



**MANTARLARDA NÜKLEİK ASİT BİLEŞİKLERİNİN
SIVI KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİ İLE TAYİNİ**

İbrahim CAMCI

İLAÇ ENDÜSTRİSİNDE AR -GE ÜRETİM ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Saliha Ebru BÜYÜKTUNCEL**

Yüksek Lisans Tezi-2023

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MANTARLARDA NÜKLEİK ASİT BİLEŞİKLERİNİN
SIVI KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİ İLE TAYİNİ**

İbrahim CAMCI

**İlaç Endüstrisinde Ar-Ge Üretim Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı:
Prof. Dr. S. Ebru BÜYÜKTUNCEL**

Bu Araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından TYL
2019/ 1957 Proje numarası ile desteklenmiştir

**MALATYA
2023**

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

ETİK BEYANI

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak “Prof. Dr. S. Ebru Büyüktuncel” danışmanlığında hazırlayıp sunduğum “Mantarlarda Nükleik Asit Bileşiklerinin Sıvı Kromatografisi Yöntemi ile Tayini” başlıklı Yüksek Lisans tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim. 03/02/2023

İbrahim Camcı

İmza

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Ses Dalgaları-Destekli Sıvı Ekstraksiyonu (Sonication-Assisted Liquid Extraction, SAE)	3
2.2. Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonu (Pressurized Liquid Extraction, PLE)	4
2.3. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi Cihazı (High Performance Liquid Chromatography, HPLC).....	5
2.3.1. Çözücü Hazneleri.....	6
2.3.2. Pompa.....	10
2.3.3. Enjeksiyon Sistemi.....	11
2.3.4. Kolon Sistemi	12
2.3.5. Dedektörler.....	17
2.4. Sistem Uygunluk Parametreleri.....	21
2.4.1. Dağılma Katsayısı.....	21
2.4.2. Alıkonma Zamanı.....	22
2.4.3. Kapasite faktörü.....	22
2.4.4. Seçicilik faktörü.....	23
2.4.5. Kolon Ayırma Gücü.....	23
2.4.6. Kromatografik Kolon Etkinliği.....	24
2.4.7. Kuyruklanma Faktörü (T) ve Asimetri Faktörü.....	24
2.5. HPLC ile Nicel Analiz.....	25
2.5.1. Örnek Hazırlanması.....	25
2.5.2. Kalibrasyon Teknikleri.....	26
2.6. Analitik Yöntem Validasyonu Parametreleri.....	28

2.6.1. Seçicilik, Özgünlük.....	29
2.6.2. Kesinlik.....	29
2.6.3. Doğruluk.....	29
2.6.4. Geri Kazanım.....	30
2.6.5. Kalibrasyon/ Standart Eğrisi.....	30
2.6.6. Hassasiyet.....	30
2.6.7. Saptama Alt Sınırı (LOD).....	30
2.6.8. Alt Tayin Sınırı (LOQ).....	31
2.7. Literatür Özeti.....	32
3. MATERYAL VE METOT.....	36
3.1. Reaktif ve Materyaller.....	36
3.2. Cihazlar.....	41
3.3. Yöntem.....	41
3.3.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması.....	41
3.3.2. Kromatografik Şartların Optimizasyonu.....	41
3.3.3. Mantar Örneklerinin Ekstraksiyonu.....	42
4. BULGULAR.....	44
4.1. Foto Diyot Dizisi Dedektörü Kullanarak Etken Madde Ayrımının Optimize Edilmesi.....	44
4.2. Sistem Uygunluk Parametrelerinin Hesaplanması.....	47
4.2.1. Kapasite Faktörü (k').....	47
4.2.2. Seçicilik Faktörü (α) ve Ayırıcılık (R).....	48
4.2.3. Teorik Tabaka Sayısı (N), Kuyruklanma ve Asimetri Faktörü.....	48
4.3. Metot Validasyonu.....	49
4.3.1. Kalibrasyon Eğrisi.....	49
4.3.2. Kesinlik ve Doğruluk.....	51
4.4. Mantar Örneklerindeki Nükleotidlerin Tayini.....	53
4.4.1. Ses Dalgaları Destekli Sıvı Ekstraksiyonun Yönteminin Optimize Edilmesi.....	53
4.4.2. Basıncılı Sıvı Ekstraksiyonu Yönteminin Uygulanması.....	54
5. TARTIŞMA.....	68
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	73
KAYNAKLAR.....	75

EKLER.....	81
EK.1. ÖZGEÇMİŞ.....	81
EK.2.	82



TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda ilgisini ve desteğini esirgemeyen bilgisi ve deneyimleriyle beni yönlendiren değerli danışman hocam Prof. Dr. Saliha Ebru BÜYÜKTUNCEL'e; Laboratuvar cihazlarından faydalandığımız Sayın Doç. Dr. Emine Şalva'ya; Basınçlı sıvı ekstraksiyonu cihazını kullanmamızda yardımcı olan Sn. Prof. Dr. Selim Erdoğan'a ve her zaman yanımda olan canım aileme tüm içtenliğimle teşekkür ediyorum.



