

T.C.
KIRKLARELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

HÜNNAP BİTKİSİNDE KUERSETİNİN HPLC-DAD İLE TAYİNİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Berna AKKURT

OCAK - 2025

T.C.
KIRKLARELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

HÜNNAP BİTKİSİNDE KUERSETİNİN HPLC-DAD İLE TAYİNİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Berna AKKURT

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Cemile ÖZCAN

Eş Danışman: Doç. Dr. Ulviye ÇEBİ

Ocak – 2025

“HÜNNAP BİTKİSİNDE KUERSETİNİN HPLC-DAD İLE TAYİNİ” adlı tez çalışması adlı tez çalışması **Berna AKKURT** tarafından hazırlanmış olup aşağıdaki jüri tarafından **OY BİRLİĞİ** ile Kırklareli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Cemile ÖZCAN
Kırklareli Üniversitesi

.....

Eş Danışmanı:

Doç. Dr. Ulviye ÇEBİ
Atatürk Toprak Araştırma Enstitüsü

.....

Jüri Üyeleri:

Prof. Dr. Meryem ÇAMUR DEMİR
Kırklareli Üniversitesi

.....

Prof.Dr. Yasemin BAKIRCIOĞLU KURTULUŞ
Trakya Üniversitesi

.....

Tez Savunma Tarihi: 09/01/2025

.....
Doç.Dr. H.Hale KARAYER
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Kırkırelı Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez ve Proje Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında; tez içinde sunduğum bilgileri, verileri ve dokümanları, değişik sonuç verebilecek şekilde araştırma araç gereçleri kullanmadan, işlem veya kayıt sonuçlarını değiştirmeden akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Berna AKKURT
09/01/2025

ÖZET

HÜNNAP BİTKİSİNDE KUERSETİNİN HPLC-DAD İLE TAYİNİ

Berna AKKURT

Yüksek Lisans Tezi

Kırklareli Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Danışman: Prof. Dr. Cemile ÖZCAN

Eş Danışman: Doç. Dr. Ulviye ÇEBİ

Ocak 2025, 46 sayfa

Bu çalışmada, Kırklareli ilinde yetişen hünnap bitkisinde kuersetin, yüksek hassasiyetli HPLC-DAD kullanılarak çöktürme yapılmadan doğrudan tayin edilmiştir. Yöntem geliştirme aşamasında, HPLC-DAD enjeksiyon hacmi, dalga boyu, akış hızı ve kolon sıcaklığı gibi parametreleri optimize etmek için kullanılmıştır. İdeal dalga boyu olan 255 nm ile kuersetinin 0,1-25 ppm doğrusal aralıkta doğrusallığa sahip olduğu gösterilmiş ve LOD LOQ değerleri sırasıyla 0,02 ppm-0,07 ppm olarak bulunmuştur. Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik için yüzde bağıl standart sapma sırasıyla %0,1 kadar düşük ve %4,8 kadar yüksekti. Oluşturulan teknik, uygun teknik kullanılarak ekstrakte edilen hünnap örnekleri üzerinde başarıyla kullanılmıştır. Ayrıca, yöntemin doğruluğu için hünnap örneklerine standart kuersetin çözeltisi eklenmiş ve >%95 oranında geri kazanım elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Hünnap, Kuersetin, HPCL-DAD

ABSTRACT

DETERMINATION OF QUERCETIN IN *JUJUBE* PLANTS BY HPLC-DAD

Berna AKKURT

MSc Thesis

Kirklareli University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Supervisor: Prof. Dr. Cemile ÖZCAN

Co-supervisor: Assoc. Doç. Dr. Ulviye ÇEBİ

January 2025, 46 pages

In this study, quercetin was directly determined in jujube plants growing in the province of Kirklareli using high sensitivity HPLC-DAD without precipitation. During the method development phase, HPLC-DAD was used to optimize parameters such injection volume, wavelength, flow rate, and column temperature. With an ideal wavelength of 255 nm, quercetin was shown to have linearity within the linear range of 0.1–25 ppm, and the LOD LOQ values were found to be 0.02 ppm–0.07 ppm, respectively. The percentage relative standard deviation for intra-day and inter-day repeatability was as low as 0.1% and as high as 4.8%, respectively. The created technique was successfully used on jujube samples that were extracted using the proper technique. In addition, standard quercetin solution was added to the jujube samples for the accuracy of the method and >95% recovery was achieved.

Keywords: *Jujube*, Quercetin, HPLC-DAD

TEŞEKKÜR

Tez danışmanım değerli Sayın Prof. Dr. Cemile Özcan'a, sürecin başından sonuna kadar gösterdiği üstün bilimsel liderlik, değerli öneriler ve sabırlı rehberliği için derin şükranlarımı sunarım. Kendisi, araştırmamın şekillenmesinde ve bilimsel bakış açımın gelişmesinde büyük rol oynamıştır.

Tezimi hazırladığım süre boyunca bana bilimsel destek sağlayan kimya bölümünün değerli öğretim üyelerine, yardımlarından ötürü Doç. Dr. Ulviye ÇEBİ'ye minnettarım. Ayrıca, aileme, eşim Nihat AKKURT'a ve oğlum Muhammed Yusuf AKKURT'a, bu uzun ve zorlu süreçte gösterdikleri sabır, anlayış ve sürekli destek için içtenlikle teşekkür ederim. Onların moral ve motivasyonu, bu çalışmanın tamamlanmasında en büyük güç kaynağım olmuştur.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Hünnap	3
2.2 Flavonoidler.....	5
2.2.1. Flavonoller.....	5
2.3. HPLC	7
2.3.1. HPLC Dedektörler.....	8
2.4. Literatür Taraması	10
3. MATERYAL VE DENEYSEL YÖNTEM.....	13
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	15
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	25
KAYNAKLAR.....	29
ÖZGEÇMİŞ.....	35

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge 2. 1 Kuersetinin fiziksel özellikleri	7
Çizelge 4. 1 HPLC-DAD ile kuersetin elde edilen validasyon koşulları	22
Çizelge 4. 2 Hünnap örneklerine yapılan standart ekleme sonuçları (n=6).....	22
Çizelge 4. 3 Kuersetin için yapılan literatür karşılaştırması.....	23



ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil 2.1. Flavonoid sınıfına ait bileşikler	5
Şekil 2.2. Kuersetin bileşiğinin yapısı	6
Şekil 4. 1 Kuersetin için HPLC-DAD ile dalga boyu taraması kromatogramı	16
Şekil 4. 2 HPLC-DAD ile kuersetin optimizasyonunda akış hızı taraması kromatogramı	17
Şekil 4. 3 HPLC-DAD’da sırasıyla 0,6; 0,7; 0,8 mL/dk akış hızında kuersetin için alınan kromatogram.....	18
Şekil 4. 4 HPLC-DAD ile kuersetin tayini için optimum kolon sıcaklığının bulunması	19
Şekil 4. 5 HPLC-DAD ile kuersetin tayini için optimum enjeksiyon hacmi taraması...	20
Şekil 4. 6 Kuersetinin 0,1-50 mg/L standart çözeltilerin HPLC-DAD kromatogramı...	20
Şekil 4. 7 Kuersetinin a) 0,1; 0,25; 0,5; 1 ppm ve b) 0,5; 1; 2,5; 5 ppm standart çözeltilerin farklı kromatogram gösterimi	21
Şekil 4. 8 Kuersetin için elde edilen kalibrasyon grafiği.....	21

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
°C	Celsius Derecesi
Kısaltmalar	Açıklamalar
ACN	Asetonitril
DAD	Diyot Dizi Dedektörü
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
GC	Gaz Kromatografisi
LOD	Gözlenebilme Sınırı
LOQ	Belirleyebildiğimiz Minimum Madde Miktarı Değeri
MS	Kütle Spektrometresi
Uv-Vis	Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopisi
ppm	mg/kg, mg/L, ug/mL, ug/g
PTFE	Politetrafloroetilen

1. GİRİŞ

Flavonoidler, polifenol alt grubunda yer alan fenolik bileşiklerdir. Bugüne kadar 8000'den fazla bilinen fenolik bileşik bulunmaktadır. Sağlık açısından önemli faydaları olan flavonoidlerin antialerjenik, antiviral, antiinflamatuvar ve damar genişletici özellikleri olduğu bilinmektedir [1-2]. Geleneksel tıpta, özellikle Covid-19 salgın sürecinin ardından doğala dönüş yani bitkilere yönelim artmıştır. Çalışmalarda, bazı bitkilerin antioksidan, antimikrobiyal, antialerjenik, antiviral ve antiinflamatuvar gibi birçok farklı işlevi olduğunu bildirmektedir [3-4].

Bu çalışmada tayini yapılan kuersetin flavonoidi, serbest radikalleri nötralize etmeye ve çeşitli kronik hastalıklarla bağlantılı olan antioksidan özellikler sergilediği, alerji, astım ve kardiyovasküler hastalıklar gibi durumları potansiyel olarak hafiflettiği ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır [5-6]. Çalışmada hünnap bitkisindeki kuersetin tayini yapılması amaçlanmaktadır. Hünnapın geleneksel tıpta uzun bir geçmişe sahip olduğu ve sağlık açısından da faydalar sunduğu bildirilmektedir [7-10].

Doğal ürünlerdeki flavonoidlerin karakterizasyonu ve tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), nükleer manyetik rezonans spektrofotometresi (NMR), infrared (IR), ultraviyole-görünür bölge (UV-Vis), gaz kromatografisi (GC), yüksek performanslı sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (HPLC-MS), gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) gibi çok sayıda modern teknikler kullanılmaktadır [11]. UV/görünür dedektörler HPLC analizinde en çok kullanılan dedektörler arasındadır ve genellikle diyot array dedektörü (DAD) şeklindedir. DAD, bir dalga boyu aralığındaki piklerin spektrumlarının eşzamanlı olarak alınmasını sağlar. Bu özellik, en uygun dalga boyunun seçilmesini sağlayarak hassasiyetin artmasına neden olur [12-13]. Doğal örnekler milyonlarca bileşik içerebildiğinden kromatografik yöntemler kullanılarak bunların birbirinden ayrılması daha büyük öneme sahiptir. Çalışmamızda hünnap meyvesindeki kuersetin analizi için yüksek hassasiyet ve doğruluğu nedeniyle tercih edilen bir yöntem olan yüksek performanslı sıvı kromatografisi- diyot dizi dedektörü (HPLC-DAD) kullanılmıştır.

Çalışmamızda, Kırklareli ilinde yetiştirilen hünnap bitkisindeki antioksidan, anti-mikrobiyal, radikal giderme, ülser giderici (anti-ülser), antiinflamatuvar, antikanser, vs. özellik taşıyan polifenollerden flavonoid alt grubundan bir flavonol olan kuersetin bileşiği HPLC-UV-DAD cihazı ile metot validasyonu, doğrulaması ve gerçek örnekteki miktarının belirlenmesi amaçlandı.



2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Hünnap

Hünnap (*Ziziphus jujuba* L.), *Rhamnaceae* familyasına ait, doğrudan tropikal ve subtropikal iklimlerde yetişen, oldukça dayanıklı ve uzun ömürlü bir bitkidir. Asya'nın çeşitli bölgelerinde yetişen, özellikle Çin, Kore, Japonya ve Hindistan'da yaygın olarak bulunan hünnap bitkisi, genellikle 4-6 metreye kadar uzayabilen bir ağaçtır. Meyveleri olgunlaştığında genellikle kırmızımsı kahverengi renginde ve yuvarlak ya da oval bir şekle sahiptir [14]. Hünnap meyvesi, binlerce yıldır geleneksel Çin tıbbında besin ve ilaç olarak kullanılmaktadır [15]. Bunun yanı sıra, bu bitkinin toprak erozyonunu azaltma ve çevresel iyileşme sağlama gibi ekolojik yararları da bulunmaktadır [16].

