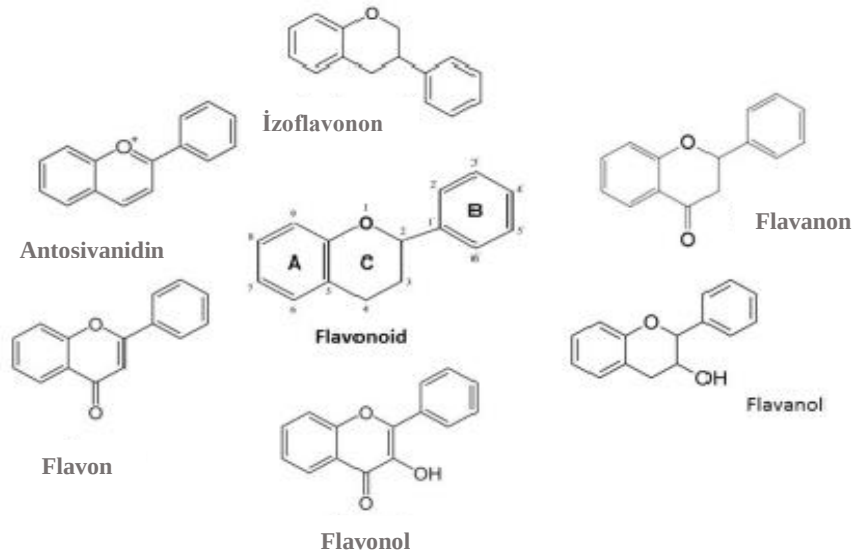
yaşlanmayı önemli ölçüde azaltır. Günlük flavonoid alımı tüketilen meyve, sebze ve içeceklerden aslı olarak 50-800 mg'dır (Pietta, 2000). Bu sebepten 10.000'den çok flavonoid izole edilmiş ve tanımlanmıştır (Joseph, Edirisinghe ve Burton-Freeman, 2015).

Çizelge 2.2. *Flavonoid kaynakları*

Flavonoid kaynakları	
Meyveler	Elma, armut, çilek, sitrus meyveleri, üzüm, karadut
Sebzeler	Brokoli, kereviz, kırmızı biber, soğan, ıspanak
İçecekler	Çay, kırmızı şarap
Diğer gıdalar	Süt, kakao, çikolata, baharatlar

Genel olarak flavonoidler fenil benzo-piron türevleridir (Şekil 2.1). 15 karbon atomlu 2 aromatik halka (A, B) oksijenli bir hetero halka ile (C) bağlanmıştır (Caporali vd., 2022).

İskelet yapılarına göre flavonoidler; kateşinler (flavan-3-oller), antosiyanidinler, flavonoller, flavonlar, flavononlar, isoflavonlar olmakla 6 alt gruba ayrılmaktadırlar (Bayır, 2011).



Şekil 2.1. Flavonoidleri kimyasal yapısı (Bayır, 2011)

Kimyasal yapılarına bağlı olarak flavonoidlerin onaylanan antioksidan, anti-enflamatuvar, antitümör, antimikrobiyal, antiviral, antianjiyojenik gibi farmakolojik

özellikleri vardır (Caporali vd., 2022). Bu bileşikler biyoaktiviteleri için oldukça çok araştırılmaktadırlar. Epidemiyolojik çalışmalar, yüksek flavonoid tüketiminin kardiovasküler-serebrovasküler gibi kronik hastalık riskini azalttığını göstermiştir (Puupponen-Pimä vd., 2006)

Bitki ekolojisinde çeşitli rolleri vardır. Çekici renkleri nedeniyle flavonlar, flavonoller ve antosiyanidinler, polinatör böcekler için görsel sinyal olabilirler. Burukluk özelliklerinden dolayı, kateşinler bitkide zararlı böceklere karşı savunma sistemi olarak davranırlar (Caporali vd., 2022).

Çizelge 2.3. *Flavonoid türleri*

Flavonoid Türleri	
Flavonlar	luteolin, luteolin glikozitler, apigenin, rutin
Flavanonlar	hesperidin, naringin, naringenin, ponkirin
Flavonoller	kuersetin, kaempferol, mirisetin
İzoflavonon	diadzein, diadzin, genistein, glisitein, genişin
Antosiyanidin	apigenidin, siyanidin
Flavan-3-oller (Katekinler)	kateşin, epikateşin

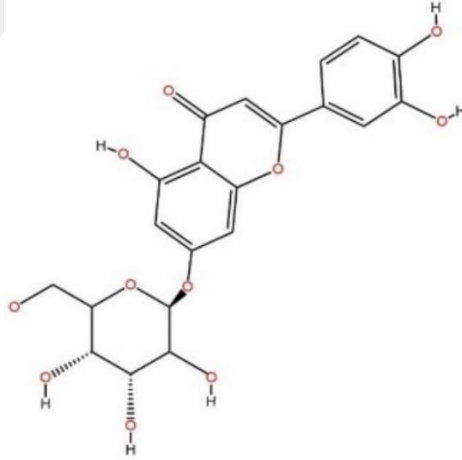
Flavonoidler glikozit ve aglikonlar olarak bulunmaktadır. Şeker birimi bağlanmış flavonoid molekülü “glikozit”, bağlanmamış flavonoid molekülü ise “aglikon” adlandırılır. Aglikonlar bağırsakta hücre membranlarından emilirler, glikozitler ise bağırsağa girmeden önce şeker kısmından ayrılırlar (Bayır, 2011).

2.2. Fenolik Asitlerin Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri

2.2.1. Luteolin

Luteolin (3',4',5,7-tetrahidroksi flavon) sarı renkli, birçok bitkide bulunan önemli bir flavondur. Bir C2-C3 çift karbon ağına sahip, kimyasal olarak 2 benzen halkası ve bir oksijen içeren, C6-C3-C6 yapısında moleküldür. Doğal halde dağ kekiği, kereviz, biber, brokoli, havuç ve başka sebzelerde bulunmaktadır. Çin, İran ve Brezilyada geleneksel tıpta hastalıkların tedavisinde uzun süre kullanılmıştır. Luteolin antienflamatuar, kemoterapötik, antidiabetik, kardioprotektif, antialerjik, antioksidan, antimikrobial gibi özelliklere sahiptir. Merkezi sinir sistemi için önemli olan kan-beyin bariyerini geçebildiği için beyin tümörü, Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılabilir olduğu tespit edilmiştir (Kwon, 2017).

Luteolinin glikozit formu; luteolin-7-glikozit turpgiller, yeşil yapraklı sebzeler (kırmızı lahana, lahana, ıspanak, marul), otlar (kekik, biberiye, maydanoz), fasulye, fındık, çikolata, nar, elma, üzüm ve baharatlarda zengin olarak bulunur (Caporali vd., 2022).



Şekil 2.2. Luteolin-7-glikozit molekülü

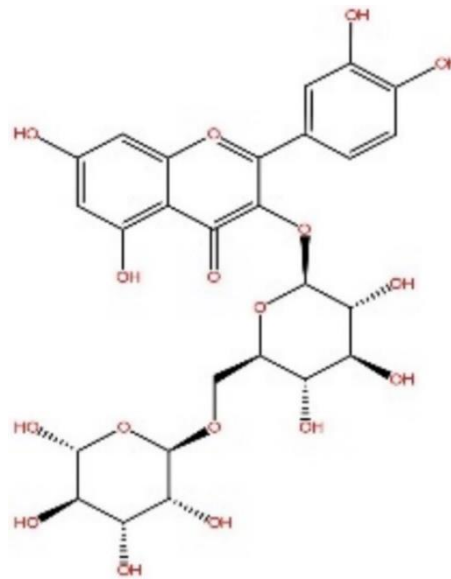
2.2.2. Rutin

Rutin (kersetin 3-O-rutinosid), sarı kristal tozudur. Rutin bitkilerde ve bitki bazlı ürünlerde yaygın bulunan flavonoid glikozittir. Suda az, alkol, asetonda çok çözünen maddedir. Bitkilerde çoğunlukla farklı şeker parçaları ile birlikte glikozit olarak bulunurlar. Şekerle konjugasyon glikoziti stabilize eder, bu da suda çözünürlüğü artırır ve biyoaktivite, biyoyararlanımı etkiler (Budzynska vd., 2019). Elma, çay, karabuğday

gibi bitkilerde bol miktarda bulunur. Bugüne kadar 70’den çok bitkinin rutin içerdiği bildirilmiştir (Gullon vd., 2017).

İlk defa 19-cu yüzyılda *Ruta graveolens* bitkisinden izole edilmiştir ve “rutin” adı buradan gelir (Budzynska vd., 2019). *Ruta graveolens* bitkisinin toprak üstü kısımlarında % 2-3 oranında rutin bulunur (Ganeshpurkar ve Saluja, 2016). *Polygonaceae* familyasından olan karabuğday rutinin doğal ana kaynağıdır (Gullon vd., 2017). 50 tıbbi bitkinin karşılaştırmalı analizi rutinin en yüksek sedefli bitkilerde (86,6 mg/g) sonra karabuğday çiçeklerinde (53,5 mg/g) olduğunu göstermiştir (Budzynska vd., 2019).

Rutin şeker düşürme, insülin salınımı düzenleme gibi farmakolojik etkileri sebebiyle geniş araştırılmaktadır. Ve ayrıca anti-tümör, anti-enflamatuvar özellikleri ile birlikte ROS’un sebep olduğu hasarı azaltır (Attia, Fattah ve Nasralla, 2020). Antioksidan ve kan basıncını düşürme, kılcal damar geçirgenliğini azaltma, kan sulandırma gibi fizyolojik aktivitelerine göre terapötik ilaç olarak kullanılan bitkiler kategorisine girer (Subbarayan, Natesan ve Chen, 2020). Rutin ile sinyal iletim yolları modüle edilebilir ve tiroid fonksiyonları iyileştirilebilir (Guven, Arici, Simsek, 2019). Rutin özellikle varisli damar, iç kanama, basur hastalıklarının tedavisi için tavsiye edilmektedir (Gullon vd., 2017). Son araştırmalara göre 150’den fazla farmasötik üründe rutin aktif birleşen olarak kullanılmaktadır (Subbarayan, Natesan ve Chen, 2020). Rutinin büyük dezavantajı düşük suda çözünürlük, zayıf stabilite ve limitli membran geçirgenliğinden kaynaklanan sınırlı biyoyararlanımıdır. Günlük oral doz 500 mg – 2000 mg’dır (Gullon vd., 2017).



Şekil 2.3. Rutin molekülü

2.3. Rutin ve Luteolin-7-glikozit ile İlgili Yapılmış Diğer Çalışmalar

2.3.1. Rutin çalışmaları

Zhu vd., (2022) sıçanlarda oral uygulanmadan sonra *Prunus mume fructus* (MF) ekstraktını analiz etmişler. Bu çalışmada oral MF ekstraktı uygulandıktan sıçan plazmasında 16 prototip bileşenin eşzamanlı tayini için güvenilir ve hassas UPLC-MS/MS yöntemi geliştirilmiş ve doğrulanmıştır. Plazma numuneleri, asetonitril kullanılarak protein çöktürme ile hazırlanmıştır. Analiz, Acquity Uplc Beh C18 (2,1 × 100 mm, 1,7 µm) kolonunda, mobil faz olarak metanol ve % 0,1 (v/v) formik asit karışımında ve akış hızı 0.3 mL/dakikada gerçekleştirilmiştir. Rutinin miktarı Agilent Jet Stream elektrosprey iyonlaştırması negatif iyon modunda kullanılarak belirlenmiştir. Yöntem 0,5-250,0 ng/mL derişim aralığında doğrusaldır. Bu çalışmada rutin için, tayin sınırı 0,2 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Analitler için stabilite çalışmaları analiz koşullarında test edilmiş ve % 13,7'den daha düşük BSS bulunmuştur. Geliştirilmiş yöntem, rutin sıçan plazmasında farmakokinetik değerlendirilmesi için başarıyla kullanılmıştır.