ÖZET

Mantarlarda Nükleik Asit Bileşiklerinin Sıvı Kromatografisi Yöntemi ile Tayini

Amaç: Mantarlardaki dikkat çekici nükleosit rezervuarı nedeniyle, son zamanlarda bunların dağılımının nitel ve nicel olarak belirlenmesi önem kazanmıştır. Bu çalışmada Tekirdağ yöresinden toplanan yenilebilir mantar türlerindeki bazı nükleosit ve nükleobazların HPLC sistemi ile analiz edilmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Analizi yapılan mantar türleri sırasıyla Trüf (*Tuber borchii*), Trüf (*Tuber aestivum*), Borazan (*Craterellus fallax*), Kuzu Göbeği (*Morchella esculenta*), Porcini (*Boletus edulis*), Sığır Dili (*Hydnum repandum*), Sarı Kız (*Cantharellus cibarius*) ve Kanlıca (*Lactarius Salmonicolor*) mantarlarıdır. Mantarlar liyofilize edildikten sonra -20°C’de muhafaza edilmişlerdir. Mantarda bulunan nükleotidler ters faz sıvı kromatografisi yöntemi ile analiz edilmiştir. Bileşiklerin ayrılması gradient elüsyonla SWEA C₁₈ kolonu (4.6 mm x 250 mm, 5µm) ile gerçekleştirilmiştir. A çözücüsü olarak pH’sı 3.7 olan MeOH: 50 mM sodyum fosfat tamponu (1:99, h/h) karışımı; B çözücüsü olarak pH’sı 6.2 olan MeOH: 50 mM sodyum fosfat tamponu (20:80) kullanılmıştır. İç standart 3-metil ksantindir. Yöntem valide edilmiştir. Liyofilize edilen mantar örneklerini ekstrakte etmek için ses dalgaları destekli sıvı ekstraksiyonu ve basınçlı sıvı ekstraksiyonu olmak üzere iki farklı ekstraksiyon yöntemi ile kullanılmıştır. Ekstraksiyon çözücüsü olarak deiyonize su kullanılmıştır. Sıcaklık, zaman gibi parametreler optimize edilmiştir.

Bulgular: 14 nükleotit 25 dakika sürede 254 nm dalgaboyunda eş zamanlı olarak ayrılmıştır. Ses dalgaları ekstraksiyon yönteminin daha etkin olduğu saptanmıştır. Bunun sebebi basınçlı sıvı ekstraksiyonu sisteminin kapalı bir sistem olması ve matriks çözücü etkileşiminin yetersiz kalması olabilir. Çalışılan yenilebilir mantar türleri arasında en yüksek nükleotit miktarına sahip olan tür ün Kuzu Göbeği olduğu bulunmuştur.

Sonuç: Çalışılan tüm mantarlarda en fazla bulunan bileşiklerin adenosin, guanosin ve üridin olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: HPLC-DAD, nükleobaz, nükleosit, yenilebilir mantarlar, ses dalgaları destekli sıvı ekstraksiyonu

ABSTRACT

Determination of the Nucleic Acid Constituents in Mushrooms by Liquid Chromatography

Aim: The remarkable reservoir of nucleotides in mushroom has led to a recent interest in the qualitative and quantitative determination of their distribution. In the present research, it was intended to analyse some nucleosides and nucleobases in edible mushroom species collected from Tekirdağ region by HPLC system.

Material and Method: The analyzed mushroom species are Truffle (*Tuber borchii*), Truffle (*Tuber aestivum*), Black Trumpet (*Craterellus fallax*), Lamb Belly (*Morchella esculenta*), Porcini (*Boletus edulis*), Sığır Dili (*Hydnum repandum*), Chanterelle (*Cantharellus cibarius*) and Kanlıca (*Lactarius salmonicolor*) mushrooms, respectively. After the mushrooms were lyophilized, they were stored at -20°C. The nucleotides in the mushrooms were analyzed by the reverse phase liquid chromatography method. Separation of compounds was accomplished by gradient elution on a SWEA C18 column (4.6 mm x 250 mm, 5µm). A mixture of MeOH: 50 mM sodium phosphate buffer (1:99, v/v) at pH 3.7 as solvent A; MeOH: 50 mM sodium phosphate buffer (20:80) at pH 6.2 was used as solvent B. The internal standard is 3-methyl xanthine. The method has been validated. Two different extraction methods were used to extract the lyophilized mushroom samples, namely, sonication-assisted liquid extraction and pressurized liquid extraction. Deionized water was used as the extraction solvent. Parameters such as temperature and time have been optimized.

Results: The 14 nucleotides were simultaneously separated at a wavelength of 254 nm in 25 minutes. Sonication-assisted liquid extraction method has been found to be more effective. This is because the pressurized liquid extraction system is a closed system and matrix-solvent interaction is insufficient. Among the edible mushroom species studied, Lamb's Belly was found to have the highest nucleotide content.

Conclusion: Adenosine, guanosine and uridine were found to be the most abundant compounds in all mushrooms studied.

Keywords: HPLC-DAD, nucleobase, nucleoside, edible mushrooms, sound wave assisted liquid extraction