Hünnap meyvesi, yüksek besin değeri ve sağlığa olan yararları ile dikkat çekmektedir. İçeriğinde bol miktarda C vitamini bulunur ve bu sayede bağışıklık sistemini desteklemektedir. Ayrıca B vitaminleri, potasyum, kalsiyum, fosfor, magnezyum ve demir gibi mineraller de meyvede yer alır. Antioksidan özelliklere sahip olan flavonoidler ve saponinler de hünnapta bulunmaktadır [17]. Bu bileşikler, vücuttaki serbest radikallerle savaşarak hücrelerin yaşlanmasını yavaşlatmaya ve bağışıklık sistemini güçlendirmeye yardımcı olmaktadır. Ayrıca, hünnapta bulunan polifenoller ve triterpenoid bileşiklerin kardiyovasküler sağlık üzerinde olumlu etkiler yaratabileceği araştırmacılar tarafından öne sürülmektedir [18-19].

Hünnap, Çin tıbbında ve geleneksel tıpta genellikle stresle başa çıkmak, uyku bozukluklarını iyileştirmek ve sindirim sorunlarını hafifletmek amacıyla kullanılır [14]. Hünnap özlerinin, özellikle kanser hücrelerinin büyümesini engelleme potansiyeline sahip olduğu ve çeşitli kanser türlerine karşı koruyucu bir etki sağladığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, yapılan bazı klinik çalışmalarda hünnap özlerinin anti-inflamatuar, antikanser ve antioksidan etkileri olduğu gösterilmiştir [20-21].

Hünnap, sadece meyvesiyle değil, aynı zamanda çeşitli sağlık yararlarıyla da modern tıpta dikkat çekmektedir. Hünnap özleri, bağışıklık sistemini güçlendirmek, kardiyovasküler

hastalık risklerini azaltmak ve sindirim sistemini desteklemek gibi faydaları bulunmaktadır. Ayrıca, son yıllarda yapılan araştırmalar, hünnap özlerinin bilişsel işlevleri iyileştirdiği ve nörolojik hastalıklar üzerinde potansiyel terapötik etkiler sağladığına dair bulgular da sunmaktadır [22-23].

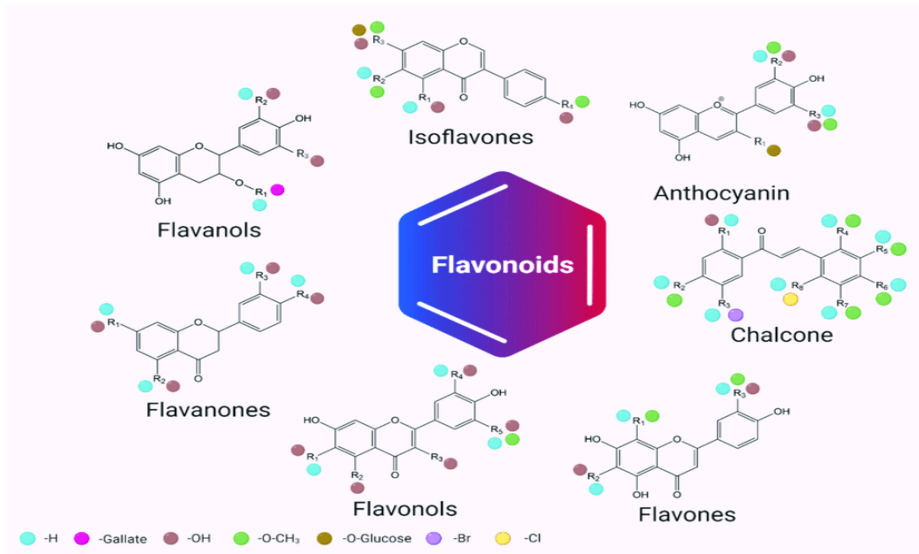
Hünnap bitkisinin özellikleri irdelendiğinde;

- *Antioksidan özellikleri:* Yüksek seviyedeki C vitamini ve flavonoidler, hünnapı hücreleri oksidatif stres ve iltihaptan korumaya yardımcı olan güçlü bir antioksidan yapar. Çalışmalar, bu bileşiklerin kalp hastalığı ve kanser gibi kronik hastalık riskini azaltabileceğini [14],
- *Bağışıklık desteği:* Hünnaptan elde edilen polisakkaritler, vücudun savunma mekanizmalarını güçlendirmeye yardımcı olan bağışıklık sistemini güçlendirici [24],
- *Sindirime yardımcı:* Geleneksel olarak hünnap, özellikle kabızlığın tedavisinde ve lif içeriği nedeniyle bağırsak hareketliliğinin iyileştirilmesinde sindirim sağlığını desteklediği [25],
- *Uyku yardımı ve sakinleştirici etkiler:* Hünnap genellikle geleneksel Çin tıbbında uykusuzluk ve anksiyeteyi tedavi etmek için kullanılır. Saponinler de dahil olmak üzere bazı bileşiklerin sakinleştirici etkileri olduğu [26],
- *Kan dolaşımı ve kardiyovasküler sağlık:* Hünnaptaki potasyum içeriği kan basıncını düzenlemeye yardımcı olabilirken, antioksidan özellikleri kolesterolü düşürmeye ve kalp sağlığını iyileştirmeye [27] yardımcı olur.

2.2 Flavonoidler

Flavonoidler, değişken fenolik yapılaraya sahip bir grup doğal maddeye aittir ve meyve, sebze, tahıl, ağağ kabuğu, kök, sap, iek, çay ve şarapta bulunur [28]. Bu doğal ürünler, flavonoidlerin etkili bileşikler olarak izole edilmesinden çok önce sağlık üzerindeki yararlı etkileri ile bilinmekteydi. Birçoğu iek, meyve ve yaprakların çekici renklerinden sorumlu olan 4000'den fazla flavonoid çeşidi tanımlanmıştır [29]. Temel olarak, flavonoidler düşük molekül ağırlıklarına sahip olup bitkilerin ikincil metabolitleridir. Flavonoidlerin karmaşıklığı, hidroksilasyon seviyesi için temel kategoriye, ayırt edici konjugasyonlara, ikamelere ve ayrıca polimerizasyon seviyesine bağlıdır [30]. Flavonoidlerle yapılan çalışmalarda canlı ve insan üzerinde birçok faydalı etkisi olduğu saptanmıştır [31,32].

Flavonoidler, temel iskeletlerindeki modifikasyonlara göre yedi alt sınıfa ayrılır; bu alt sınıflar flavonoller, flavonlar, flavanonlar, izoflavonlar, kalkonlar, kateşinler ve antosiyaninleri içerir [33]. Çalışmada analizi yapılan kuersetin bileşiği flavonoid alt sınıfından flavonol alt grubu bileşiğidir.

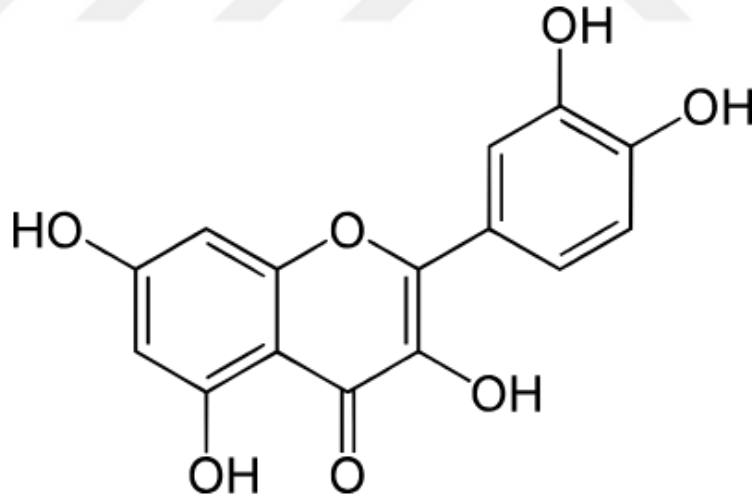


şekil 2.1. Flavonoid sınıfına ait bileşikler

2.2.1. Flavonoller

Flavonoller, flavonoid ailesine ait bileşiklerdir ve bitkilerde bulunan, özellikle antioksidan ve anti-inflamatuar özelliklere sahip bir grup bileşiği ifade eder. Flavonoller,

genellikle $C_{15}H_{10}O_2$ formülüne sahip olup, bir C-ring ve fenolik gruplar içeren bileşiklerdir. Bu bileşikler, hücrelerdeki serbest radikalleri nötralize etme kapasitesine sahip olup, kalp ve damar sağlığı üzerinde olumlu etkilere sahiptirler. Flavonoller arasında en bilinenler myrisetin, kamferol ve kuersetin gibi bileşiklerdir. Bir bitki pigmenti olan kuersetin ($C_{15}H_{10}O_7$), güçlü bir antioksidan olup çoğunlukla soğan, üzüm, çilek, kiraz, brokoli ve turunçgillerde bulunan bir flavonoldür. Çeşitli ilaç toksisitelerinin neden olduğu doku hasarına karşı koruyucu yeteneklere sahip olduğu bilinen çok yönlü bir antioksidandır [34]. Kuersetin, güçlü antioksidan [35], anti-enflamatuar [36], kardiyovasküler [37], antikanser [38] ve gastrik koruma [39] özellikleri nedeniyle son yıllarda büyük ilgi görmüştür. Çeşitli meyve, sebze ve bitkilerde bulunabilir [40,41] ve çeşitli kardiyovasküler hastalıkların [37], nörodejeneratif hastalıkların [42] ve kanserin [38] önlenmesi ve tedavisinde etkili olduğu gösterilmiştir. Kuersetin, metanol (4,0 mg/mL, 37 °C’de orta derecede çözünürlük) ve dimetil sülfoksit (25 °C’de 150 mg/mL, yüksek çözünürlük) gibi organik çözücülerde çözünür. Öte yandan, suda ise düşük çözünürlüğe sahiptir (25 °C’de yaklaşık 0,01 mg/mL) [43,44].



Şekil 2.2. Kuersetin bileşiğinin yapısı

Çizelge 2. 1 Kuersetinin fiziksel özellikleri

Özellik	Değer	Açıklama
Kimyasal formül	$C_{15}H_{10}O_7$	Flavonoid yapısında.
Molar kütle	302,24 g/mol	Molekül ağırlığı.
Fiziksel görünüm	Sarı-yeşil kristal toz	Saf hâliyle kristal yapıda.
Erime noktası	316–317 °C	Kristal yapı için erime noktası.
Çözünürlük (suda)	Düşük	Organik çözücülerde çözünür.
Yoğunluk	1,799 g/cm ³	Kristal yapısına bağlı olarak.
pKa değeri	~6,8–7,8	Asitlik değeri (fonksiyonel gruplar).
UV-Vis absorpsiyon	256 nm ve 370 nm	Maksimum absorpsiyon dalga boyu.

2.3. HPLC

HPLC, sıvı kromatografi yöntemlerinden biridir ve özellikle analitik kimya ve biyokimya alanlarında yaygın olarak kullanılır. Bu yöntem, bir karışımdaki bileşenlerin ayrılmasını, analiz edilmesini ve saflaştırılmasını sağlar. HPLC'nin çalışma prensibi, yüksek basınç altında bir sıvı mobil fazın, sabit bir faz (kolon) üzerinde geçirilmesi ile başlar. Bileşenler, kolon içindeki sabit fazla etkileşerek farklı hızlarla hareket eder ve bu sayede karışımdaki bileşenler birbirinden ayrılır. HPLC'de kullanılan kolonlar genellikle silika bazlıdır ve mobil fazlar çeşitli çözücülerden oluşabilir [45]. Kolondan çıkan bileşenler, genellikle UV-Vis, DAD veya kütle spektrometrisi gibi cihazlarla dedekte edilir.