Dengue son 50 yıldır sivrisinek kaynaklı en çok yayılan enfeksiyonlardan biridir. Divya-Denguenil-Vati (DNV), Dengue fever enfeksiyonunun çözümü için 5 bitkinin karıştırılmasıyla oluşturulmuştur. Bu çalışmada Balkrishna vd., (2022) DNV için UNPLC ve HPTLC'de seçici, hassas, kesin yöntem geliştirmişler. UHPLC yöntemi rutin ve diğer maddelerin eşzamanlı tayini için geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Rutin daha sonra HPTLC'de geliştirilerek valide edilmiştir. Yöntemler Uluslararası Uyum Konferansı (ICH) yönergelerine göre doğrusallık ($r^2 > 0,99$), hassaslık, kesinlik (% RSD < % 5), ve doğruluk (% 88-% 105) parametreleri açısından valide edilmiştir. Geliştirilen yöntemler, 26 ticari DNV gruplarını test etmek için kullanılmıştır.

Diğer bir çalışmada, rutin tayini için oldukça hassas floresan yöntemi oluşturulmuştur. Silikon kaynağı olarak 3-(2-aminoetilamino) propil-dimetoksietilsilan ve indirgeyici olarak amidol kullanılmıştır. Tek kap hidrotermal yöntemle suda çözünür floresan silikon nanopartiküller hazırlanmıştır (SİNP). SİNP'ler parlak yeşil flüoresan, tuz toleransı, sıcaklık kararlılığı ve suda iyi çözünürlük göstermiştir. Rutin için doğrusallık aralığı ve saptama sınırı değerleri sırayla 0,05-400 µM ve 15,2 nM olarak bulunmuştur. Bu yöntem rutin tabletlerinde ve *Sophora japonica*'de rutini tayin etmek için başarıyla uygulanmıştır (Pan vd., 2022).

Hemidesmus indicus'da rutin miktarının belirlenmesi için Shrivastava ve Daharwal (2021) yüksek performanslı ince tabaka kromatografi (HPTLC) yöntemi geliştirmişler. Yöntem Uluslararası Uyum Konferansı (ICH) yörüngelerine göre doğrusallık, doğruluk, kesinlik ve sağlamlık parametreleri açısından valide edilmiştir. Bağımsız değişkenlerin yanıt üzerindeki etkisini araştırma için Box-Behnken tasarımı ve yanıt yüzey metodolojisi uygulamışlardır. 3 bağımsız değişken; mobil faz bileşimi (% h/h), mobil faz hacmi (mL) ve akış hızı incelenmiştir. Doğrusallık aralığı ve korelasyon katsayısı rutin için HPTLC yöntemi ile 200-1000 ng/spot aralığında, r^2 0,9998 değerinde bulunmuştur. Üç farklı konsantrasyon seviyesindeki pik alan tayini, rutinün gün içi (0,04-0,05) ve günler arası (0,04-0,06) kesinlik için düşük % BSS (<2 %) değerleri olduğunu göstermiştir. Rutinin ekstrakt ve pazarlanan ana tentür'de ortalama rutin miktarı sırasıyla $229 \pm 0,57$ ve $210 \pm 0,57$ µg/g olarak tespit edilmiştir. Önerilen yöntem, *H. Indicus*'un kalite kontrol değerlendirmesiyle rutin tayini için basit, kesin ve doğru olarak kabul edilmiştir.

18-molibdo-2-fosfat Wall-Dawson heteropoli anyonu (18-MPA) kullanılarak Askorbik asit ve rutinün eş zamanlı tayini için yeşil, basit ve oldukça hassas sıralı enjeksiyon laboratuvarı valf yöntemi geliştirilmiştir. Yöntem, 18-MPA ve indirgeyici ajanlar arasındaki reaksiyon hızının çözelti pH'dan bağlı olmasına dayalıdır. pH 4,7'de bir tek askorbik asit etkileşime girebilirken, pH 7,4'de reaksiyon askorbik asit ve rutin için eş zamanlı olur. Analizin kesinlik ve seçiciliğini artırmak, reaktif tüketimini en aza indirmek ve Schlieren etkisini kaldırmak için sıralı enjeksiyon analizi manifold harici reaksiyon odası ile desteklenmiştir. 18-MPA indirgenmesiyle bir ve iki elektronlu heteropoli mavisi oluşur. Bir elektronlu heteropoli mavisinin fraksiyonu, indirgeyicinin düşük konsantrasyonlarında artar. İzobestik noktaya karşılık gelen dalga boyunun ölçülerek, kalibrasyon grafikleri elde edilir. Mevcut yöntem rutin için sırasıyla 0,3-24 mg/L aralığında doğrusallık göstermiştir. Saptama sınırı ise 0,13 mg/L olarak bulunmuştur. Yöntem, kabul edilebilir doğruluk ve kesinlik (% 1-2) ile askorutin tabletlerinde rutin tayin için Al-Shwaiyat vd., (2018) tarafından başarıyla uygulanmıştır.

2.3.2. Luteolin-7-glukozit çalışmaları

Onosma inexpectata Teppner ve *O. Amenum* DC'de fitokimyasal içerik incelenmiştir. Sıvı kromatografi-elektrosprey iyonizasyon tandem kütle spektrometresi kullanılarak 27 birleşik tanımlanmış ve miktarı belirlenmiştir. *Onosma inexpectata* luteolin-7-glukozit içerdiği belirlenmiştir. Luteolin-7-glikozit için tayin sınırı ve saptama sınırı sırasıyla 1,51 µg/L ve 0,45 µg/L olarak bulunmuştur. *O. inexpectata*'da 19812 ± 781 µg/g, *O. armenu*'da ise 29.04 ± 3 µg/g luteolin-7-glukozit bulunmuştur (Sarıkurkcu ve Tlili, 2021).

Palombo vd., (2016) luteolin-7-glukozitin sedef hastalığında tedavi yöntemi olarak kullanılması için araştırmışlar. Epidermis keratinositlerin bazal tabakada çoğaldığı ve suprabazal tabakalarda farklılaşmaya maruz kalan dokudur. Keratinosit çoğalması ile farklılaşması ve ölümü arasında denge önemlidir. Dengenin bozulması patolojik değişikliklere neden olabilir. Sedef hastalığı gibi yaygın deri hastalıkları hiperproliferasyon ile bağlıdır. Lut-7G'in hücre döngüsünde değişikliğe neden olduğu ve keratinosit farklılaşmasını indüklediği gösterilmiştir. Sedef hastalığının Imiquimod (IMQ) fare modelinde lut-7G uygulanması, akantozis'de azalmaya ve epidermal farklılaşma belirteçlerinin ekspresyonuna yol açar. IMQ'le aktive edilen IL-22 sinyal yolunun incelenmesi, Lut-7G'in fosfor ile edilerek aktive edilmiş STAT3 nükleer translokasyonu bozduğunu ve IL-22 sinyal kaskadını bloke ettiğini kanıtlanmıştır. Tüm bu sebepler baz alınarak lut-7G kullanılarak sedef hastalığı gibi hiperproliferatif ve inflamatuvar deri hastalıklarının tedavisinde umut verici sonuçlara ulaşıldığı görülmektedir.

Diğer bir çalışmada Sa vd., (2015) tarafından luteolin-7-glikozitin karaciğer lipid metabolizması üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Tüm vücut lipid metabolizmasında bozulmalar non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH) ve kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok hastalığın başlamasına yol açabilir. Daha önce sıçanlarda plazma lipid profilini iyileştirdiğini gösteren lut-7G'in lipid düşürücü etki mekanizmaları araştırılmıştır. Bir hafta boyunca oral uygulanan lut-7G, peroksizom proliferatörü ile aktive olan reseptör-alfa ve sıçan karaciğerinde izlenen genin karnitin palmitoil transferaz ekspresyonunu uyardığını göstermiştir. Lut-7G yağ asidi sentaz protein seviyelerini etkilemeden, sterol düzenleyici element bağlayıcı protein-1'in (SREBP) hepatik ifadesini azaltma eğilimi göstermiştir. SREBP-2 ve LDLr ve mRNA seviyeleri değişmemiş, HMG

CoA redüktaz (HMGCR) ekspresyonu lut-7G tarafından baskılanmıştır. Bu sonuçlar lut-7G'in metabolik hastalıklara karşı kullanılır olmasını kanıtlıyor.

Tüm kanser türleri arasında akciğer kanseri en geniş yayılmış olandır. Bunun % 85'i küçük hücreli dış akciğer kanseridir (NSCLC). NSCLC zamanı Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR) geninde Leu 858 Arg (L858R) ikame mutasyonu bildirilmiştir. Bu sebepten inhibitörler kullanılarak L8585R mutasyonu içeren EGFR'ler NSCLC'ye karşı ilaçların sentezi için kullanılabilir. Maiti vd., (2020) *Vernonia cinerea* bitkisinden EGFR L858R içeren güçlü inhibitörleri tanımlamışlardır. Luteolin-7-glikozit EGFR-L858R'de bulunan Met793 ile PD168393 referans inhibitörüne benzer etkileşim göstermiştir. Lut-7-glu'un kararlılığı EGFR L858R'de analiz edilmiş ve 60 nanosaniyede açık su koşullarında moleküler dinamik simülasyonu gerçekleştirildi. Eylemsizlik yarıçapı, izomer elementlerdeki sapmalar, çözücü erişebilir yüzey alanı ve hidrojen bağı modeli sonuçlarına göre lut-7G PD168393 ile karşılaştırıldığında daha iyi kararlılık göstermiştir. Luteolin-7-glukozitin daha iyi inhibisyon özellikleri sebebiyle EGFR L858R mutasyonuna sahip akciğer kanserine karşı etkili ilaçlar geliştirmek için daha fazla kullanılabilir olduğu gösterildi.

Başka bir çalışmada Jin vd., (2020) hasat zamanı *Cynomorii herba* bitkisinden flavonoidleri SK-KS/KS ile belirlemek için hassas ve doğru yöntem geliştirmişler. *Cynomorii herba* Çinde yiyecek olarak ve geleneksel tıpta böbrek rahatsızlıkları için, yaşlanma karşıtı olarak yaygın kullanılmaktadır. Kromatografik ayırım Eclipse plus C18 (3.0 mm x 50 mm, 1,8 µm) kolanda 40°C'de gerçekleştirilmiştir. Asetonitril ve % 0,05 formik asit içeren mobil faz kullanılmış ve akış hızı 0,4 mL·min⁻¹ olmuştur. Optimize koşullar altında luteolin-7-glukozit için doğrusallık aralığı, tayin sınırı ve saptama sınırı sırasıyla 20,2-1010 ng·mL⁻¹, 0,3 ng·mL⁻¹, 0,1 ng·mL⁻¹ değerlerinde bulunmuştur. Valide edilen yöntem aralıklı hasat zamanlarında *Cynomorii herb*'da fenolik bileşenlerin analizi için başarıyla uygulanmıştır.