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%CV	: Yüzde varyasyon katsayısı
2-DOA	: 2-deoksiadenosin
CRM	: Sertifikalı referans materyal
ELSD	: Evaporatif Işık Saçma Dedektörü
HPLC	: Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi, High Performance Liquid Chromatography.
HPLC-DAD/TOF-MS	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi-diyot dizisi dedektörü /elektron spreyci iyonlaşmalı uçuş zamanlı kütle spektrometresi.
HPLC-DAD/Trap-MSn	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi-diyot dizisi dedektörü/ iyon tuzaklı kütle spektrometresi
ICH	: Uluslararası Uyum Konferansı
IUPAC	: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
k'	: Kapasite Faktörü
LOD	: Saptama Alt Sınırı
LOQ	: Alt Tayin Sınırı
MS	: Kütle Spektrometresi, Mass Spectrometry
N	: Teorik tabaka sayısı
ODS	: Oktadesilsilan
PDA	: Fotodiyot Dizisi Dedektörü
PEEK	: Polieter eter keton
PLE	: Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonu, Pressurized Liquid Extraction
R	: Ayırıcılık
SAE	: Ses Dalgaları-Destekli Sıvı Ekstraksiyonu, Sonication-Assisted Liquid Extraction
T	: Kuyruklanma faktörü
USP	: Birleşik Devletler Farmakopesi
α	: Seçicilik Faktörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sekil No		Sayfa No
Şekil 2.1.	Sonikatör cihazının şematik gösterimi.....	3
Şekil 2.2.	Silindirik problu sonikasyon sistemi.....	4
Şekil 2.3.	PLE sistemi.....	5
Şekil 2.4.	HPLC sistemi.....	6
Şekil 2.5.	HPLC özel süzme sistemi.....	7
Şekil 2.6.	Ultrasonik banyo çözünmüş havanın uzaklaştırılması.....	7
Şekil 2.7.	On-line solvent vakum degazörünün şematik gösterimi.....	8
Şekil 2.8.	İzokratik elüsyon.....	9
Şekil 2.9.	Düşük basınç gradient sistemi.....	9
Şekil 2.10.	Yüksek basınç gradient sistemi.....	10
Şekil 2.11.	Şırınga tipi pompanın şematik diyagramı.....	10
Şekil 2.12.	Pistonlu pompanın şematik diyagramı.....	11
Şekil 2.13.	Rheodyne marka luplu manuel enjeksiyon sistemi	11
Şekil 2.14.	Lupa örneğin enjekte edilmesi ve hareketli fazın örneği kolona doğru taşınması.....	12
Şekil 2.15.	Kolon boyunun ayırma etkisi.....	13
Şekil 2.16.	Partikül boyutunun ayırma etkisi.....	13
Şekil 2.17.	Numunenin kromatografik polarite spektrumu.....	14
Şekil 2.18.	Hareketli fazın kromatografik polarite spektrumu.....	15
Şekil 2.19.	Sabit fazın kromatografik polarite spektrumu.....	15
Şekil 2.20.	Sıvı akış hücresi	18
Şekil 2.21.	PDA'nın şematik gösterimi	18
Şekil 2.22.	Floresans dedektörün şematik gösterimi.....	19
Şekil 2.23.	Kırılma indisi dedektörü.....	19
Şekil.2.24.	Elektrokimyasal dedektör	20
Şekil.2.25.	Evaporatif ışık saçma dedektörünün şematik gösterimi.....	21
Şekil 2.26.	Örnek kromatogram.....	22
Şekil 2.27.	İki bileşenli bir karışımdan elde edilen kromatogram.....	23

Şekil 2.28.	Kuyruklanma ve asimetri faktörünün hesaplaması için parametrelerin kromatogram üzerinde gösterilmesi.....	25
Şekil 2.29.	Örnek süzme filtresi.....	25
Şekil 2.30	Kromatogramdan kalibrasyon eğrisinin oluşturulması.....	27
Şekil 2.31.	Standart ekleme tekniği.....	28
Şekil 3.1.	Nükleotidlerin kimyasal yapıları.....	36
Şekil 3.2.	Analizi yapılan mantar türleri.....	39
Şekil 3.3.	Çelik ekstraksiyon hücreleri.....	42
Şekil 3.4.	Dionex ASE 200 basınçlı sıvı ekstraksiyonu sistemi.....	42
Şekil 4.1.	Hareketli fazın pH'sının ayırma etkisi.....	44
Şekil 4.2.	Etken maddelerin kromatografik ayrımının gösterimi.....	45
Şekil 4.3.	1-40 ppm derişim aralığında elde edilen kromatogramlar.....	49
Şekil 4.4.	Sıcaklığın ekstraksiyona etkisi.....	52
Şekil 4.5.	Zamanın ekstraksiyona etkisi.....	53
Şekil 4.6.	Porçini (<i>Boletus edulis</i>) A. Ultrasonik ekstraksiyon B. Basınçlı sıvı ekstraksiyonu.....	54
Şekil 4.7.	İki ekstraksiyon yönteminin karşılaştırılması.....	55
Şekil 4.8.	Sarıköz (<i>Cantharellus cibarius</i>) A. Ultrasonik ekstraksiyon B. Basınçlı sıvı ekstraksiyonu.....	56
Şekil 4.9.	Kanlıca (<i>Lactarius Salmonicolor</i>) A. Ultrasonik ekstraksiyon B. Basınçlı sıvı ekstraksiyonu.....	57
Şekil 4.10.	Borazan (<i>Craterellus fallax</i>) A. Ultrasonik ekstraksiyon B. Basınçlı sıvı ekstraksiyonu.....	58
Şekil 4.11.	Kuzu Göbeği (<i>Morchella esculenta</i>) A. Ultrasonik ekstraksiyon B. Basınçlı sıvı ekstraksiyonu.....	59
Şekil 4.12.	Sığır Dili (<i>Hydnum repandum</i>) A. Ultrasonik ekstraksiyon B. Basınçlı sıvı ekstraksiyonu.....	60
Şekil 4.13.	Trüf (<i>Tuber Aestivum</i>) A. Ultrasonik ekstraksiyon B. Basınçlı sıvı ekstraksiyonu.....	61
Şekil 4.14.	Trüf (<i>Tuber Borchii</i>) A. Ultrasonik ekstraksiyon B. Basınçlı sıvı ekstraksiyonu.....	62