HPLC, farmasötik endüstride ilaç bileşenlerinin saflaştırılması ve kalite kontrolü gibi önemli uygulamalara sahiptir. Ayrıca çevre analizlerinde su, hava ve toprak örneklerinin kirletici bileşenler açısından incelenmesi için kullanılır [46]. Gıda endüstrisinde ise gıda katkı maddeleri, pestisit kalıntıları ve vitaminlerin analizinde büyük bir rol oynar. HPLC'nin avantajları arasında yüksek hassasiyet, karmaşık karışımların ayrılması ve farklı kolon tipleri ile mobil fazlar üzerinde özelleştirme seçenekleri bulunur. Bununla birlikte, HPLC'nin dezavantajları arasında yüksek maliyetli ekipman ve çözücüler gerektirmesi ile çözücü tüketiminin uzun süreli kullanımlarda yüksek olması yer alır [45].

HPLC'de analiz yapılırken analiz edilecek örnekle bileşenleri taşıyan sıvı faz mobil faz olarak adlandırılır. Bu sıvı, çözücülerden veya çözücü karışımlarından oluşur. Mobil fazın taşınması esnasında bileşenlerin tutunmalarını sağlayan kolonlarındaki dolgu maddesi genellikle silika bazlı katı bir sabit fazdır. Kolonun uzunluğu ve içindeki sabit

fazın özellikleri, analizin hassasiyetini etkiler. Kolondan çıkan bileşenler, genellikle UV-Vis dedektörü veya kütle spektrometrisi gibi cihazlarla tespit edilir.

HPLC uygulamaları irdelendiğinde; biyoteknoloji ve farmasötik endüstriden çevre analizlerine, gıda ve içecek endüstrisinden kimyasal endüstriye kadar birçok bileşenin ayırma ve saflaştırılmasında kullanılmaktadır. İlaç bileşenlerinin saflaştırılması ve kalite kontrolü, su, hava ve toprak örneklerinin kirletici bileşenler açısından incelenmesi, gıda katkı maddeleri, pestisit kalıntıları ve vitaminlerin analizlerinde yüksek doğruluk ve hassasiyette kullanıldığı bilinmektedir [47].

2.3.1. HPLC dedektörler

HPLC sistemlerinde kullanılan dedektörler, ayrılmış bileşenlerin tespit edilmesini ve ölçülmesini sağlayan önemli bileşenlerdir. HPLC dedektörleri, çeşitli fiziksel ve kimyasal özelliklere dayalı olarak çalışır ve analitik uygulamalarda büyük öneme sahiptir. HPLC'deki dedektörler, genellikle bileşiklerin konsantrasyonlarını, kimyasal yapısını veya diğer özelliklerini ölçmek için kullanılır. Aşağıda HPLC'de kullanılan başlıca dedektör türleri detaylandırılmıştır.

UV/Vis Dedektörleri

Çalışma Prensibi: UV-Vis dedektörleri, örneklerin ultraviyole veya görünür ışık dalga boylarında absorpsiyonunu ölçer. Bu dedektörler, bileşenlerin ışık absorpsiyon özelliklerinden yararlanır. Bir bileşik, belirli bir dalga boyunda ışık emer ve bu emilim derecesi bileşiğin konsantrasyonuna orantılıdır.

Yaygın olarak kullanılan, düşük maliyetli ve güvenilir dedektörlerdir. Çoğu organik bileşik, özellikle aromatik bileşikler ve çift bağ içeren bileşikler UV ışığını absorbe edebilir. Örneğin, DAD bir UV-Vis dedektörüdür. Fakat DAD, birçok dalga boyunda aynı anda ölçüm yaparak geniş bir spektrumda veri sağlar [48-50].

Fluoresans dedektörleri

Çalışma Prensibi: Bu dedektörler, bileşiklerin ışık emme ve ardından fluoresans (ışık yayma) özelliklerinden yararlanır. Bir bileşik, belirli bir dalga boyunda enerji alır ve bu enerjiyi daha uzun bir dalga boyunda yayımlar. Fluoresans dedektörleri, genellikle çok

hassas tespit için kullanılır çünkü ışık yayma, ışık emmeden daha düşük bir yoğunlukta olabilir [50,51].

Kırılma indisı dedektörleri (RID)

Bu dedektör, çözeltinin kırılma indisini ölçer. Kırılma indisı, bileşenlerin optik özelliklerine dayanır. Bileşikler, ışığın çözeltideki kırılma indisini değiştirir ve bu değişiklik dedektör tarafından ölçülür. Organik bileşiklerin tespitinde kullanılan RID, UV ışığına duyarlı olmayan bileşiklerin analizi için de uygundur. Bu nedenle şekerler veya glikoz gibi bileşiklerin analizinde kullanılır [50,52].

Elektrokimyasal dedektörler

Elektrokimyasal dedektörler, bir elektrot ile bileşiğin oksidasyon veya redüksiyon reaksiyonlarını ölçer. Bu tür dedektörler, özellikle iyonik bileşiklerin analizi için uygundur. Elektriksel bir sinyal üreterek bileşiğin miktarını belirler. Bileşenlerin elektrokimyasal tepkileri, çok hassas bir şekilde ölçülebilir ve genel olarak farmasötik veya biyolojik analizlerde kullanılmaktadır [50,53].

Kütle spektrometrisi (MS) ile HPLC

HPLC-MS, bileşenlerin kütle/yük oranlarını tespit eden bir dedektördür. HPLC ile ayrılan bileşikler, bir kütle spektrometreye yönlendirilir. Kütle spektrometresi, moleküllerin kütlelerini ve yapısal özelliklerini belirler. Bu teknik, bileşiklerin kesin tanımlanmasını sağlar. Çok hassas ve özgül analiz sunan MS dedektörleri bileşenlerin kimyasal yapısı hakkında derinlemesine bilgi vererek farmasötik, çevresel analiz ve toksikoloji çalışmalarında kullanılmaktadır [50].

Yüklü aerosol detektörü (CAD)

Sıvı fazdaki bileşiklerin aerosoller aracılığıyla elektriksel tespitiyle çalışır. HPLC’de ayrılan bileşikler önce bir nozuldan geçirilir ve sonrasında aerosolize edilir. Bu aerosoller elektriksel yükler taşır ve bir dedektör aracılığıyla toplanarak sinyal üretir. Suya çözünmüş bileşenlerin analizinde de kullanılan CAD dedektörleri her türlü bileşiği, UV/Vis dedektörlerine bağımlı olmaksızın tespit edebilir [50,54].

2.4. Literatür Taraması

Bakour ve arkadaşları, fenolik bileşikleri tanımlamak ve analizlerini yapmak için HPLC-DAD cihazı kullanmışlar. On familyaya ait on dört bitkiyi etanol ile ekstrakte edip antioksidan aktivite, toplam fenolik, flavon ve flavonol içeriğini değerlendiren bir çalışma yapmışlar. Örneklerdeki toplam fenolik içeriğini 1,27-99,5 mg/g arasında değiştiğini ve en fazla antioksidan özellik gösteren bitkilerin *Mentha spicata* ve *Mentha pulegium* türü olduğunu belirlemişler [55].

Hünnap, geleneksel tıpta yaygın kullanılan ve zengin biyolojik aktivite gösteren meyvelerden biridir. İçeriğinde flavonoidler, fenolik bileşikler, vitaminler ve mineraller gibi sağlığa faydalı birçok bileşik bulunmaktadır [14]. Son çalışmalar hünnap meyvelerinin antikanser [56], antiinflamatuvar [57], gastrointestinal koruyucu [58], antioksidan [59], antiinsomnia, immün sistemi uyarıcı [60] ve nöroprotektif etkiler [61] gibi birçok biyoaktiviteye sahip olduğunu göstermiştir [62].

Kuersetin, doğal bir flavonoid olup oksidatif stresin önlenmesi ve serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi gibi önemli biyolojik rollere sahiptir. Kuersetinin kanser önleyici, bağışıklık sistemi destekleyici ve nöroprotektif etkileri literatürde detaylı bir şekilde rapor edilmiştir [63].

HPLC, bitkisel kaynaklardan kuersetin gibi fenolik bileşiklerin tayininde yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Bu yöntem, yüksek hassasiyeti, doğruluğu ve hızlı analiz süreleri ile öne çıkar. Hünnapta kuersetin tayini için genellikle HPLC-DAD kullanılır [44]. Shah ve arkadaşları, kuersetin tayini için HPLC-DAD metodunu kullanmışlardır ve mobil faz olarak metanol ve su içinde formik asit kullanmışlardır [64].

Aneta ve ark., İspanyol hünnap meyvesinin (*Ziziphus jujuba* Mill.) besin değeri ve sağlık yararları incelemiş ve çalışmada dört İspanyol hünnap çeşidinin polifenolik bileşimi, askorbik asit (C vitamini) içeriği ve antioksidan kapasitesini analiz etmişler. Toplam 25 polifenolik bileşik tespit edilmiş, bunlar arasında flavan-3-oller (polifenollerin %92'sini oluşturur) ve flavonoller öne çıkmıştır. Hünnap meyvesi, 387-555 mg/100 g taze ağırlık aralığında yüksek askorbik asit içeriğiyle dikkat çekmişlerdir. Çalışmada HPLC-MS ile hünnap meyvesi çeşitlerinde belirledikleri kuersetin miktarını 0,2-0,7 mg/100 gdm olarak belirlemişler. Ayrıca, toplam fenolik bileşiklerin içeriği 1442 ile 3432 mg/100 gdm arasında değiştiğini ve antioksidan kapasite değerlendirmesi, polifenoller, askorbik asit

bileşenleri ile meyvenin güçlü antioksidan özelliklerine önemli katkı sağladığını gösterdiğini raporlamışlardır [65].

Liao ve ark. yapmış olduğu çalışmada *Ziziphus jujuba var. spinosa* bitkisinin dokuz temel biyoaktif bileşimini (alkaloidler, flavonoidler ve triterpenoidler) eş zamanlı olarak analiz etmek için HPLC-DAD-ELSD-MS/MS yöntemini geliştirmiştir. *Ziziphus jujuba* bitkisinin biyoaktif bileşiklerini analiz etmek amacıyla geliştirilen HPLC-DAD-ELSD-MS/MS yöntemine odaklanmaktadır. Çalışmada, optimum kromatografik koşullar belirlenmiş ve çeşitli ekstraksiyon yöntemleri karşılaştırılmış olup çalışma sonunda alkaloid, flavonoid ve triterpenoid sınıfına ait dokuz biyoaktif bileşik eş zamanlı olarak tespit edilmiştir. Optimum kromatografik koşullar, su ve metanolün %0,1 formik asit içeriğiyle kullanıldığı bir gradiyent elüsyon sistemiyle sağlamışlardır. Çeşitli ekstraksiyon yöntemleri (ultrasonikasyon, vortex ve reflü) karşılaştırılarak 50% metanol kullanımıyla ultrasonik ekstraksiyonun en verimli yöntem olduğu belirlemişlerdir. Bu yöntem, *Z. jujuba*'nın kalite kontrolü için hızlı ve etkili bir araç sunduğunu raporlamışlardır [66].

Xue ve ark yapmış olduğu çalışmada, Çin hurması (*Ziziphus jujuba Mill.*)'nin farklı çeşitleri, gelişim aşamaları ve dokularında bulunan fenolik asitler ve flavonoidlerin bileşimi ile içeriği sistematik olarak incelemişlerdir. Araştırmacılar, ultra yüksek performanslı sıvı kromatografi (UPLC) kullanarak toplamda 13 fenolik asit ve flavonoid tespit etmişlerdir. Meyvelerde 12, yapraklarda 11 ve gövdelerde 10 bileşik bulunmuş; (+)-kateşin, rutin, kuersetin, luteolin, spinosin, gallik asit ve klorojenik asit tüm dokularda ortak olarak belirlemişlerdir. Çeşitler arasında içerik bakımından farklılıklar gözlenirken, yapraklarda en yüksek, meyvelerde ise en düşük toplam fenolik asit ve flavonoid içeriği ölçülmüştür. Dokular arasında da bileşik farklılıkları saptanmış; meyvede (+)-kateşin, epikateşin ve rutin; yapraklarda kuersetin ve rutin; gövdede ise (+)-kateşin ve rutin en baskın bileşikler olarak tespit etmişlerdir. Bu bulgular, yüksek değerli fenolik asit ve flavonoid içeriğine sahip çeşitlerin seçimi ve işlenmesi için önemli bir referans sağlamıştır [67].