2.4. Campanula Cinsinin Morfolojik Özellikleri

Campanula L. Campanulaceae familyasının en büyük cinsidir, esas olarak kuzey yarımkürede dağılmış 400'den fazla tür içerir. *Campanula* türleri çoğunlukla dar endemiktirler. Cinsin ana çeşitlilik merkezi, Türkiye, doğu Akdeniz bölgesi ve Kafkasyadır. Dünya genelinde çiçeklerinin şekil ve renginden dolayı genellikle peyzaj mimaride süs bitkisi olarak kullanılmaktadır (Karaliya vd.,2022). *Campanula* türleri çiçeklerinin çan şeklinde olması sebebiyle Türkiyede “çan çiçeği” veya “çingirak otu” olarak bilinmektedir (Hürkul, Köroğlu, 2019). Familya saponin, karbonhidrat, lateks, alkaloid ve polifenol gibi farmakolojik etkilere sahip olması bakımından önemlidir (Hürkul, Köroğlu, 2019). Bu cinsin çeşitli türlerinin kök, çiçek ve gövdesi bazı ülkelerde halk arasında çeşitli hastalıkların tedavisinde, geleneksel ilaçların hazırlanmasında kullanılmaktadır (Karaliya vd., 2022). Bazı *Campanula* türlerinin toprakaltı, toprak üstü, yaprak ve çiçek kısımları gıda olarak tüketilir (Alçıtepe, 2019). Türkiye florasında 128 tür *Campanula* bulunmaktadır. Bunların 68 tanesi endemik olarak Türkiyede doğal yetişmektedir ve endemizm oranı % 53'dir (Ozdol, vd., 2022).

Campanula türleri bademcik iltihabı, larenjit, bronşit, taş düşürücü tedavisinde halk tarafından çok uzun bir süre kullanılmaktadır (Roi, 1995). Türkiyede yara iyileştirici, enflamatuvar hastalıkların tedavisinde ve süt artırıcı olarak kullanılmıştır. Bundan başka cinsin antioksidant, antiviral, antialerjik, sitotoksik, emetik özellikleri belirtilmiştir (Çoban ve Barışık, 2021).

Campanula türleri fenolik asitler, flavonoid aglikonları ve onların glikozitleri, fenil-propanoit gibi polifenoller, triterpenler, poliasitler ile zengindir (Ayaz, 2021).

2.4.1. *Campanula propinqua* bitkisinin morfolojik özellikleri

Campanula propinqua yıllık otsu bitkidir. Subtropikal iklimde yetişir. Gövdesi ince, 7-35 cm yüksekliğinde, tabandan ikiye bölünmüştür. Yaprakları dar dikdörtgen, sapsız, 5–35 × 2–10 mm'dir. Çiçekleri gösterişlidir.

Genellikle kumlu topraklarda, dağlarda sarp kayalık yamaçlarında, yol kenarlarında, bazen ormanlarda yetişirler. Mayıs-Temmuz aylarında çiçekler. Adıyaman, Adana, Antalya, Erzurum, Diyarbakır, Kars ve Malatyada bulunurlar.

Çizelge 2.4. *Campanula propinqua* 'nın taksonomisi (http-2)

Alem (Kingdom)	Plantae (Bitkiler)
Altalem (Subkingdom)	Tracheobionta (Damarlı Bitkiler)
Üst Bölüm (Superdivisio)	Spermatophyta (Tohumlu Bitkiler)
Bölüm (Divisio)	Magnoliophyta (Kapalı Tohumlular)
Sınıf (Subclass)	Magnoliopsida (Çift Çenekliler)
Takım (Order)	Campanulales
Aile (Family)	Campanulaceae (çançiçeğigiller)
Cins (Genus)	Campanula L. (çan çiçeği)
Tür (Species)	Campanula propinqua Fisch. Et Mey. (kum çanı)

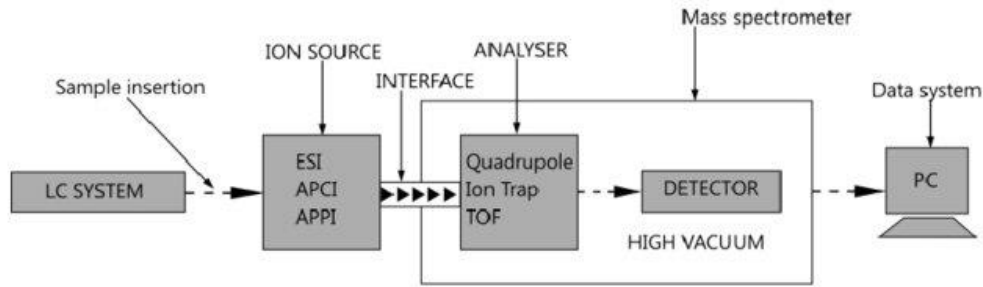
2.5. Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi

Sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi (SK-KS) (Liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS) kalitatif ve kantitatif analitik çalışmalarda geniş imkan sağlayan bir analitik ayırma tekniğidir. SK-KS, YPSK (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) ve KS (Kütle Spektrometresi) sistemlerinin birlikte çalıştırılmasından oluşan yapı ve miktar tayininde kullanılan bir cihazdır. Son yıllarda SK-KS yüksek seçicilik, ayırım gücü, duyarlılık ve hassasiyet gibi avantajları sebebiyle kantitatif ve kalitatif analizlerinde kullanılmaktadır.

Amerikalı bilim insanı John Bennet Fenn atmosferik basınçta iyonizasyon (API) sağlayan elektro sprey iyonlaştırma (ESI) tekniğini bulmuştur. Bu tekniği kullanarak sıvı faz bileşenleri iyonlaştırılıp gaz fazına geçirilmeleri mümkün olmuştur. YPSK'den gelen sıvı faz bileşenleri ESI tekniği ile KS sistemine girmeden ara ünite ile hem gaz fazına transfer edebilmekte hem de iyonlaştırabilmektedir. Böylece SK ve KS sistemler birleştirilmiş ve yüksek seçicilik, ayırım gücü ve hassasiyet ile analizler yapılmaktadır.

2.5.1. SK-KS sistemleri

SK-KS sistemi kabaca bir YPSK, bir API ünitesi ve bir KS'in birleştirilmesinden oluşmaktadır.



Şekil 2. 4 SK-KS Sistemi (Milhome ved., 2017)

KS cihazı vakum pompaları, iyon optikleri, kütle analizörü, dedektör, bilgisayar ve yazılımdan oluşmaktadır. KS cihazlarında iki tür vakum pompası; kaba vakum pompası ve turbo moleküler vakum pompası kullanılmaktadır.

2.5.2. SK-KS sistemlerinde kullanılan kütle analizörleri

Kütle analizörü birleşenlerin gaz fazında uçurulduğu ve m/z oranlarına göre ayrıldığı kısımdır. Genellikle sık kullanılan kütle analizörü dört çubuklu (quadrupole), iyon tuzağı (ion trap) ve uçuş zamanlı (time of flight) kütle analizörü ve tadem-üçlü quadrupole-analizörleridir.

Dört Çubuklu (Quadrupole) – tetragonal yerleştirilmiş dört adet metal silindirik çubuktan oluşmaktadır ve sk-ks cihazlarında en yaygın ve eski kullanılan analizördür. Bu analizörde kütleler iki farklı uygulanma ile analiz edilmektedir. Seçilmiş iyon analizi (SIM) ve tarama (scan). SIM uygulaması, doğru akım (DC) ve radyo frekansı (RF) değerleri sabit tutularak belli m/z 'ler detektöre ulaştırılarak kantitatif amaçlı kullanılmaktadır. Tarama'da ise DC ve FR değerlerinin değiştirilerek farklı m/z değerinin detektöre ulaştırılmasından oluşmaktadır ve kalitatif analizlerde kullanılabilir.

Tadem Kütle Analizörü-üç adet ardışık dört çubuklu kütle analizörü, parçalanma ünitesi ile ayrılmış iki adet dörtlü kütle analizöründen oluşmaktadır. Parçalanma ünitesi iyon ayırımı ve taraması yapmaz iyonların parçalanmasını sağlar. Aynı zamanda ana kütlelerin parçalanması ve parçaların tayini de yapmaktadır. Tadem kütle analizörü hem seçici hassas miktar tayinlerinde hem de yapı tayinlerinde kullanılan cihazlardır.

Uçuş Zamanlı (TOF) sistemleri tek bir kütle analizöründen oluşurlar ve fragmentasyon parçalaması yapmazlar. TOF genellikle peptid, protein gibi büyük moleküllerin ayırımı ve kütle tayini amacı ile sıklıkla kullanılmaktadır. İyonların uçuruldukları yolu uzatmak ve ayırım gücünü arttırmak için elektriksel yansıtıcılar kullanılmaktadır.

İyon Tuzağı (Ion Trap) analizörleri defalarca parçalanma işlemi yapabildiği için iyon tuzağı analizörleri n kadar iyon izolasyonu ve parçalama işlemi yapılabileceğini ifade eden KS^n simgesiyle gösterilmektedir. İyon tuzağı analizörü fragman kütle sinyallerini değerlendirerek SRM veya MRM uygulayarak seçici kantitatif, KS^n özelliği sebebi ile kalitatif analizler yapmaktadır.

2.5.3. SK-KS sisteminde kullanılan dedektörler

Kütle analizörlerinden ayrılmış iyonların çarparak elektriksel sinyal oluşturdıkları kısımdır. 3 çeşit dedektörler kullanılır; elektron çoğaltıcılar, dinotlu foto çoğaltıcılar ve mikro kanallı yüzey.

Elektron çoğaltıcılar-dörtlü ve iyon tuzağı analizörlerinde kullanılmaktadır. İyonlar dinota çarparak elektron koparır ve kopan elektron boynuz şeklindeki çoğaltıcıya girerek bu dedektörler tarafından elektrik sinyali üretir.

Dinotlu foto çoğaltıcılar-İyonlar dedektöre çarparak bir elektron koparır ve kopan elektron fosfor kaynağına çarparak foton emisyon yaratır. Foton foto katoda ulaşır ve elektrik sinyaline dönüştürülürler.

Mikro kanallı yüzey-çok hızlı sinyal ürettikleri için TOF analizörlerle birlikte kullanılmaktadır. Duyarlılıkları diğer dedektörlerden daha iyidir.

2.5.4. SK-KS sistemlerinde kullanılan iyonlaştırma yöntemleri

SK-KS sistemlerinde genellikle üç tip farklı iyonlaştırma teknikleri uygulanmaktadır. Bunlar elektro spre y iyonlaştırma (ESI), atmosferik basınçta foto iyonlaştırma (APPI) ve atmosferik basınçta kimyasal iyonlaştırma (APCI) yöntemlerinden oluşmaktadır.

ESI kütle spektrometrisinden çıkan maddeleri taşıyan hareketli faz elektriksel alanda azot gazı ile spre y edilir. Damlacıklara dönüşen ve *Coulumb* patlamasıyla daha da küçülen iyonlar elektrik alanı sebebiyle kütle ayrıştırıcıya gönderilir. Kütle ayırıcıdan önce bir çözücü uçurma ünitesi vardır. Bu bölümde iyonlara azot uygulanır ve iyon etrafındaki çözücünün tamamen buharlaştırılması sağlanır.