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No		Sayfa No
Tablo 2.1.	Gazların sudaki çözünürlükleri	8
Tablo 2.2.	Yaygın HPLC dedektörleri ve özellikleri.....	17
Tablo 3.1.	Çalışmada kullanılan etken maddeler.....	35
Tablo 3.2.	Çalışmada kullanılan reaktifler	38
Tablo 3.3.	Optimum ayırma koşulları.....	41
Tablo 4.1.	Gradient programı.....	44
Tablo 4.2.	Nükleotitlerin bağıl alıkonma zamanları.....	45
Tablo 4.3.	Kapasite Faktörleri.....	46
Tablo 4.4.	Seçicilik faktörleri ve ayırıcılık değerleri.....	47
Tablo 4.5.	Teorik tabaka sayısı ve asimetri faktörü değerler.....	48
Tablo 4.6.	Nükleotid bileşiklerinin kalibrasyon eğrileri.....	49
Tablo 4.7.	Etken maddelerin doğruluk değerleri.....	50
Tablo 4.8.	Etken maddelerin kesinlik değerleri (günlerarası).....	51
Tablo 4.9.	Mantarlarda ultrasonik ekstraksiyon yöntemiyle bulunan nükleosit ve nükleobaz miktarları ($\mu\text{g.g}^{-1}$)(n=3).....	63
Tablo 4.10.	Mantarlarda basınçlı sıvı ekstraksiyonu yöntemiyle bulunan nükleosit ve nükleobaz miktarları ($\mu\text{g.g}^{-1}$)(n=3).....	64
Tablo 5.1.	Tuber türlerinin meyve veren gövdesindeki nükleosit ve nükleobaz içerikleri ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	65
Tablo 5.2.	Tm'nin sulu ekstraktındaki bileşiklerin içerikleri (mg/g).....	66
Tablo 5.3.	İncelenen nükleositlerin <i>Cordyceps taii</i> 'deki miktarları.....	67
Tablo 5.4.	Farklı Genoderma türlerinin nükleosirt ve nükleobaz içerikleri.....	69
Tablo 5.5.	<i>Ganoderma lucidum</i> ve <i>G. sinense</i> türlerinin meyve veren gövdesindeki nükleosit ve nükleobaz içerikleri ($\mu\text{g.g}^{-1}$).....	70

1. GİRİŞ

Mantarlar çok eski tarihlerden beri tüketilmektedir. Eski Yunanlılar mantarların savaşçılar için güç sağladığına inanıyordu. Romalılar "Tanrıların Yemeği" olarak kabul ettiler. Yüzyıllar boyunca, Çin kültürü mantarları sağlıklı bir gıda, bir "yaşam iksiri" olarak görmüştür. Günümüzde mantarlar, kalori, karbonhidrat, yağ ve sodyum bakımından düşük oldukları için popüler değerli gıdalardır, ayrıca kolesterol içermezler (1).

Mantarlar yüksek besleyici ve fonksiyonel değere sahip önemli besin kaynakları olarak kabul edilmektedirler. Organoleptik değeri, tıbbi özellikleri ve ekonomik önemi nedeniyle oldukça ilgi çekmektedirler (2). Yüksek protein, lif, vitamin, mineral içerikleri, düşük yağ seviyeleri ve önemli yağ asidi içeriği yenilebilir mantarların besin değerini oluşturmaktadır (3). Yemek mantarları vejetaryen diyetler için çok faydalıdır. Çünkü yetişkinlerin gereksinimleri için gerekli amino asitlerin çoğunu sağlarlar. Besin açısından önemli miktarda riboflavin (B2 vitamini), niasin ve folat ve eser miktarlarda C, B1, B12, D ve E vitaminleri içerirler (4). Yabani mantarlar kültür mantarlarından farklı olarak iyi bir D2 vitamini kaynağıdır. Çünkü kültür mantarları karanlıkta yetiştirilir ve D2 vitamini üretmek için UV-B ışığına ihtiyaç vardır (5). Mantarlar aynı zamanda kalsiyum, potasyum, fosfor ve bakır mineralleri içerir (6). Ayrıca, çevresindeki ağır metalleri biriktiren çok etkili bir mekanizmaya sahiptir. Bu yüzden çevre kirliliği seviyesini belirlemek için kullanılabilirler (7).

Yenilebilir mantarlar polisakkaritler, steroidler, fenoller, terpenoidler ve nükleosidler gibi birçok farklı biyoaktif bileşik içerir. Bunların insan sağlığına sağladığı çeşitli yararları bilinmektedir (1). Son zamanlarda mantarların, antioksidan, antikanser, prebiyotik, immünomodüle edici, antiinflamatuvar, kardiyovasküler, anti-mikrobiyal ve anti-diyabetik özellikleri ortaya çıkmıştır (8-13).

Sitidin, uridin, adenosin, guanosin, timidin and inosin gibi nükleositlerin purinerjik ve / veya pirimidin reseptörleri aracılığıyla insan vücudundaki çeşitli fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde ve modülasyonunda yer aldığı bildirilmiştir (14). Hemen hemen tüm hücrel işlevlerde hayati önem taşıyan DNA ve RNA sentezinde öncül moleküller olarak hareket ederler. Ayrıca nükleosidler ve / veya nükleotidler beyin fonksiyonunu geliştirdiği, bağışıklık cevabını artırdığı, yağ asitleri metabolizmasını etkilediği, bağırsakta

demir emilimine katkıda bulunduğu ve hasardan sonra gastrointestinal sistem onarımını iyileştirdiği rapor edilmiştir (15).

Sağlıklı insanlar vücutlarında nükleotitleri üretebilir ve geri dönüştürebilir. Ayrıca, nükleotitçe zengin gıdalardan sağlanan nükleositler, hastalıkların iyileşmesi ve bağışıklık sistemi problemleri gibi durumlarda faydalı olabilirler. Mantarlardaki dikkate değer nükleosit rezervuarı nedeniyle, bilim insanları son zamanlarda bunların mantarlardaki dağılımı için nitel ve nicel analiz metotları geliştirmişlerdir (16).