3. MATERYAL VE DENEYSEL YÖNTEM

Bu bölümde, kuersetin tayini için İleri Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezinde bulunan Agilent marka 1260 Infinity Series HPLC cihazı, örneklerin ekstraksiyonu için de ultrasonik banyo kullanılmıştır. Bunların yanı sıra, C18 kolon ($5\ \mu\text{m} \times 4.6\ \text{mm} \times 150\ \text{mm}$) analitik kolon, analitik terazi, muhtelif cam malzemeler, falkon tüpleri, 0,45 μm PTFE enjeksiyon filtresi, buzdolabı, ultra safsu (ELGA marka) gibi ekipmanlardan da faydalanılmıştır.

Kullanılan kimyasallar;

Kuersetin (sigma-aldrich marka, cas numarası: 117-39-5), metanol (MeOH) (Merck), asetonitril (ACN) (Merck), formik asit (FA) (Merck), hidroklorik asit (Merck), etanol (Merck) vb. kimyasallar HPLC grade saflıktaydı.

3.1. Hazırlanan Standart Çözeltiler ve Reaktifler

Kuersetin standardı: 0,05 g kuersetin analitik terazide tartılarak 100 mL’lik balon jojeye alındı. Metanol ortamında hazırlanan 500 ppm ana stok çözeltiden, 50 ppm ara stok çözeltisi, ara stok çözeltiden ise seyreltmeler yapılırken ACN kullanıldı.

Ara stoktan 0,1-25 ppm aralığında farklı konsantrasyonlarda HPLC’de okunmak üzere standart çözeltiler hazırlandı. Optimizasyon çalışması yapılırken ise 25 mg/L kuersetin standardı kullanıldı.

Mobil faz: Ultra saf su/MeOH/ACN/FA karışımı (52:42:5:1, h:h:h:h) kullanıldı [68-70].

1,2 M HCl’ in hazırlanması: %37’ lik yoğunluğu 1,19 g/mL ekstra pure HCl (Merck 100317) ten 9,94 mL alıp 100 mL’ ye tamamlanarak 1,2 M HCl çözeltisi hazırlandı [68].

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

3.2. Kuersetin Tayininde HPLC-DAD Koşullarının Optimizasyon Çalışmaları

Bu amaçla HPLC-DAD’da önemli olan optimizasyon parametreleri (dalga boyu, akış hızı, kolon sıcaklığı, enjeksiyon hacmi) belirlendi. Bu çalışmada bir parametre değiştirilirken, diğer parametrelerde optimum olarak bulunan değerler kullanıldı. Elde edilen kromatogramlar “BULGULAR VE TARTIŞMA” bölümünde sunulmuştur.

3.3. Örneklerin Temin Edilmesi ve Analize Hazırlanması

Hünnap meyvesi 2022 yılının Ekim ayında halk pazarından satın alınmıştır. Satın alınan numuneler laboratuvara getirilerek musluk suyu, sonra saf su ile yıkanarak çekirdeklerinden ayrıldı. 45 °C’de etüvde 3 gün sabit tartıma gelene kadar kurutuldu. Kurutulan örnekler titanyum nitrür kaplı öğütücüde öğütüldü ve 100 mesh’lik elekten elendi. Homojenize edilmiş olan 1 g’lık kurutulmuş hünnap örnekleri 50 mL’lik falkon tüpüne bırakılarak üzerine 10 mL metanol, 0,5 g sitrik asit, 1 mL 1,2 M HCl eklendi ve ultrasonik banyoda yarım saat ekstrakte edildi. Süzgeç kâğıdıyla süzülen ekstraktların son hacimleri 10 mL’ye tamamlandıktan sonra 0,45 µm PTFE enjeksiyon filtresiyle süzülen ekstraktlardaki kuersetin analizi için HPLC-DAD cihazına enjekte edildi.

Çalışmanın doğrulanması için ekstraksiyondan önce hünnap numunelerine standart ekleme metodu uygulanarak 500 ppm’den 1 mL ve 2 mL kuersetin standardı eklendi. Ekstraksiyon prosedürü uygulanarak 0,45 µm PTFE enjeksiyon filtresiyle süzülen ekstraktlardaki kuersetin miktarı HPLC-DAD cihazı analiz edildi ve böylece gerçek örnekteki derişimi hesaplandı. Elde edilen sonuçlar “BULGULAR VE TARTIŞMA” bölümünde sunulmuştur.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

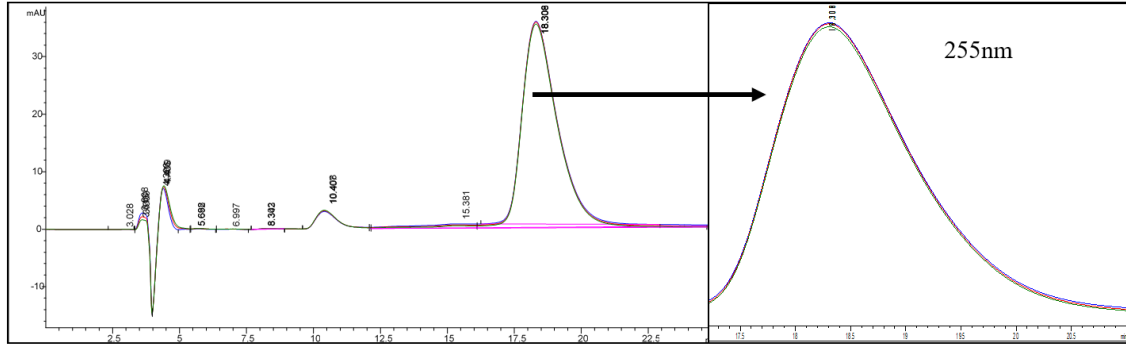
Bu çalışmada Kırklareli ilinde yetiştirilen hünnap bitkisindeki kuersetinin yüksek hassasiyetli HPLC-DAD ile önderiştirme olmadan direk tayini amaçlanmıştır. Bu amaçla HPLC-DAD ile metot geliştirme aşamasında dalga boyu, akış hızı, kolon sıcaklığı, enjeksiyon hacmi gibi parametreler optimize edildi. Optimizasyon da seçilen parametrelerin kromatogramları Şekil 4.1-4.5 arasında sunulmuştur.

HPLC cihazı ile çalışmalar yapılırken solvent seçimi analizi yapılan bileşiklerin kromatogramda doğru bir şekilde ayrılmasını, tanımlanmasını, çözünürlüğünü, tekrarlanabilirliğini ve çözünürlük performansını doğrudan etkileyen en önemli parametrelerin başında gelmektedir [12,45,47]. Bunların yanısıra çevre dostu solvent seçimi de HPLC analizinde dikkate alınması gereken önemli bir faktördür. Yapılan çalışmada literatürde de bulunan ultra saf su/MeOH/ACN/FA karışımı (52:42:5:1) karışımı kullanılmıştır [68-70].

4.1. Dalga Boyu Taraması

HPLC’de dalga boyu seçimi kullanılan UV-DAD dedektörün doğru ve hassas ölçümler yapabilmesi açısından oldukça önemli faktörlerin başında gelmektedir. Çünkü bileşikler belirli dalga boylarında maksimum absorpsiyon verme özelliği taşımaktadırlar. Böylece seçilecek olan dalga boyunun doğru seçimi, analizlerin tekrarlanabilirliğini ve güvenilirliğini etkileyerek doğru sonuca ulaşılmasını sağlar [12,45,47]. Öncelikle kuersetinin belirlenmesinde dalga boyu seçimi için UV-Vis’de maksimum dalga boyu sinyalinin alındığı aralık belirlendi ve DAD dedektörde ise bu aralığa düşmesi muhtemel dalga boyu değerleri girilerek kuersetin için metot validasyon çalışması yapılmıştır. Bunun için 25 ppm kuersetin standardı kullanıldı. Enjeksiyon hacmi 20 uL, akış hızı 0,6 mL/dk ve kolon sıcaklığı 25 °C sabit değer alınarak DAD dedektörü ile dalga boyu taraması yapılmış ve kuersetin için, maksimum absorpsiyona sahip olduğu spesifik dalga boyu ölçülmüştür.

Dalga boyu taramasında 254 nm, 255 nm, 256 nm (± 2) dalga boylarından maksimum dalga boyu 255 nm olarak belirlenmiş ve elde edilen kromatogram Şekil 4.1 de sunulmuştur.



Şekil 4. 1 Kueretin için HPLC-DAD ile dalga boyu taraması kromatogramı

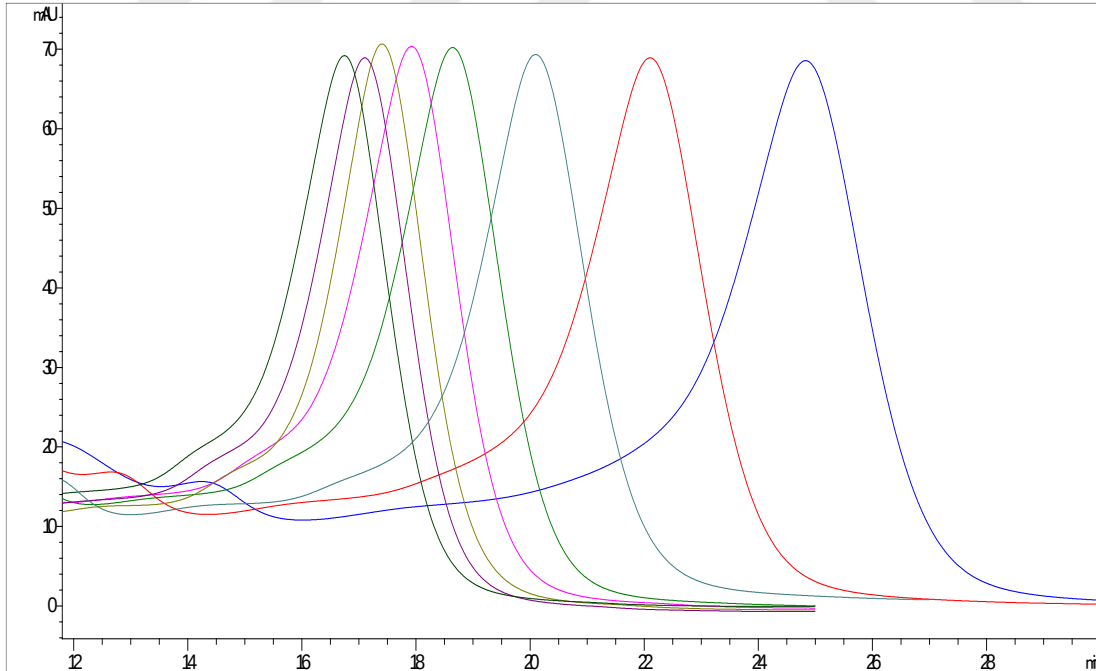
4.2. Akış Hızı Taraması

Akış hızı taramasında mobil fazın kolondan belirli bir hızla geçerek bileşenlerin belirlenmesi ve ayrılması, kolon üzerinden geçme süresini ve kolon/sistem iç basıncını doğrudan etkilemektedir [12,45,47]. Mobil fazda kullanılan çözücülerin kolonda ilerlerken her biri farklı şekilde analiz performansını etkilediğinden dolayı optimizasyon çalışmasında önemli parametrelerdendir. Çünkü yüksek akışta sistem basıncının artmasına düşük akışta ise basıncın düşmesinden de kaynaklı analiz süresinin uzamasına neden olmaktadır. Ayrıca mobil fazda kullanılan kimyasalların özellikleri de analizi yapılan bileşenin kolondan tutunma süresini etkilemektedir. Yani kolon iç dolgusundaki sabit fazla etkileşim içerisinde en iyi ayrımı sağlamada katkı sağlar.