3. GEREÇLER

3.1. Kullanılan Bitkisel Örnekler

Bu çalışmanın yapılması için *Campanula propinqua* bitkisi toplanmış, bitkinin yaprak ve çiçeklerine ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. Analizlerde bitkinin yaprak ve çiçek ekstreleri kullanılmıştır.

3.2. Kimyasal Maddeler

Çizelge 3.1. *Kullanılan kimyasal maddeler*

Rutin	Sigma-Aldrich
Luteolin-7-glikozit	Sigma-Aldrich
Metanol	Sigma-Aldrich marka ($\geq$ % 99,9; gradiyent saflıkta)
Asetonitril	Carlo Erba marka ($\geq$ % 99,9; gradiyent saflıkta)
Formik asit	Fluka marka
Ammonium format	Fluka marka
Ultra saf su	

3.3. Cihazlar ve Diğer Gereçler

Analizlerde kullanılan cihaz ve gereçler Çizelge 3.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 3. 2. Analizlerde kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Marka/Model
Buzdolabı	Arçelik, No Frost & Electronic, Türkiye
Hassas terazi	Mettler Toledo, XP205, İsviçre
Ultrasonik banyo	Bandelin Electronic, RK510 H, Almanya
Ultra saf su cihazı	Millipore Ultrapure Water System, Fransa
Vorteks karıştırıcı	ISOLAB marka
Şırınga filtre	Millex Syringe Filter, PVDF 0.22µm 4mm, Almanya
Kolon	Agilen Zorbax C18
Pipet	Eppendorf marka
LC-MS/MS cihazı	Agilent Technologies Trip. Quad. LCMS 6460

4. YÖNTEMLER

4.1. Bitki Numunelerinin Hazırlanması ve Ekstraksiyonu

Campanula propinqua bitkisi Adıyaman ili Şerefli ve Ulubaba köyü arası yol kenarından, taşlık alanlardan Mayıs ayında toplanmıştır. Toplanan bitkinin tür tayini ve ekstraksiyon işlemi Dr. Öğr. Üyesi Erkan Yılmaz tarafından yapılmıştır.

Tür tayini yapılmış bitki laboratuvar ortamında gün ışığına maruz bırakılmadan kurutulmuştur. Kurutularak ufalanan bitkinin yaprak ve çiçekleri, metanol içerisinde oda ısısında her seferinde 1 gün olacak şekilde maserasyonla ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuştur. Maserasyon işlemi 2 kez tekrarlanmıştır. Daha sonra birleştirilen çözeltiler filtre kağıdı aracılığıyla süzölmüş ve daha sonra döner buharlaştırıcı ile 40 °C’de vakum altında kuruyana kadar buharlaştırılmıştır. Bitki solvent oranı 1:20 (w/v) olarak kullanılmıştır. 5 gram için her ekstraksiyonda 100 ml metanol kullanılmıştır. 5 gr bitki yaprağından 0,892 gr ekstre, 5 gr bitki çiçeğinden ise 1,005 gr ekstre elde edilmiştir.



Şekil.4.1. *Campanula propinqua* bitkisi (<http-4>)

4.2. Ekstakt Numune Çözeltilerinin Hazırlanması

Campanula propinqua bitkisinin yaprak ekstraktından 10 mg hassas terazide tartılarak 10 ml metanol ile bir çözelti hazırlanmıştır. Bitkinin çiçek ekstresinden ise 10 mg tartılarak 10 ml metanol'le çözelti hazırlanmıştır. Ekstre çözeltileri vortex cihazıyla karıştırılmıştır. Daha sonra ultrasonik banyoda 15 dk bekletilerek çözünmüştür ve 0,45 µm'lik şırınga filtre aracılığı ile süzölmüştür. Hazırlanan stok çözeltiler 20 °C'de buzdolabında saklanmıştır. SK-KS/KS analizleri için yaprak ekstre çözeltisi 1:100 oranında, çiçek ekstre çözeltisi ise 1:10 oranında olacak şekilde asetonitril:su (formik asit) (50:50:0,5, h:h:h) ile seyreltilmiştir.

4.3. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Stok çözeltisi hazırlamak için her bir fenolik madde standartlarından uygun miktarlarda tartılarak 15 ml'ye metanol ile seyreltilmiştir. Fenolik madde çözeltisinin hazırlanması Doç. Dr. Fatih GÖGER tarafından temin edilmiştir. Fenolik bileşiklerin stok çözeltisinde son derişimleri lut-7-glukozit için 0,24 mg/mL, rutin için ise 0,39 mg/mL olmuştur. Çözelti karışımı analizlerde kullanılabilecek kadar -20°C'de saklanmıştır.

Stok çözeltisinden metanol ile gerekli seyreltmeler yapılmış ve rutin için 0,975 ppb-1950 ppb derişim aralığında, lut-7G için ise 0,6 ppb-600 pbb derişim aralığında dilüsyon işlemi ile 8 adet çözelti hazırlanmıştır.

4.4. Yöntemin Validasyonu

Yeni analitik yöntem cihaz, yöntemin amacı, metodun çeşidi göz önünde bulundurularak geliştirilmelidir. Fenoliklerin tayini için geliştirilen SK-KS/KS parametreleri Uluslararası Uyumluluk Konferansı'na (ICH) göre doğrusallık, kesinlik, kararlılık, tayin sınırı ve saptama sınırı, doğruluktur. Yapılan validasyon çalışmalarının amacı geliştirilen yöntemin amaca uygunluğunun belirlenmesidir.

4.4.1. Doğrusallık

Yöntemin doğrusallığını belirlemek için regresyon eğrisinin eğimi, korelasyon katsayısı, y ekseninin kesim noktası verileri incelenmektedir (ICH, 2005).

Fenolik bileşikler kantitatif olarak belirlemek için SK-KS/KS cihazına sırasıyla çözeltiler enjekte edilerek sekiz noktalı kalibrasyon grafikleri çizilmiştir. Rutin için 0,9750-1950 ppb, Luteolin-7-glukozit için 0,6–1200 ppb derişim aralıklarında olan çözeltiler hazırlanmıştır. 3 ayrı günde ve her noktada üçer tekrarla analizler yapılmıştır.

4.4.2. Duyarlılık

Duyarlılık saptama sınırı ve tayin sınırı olarak bölünmektedir. Tayin sınırı (LOQ) analitin tayin edilebilecek, doğrusallık aralığı dışında olan veya aralığın en alt sınırını oluşturan konsantrasyonudur. Saptama sınırı (LOD) miktar tayini sınırları içerisine girmeyen, analitin uygun kesinlik ve doğrulukla tayin edilebilecek en düşük derişimidir (Ertaş ve Kayalı, 2005; Özkan, 2011, s. 114).

Tayin sınırı ve saptama sınırını görsel değerlendirme, sinyal-gürültü oranı ve eğimin standart sapmasına göre belirlemek mümkündür (Özkan, 2011, s. 114). Saptama sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) sinyal/gürültü yararlanarak aşağıda belirtilen eşitlikle hesaplanmıştır.

$$LOD = 3 \times (\text{sinyal/gürültü})$$

$$LOQ = 10 \times (\text{sinyal/gürültü})$$

4.4.3. Kesinlik

Yöntemin kesinliğinin belirlemek için gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlik çalışmaları yapılmıştır. Rutin (0,975; 19,5; 975 ppb) ve luteolin-7-glikozit (0,6; 12; 600 ppb) için farklı derişim aralıklarındaki çözeltileri 3 set olarak hazırlanmıştır. 3 farklı günde 6'şer kez (gün içi) olacak şekilde enjeksiyonları yapılmıştır. Kesinlik,

$$\%BSS [(Standart\ sapma / ortalama) \times 100] \text{ ile gösterilmiştir.}$$

4.4.4. Doğruluk

Doğruluk geri kazım çalışmaları ile belirlenir. Yöntemin doğruluğunu belirlemek için 3 farklı derişimde çözelti hazırlanmıştır. Rutin için 1,95; 97,5; 1950 ppb ve luteolin-7-glikozit için 1,2; 60; 1200 ppb derişim aralığında hazırlanan çözeltiler 3'er kez olacak şekilde analiz edilmiştir.

% Geri Kazanım = (gözlemlenen değer/teorik değer) x % 100 eşitliği ile hesaplanmaktadır.



5. BULGU VE TARTIŞMALAR

5.1. Yöntem Optimizasyonu

Rutin ve lut-7G'in eş zamanlı tayini için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır ve en uygun koşullar belirlenmiştir. Bunun için farklı sıcaklık, enjeksiyon hacmi, akış hızı ve hareketli fazlar araştırılmıştır.

Optimizasyon çalışmaları sırasında yapılan literatür çalışmaları baz alınarak Zorbax Eclipse Plus C18 (3 x 100mm, 3,5µm partikül boyutu) kolonu kullanılmıştır. Hareketli faz olarak ammonium format:su içeren çözelti denenmiştir. En uygun A hareketli faz olarak % 0,5 formik asit içeren saf su, B hareketli faz olaraksa % 0,5 formik asit içeren su:asetonitril çözelti karışımı kullanılmıştır. Hareketli faz akış hızı 0,330 mL · dk⁻¹ olacak şekilde uygulanmıştır.

Çizelge 5.1. *Optimum çalışma koşulları*

Kolon	Zorbax Eclipse Plus C18 (3 x 100mm, 3,5µm)
Akış Hızı	0,330 mL · dk ⁻¹
Enjeksiyon süresi	12 dk
Enjeksiyon hacmi	2,5 µl
Kolon sıcaklığı	30°C
Mobil Faz A	su:formik asit (% 0,5)
Mobil Faz B	su:asetonitril (formik asit) (50:50:0,5)

Çizelge 5.2. *Fenolik bileşiklerin tayini için uygulanan gradient sistemi*

Zaman (dk)	A Hareketli Fazı	B Hareketli Fazı
0,00	90,00	10,00
3,00	80,00	20,00
4,50	75,00	25,00
6,00	70,00	30,00
7,50	70,00	30,00
9,00	10,00	90,00
9,30	10,00	90,00
9,60	90,00	10,00
12,00	99,00	1,00

Kütle spektrometresi koşulları: Sinyaller 10-1000 m/z aralığında taranmıştır. ESI'da püskürtücü gaz azot 45 psi basıncında uygulanmıştır. Analizler negatif iyon modunda yapılmıştır.