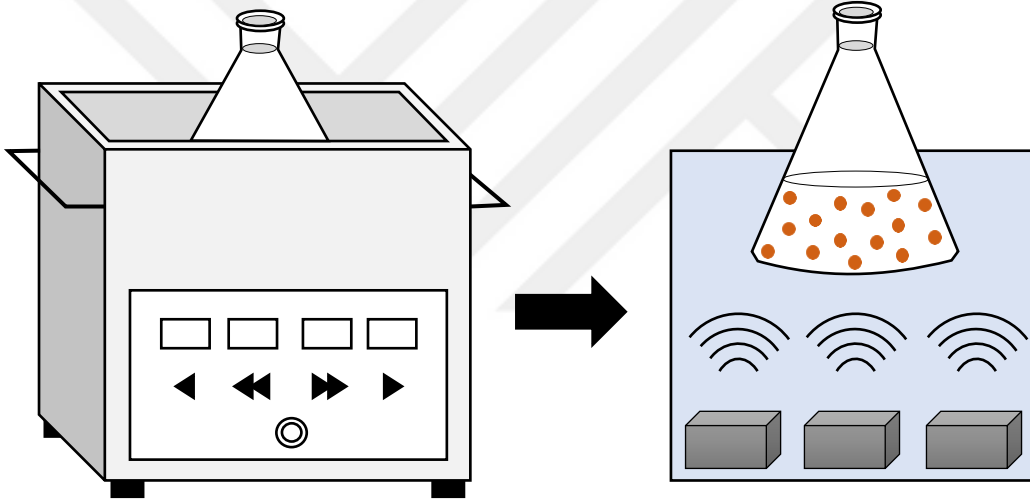
Çalışmamızda yenilebilir mantar türlerinde nükleik asit bileşiklerinin ters faz sıvı kromatografisi yöntemi kullanılarak ve iki farklı ekstraksiyon yöntemiyle tayin edilmesi amaçlanmıştır. Çalışılan mantar türleri Trüf (*Tuber borchii*), Trüf (*Tuber aestivum*), Borazan (*Craterellus fallax*), Kuzu Göbeği (*Morchella esculenta*), Porçini (*Boletus edulis*), Sığır Dili (*Hydnum repandum*), Sarı Kız (*Cantharellus cibarius*) ve Kanlıca (*Lactarius Salmonicolor*) mantarlarıdır. Literatürde Trüf (*Tuber borchii*) ve Trüf (*Tuber aestivum*) ile ilgili çalışma bulunmaktadır. Diğer türlerle ilgili çalışmaya rastlanmamıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ses Dalgaları-Destekli Sıvı Ekstraksiyonu (Sonication-Assisted Liquid Extraction, SAE)

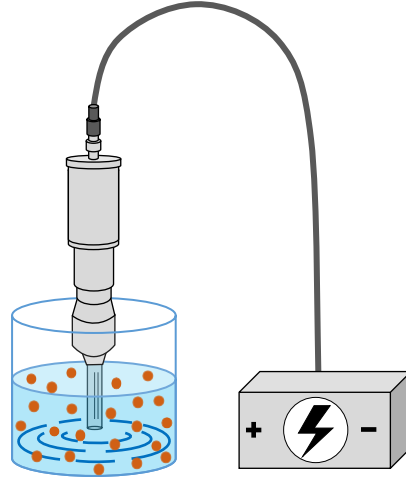
Ultrasonik ekstraksiyon olarak da adlandırılan ses dalgaları destekli sıvı ekstraksiyonunda örneğe 20 kHz üstündeki frekanslarla akustik titreşimler gönderilir. Böylece kavitasyon (boşluk oluşumu) meydana gelir. Kavitasyon etkisiyle sıvı ortamda önemli ölçüde kabarcık oluşur. Bu kabarcıklar sayesinde katılar mekanik olarak sarsılır ve partiküllerin kopmasına neden olur. Ses dalgaları sayesinde çözücü ve katı maddenin etkin olarak temas etmesi ve analitin yüksek oranda geri kazanımı sağlanır (17).

Bu yöntemde laboratuvarlarda en fazla kullanılan ve ekonomik olan cihaz ultrasonik banyodur (18). (Şekil 2.1)



Şekil 2.1. Sonikatör cihazının şematik gösterimi

Bu amaçla silindirik bir prob da kullanılabilir (19). (Şekil 2.2). Prob kullanılırsa ekstraksiyon için harcanan zaman azalır. Fakat daha pahalı ve kısa ömürlüdürler. Ultrasonik banyo ile aynı anda bir çok örnek analiz edilebilir (20).



Şekil 2.2. Silindirik problu sonikasyon sistemi

Sıcaklık, sonikasyon zamanı, örnek miktarı, örneğin partikül büyüklüğü, çözücü hacmi, sonikasyon genliği gibi parametreler optimize edilerek ekstraksiyon verimi artırılır.

Bu yöntemin avantajı, matriksten bağımsız, hızlı ve ekonomik olmasıdır.