Mobil fazda kullanılan çözücüler analizi yapılan bileşenlerin çözünürlüğünü artırma, kolon üzerinde bileşenlerin ayrılma hızını düzenleme ve doğru çözünürlük koşullarını sağlama gibi işlevlerde katkı sunar [12]. Mobil fazda kullanılan MeOH, ACN, ultra saf su ve FA karışımı, analizi yapılan kueretin bileşiğinin HPLC’de analizi için seçilmiştir. MeOH’ın polar özelliği ve düşük viskozitesinden dolayı; ACN’nin az polarlığı, düşük viskozitesi, iyi çözünmesi ve UV-DAD dedektörlerinde kullanımının uyumlu olmasından dolayı; FA’nın ortam pH’ını düşürerek asidik ortam sağlaması; ve suyun polar bileşikleri çözmede en iyi çözücülerden biri olmasından dolayı seçilmiştir [71]. Ayrıca, kueretin çözeltisi, çözünme koşullarına göre asidik pH (yaklaşık 4-6) aralığında olabilir. Özellikle

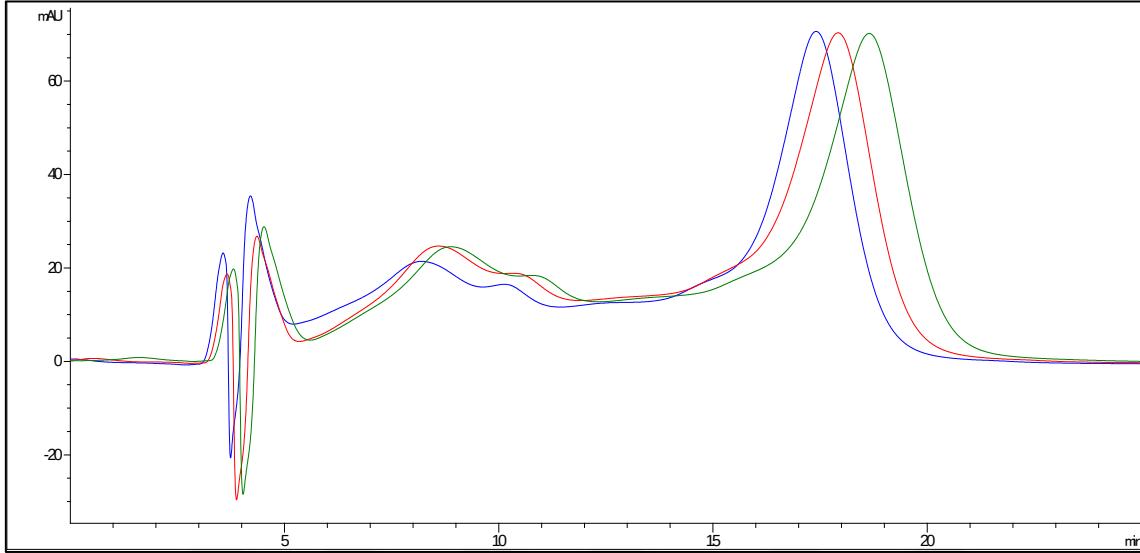
kuersetin aglikon formu (serbest kuersetin) asidik ortamda daha iyi çözünür. Fenolik bileşikler yapılarından dolayı, ortamın pH değerine göre çözünürlüğü değişmektedir [72]. Özellikle pH 3-6 arası asidik koşullarda kuersetinin çözünürlüğü artmaktadır [72]. Mobil faza eklenen FA ile ortamın pH değeri 5,2 olarak ölçülmüştür. Kısaca mobil fazdaki bu etkileşimler ile optimizasyon yapılarak daha net ve ayrılmış pikler elde edildi. Ayrıca mobil fazın özelliği kullanılan kromatografi tekniğini de normal faz ve ters faz olarak da etkilemektedir. Şöyleki, normal faz, apolar sabit faz olarak, ters faz ise polar sabit faz olarak hareket olanağı sağlar. Kısaca, apolar bileşikler apolar özellikli mobil fazda daha hızlı hareket ederken, polar bileşikler ise polar mobil fazda daha hızlı hareket eder. Kuersetin bileşiği de polar özellik gösteren bir bileşik olduğundan dolayı ters faz kromatografi tekniği yani polar mobil faz kullanılmıştır. Mobil fazın doğru seçilmesi, bileşiklerin iyonlaşmasını ve dolayısıyla kolon ile etkileşimlerini önemli oranda değiştirmektedir [72].

Akış hızı taramasında 0,4 mL/dk, 0,5 mL/dk, 0,6 mL/dk, 0,7 mL/dk, 0,8 mL/dk, 0,9 mL/dk, 1 mL/dk ve 1,2 mL/dk tarandı. Yüksek simetri ve alana sahip 0,8 mL/dk akış hızında karar kılındı. Akış hızına ait kromatogram Şekil 4.2 ve 4.3'te gösterilmiştir.



Şekil 4. 2 HPLC-DAD ile kuersetin optimizasyonunda akış hızı taraması kromatogramı

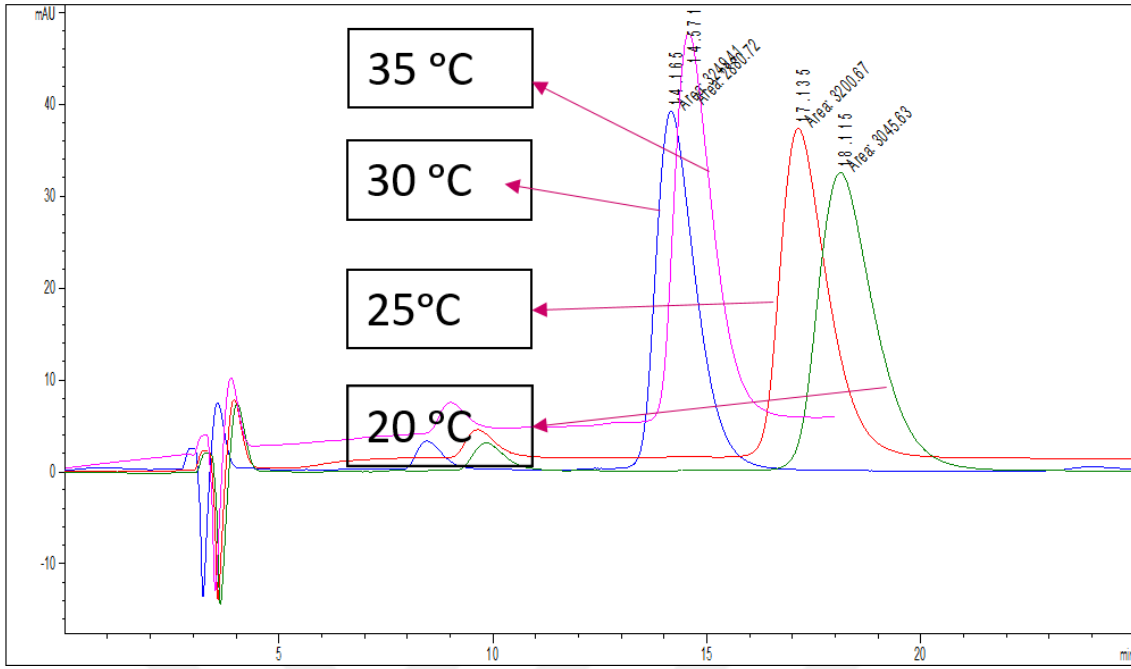
Pik yükseklikleri birbirine oldukça yakın görünen 0,6 mL/dk, 0,7 mL/dk ve 0,8 mL/dk kromatogramlarının ayrımını görebilmek için ise Şekil 4.3'te görülen kromatogram sunulurak karar verilmiş ve akış hızı olarak 0,8 mL/dk alınmıştır (alan değerleri ise sırasıyla 7271,78; 7442,16; 7557,47).



Şekil 4. 3 HPLC-DAD'da sırasıyla 0,6; 0,7; 0,8 mL/dk akış hızında kuersetin için alınan kromatogram

4.3. Kolon Sıcaklığı Taraması

Kolon sıcaklığı, analitlerin mobil faz ve sabit faz arasındaki etkileşimlerini etkilediği için ayırım performansında önemli bir rol oynar. Sıcaklık artışı genellikle daha iyi çözünürlük, pik simetrisinin düzgün olması, viskoziteyi düşürme, tutunma süresinin analiz süresince sabit kalması ve analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliğine katkı sağlar [12]. Ancak, kolonun özellikleri ve analizi yapılacak bileşen/bileşenlerin özelliği dikkate alınarak kolon sıcaklık taramasında belirli aralıklar çalışılmaktadır. Bunun için kolon sıcaklığı taramasında 20 °C, 25 °C, 30 °C ve 35 °C çalışıldı. Elde edilen kromatogram Şekil 4.4'te sunulmuştur.

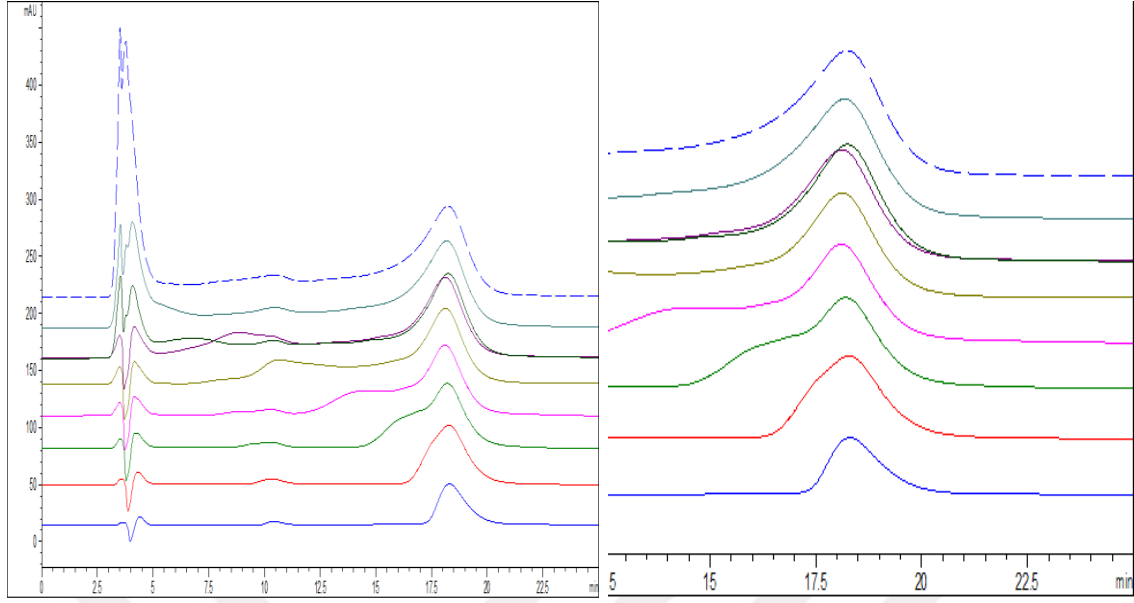


Şekil 4. 4 HPLC-DAD ile kueretin tayini için optimum kolon sıcaklığının bulunması

Kueretin tayininde belirlenmiş olan 255 nm dalga boyu ve 0,8 mL/dk akış hızı sabit alınarak yapılan kolon sıcaklığı taramasında optimum kolon sıcaklık değeri 25 °C olarak belirlendi.