Source parameters

Gas Temp: 300 °C

Gas Flow: 5 l/min

Nebulizer: 45 psi

Sheath Gas Temp: 250 °C

Sheath Gas Flow: 11 l/min

Capillary: 3500 V (Positive), 3500 V (Negative), 3318 nA

Nozzle Voltage: 500 V

Chamber Current: 0.52 µA

Şekil.5.1. KS/KS cihazında source parametreleri

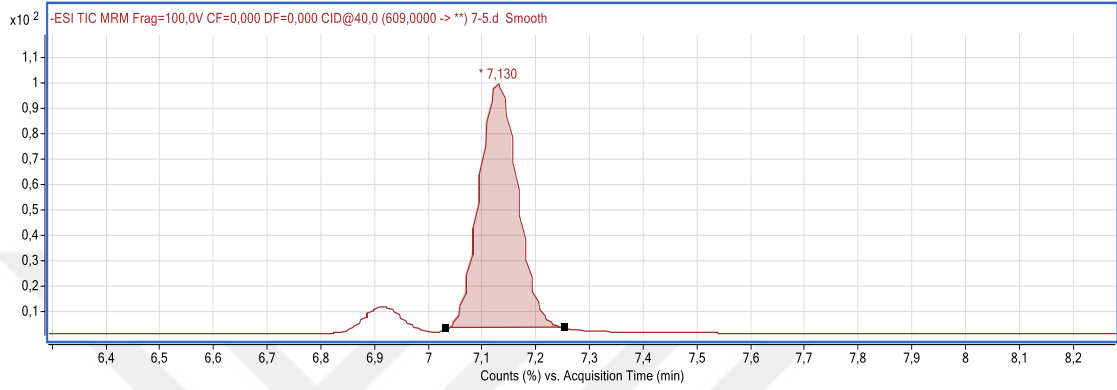
Acquisition	Source	Chromatogram	Instrument								
Scan segments											
Compound Group	Compound Name /	ISTD?	Precursor Ion	MS1 Res	Product Ion	MS2 Res	Dwell	Fragmentor	Collision Energy	Cell Accelerator Voltage	Polarity
	Lut-7-Glu	☐	447	Wide	285	Wide	30	100	40	7	Negative
▶	Rutin	☐	609	Wide	301	Wide	30	100	40	7	Negative

Şekil.5.2. KS/KS cihazında acquisition optimizasyon değerleri

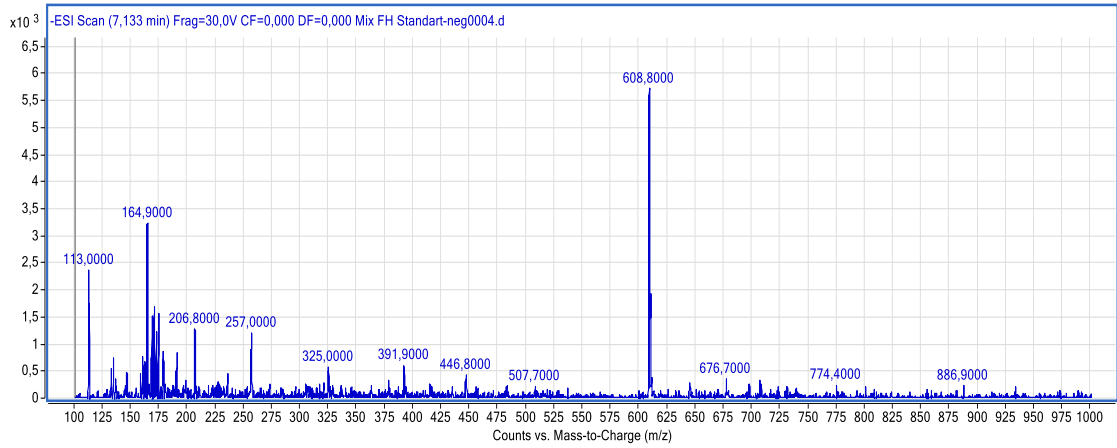
Bu çalışmada 609 m/z ana kütleyle sahip rutin için MRM sonucu oluşan 301 m/z parçalanma ürününün pik alanı kullanılmıştır. 447 m/z ana kütleyle sahip luteolin-7-glikozit için ise 285 m/z parçalanma ürününün pik alanı kullanılmıştır.

609 m/z → 301 m/z

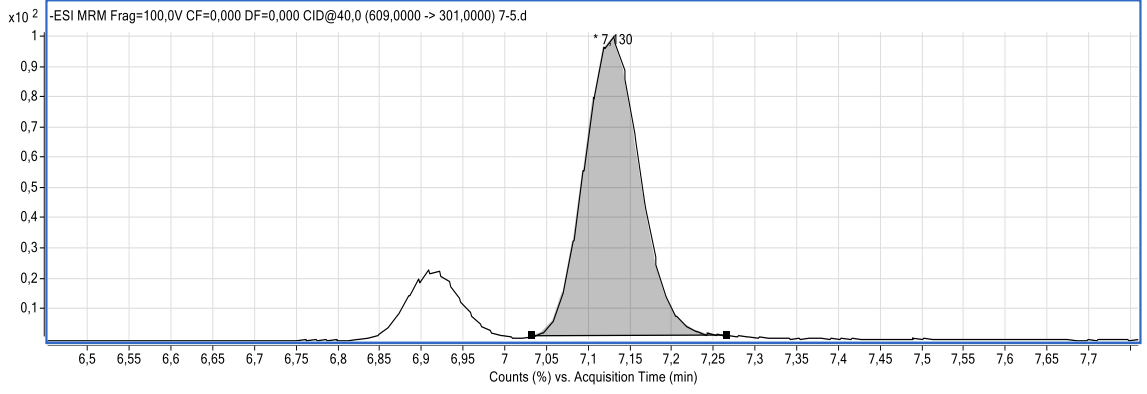
447 m/z → 285 m/z



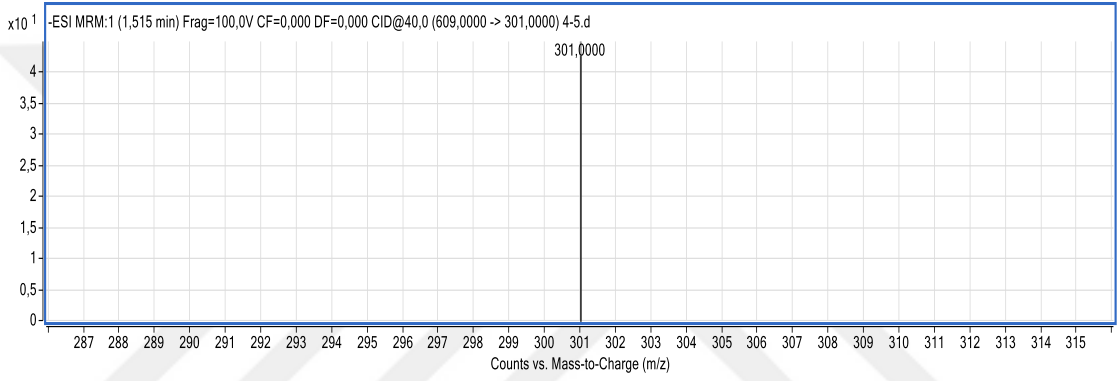
Şekil.5.3. Rutin'in 609 m/z ana ürün kromatogramı



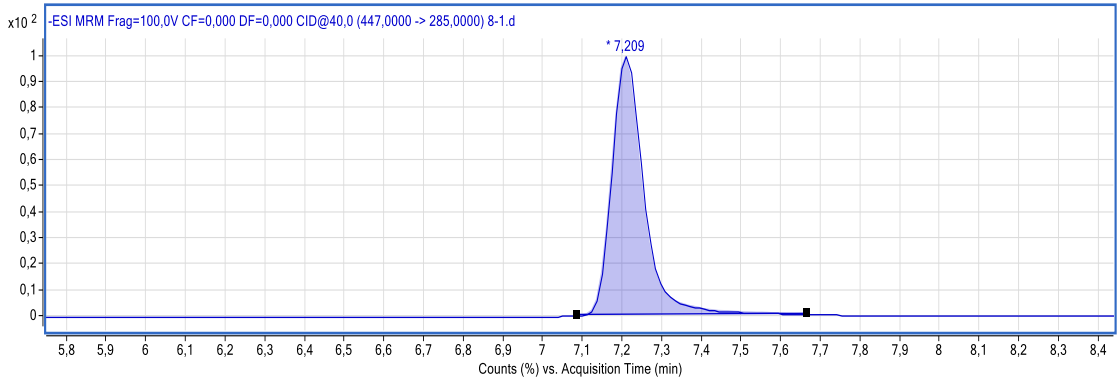
Şekil.5.4. Rutin'in 609 m/z ana ürün spekturumu



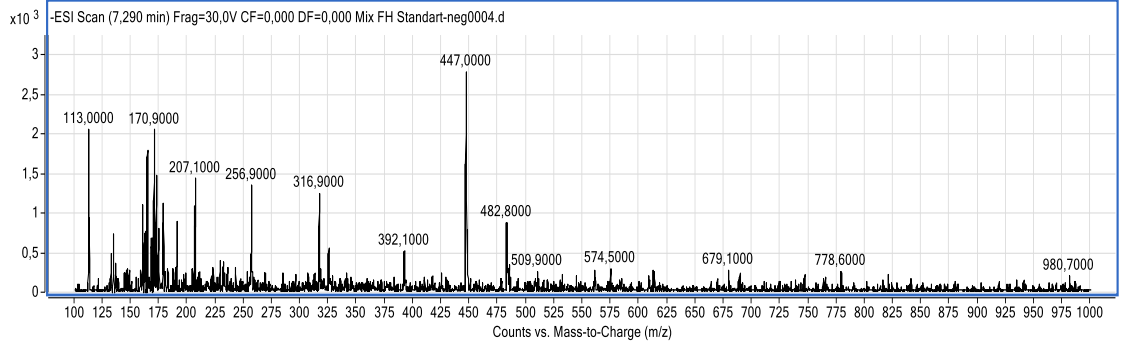
Şekil.5.5. Rutinin 301 m/z parçalanma ürün kromatogramı



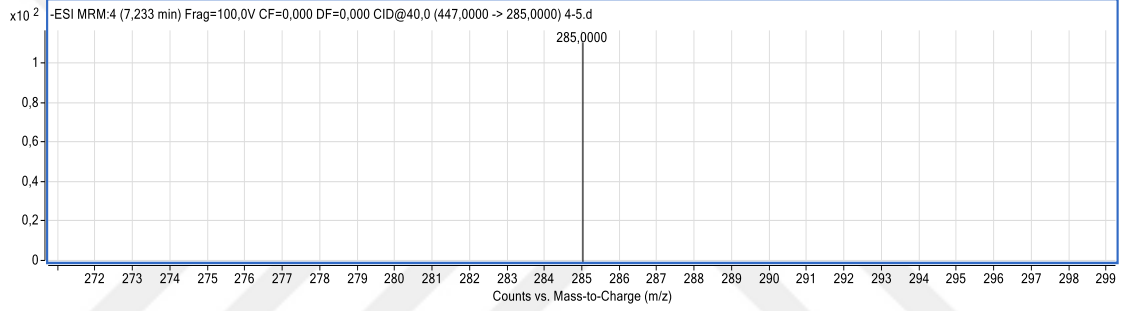
Şekil.5.6. Rutin'in Kütle Spektrumu 301 m/z parçalanma ürünü



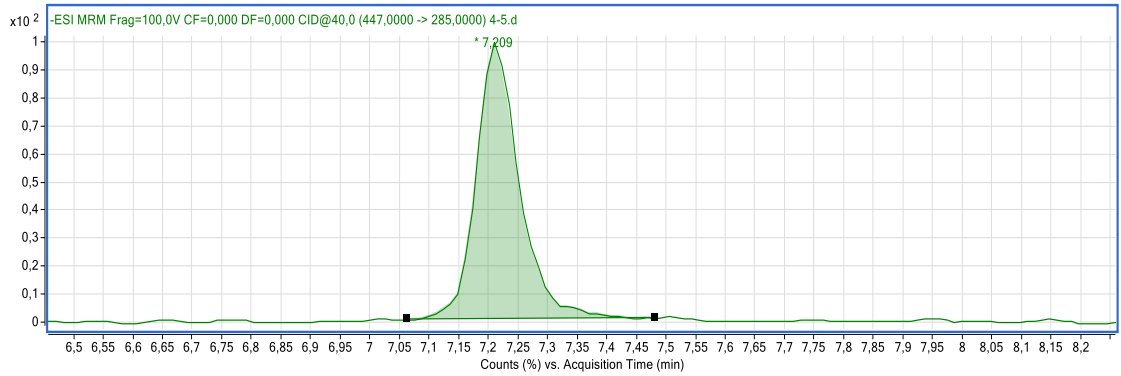
Şekil.5.7. Luteolin-7G'in 447 m/z ana ürün kromatogramı