2.2. Basıncılı Sıvı Ekstraksiyonu (Pressurized Liquid Extraction, PLE)

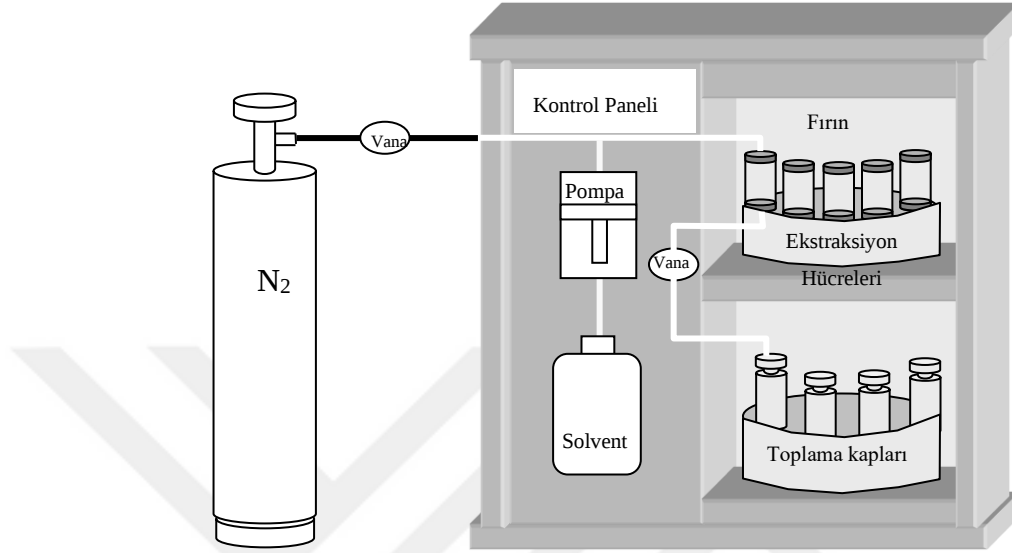
Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu olarak da bilinir. Örneğe yüksek basınç uygulanır. Çözücülerin daha yüksek sıcaklıklarda sıvı halde kullanılmasına olanak sağlar. Sıcaklık verimi etkileyen önemli bir parametredir. Yüksek sıcaklıklar analit ve örnek matriksi arasındaki etkileşimleri bozarak ekstraksiyon verimini artmasına neden olur (21). Sıcaklığı yükselmesi çözücü, analit ve örnek matriksinin yüzey geriliminin düşmesini ve böylece örneğin daha fazla ıslanmasını sağlar. Çözücünün viskozitesini azaltarak örnek matriksiyle etkileşimini ve difüzyon hızını artırır. Bu ekstraksiyon hızının da artması demektir (22). Artan sıcaklık ve basınç ekstraksiyon kinetiğini hızlandırır ve daha etkin bir ekstraksiyon gerçekleşir (23). Basınç uygulanması, örnek matriksinde bulunan hava kabarcıklarının oluşmasını engelleyerek çözücünün analite daha kolay ulaşmasını sağlar (24). Kullanılan çözücü miktarı geleneksel yöntemlere göre azdır. Bununla birlikte termal olarak kararlı olmayan örneklerin ekstraksiyonu için uygun değildir.

Ekstraksiyon verimini sadece uygulanan basınç ve sıcaklık etkilemez. Ekstraksiyon zamanı, çözücü seçimi, çözücü hacmi, yüklenen örnek miktarı, örneğin partikül boyutu da önemli parametrelerdir (25).

PLE sisteminin bileşenleri; fırın, ekstraksiyon hücresi, pompa ve basınç altında tutan sistem, ve toplama kaplarıdır (Şekil 2.3).

Ekstraksiyon basamakları; örneğin ekstraksiyon hücresine yüklenmesi, çözücü ile doldurulması, ekstrakte edilmesi, ekstraktın toplama kaplarına ulaşmasıdır.

Toplanan hacim genellikle 10-100 mL arasındadır. Ekstraktı deriştirmek için buharlaştırma basamağı gerekebilir.



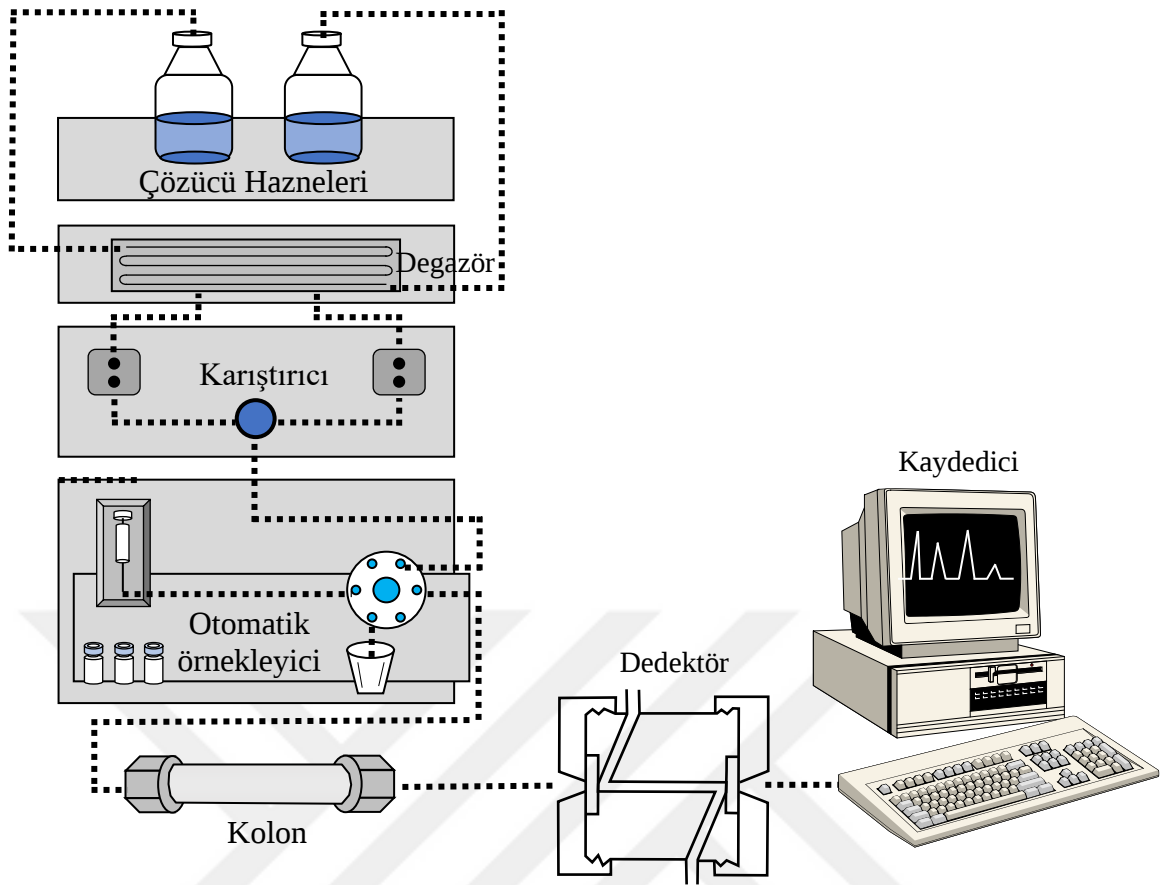
Şekil 2.3. PLE sistemi (26)