4.4. Enjeksiyon Hacmi Taraması

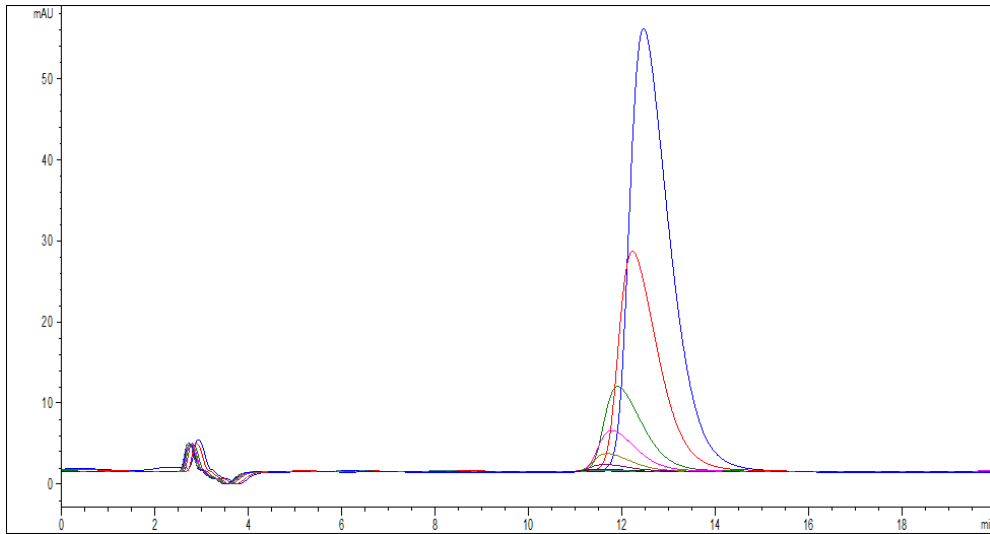
Sisteme enjekte edilecek numunenin hacmi, yani enjeksiyon hacmi taraması hem analizin hassasiyetini hem de kolon performansını etkileyen önemli parametrelerdendir [12,45,47]. Çok küçük hacimlerde enjekte edilen analit, dedeksiyon sınırının altında bir sinyal verebilirken, fazla hacim enjeksiyonu kolonun aşırı yüklenmesine ve tepe şekillerinin bozulmasına neden olabilir [12,45,47]. Bu durum, pikin yayvanlaşmasına yani genişlemesine, simetrik yapının bozulmasına neden olabilir. Uygun bir enjeksiyon hacmi seçimi ile analizlerin tekrarlanabilirliği ve doğruluğu önemli derecede artırılmış olur. Çalışmada, kueretin tayini için doğru enjeksiyon hacmini belirlemede 5-50 uL (5 uL, 10 uL, 15 uL, 20 uL, 25uL, 30 uL, 35 uL, 40 uL ve 50 uL) aralığı çalışıldı. Elde edilen kromatogram Şekil 4.5'te sunulmuştur.



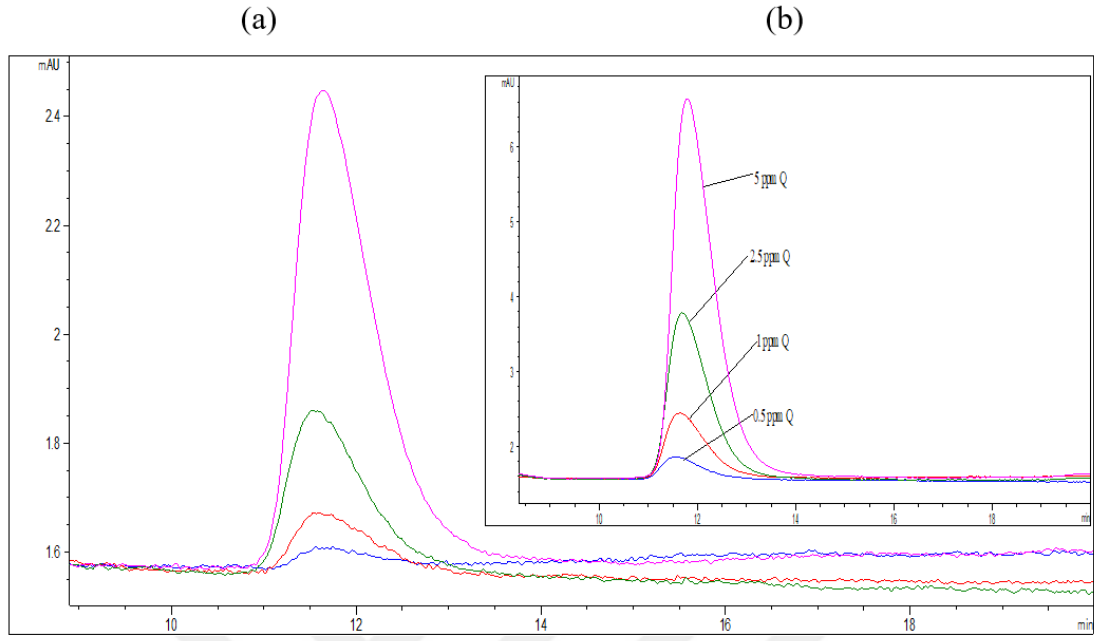
Şekil 4. 5 HPLC-DAD ile kuersetin tayini için optimum enjeksiyon hacmi taraması

Şekil 4.5'teki kromatogram incelendiğinde optimum enjeksiyon hacmi 5 uL olarak belirlenmiş ve çalışma grafiği oluşturularak kesinlik parametreleri belirlenmesi için çalışmalar da yapılmıştır.

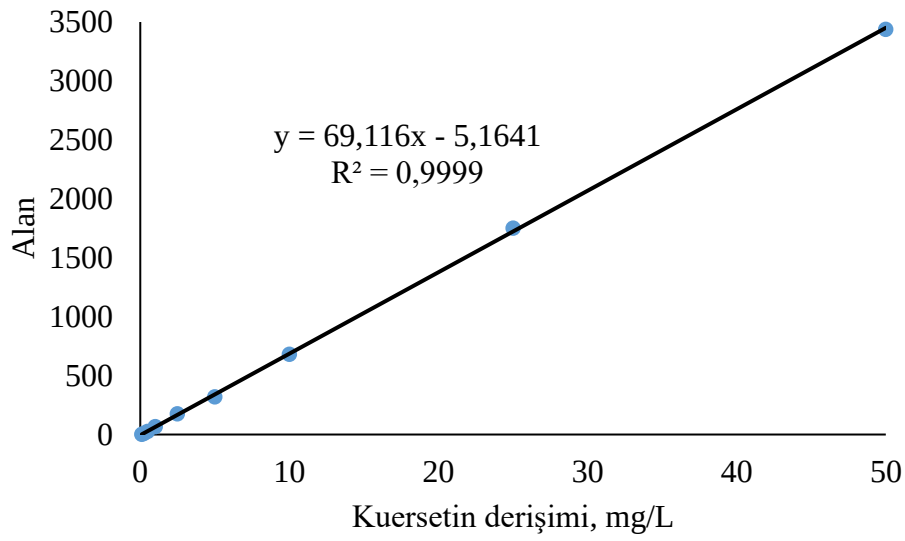
Optimum koşullar (255 nm dalga boyu, 0,8 mL/dk akış hızı, kolon sıcaklığı 25 °C, enjeksiyon hacmi 5 uL) belirlendikten sonra standartlar cihaza enjekte edildi ve elde edilen kromatogramlar ve çalışma grafiği (kalibrasyon) sırasıyla Şekil 4.6-4.7 ve Şekil 4.8'de verilmiştir.



Şekil 4. 6 Kuersetinin 0,1-50 mg/L standart çözeltilerin HPLC-DAD kromatogramı



Şekil 4. 7 Kuersetinin a) 0,1; 0,25; 0,5; 1 ppm ve b) 0,5; 1; 2,5; 5 ppm standart çözeltilerin farklı kromatogram gösterimi



Şekil 4. 8 Kuersetin için elde edilen kalibrasyon grafiğı

Kuersetin için elde edilen optimum koşullar ve validasyon parametreleri Çizelge 4.1’de sunulmuştur.

Çizelge 4. 1 HPLC-DAD ile kuersetin elde edilen validasyon koşulları

Parametreler	Kuersetin
Dalga boyu, nm	255
Akış hızı, mL/dk	0,8
Kolon sıcaklığı, °C	25
Enjeksiyon hacmi, uL	5
Lineerite ($y=mx+n$)	$69,116x - 5,1641$
Korelasyon katsayısı, R^2	0,9999
Relatif standart sapma (RSD), %	1,5
Gün içi ve günler arası RSD, %	0,1 ve 4,8
Tespit limiti (LOD), ppm	0,02
Miktar tayini sınırı (LOQ), ppm	0,07

Linearite 0,1-50 ppm doğrusal aralığında ve LOD-LOQ değerleri sırasıyla 0,02 ppm – 0,07 ppm olarak belirlenmiştir. Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik, yüzde bağıl standart sapma cinsinden %0,1 ve %4,8 olarak elde edilmiştir.

Metot doğrulaması için standart ekleme metodu uygulandı. Bunun içinde ekstraksiyon aşamasında ise gerçek örneklerle anastok standart çözeltiden 0,2 mL ve 0,4 mL ekleme yapılarak geri kazanım değerleri hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4. 2 Hünnap örneklerine yapılan standart ekleme sonuçları (n=6)

	Eklenen standart, ppm	Okunan değer, ppm	% geri kazanım
Hünnap	0	470	-
	2,5	471	99,7
	5	476	101

Ayrıca yöntemin doğruluğu için hünnap örneklerine standart kuersetin çözeltisi ilave edilmiş ve %95’in üzerinde geri kazanım sağlanmıştır. Ekstrakte edilen hünnap örneklerine geliştirilen metot başarıyla uygulanmıştır.

Kuersetin günlük alım dozu bir araştırmada 16 mg/gün -70 mg/gün [72] diğer bir araştırmada ise 70 kg’lık bir yetişkin için 100 mg’a kadar faydalı olabileceği

yorumlanabilmektedir [73]. Haruno ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, tahmini günlük sebze alımları ve kuersetin alımlarını sırasıyla 187-573 g/gün ve 12,6-49,9 mg/gün olarak raporlamıştır [75]. Tarhanada kuersetin miktarını 4,40-11,33 mg/100 gdb olarak belirlemişler [74]. Yapmış olduğumuz çalışmada 47,0 mg kuersetin/100 g ise 70 kg'lık bir yetişkinin tüketeceği kuersetin günlük alım dozu (daily intake dose) 700 mg kuersetin/100 g olacaktır (günlük alım doz önerisi olarak 10 mg/kg kabul edilirse).