Şekil.5.8. Luteolin - 7G'in 447 m/z ana ürün spekturumu



Şekil.5.9. Luteolin-7G'in Kütle Spekturumu 285 m/z parçalanma ürünü



Şekil.5.10. Luteolin-7G'in 285 m/z parçalanma ürün kromatogramı

5.2. Yöntem Validasyonu

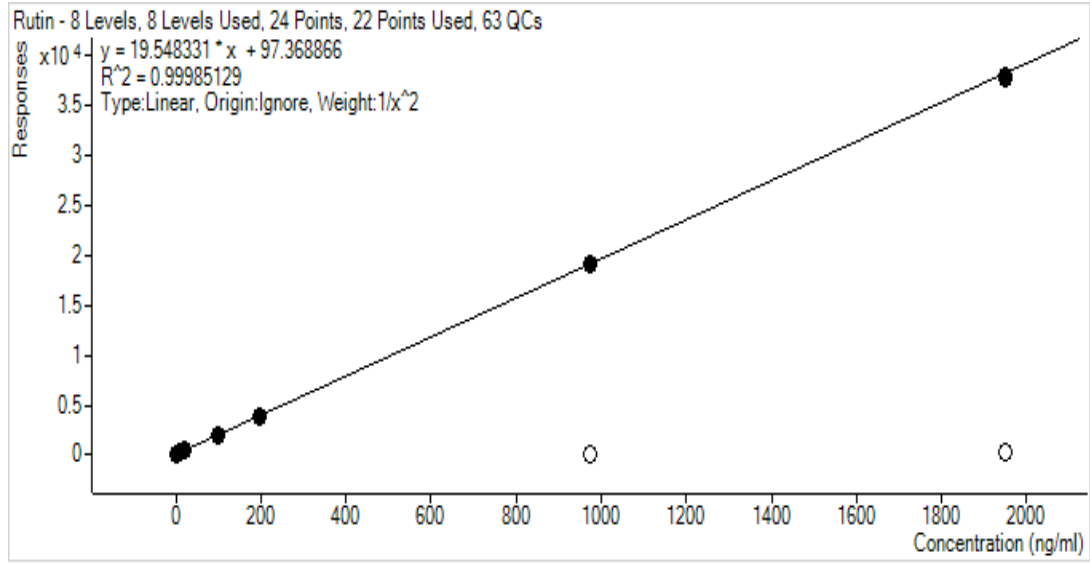
Yöntem validasyonu Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Methods rehberi doğrultusunda yapıldı. Hesaplamalar için Microsoft Excel programı kullanılmıştır. Yöntem Uluslararası Uyum Konferansı (ICH) yönergelerine göre doğrusallık, kesinlik, doğruluk parametrelerine göre valide edilmiştir.

5.2.1. Doğrusallık

Doğrusallık değerinin belirlenmesi için rutin için 0,975-1,95-9,75-19,5-97,5-195-975-1950 ppb konsantrasyonlarda, luteolin-7-glikozit içinse 0,6-1,2-6-12-60-120-600-1200 ppb konsantrasyonlarda çözeltiler gerekli seyreltmeler yapılarak hazırlanmış ve analiz edilmiştir. Doğrusallık aralığı Rutin için 0,975-1950 ppb, Lut-7G için 0,6-1200 ppb olarak belirlenmiştir. Hesaplamalar ağırlıklı ($1/x^2$) kullanılarak yapılmıştır. Doğrusal regresyon analizinden sonra bulunan sonuçlar Çizelge 5.3 ve Çizelge 5.4’de verilmiştir.

Çizelge 5.3. Rutin için doğrusallık sonuçları

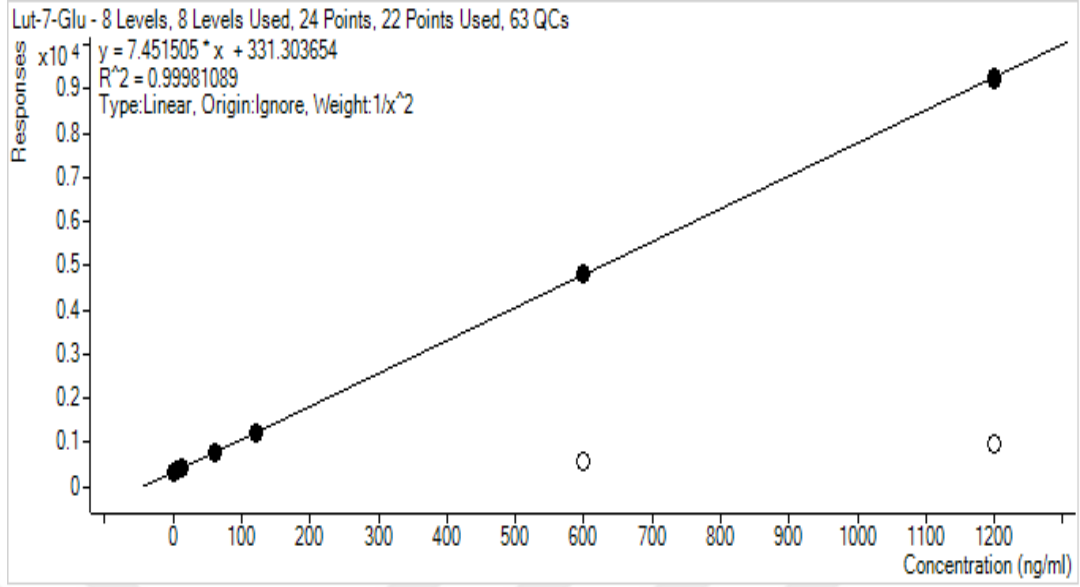
Parametreler	Günler içi (n=8)			Günler arası (n=24)
	1.Gün	2.Gün	3.Gün	
Eğim±SS	19,443±39,6032	19,53114±17,21367	19,69236±19,56377	19,5483±56,4474
Kesim±SS	97,3705±14,96859	97,39896±6,506157	97,30916±7,39441	97,3689±12,0346
R ²	0,9999	0,9999	0,9997	0,9998
LOQ (ppb)				2,12
LOD (ppb)				0,64
Güven Aralığı	5,35-4,66	5,14-4,84	5,11-4,77	5,26-4,71



Şekil 5.6. Rutin analizi kalibrasyon grafiği

Çizelge 5.4. Lut-7G için ağırlıklı doğrusallık sonuçları

Parametreler	Günler içi (n=8)			Günler arası (n=24)
	1.Gün	2.Gün	3.Gün	
Eğim±SS	7,4355±18,6865	7,5017±6,0633	7,4207±1,5405	7,4515±16,0371
Kesim±SS	331,2460±6,6067	331,3378±2,2917	331,3245±0,5822	331,3037±3,4191
R ²	0,9999	0,9999	0,9997	0,9998
LOQ (ppb)				0,44
LOD (ppb)				0,13
Güven Aralığı	44,95-44,15	44,31-44,03	44,68-44,61	44,67-44,26



Şekil 5.7. Lut-7G analizi kalibrasyon grafiği

5.2.2. Duyarlılık

İlk olarak standart sapma ve kalibrasyon eşitliği eğim değerine göre tayin sınırı ve saptama sınırı hesaplanmıştır. Elde edilen LOQ ve LOD değerleri sırasıyla rutin için 28,8 ve 9,5, lut-7G içinse 21,5 ve 7,1 olmuştur. Lakin değerler validasyonu yapılan çalışma aralığına göre yüksek olmuştur. Bu sebeple sinyal/gürültü oranı baz alınarak yeniden LOQ ve LOD tespit edilmiştir. Tayin sınırı ve saptama sınırı rutin için 2,12 ppb ve 0,64 ppb olarak hesaplanmıştır (Çizelge 5.3). Lut-7G içinse 0,44 ppb ve 0,13 ppb olarak bulunmuştur (Çizelge 5.4)

5.2.3. Kesinlik

Rutin için 0,975 ppb, 19,5 ppb, 975 ppb ve luteolin-7-glikozit içinse 0,6 ppb, 12 ppb, 600 ppb konsantrasyonlarda 3 set olarak çözeltiler hazırlanmıştır. Yöntem kesinliğini belirlemek amacıyla 3 farklı günde 6'şer kez (gün içi) olacak şekilde analizler yapılmıştır. Analiz sonuçlarının kesinlik çalışması için % BSS değeri hesaplanmıştır. Kesinlik ile ilgili sonuçlar Çizelge 5.5'de verilmiştir. Çizelge incelendiğinde fenolik bileşikler için % 2'den daha düşük BSS değeri elde edilmiştir.

Çizelge 5.5. Rutin için kesinlik sonuçları

Rutin Derişimi (ppb)	Parametreler	Günler içi (n=6)			Günler arası (n=18)
		1.Gün	2.Gün	3.Gün	
0,975	$\bar{X}$	0,9535	0,9535	0,9649	0,9607
	SS	0,0052	0,0052	0,0068	0,0079
	% BSS	0,5420	0,5420	0,7090	0,8272
19,5	$\bar{X}$	19,3340	19,2794	19,3422	19,3186
	SS	0,1369	0,1809	0,1123	0,1402
	% BSS	0,7079	0,9383	0,5804	0,7259
975	$\bar{X}$	968,0604	965,3803	965,6211	966,3539
	SS	6,1745	3,8855	5,9148	4,6447
	% BSS	0,6378	0,4025	0,6125	0,4806

Çizelge 5.6. Luteolin-7-glukozit için kesinlik sonuçları

Lut-7-glu Derişimi (ppb)	Parametreler	Günler içi (n=6)			Günler arası (n=18)
		1.Gün	2.Gün	3.Gün	
0,6	$\bar{X}$	0,6310	0,6007	0,6146	0,6154
	SS	0,0063	0,0082	0,0079	0,0146
	% BSS	0,9908	1,3690	1,2885	2,3710
12	$\bar{X}$	11,9865	11,8869	11,8558	11,9097
	SS	0,0928	0,0727	0,0391	0,0885
	% BSS	0,7743	0,6120	0,3294	0,7431
600	$\bar{X}$	599,6027	593,5186	596,3883	596,5032
	SS	6,3260	3,5091	3,3069	4,8982
	% BSS	1,0550	0,5912	0,5545	0,8211

5.2.4. Doğruluk

Yöntemin doğruluğu için 1,2 ppb, 60 ppb ve 1200 ppb derişiminde fenolik birleşen çözeltileri 3 set olarak hazırlanmıştır. Daha sonra 3'er kez olacak şekilde analizi yapılmıştır. Analiz sonuçlarının geri kazanım değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 5.6).