2.3. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

HPLC yönteminde kolonda kullanılan dolgu maddelerinin partikül boyutu küçültülür. Böylece sabit faz yüzey alanının artmasıyla birlikte kolonun etkinliği artar. Sabit fazın tanecik boyutunun çok küçük olması nedeniyle hareketli fazın kolondan geçirilebilmesi için belli bir basınç uygulanması gerekir.

HPLC eş zamanlı ayırma ve analiz için pek çok alanda kullanılmaktadır. Nükleik asitler, proteinler, amino asitler, terpenoitler, pestisitler, antibiyotikler, steroidler, hidrokarbonlar, karbonhidratlar, metal organik bileşikler ve bazı inorganik maddeler metodun uygulanabildiği başlıca alanlardır.

Bir HPLC sistemi altı ana bileşenden oluşmaktadır. Bu bileşenler; çözücü hazneleri, pompa, enjeksiyon bloğu, kolon, dedektör ve veri işleme-kaydedicidir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. HPLC sistemi

2.3.1. Çözücü Hazneleri

HPLC’de kullanılan sabit faz kısıtlıdır. Bu nedenle sabit fazı değiştirmek yerine, hareketli fazın bileşimini değiştirerek iyi bir ayırma gerçekleştirebiliriz.

Hareketli fazın saflığı: Hareketli faz içinde bulunabilecek çok düşük oranlardaki safsızlıklar kolonda büyük hasarlara neden olabilir. HPLC’de hareketli faz olarak kullanılacak çözücüler:

- Uçurulduktan sonra çok az artık bırakmalıdır.
- Partikül içermemelidir.
- Kimyasal olarak saflığı % 99.5’den fazla olmalıdır.
- Nem oranı düşük olmalıdır.

Filtrasyon: HPLC’de hareketli faz olarak kullanılan tüm solventler, sistemde kullanılmadan önce mutlaka süzülmalıdır. Filtrasyon işleminde her HPLC laboratuvarında bulunması gereken özel süzme sistemi kullanılmalıdır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. HPLC özel süzme sistemi

Filtrasyonda kullanılan üç tip membran vardır: Su ile geçimli olanlar, organik çözücü ile geçimli olanlar ve her ikisi ile geçimli olanlar. Selüloz ester filtreler sulu çözeltiler için, politetrafloroetilen (PTFE) filtreler organik çözücüler için kullanılır. Naylon filtreler yüksek hem sulu çözeltilerle hem de organik çözeltilerle kullanılabilir. Bu membranların por büyüklüğü 0.2-0.45 μm arasındadır. Özellikle tampon çözeltiler, etanol ve metanol için süzme işlemi çok önemlidir. Asetonitril süzülmeden de kullanılabilir.

Çözünmüş oksijen: Hareketli faz içerisinde çözünmüş olan hava HPLC’de karşılaşılan önemli bir problemdir. Bu hava kabarcıkları, basınçta dalgalanmaya ve dedektörden geçtiklerinde, yalancı pikler neden olurlar. Bu sebeple çözünmüş havanın sistemden uzaklaştırılması gerekir. Bu işleme degaze işlemi denir.

Degaze işlemi: Isıtma ve ultrasonik karıştırıcılarda karıştırma önerilmiştir, ancak yetersizdir (Şekil 2.6).



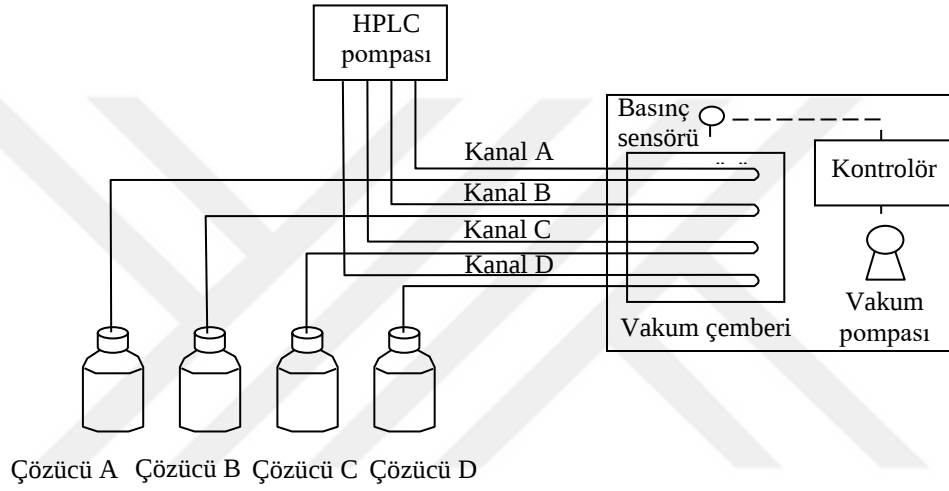
Şekil 2.6 . Ultrasonik banyo çözünmüş havanın uzaklaştırılması

Çözücünden azot veya helyum gibi inert bir gaz geçirerek yapılan degaze işlemi pahalı ama etkili bir yöntemdir. Helyumun çözünürlüğü çok düşüktür. Tablo 2.1’de oksijen, helyum ve azot gazının sudaki çözünürlüğü karşılaştırılmıştır.