Angg ve arkadaşları, ters fazlı izokratik HPLC (RP-HPLC) yöntemini tanımlamış ve çeşitli Çin tıbbi ürünlerinde yaptıkları analizlerde, en yüksek kuersetin miktarı 311 ug/100 mg ile ayçiçeği tohumu örneğinde tespit etmişlerdir. Diğer örneklerde ise kuersetin miktarının genelde daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlara göre kuersetinin farklı bitkisel ürünlerde değişken konsantrasyonlarda bulunduğunu raporlamışlardır [76]. Kuersetin tayini için yapılmış olan bazı çalışmalar Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4. 3 Kuersetin için yapılan literatür karşılaştırması

	Numunedeki miktarı (mg/kg)	Kolon sıcaklığı (°C)	Akış hızı (mL/dk)	Enjeksiyon hacmi (uL)	Cihaz	Kaynak
Hünnap meyvesi	7,47					
Hünnap yaprağı	4248	35	0,25	3	UPLC	[67]
Hünnap dalı	115					
Isırgan otu	18					
Kuşburnu	<t.s	30	0,6	5	HPLC-MS	[69]
Menengiç	<t.s					
Semizotu	39					
Zencefil	7.532	35	1,3	20	HPLC	[76]
Safran	3.195	35	1,3	20	HPLC	[76]
Zerdeçal	36.523	35	1,3	20	HPLC	[76]
Hünnap	470	25	0,8	5	HPLC-DAD	Bu çalışmada



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Halk arasında ve geleneksel tıpta oldukça fazla kullanım alanı bulan ve meyve olarak tüketilen hünnap, içeriğindeki flavonoidler, fenolik bileşikler, vitaminler ve mineraller ile zengin biyolojik aktivite gösteren bir bitkidir. Hünnap bitkisi anti-kanser, anti-inflamatuar, antioksidan vb. biyoaktif bileşenlere sahiptir. Hünnapta da bulunan antioksidan, anti-inflamatuar ve anti-kanser araştırmalarında etken bir bileşik olarak kullanılan kuersetin, doğal bir polifenol alt grubunda bulunan flavonoid-flavonoldür. Bitkisel kaynaklardaki flavonoidlerin tayininde HPLC, GC, HPLC-MS, GC-MS gibi kromatografik teknikler yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle HPLC sistemleri, yapısında hidroksil grubu bulunduran bileşiklerin tayininde türevlendirmeye gerek duymaksızın yüksek doğruluk-hassasiyet ve zaman tasarrufu açısından oldukça ekonomik bir yöntemdir.

Bu çalışmada Kırklareli ilinde yetiştirilen hünnap bitkisindeki kuersetin bileşiğinin miktar tayini için HPLC-DAD yöntemi başarıyla geliştirilmiş ve uygulanmıştır. HPLC-DAD ile metod geliştirme aşamasında dalga boyu, akış hızı, kolon sıcaklığı, enjeksiyon hacmi gibi parametreler çalışılarak optimize edilmiştir.

Mobil fazda polar özellik ve düşük viskoziteye sahip olan MeOH, polaritesi az olan ve yine düşük viskoziteye sahip olan ACN ve MeOH ve ACN'ye göre yüksek polariteye sahip olan su kullanılmıştır. Ortamın asitliğini artırmak yani pH değerini düşürmek için ise FA kullanıldı ve serbest kuersetin için en iyi çözünürlük ortamı sağlanmıştır. Çalışmada ters faz kromatografi tekniği yani polar mobil faz kullanılmıştır. Akış hızı taramasında 0,4-1,2 mL/dk aralığı tarandı ve yüksek simetri-alana sahip 0,8 mL/dk olarak belirlendi. Kolon sıcaklığı, kuersetinin kolonda ayırımında önemli faktörlerdendir. Kolon sıcaklığının artması çözünürlüğü artırarak viskozitenin düşmesine neden olarak pik simetrisinin düzgün olmasına, tutunma süresinin analiz süresince sabit kalmasına ve analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliğine katkı sağlamaktadır. Çalışmada 20-35 °C arası taranarak optimum kolon sıcaklığı 25 °C olarak seçilmiştir. Analiz hassasiyeti ve kolon performansını etkileyen önemli parametrelerden olan enjeksiyon hacmi taramasında

analizlerin tekrarlanabilirliği ve doğruluğunu artıran önemli parametrelerdendir. Optimum olarak 5 uL olarak tespit edilmiştir.

Kısaca özetlenirse; optimizasyon sonucunda 255 nm dalga boyu, 0,8 mL/dk akış hızı ve 5 uL enjeksiyon hacmi belirlenerek kuersetin tayininde metot başarıyla uygulanmıştır. Validasyon parametrelerinden linearite 0,1-50 ppm doğrusal aralığında, 0,9999 korelasyon katsayısı ve LOD-LOQ değerleri sırasıyla 0,02 ppm–0,07 ppm olarak belirlenmiştir. Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik, yüzde bağıl standart sapma cinsinden %0,1 ve %4,8 olarak elde edilmiştir. Uygun metotla ekstrakte edilen hünnap örneklerine geliştirilen metot başarıyla uygulanmıştır. Ayrıca yöntemin doğruluğu için hünnap örneklerine standart kuersetin çözeltisi ilave edilmiş ve %95'in üzerinde geri kazanım sağlanmışır.

Geliştirilen HPLC-DAD yöntemi, hünnap bitkisine başarıyla uygulanmıştır. Yapılan çalışma litertürle kıyaslanırsa kuersetin miktarı 470 mg/kg ile oldukça yüksek derişimde bulunmuştur. Yöntem Kırklareli dışında farklı bölgelerde yetişen hünnap örneklerine ve farklı bitkisel örneklerdeki kuersetin veya diğer polifenol bileşiklerinin analizinde uygulanabilirliğinin araştırılarak çevresel faktörlerin (toprak, iklim, tarım teknikleri) bu bileşikler üzerindeki etkisi değerlendirilebilir.

Bunların yanısıra, hünnapın antioksidan, antikanser ve antiinflamatuvar özellikleri hücre kültürleri ve hayvan modellerinde detaylı olarak test edilebilir. Bu çalışmalar, biyoaktif bileşiklerin etkinlik mekanizmalarının anlaşılmasına katkı sağlayarak fonksiyonel gıda ürünlerinde kullanılabilirliği araştırılabilir. Özellikle, kuersetin gibi biyoaktif bileşiklerin formülasyon teknolojilerinde (örneğin, ilaç taşıyıcı sistemler veya kontrollü salınım teknolojileri) kullanımı için yeni çalışmalar yapılabilir ve sağlık destekleyici takviyeler, çaylar, probiyotik gıdalar gibi ürünlerin geliştirilmesinde hünnaptaki diğer bileşenlerin etkisi de araştırma konusu olma potansiyeli taşımaktadır. Hünnabın biyolojik özellikleri ve ekonomik değeri göz önüne alındığında, bu bitkinin endüstriyel tarımı artırılarak işlenmesi ile ticari potansiyeli değerlendirilebilir. Üstelik, bunun için yerel çiftçilere eğitim ve destek programları sunularak hünnap tarımı ve işlenmesi sırasında çevresel etkiler en aza indirilip, sürdürülebilir tarım teknikleri de uygulanabilir. Ayrıca, üretim yan ürünlerinden (yaprak, çekirdek) biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonu için araştırmalar yapılabilir.

Sonuç olarak; bu çalışma, Kırklareli’nde yetişen hünnap bitkisindeki kuersetin bileşiminin HPLC-DAD yöntemiyle miktar tayini araştırılmıştır. Bunun için yöntemin optimum parametreleri yüksek doğruluk ve kesinlikle tespit edilmiş ve gerçek örneklerle başarıyla uygulanmıştır.





KAYNAKLAR

- [1] **Samrot, A. V., Mun, C. Y., & Qi, N. X.** (2022). Plant Latex: Phytochemistry, Medicinal Properties And Application–A Review. *Journal of Pharmaceutical Negative Results*, 5351-5375.
- [2] **Dinu, M., Galea, C., Chirilov, A. M., Tatu, A. L., Nwabudike, L. C., Dumitriu Buzia, O., & Stefan, C. S.** (2024). A Journey Along the Boulevard of Bioactive Compounds from Natural Sources, with Cosmetic and Pharmaceutical Potential: Bee Venom, Cobra Venom, Ficus carica. *Cosmetics*, 11(6), 195.
- [3] **Iqbal, M.** (2022). *Complementary and Alternative Medicinal Approaches for Enhancing Immunity*. CRC Press.
- [4] **Casula, E.** (2022). Design, characterization and efficacy evaluation of natural nasal sprays based on phospholipid vesicles loading plant-extracts.
- [5] **David, A. V. A., Arulmoli, R., & Parasuraman, S.** (2016). Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid. *Pharmacognosy reviews*, 10(20), 84.
- [6] **Aghababaei, F., & Hadidi, M.** (2023). Recent advances in potential health benefits of quercetin. *Pharmaceuticals*, 16(7), 1020
- [7] **Mahajan, R. T. C. M., & Chopda, M.** (2009). Phyto-Pharmacology of Ziziphus jujuba Mill-A plant review. *Pharmacognosy Reviews*, 3(6), 320.
- [8] **Lam, C. T., Chan, P. H., Lee, P. S., Lau, K. M., Kong, A. Y., Gong, A. G., ... & Tsim, K. W.** (2016). Chemical and biological assessment of Jujube (Ziziphus jujuba)-containing herbal decoctions: Induction of erythropoietin expression in cultures. *Journal of Chromatography B*, 1026, 254-262.
- [9] **Shahrajabian, M. H., Sun, W., & Cheng, Q.** (2020). Chinese jujube (Ziziphus jujuba Mill.)—a promising fruit from Traditional Chinese Medicine. *Annales Universitatis Paedagogicae Cracoviensis Studia Naturae*, 194-219.
- [10] **Zhang, Y., Cao, D., Yao, J., Li, M., Wang, M., Li, J., ... & Li, J.** (2024). JUJUBE, NUTRITIOUS FRUIT ON CHINESE TRADITIONAL DIET. *Scientific Bulletin Series F. Biotechnologies*, 28(1).
- [11] **Awouafack, M. D., Tane, P., & Morita, H.** (2017). Isolation and structure characterization of flavonoids. *Flavonoids-From Biosynthesis to Human Health*, 46-58.
- [12] **Skoog, D.A.; Holler, F.J.; Crouch, S.R.** **Principles of Instrumental Analysis, 7th ed.; Cengage Learning: Boston, MA, USA, 2018; ISBN 978-1-305-57721-3.**
- [13] **Harris, D. C.** (2010). *Quantitative chemical analysis*. Macmillan.

- [14] **Gao, Q. H., Wu, C. S., & Wang, M.** (2013). The jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) fruit: a review of current knowledge of fruit composition and health benefits. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(14), 3351-3363..
- [15] **Liu, M. J., Zhao, J., Cai, Q. L., Liu, G. C., Wang, J. R., Zhao, Z. H., ... & Luo, L. H.** (2014). The complex jujube genome provides insights into fruit tree biology. *Nature communications*, 5(1), 5315.
- [16] **Bai, L., Zhang, H., Liu, Q., Zhao, Y., Cui, X., Guo, S., ... & Bai, N.** (2016). Chemical characterization of the main bioactive constituents from fruits of *Ziziphus jujuba*. *Food & function*, 7(6), 2870-2877.
- [17] **Li, J. W., Fan, L. P., Ding, S. D., & Ding, X. L.** (2007). Nutritional composition of five cultivars of Chinese jujube. *Food chemistry*, 103(2), 454-460.
- [18] **Deepika, & Maurya, P. K.** (2022). Health benefits of quercetin in age-related diseases. *Molecules*, 27(8), 2498.
- [19] **Song, L., Zhang, L., Xu, L., Ma, Y., Lian, W., Liu, Y., & Wang, Y.** (2020). Optimized extraction of total triterpenoids from jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) and comprehensive analysis of triterpenic acids in different cultivars. *Plants*, 9(4), 412.
- [20] **Tahergorabi, Z., Abedini, M. R., Mitra, M., Fard, M. H., & Beydokhti, H.** (2015). "Ziziphus jujuba": A red fruit with promising anticancer activities. *Pharmacognosy reviews*, 9(18), 99.
- [21] **Plastina, P., Bonofiglio, D., Vizza, D., Fazio, A., Rovito, D., Giordan, C., ... & Gabriele, B.** (2012). Identification of bioactive constituents of *Ziziphus jujuba* fruit extracts exerting antiproliferative and apoptotic effects in human breast cancer cells. *Journal of ethnopharmacology*, 140(2), 325-332.
- [22] **Hua, Y., Xu, X. X., Guo, S., Xie, H., Yan, H., Ma, X. F., ... & Duan, J. A.** (2022). Wild jujube (*Ziziphus jujuba* var. *spinosa*): A review of its phytonutrients, health benefits, metabolism, and applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(26), 7871-7886.
- [23] **Chen, J., Liu, X., Li, Z., Qi, A., Yao, P., Zhou, Z., ... & Tsim, K. W.** (2017). A review of dietary *Ziziphus jujuba* fruit (Jujube): Developing health food supplements for brain protection. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017(1), 3019568.
- [24] **Zhang, L., Liu, X., Wang, Y., Liu, G., Zhang, Z., Zhao, Z., & Cheng, H.** (2017). In vitro antioxidative and immunological activities of polysaccharides from *Zizyphus Jujuba* cv. Muzao. *International journal of biological macromolecules*, 95, 1119-1125.
- [25] **Zhu, D., Jiang, N., Wang, N., Zhao, Y., & Liu, X.** (2024). A Literature Review of the Pharmacological Effects of Jujube. *Foods*, 13(2), 193.
- [26] **Ruan, W., Liu, J., Zhang, S., Huang, Y., Zhang, Y., & Wang, Z.** (2024). Sour Jujube (*Ziziphus jujuba* var. *spinosa*): A Bibliometric Review of Its Bioactive Profile, Health Benefits and Trends in Food and Medicine Applications. *Foods*, 13(5), 636.