Çizelge 5.7. Rutin için doğruluk değerleri

Rutin Derişimi (ppb)	Günler içi (n=6)			Günler arası (n=18)
	1.Gün	2.Gün	3.Gün	
1,95	99,9	98,2	99,0	99,0
9,75	99,4	99,7	99,2	99,4
1950	99,6	99,4	98,9	99,3

Çizelge 5.7 incelendiğinde rutin için % 98,2-99,4 aralığında geri kazanım değerleri belirlenmiştir.

Çizelge 5.8. Lut-7G için doğruluk değerleri

Lut-7G Derişimi (ppb)	Günler içi (n=6)			Günler arası (n=18)
	1.Gün	2.Gün	3.Gün	
1,2	99,8	99,3	99,6	99,6
60	100,4	100,0	99,4	99,9
1200	99,6	98,6	99,1	98,9

Luteolin-7-glikozit için % 98,6-100,4 aralığında geri kazanım değerleri bulunmuştur.

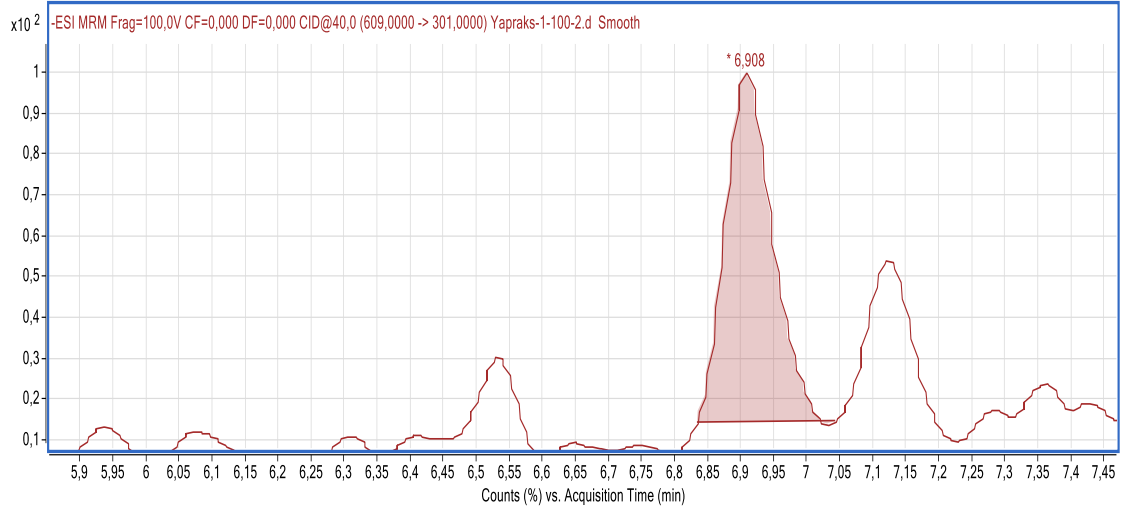
5.3. SK-KS/KS Yönteminin Bitki Ekstrelerine Uygulanması

Geliştirilen ve valide edilen SK-KS/KS yöntemi *Campanula propinqua* bitkisinin yaprak ve çiçek ekstralarında rutin ve lut-7G'in eş zamanlı tayini için uygulanmıştır. Rutin ve lut-7G içerdiği düşünülen *Campanula propinqua* bitkisinin yaprak ve çiçek ekstresi kullanılarak metanol ile 10 mg/mL'lik bir ekstre çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra mobil faz ile gerekli seyreltmeler yapılarak analiz çözeltileri hazırlanmıştır. Şekil 5.8 ve 5.9'da analiz edilen çözeltilerin SK-KS/KS kromatogramları gösterilmiştir. Hesaplanan pik alan değerleri baz alınarak rutin ve lut-7G'in miktarları tespit edilmiştir. Çizelge 5.9'da analiz edilen ekstratlarda rutin ve lut-7-glu miktarları ile ilgili sonuçlar verilmiştir. Numune çözeltilerinin 3'er kez analizi yapılmıştır. Çizelge 5.9 incelendiğinde rutin 1 gr *Campanula propinqua* bitkisinin yaprak ve çiçek ekstresinde sırasıyla 46,87µg/mg ve 4,07 µg/mg olarak tespit edilmiştir. Luteolin-7-glukozit ise yalnız bitkinin çiçek ekstresinde 4,57 µg/mg olarak belirlenmiştir.

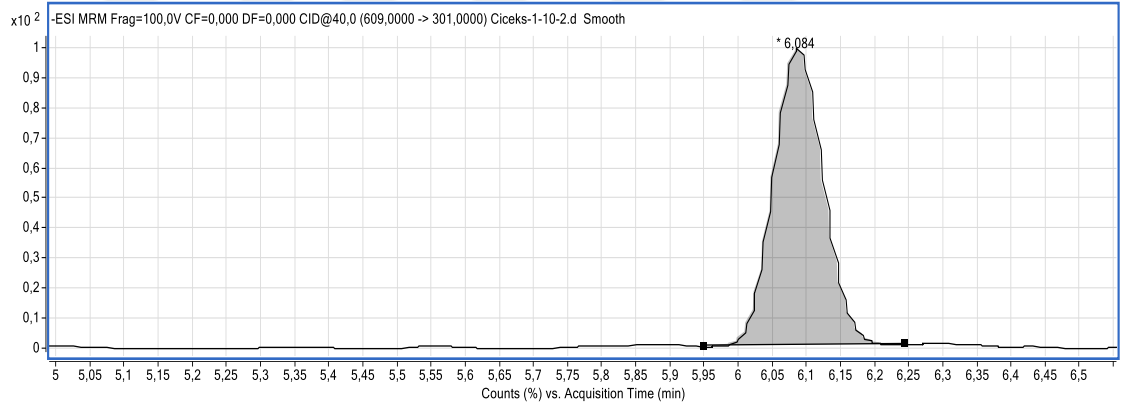
Çizelge 5. 9. *Campanula propinqua* bitkisinde bulunan bileşik miktarları

Yarprak Ekstresi	Bulunan Rutin miktarı ortalama±SS	%BSS
	(µg/mg)	
Rutin	46,87±0,63	2,32
Luteolin-7-glikozit	TE	TE
Çiçek Ekstresi		
Rutin	4,07±0,04	1,84
Luteolin-7-glikozit	4,57±0,15	1,87

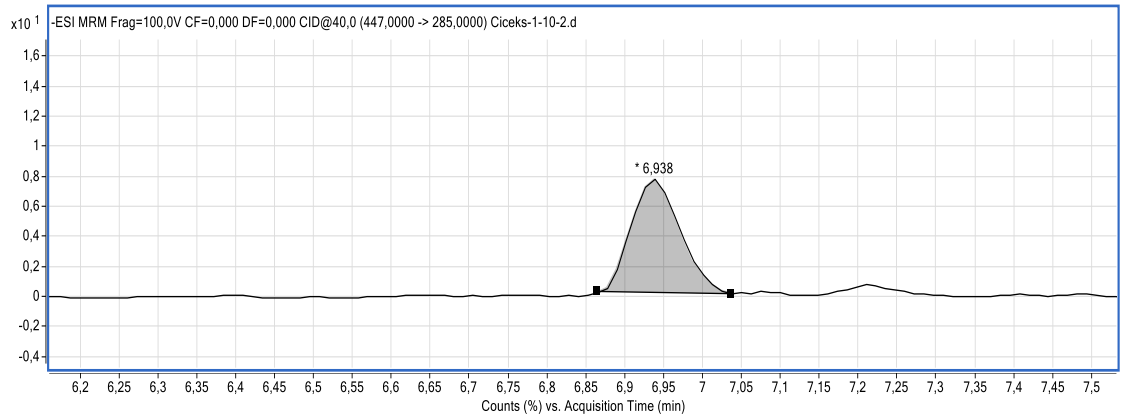
TE: tespit edilmedi



Şekil 5. 8. Yaprak ekstresinde rutin kromatogramı



Şekil 5. 9. Çiçek ekstresinde rutin kromatogramı



Şekil 5. 10. Çiçek ekstresinde luteolin-7-glikozitin kromatogramı

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bitkiler, içerdikleri birçok kimyasal maddeler sebebiyle gıda, ilaç, kozmetik endüstrilerinde kullanılmaktadır. Fenolik maddeler bitkilerde bulunan geniş kullanım alanına sahip ikincil metabolitlerdir. Son yıllarda bitkilerin ve bitki bazlı ürünlerin insan sağlığı üzerinde etkileri araştırılmaktadır. Bu tez çalışmasında antioksidan, antimikrobial, antienflamatuar, kemoterapötik, antidiabetik, kardioprotektif, antialerjik gibi özellikleri bilinen rutin ve luteolin-7-glikozit için eş zamanlı, hızlı, hassas, doğru yeni bir SK-KS/KS yöntemi geliştirilmiştir (Kwon, 2017; Subbarayan, Natesan ve Chen, 2020; Li vd., 2021; Wang vd., 2020). Geliştirilen yöntem ICH'e göre doğrusalık, kesinlik, doğruluk parametreleri açısından valide edilmiştir. Yöntem *Campanula Propinqua* bitkisinin yaprak ve çiçek ekstraktlarında rutin ve lut-7G tayini için başarıyla uygulanmıştır.

Analiz zamanı 3,5 µm iç çapı olan Agilent Zorbax C18 kolonu kullanılmıştır. Analiz sırasında ikili gradient sistemi kullanılmıştır. En iyi sonuçlar A hareketli faz olarak % 0,5 formik asit ve B hareketli faz olarak su:asetonitril (formik asit) (50:50:0,5 h:h:h) kullanılarak elde edilmiştir.

Bu koşullar doğrultusunda rutin ve lut-7G'in tayini gerçekleştirilmiştir. Rutin, *Campanula propinqua* bitkisinin yaprak ve çiçek ekstresinde tespit edilmiştir. Luteolin-7-glikozit ise bitkinin çiçek ekstresinde bulunmuştur.

KAYNAK

- Abbas, M., Saeed, F., Anjum, F.M., Afzaal, M., Tufail, T., Bashir, M.S., Ishtiaq, A., Hussain, S., Suleria, H., (2017). Natural polyphenols: An overview, *International Journal of Food Properties*, 20:8, 1689-1699
- Albuquerque, B., Heleno, S., Oliveira, B., Barros, L., Ferreira I., (2021). Phenolic compounds: current industrial applications, limitations and future challenges, *Food Function*, 12, 14–29
- Alçitepe. E, Tüylü Çançiçeği *Campanula tomentosa* Lam. (Tüylü Çan Çiçeği) ve *Campanula vardariana* Bocquet Tür Eylem Planı (2019 – 2023), T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü Iv. Bölge Müdürlüğü/Aydın Şube Müdürlüğü
- Al-Shwaiyat, M., Miekh, Y, Denisenko, T, Vishnikin, A., Andruch, V., Bazel, R., (2018). Simultaneous determination of rutin and ascorbic acid in a sequential injection lab-at-valve system, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 149, 179-184
- Altınöz, E., Altuner, E., (2021). Adaçayı bitkisinin halk arasında kullanımı ve terapötik etkileri, *Doğanın İnsana Sunduğu Tıbbi Bitkiler*. Ankara: IKSAD Publishing House, pp. 3-34.
- Attia, R.A., Fattah, S.Abdel, Nasralla, M.M., (2020). Concomitant administration of sitagliptin and rutin improves the adverse hepatic alterations in streptozotocin-induced diabetes mellitus in albino rats: an overview of the role of alpha smooth muscle actin, *Folia Morphol.*, 80 (4), 870-880
- Ayaz F., (2021). *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi - Turkish Journal of Agricultural Research* 8(1): 100-108
- Balkrishna, A., Joshi, M., Tomer, M., Verma, S., Gurjal, S., Mulay, V., Srivastava, J., Varshney, A., (2022). Identification, Validation and Standardization of Bioactive Molecules. *Chromatographia*, 831-850.
- Barnaba, C., Dellacassa E., Nicolini G., Nardin T., Malacarne M., Larcher R., (2015), Identification and quantification of 56 targeted phenols in wines, spirits, and vinegars by online solid-phase extraction – ultrahigh-performance liquid

- chromatography – quadrupole-orbitrap mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1423, 124-135
- Bayır A., (2011). Üzüm, dut ve mersinin fenolik bileşik içerikleri ile antiradikal aktiviteleri üzerine araştırmalar, Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi
- Bibalani, H., (2011) Average Stem Biomass of *Campanula propinqua* in Shanjan Rangelands, East Azerbaijan, Iran, *Current Research Journal of Biological Sciences* 3(4): 330-333
- Budzynska ,B., Faggio, C., Kruk-Slomka, M., Samec, D., Nabavi, S.F., Sureda, A., Devi, K.P., Nabavi, M.N., (2019). Rutin as Neuroprotective Agent: From Bench to Bedside, *Current Medicinal Chemistry*, 26, 5152-5164
- Caporali, S., De Stefano, A., Calabrese, C., Giovannelli, A., Pieri, M.; Savini, I., Tesauro, M., Bernardini, S., Minieri, M., Terrinoni, A. (2022). Anti-Inflammatory and Active Biological Properties of the Plant-Derived Bioactive Compounds Luteolin and Luteolin 7-Glucoside. *Nutrients*, 14, 1155
- Ceslova, L., Pravcova, K., Juricova, M., Fischer J., (2022). Rapid HPLC/MS/MS analysis of phenolic content and profile for mead quality assessment, 2022, *Food Control* 134
- Chen, J., Yang, J., Ma, L. et al. Structure-antioxidant activity relationship of methoxy, phenolic hydroxyl, and carboxylic acid groups of phenolic acids. *Sci Rep* 10, 2611 (2020).
- Ertaş, Ö.S, Kayalı, A., (2005). Analitik Yöntem Geçerliliğine Genel Bir Bakış, *Ankara Ecz. Fak. Derg. J. Fac. Pharm, Ankara* 34 (1) 41 – 57.
- Ganeshpurkar A., Saluja A.K., (2017) The Pharmacological Potential of Rutin, *Saudi Pharmaceutical Journal*, 149-164
- Gullón, B., Lú-Chau, T.A., Moreira, M.T, Lema, J.M., Eibes, G., (2017). Rutin: A review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability, *Trends in Food Science & Technology*, 67, 220-235

- Guven, H, Arici, A, Simsek, O. (2019). Flavonoids in Our Foods: A Short Review J Basic Clin Health Sci , 3:96-106.
- Haminiuk, C.W.I., Maciel, G.M., Plata-Oviedo, M.S.V. and Peralta, R.M. (2012), Phenolic compounds in fruits – an overview. International Journal of Food Science & Technology, 47: 2023-2044.
- Hlila, H.B, Mosbah, H., Zanina N., Nejma, A.B, Jannet H.B., Aouni M., Selmi, B., (2016). Characterisation of phenolic antioxidants in *Scabiosa arenaria* flowers by LC–ESI-MS/MS and NMR, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 68 (7), 932–940.
- Hurtado-Fernández, E., Gómez-Romero, M., Carrasco-Pancorbo, A., Fernández-Gutiérrez, A., (2010). Application and potential of capillary electroseparation methods to determine antioxidant phenolic compounds from plant food material, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53 (5), 1130-1160.
- Hürkul, M., Köroğlu, A., (2009). Campanulaceae familyasının etnobotanik kullanımı, kimyasal içeriği ve biyolojik aktivitesi üzerine bir derleme, *Türk Farmakope Dergisi*, 4(3): 70-84
- Isah T, (2019). Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. *Biological Research*, 52, 39
- Jin, H., Tang, G., Li J., Ma, L., Li, Y., Chang,s Y., (2020). Simultaneous determination of phenolic acids, anthraquinones, flavonoids, and triterpenes of cynomorii herba in different harvest times by Lc-Ms/Ms, *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 9 sayfa
- Joseph, S.V., Edirisinghe, I., Burton-Freeman B.M., (2016) Fruit Polyphenols: A Review of Anti-inflammatory Effects in Humans, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56:3, 419-444,
- Kahraman, A., Serteser M., Köken T., (2002). Flavonoidler, *Kocatepe Tıp Dergisi* (2002), 3, 01-08.
- Karabulut, G., Yemiş O., (2019). Fenolik Bileşiklerin Bağlı Formları ve Biyoyararlılığı,2019, *Akademik Gıda* 17(4) ,526-537

- Karalija, E., Dahija, S., Demir, A., Bešta-Gajević, R., Sanja Ćavar Zeljković, & Tarkowski, P. (2022). Exploring new sources of bioactive phenolic compounds from western balkan mountains. *Plants*, 11(7), 1002.
- Kwon, Y., (2017). Luteolin as a potential preventive and therapeutic candidate for Alzheimer's disease, *Experimental Gerontology*, 95 , 39-43
- Li, Y., Lv, H., Xue, C., Dong, N., Bi, C., Shan, A., (2021). Plant Polyphenols: Potential Antidotes for Lead Exposure, *Biological Trace Element Research* 199:3960–3976
- Maiti, P., Nand, M., Joshi, T., Ramakrishnan, M.A, Chandra, S., (2020). Identification of luteolin -7-glucoside and epicatechin gallate from *Vernonia cinerea*, as novel EGFR L858R kinase inhibitors against lung cancer: Docking and simulation-based study, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39:14, 5048-5057
- Ngo, D., Qian, Z., Ryu, B., Park, J., Kim, S., (2010,). In vitro antioxidant activity of a peptide isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) scale gelatin in free radical-mediated oxidative systems, *Journal of Functional Foods*, 107-117
- Olszowy, M., (2019). What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants?, *Plant Phystology and Biochemistry* 144, 135-143.
- Ozdol, T., Altinoglu, Y., Deniz, I. G., & Yildirim, H. (2022). A new variety of *Campanula myrtifolia* (Campanulaceae) from South Anatolia, Turkiye. *Herbarium Turcicum*, 1, 37–43.
- Özkan, S.A, (2011). Sıvı kromatografik yöntemlerin analitik validasyon işlemleri ve ilgili parametreleri, L. Genç, *Kromatografik sistemler içinde* (s.112-114). Eskişehir: Bibam Yayınları
- Palombo, R., Savini, I., Avigliano, L., Madonna, S., Cavani, A., Albanesi, C., . . . Terrinoni, A. (2016). Luteolin-7-glucoside inhibits IL-22/STAT3 pathway, reducing proliferation, acanthosis, and inflammation in keratinocytes and in mouse psoriatic model. *Cell Death and Disease*, 7(8), 11.
- Pan, C., Qin, X., Lu, M., Ma, Q., (2022). Water Soluble Silicon Nanoparticles as a Fluorescent Probe for Highly Sensitive Detection of Rutin, *ACS Omega*, 7, 28588-28596

- Pietta, P.G., (2000). Flavonoids as antioxidants, *Journal of Natural Products*, 2000, Vol. 63, No. 7
- Pietta, P.G., (2000). Flavonoids as Antioxidants, *Journal of natural products*, 63 (7), 1035-1042
- Poyrazoglu Coban, E., & Barisik, E. (2021). Investigation of the antimicrobial activities of solvent extracts of two endemic species from Turkey: *Campanula tomentosa* Lam. and *Verbascum mykales* Bornm.. *İstanbul Journal of Pharmacy*, 51(3), 348-356.
- Puupponen-Pimiä R, Nohynek L, Meier C, Kähkönen M, Heinonen M, Hopia A, Oksman-Caldentey K.M, (2001). Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *J Appl Microbiol*, 90(4):494-507
- Rahman, M.M., Rahaman, M.S., Islam, M.R., Rahman, F., Mithi, F.M., Alqahtani, T., Almikhlaifi, M.A., Alghamdi, S.Q., Alruwaili, A.S., Hossain, M.S., Ahmed M., Das R., Emrah T., (2022). Role of Phenolic Compounds in Human Disease: Current Knowledge and Future Prospects. *Molecules* 27, 233
- Robbins, R.J. (2003) Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 51, 2866-2887.
- Roi, J., (1955). *Traite des Plantes Medicinales Chinoises*, Encyclopedie Biologique, Paris.
- Sa, C., Oliviera, A.R., Machado, C., Azevedo, M., Pereira-Wilson, C., (2015). Effects on liver lipid metabolism of the naturally occurring dietary flavone luteolin-7-glucoside, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 9
- Sarikurkcu C., Tlili N., (2021). *Onosma inexpectata* and *Onosma armenum* as Novel Sources of Phytochemicals with Determination by High-Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry (HPLCMS/MS) with Evaluation of the Antioxidant and Enzyme Inhibitory Capacities, *Analytical Letters*, 55:7, 1068-1079.

- Shrivastava, S., Daharwal, S., (2021). Box–Behnken design avenue for development and validation of high-performance thin-layer chromatography method for estimation of rutin in *Hemidesmus indicus*, *Biomedical Chromatography*, 36, e5236
- Subbarayan, S., Natesan M., Chen, S.M, (2020). Simple synthesis of $\text{CoSn}(\text{OH})_6$ nanocubes for the rapid electrochemical determination of rutin in the presence of quercetin and acetaminophen, *New Journal Chemistry*, 44, 11271-11281
- Shahidi, F., Naczki, M., 1995. *Food Phenolics, Chemistry, Effects, Applications*. Technomic, USA
- Şen, S. (2020). Investigation of protein profiles of *Listeria monocytogenes* in the existence of phenolic acids using mass spectrometry. Unpublished master's thesis, İzmir Institute of Technology
- Şendoğan, T., Çölgeçen H., (2015). Bitki sekonder metabolitlerinin biyoreaktörlerde üretilmesi, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 8 (2): 09-29,
- Tsao, R., (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols, *Nutrients*, 2, 1231-124.
- Tsao, R., and Deng, Z., Separation Procedures for Naturally Occurring Antioxidant Phytochemicals, *J. Chromatogr. B*, 812, 85-99, 2004.
- Wang, Z., Li, S., Ge, S., Lin, S., (2020). Review of distribution, extraction methods, and health benefits of bound phenolics in food plants, *Journal of agricultural and food chemistry* 68 (11), 3330-3343.
- Zhu, Y., Wei, S., Cao, X., Wang, S., Chang, Y., Ouyang, H., He, J., (2022). Multicomponent pharmacokinetic study of *Prunus mume* fructus extract after oral administration in rats using UPLC-MS/MS, *Frontiers in Pharmacology*, 13, 1663-9812.
- http-1: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:140883-1>
(Erişim tarihi: 12.11.2022)
- http-2: www.tubives.com (Turkish Plants Data Service) (Erişim tarihi 12.11.2022)
- http-3: <https://www.plantarium.ru/lang/en/page/image/id/554871.html>
(Erişim tarihi 28.11.2022)