- [27] **Shahrajabian, M. H., Khoshkharam, M., Zandi, P., Sun, W., & Cheng, Q.** (2019). Jujube, a super-fruit in traditional Chinese medicine, heading for modern pharmacological science. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 7(4), 173-178.
- [28] **Middleton Jr, E.** (1998). Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Flavonoids in the living system*, 175-182.
- [29] **de Groot, H. D., & Rauen, U.** (1998). Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundamental & clinical pharmacology*, 12(3), 249-255.
- [30] **Joshi, R., Kulkarni, Y. A., & Wairkar, S.** (2018). Pharmacokinetic, pharmacodynamic and formulations aspects of Naringenin: An update. *Life sciences*, 215, 43-56.
- [31] **Karak, P.** (2019). Biological activities of flavonoids: an overview. *Int. J. Pharm. Sci. Res*, 10(4), 1567-1574.
- [32] **Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R.** (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 5, e47.
- [33] **Chen, S., Wang, X., Cheng, Y., Gao, H., & Chen, X.** (2023). A review of classification, biosynthesis, biological activities and potential applications of flavonoids. *Molecules*, 28(13), 4982.
- [34] **David, A. V. A., Arulmoli, R., & Parasuraman, S.** (2016). Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid. *Pharmacognosy reviews*, 10(20), 84.
- [35] **Xu, D., Hu, M. J., Wang, Y. Q., & Cui, Y. L.** (2019). Antioxidant activities of quercetin and its complexes for medicinal application. *Molecules*, 24(6), 1123.
- [36] **Li, Y., Yao, J., Han, C., Yang, J., Chaudhry, M. T., Wang, S., ... & Yin, Y.** (2016). Quercetin, inflammation and immunity. *Nutrients*, 8(3), 167.
- [37] **Tang, J., Diao, P., Shu, X., Li, L., & Xiong, L.** (2019). Quercetin and quercitrin attenuates the inflammatory response and oxidative stress in LPS-induced RAW264. 7 cells: In vitro assessment and a theoretical model. *BioMed research international*, 2019(1), 7039802.
- [38] **Hussain, Y., Mirzaei, S., Ashrafizadeh, M., Zarrabi, A., Hushmandi, K., Khan, H., & Daglia, M.** (2021). Quercetin and its nano-scale delivery systems in prostate cancer therapy: paving the way for cancer elimination and reversing chemoresistance. *Cancers*, 13(7), 1602.
- [39] **Shams, S. G. E., & Eissa, R. G.** (2022). Amelioration of ethanol-induced gastric ulcer in rats by quercetin: implication of Nrf2/HO1 and HMGB1/TLR4/NF- κ B pathways. *Heliyon*, 8(10).
- [40] **D'Andrea, G.** (2015). Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications?. *Fitoterapia*, 106, 256-271.
- [41] **Pinheiro, R. G., Pinheiro, M., & Neves, A. R.** (2021). Nanotechnology innovations to enhance the therapeutic efficacy of quercetin. *Nanomaterials*, 11(10), 2658.

- [42] **Wei, C., Li, S., Zhu, Y., Chen, W., Li, C., & Xu, R.** (2022). Network pharmacology identify intersection genes of quercetin and Alzheimer's disease as potential therapeutic targets. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 14, 902092.
- [43] **Wang, W., Sun, C., Mao, L., Ma, P., Liu, F., Yang, J., & Gao, Y.** (2016). The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. *Trends in food science & technology*, 56, 21-38.
- [44] **Carvalho, D., Jesus, Â., Pinho, C., Oliveira, R. F., Moreira, F., & Oliveira, A. I.** (2023). Validation of an HPLC-DAD Method for quercetin quantification in nanoparticles. *Pharmaceuticals*, 16(12), 1736.
- [45] **Bélanger, J. M., Bissonnette, M. C., & Paré, J. J.** (1997). Chromatography: principles and applications. In *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry* (Vol. 18, pp. 1-35). Elsevier.
- [46] **Buchberger, W. W.** (2011). Current approaches to trace analysis of pharmaceuticals and personal care products in the environment. *Journal of Chromatography A*, 1218(4), 603-618.
- [47] **Ahmed, R.** (2024). High-Performance Liquid Chromatography (HPLC): Principles, Applications, Versatility, Efficiency, Innovation and Comparative Analysis in Modern Analytical Chemistry and In Pharmaceutical Sciences.
- [48] **Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Dolan, J. W.** (2011). *Introduction to modern liquid chromatography*. John Wiley & Sons.
- [49] **Beckett, A. H., & Stenlake, J. B. (Eds.).** (1988). *Practical pharmaceutical chemistry: Part II fourth edition* (Vol. 2). A&C Black.
- [50] **Sunil, A., Anju, G., & Rajat, V.** (2018). HPLC detectors, their types and use: a review. *Organic & Medicinal Chemistry International Journal*, 6(5), 143-146.
- [51] **Chatwal, G. R.** (2022). *Instrumental methods of chemical analysis*. Himalaya publishing house.
- [52] **Kenmore, C. K., Erskine, S. R., & Bornhop, D. J.** (1997). Refractive-index detection by interferometric backscatter in packed-capillary high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 762(1-2), 219-225.
- [53] **Willard, H. H., Merritt, L. L., Dean, J. A., & Settle, F. A.** (1986). Instrumental methods of analysis, CBS Publishers and Distributors. *New Delhi*, 580, 626.
- [54] **Swartz, M.** (2010). HPLC detectors: a brief review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 33(9-12), 1130-1150.
- [55] **Bakour, M., Campos, M. D. G., Imtara, H., & Lyoussi, B.** (2020). Antioxidant content and identification of phenolic/flavonoid compounds in the pollen of fourteen plants using HPLC-DAD. *Journal of Apicultural Research*, 59(1), 35-41.
- [56] **Plastina, P., Bonofiglio, D., Vizza, D., Fazio, A., Rovito, D., Giordano, C., ... & Gabriele, B.** (2012). Identification of bioactive constituents of Ziziphus

- jujube fruit extracts exerting antiproliferative and apoptotic effects in human breast cancer cells. *Journal of ethnopharmacology*, 140(2), 325-332.
- [57] **Yu, L., Jiang, B. P., Luo, D., Shen, X. C., Guo, S., Duan, J. A., & Tang, Y. P.** (2012). Bioactive components in the fruits of *Ziziphus jujuba* Mill. against the inflammatory irritant action of *Euphorbia* plants. *Phytomedicine*, 19(3-4), 239-244.
- [58] **Huang, Y. L., Yen, G. C., Sheu, F., & Chau, C. F.** (2008). Effects of water-soluble carbohydrate concentrate from Chinese jujube on different intestinal and fecal indices. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(5), 1734-1739.
- [59] **Cheng, D., Zhu, C., Cao, J., & Jiang, W.** (2012). The protective effects of polyphenols from jujube peel (*Ziziphus Jujube* Mill) on isoproterenol-induced myocardial ischemia and aluminum-induced oxidative damage in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 50(5), 1302-1308.
- [60] **Li, J., Shan, L., Liu, Y., Fan, L., & Ai, L.** (2011). Screening of a functional polysaccharide from *Zizyphus Jujuba* cv. Jinsixiaozao and its property. *International journal of biological macromolecules*, 49(3), 255-259.
- [61] **Yoo, K. Y., Li, H., Hwang, I. K., Choi, J. H., Lee, C. H., Kwon, D. Y., ... & Won, M. H.** (2010). *Zizyphus* attenuates ischemic damage in the gerbil hippocampus via its antioxidant effect. *Journal of Medicinal Food*, 13(3), 557-563.
- [62] **Guo, S., Duan, J. A., Qian, D., Tang, Y., Wu, D., Su, S., ... & Zhao, Y.** (2015). Content variations of triterpenic acid, nucleoside, nucleobase, and sugar in jujube (*Ziziphus jujuba*) fruit during ripening. *Food Chemistry*, 167, 468-474.
- [63] **Kumar, S., & Pandey, A. K.** (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The scientific world journal*, 2013(1), 162750.
- [64] **Shah, K., Chokshi, A., & Vyas, N.** (2024). Development of RP-HPLC-DAD method for quantitative analysis of quercetin and piperine in botanical extracts.
- [65] **Wojdyło, A., Carbonell-Barrachina, Á. A., Legua, P., & Hernández, F.** (2016). Phenolic composition, ascorbic acid content, and antioxidant capacity of Spanish jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) fruits. *Food chemistry*, 201, 307-314.
- [66] **Liao, L., Won, T. H., Kang, S. S., & Shin, J.** (2012). Simultaneous analysis of bioactive metabolites from *Ziziphus jujuba* by HPLC–DAD–ELSD–MS/MS. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 42, 21-31.
- [67] **Xue, X., Zhao, A., Wang, Y., Ren, H., Du, J., Li, D., & Li, Y.** (2021). Composition and content of phenolic acids and flavonoids among the different varieties, development stages, and tissues of Chinese Jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.). *PloS one*, 16(10), e0254058.

- [68] **Sultana, B., & Anwar, F.** (2008). Flavonols (kaempferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal plants. *Food chemistry*, 108(3), 879-884
- [69] **Ozcan, C., Dilgin, Y., & Yaman, M.** (2012). Determination of quercetin in medicinal plants such as rose hip (*Rosa canina*), bettle (*Urtica dioica*), terebinth (*Terebinthina chica*) and purslane (*Portulace oleracea*) using HPLC-MS method.
- [70] **Özcan, C.** (2009). Semizotu, ısırgan otu, menengiç ve kuşburnu gibi tıbbi ve aromatik bitkilerde flavonollerin HPLC-MS ile tayini. Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- [71] **Friedman, M., & Jürgens, H. S.** (2000). Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(6), 2101-2110.
- [72] **Karakaya, S., & EL, S. N.** (1999). Quercetin, luteolin, apigenin and kaempferol contents of some foods. *Food Chemistry*, 66(3), 289-292.
- [73] **Arslan, D., Ünver, A., & Özcan, M.** (2005). Kersetin. *Akademik Gıda*, 3(2), 16-21.
- [74] **Kadam, A., Ozkan, K., Du, P., Koksel, H., Sagdic, O., & Koksel, F.** (2025). Impact of Pea Protein Isolate Enrichment on the Nutritional, Functional, and Glycemic Properties of Tarhana. *Plant Foods for Human Nutrition*, 80(1), 30.
- [75] **Ang, L. F., Yam, M. F., Fung, Y. T. T., Kiang, P. K., & Darwin, Y.** (2014). HPLC method for simultaneous quantitative detection of quercetin and curcuminoids in traditional chinese medicines. *Journal of pharmacopuncture*, 17(4), 36.