Tablo 2.1. Gazların sudaki çözünürlükleri

Gaz	Çözünürlük (mL/100 mL su), 15°C
He	0.94
N ₂	2.37
O ₂	4.89

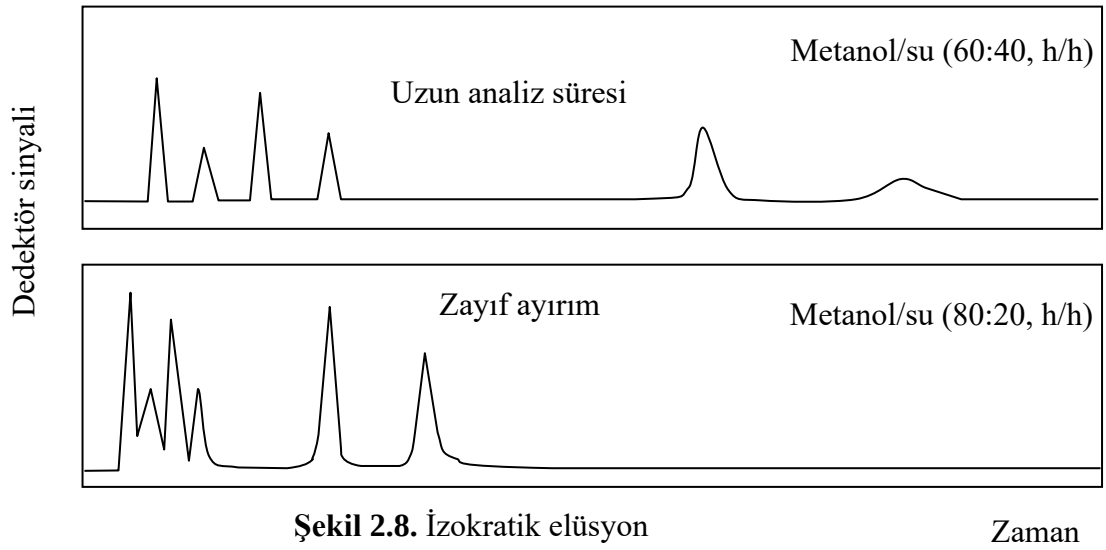
Şekil 2.7’de on-line vakum degazörünü şematik olarak gösterilmektedir. Bu sistemde çözücüdeki küçük gaz molekülleri, yarı geçirgen polimer membranlardan oluşmuş bir vakum çemberinin içinden geçerek elimine edilir.



Şekil 2.7. On-line vakum degazörü

Analizden önce süzölmüş ve degaze edilmiş mobil fazla sistem purge edilerek, bağlantı noktalarının yıkanması sağlanmalıdır. Purge işlemi daha önce kullanılan çözücü veya çözücü karışımının ve hava kabarcığının sistemden atılmasını sağlar. Purge işlemi yüksek akış hızında (5-10 ml/dakika) 2-3 dakika süreyle yapılır.

HPLC’de, iki tür ayırma gerçekleştirilir: İzokratik elüsyon ve gradient elüsyon. İzokratik elüsyonda çözücü bileşimi ayırma işlemi boyunca değişikliğe uğramaz. Bu da uzun analiz süresi ve zayıf ayırıcılık demektir (Şekil 2.8).

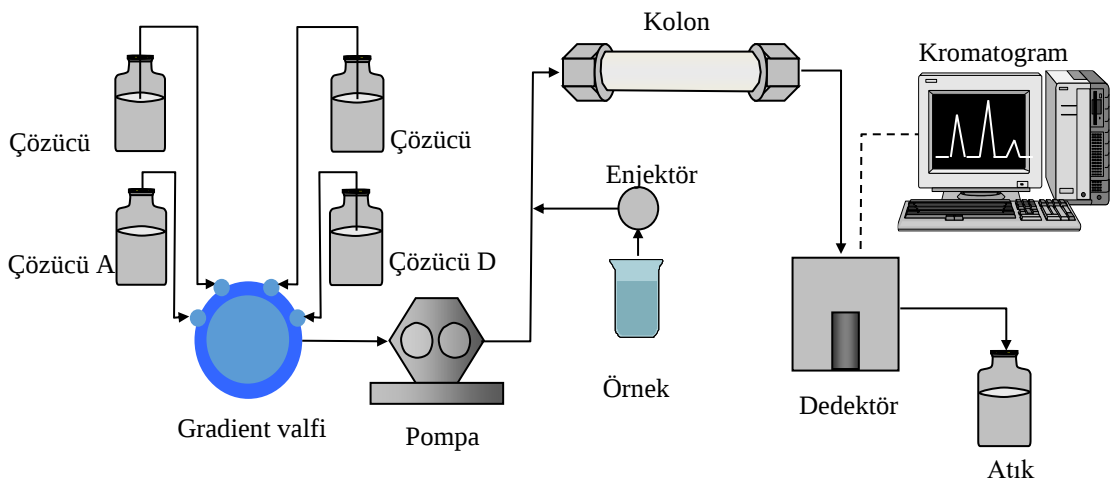


Gradient elüsyonda ayırma esnasında hareketli fazın bileşimi veya pH'sı değiştirilir.

İki tür çözücü programlayıcı vardır:

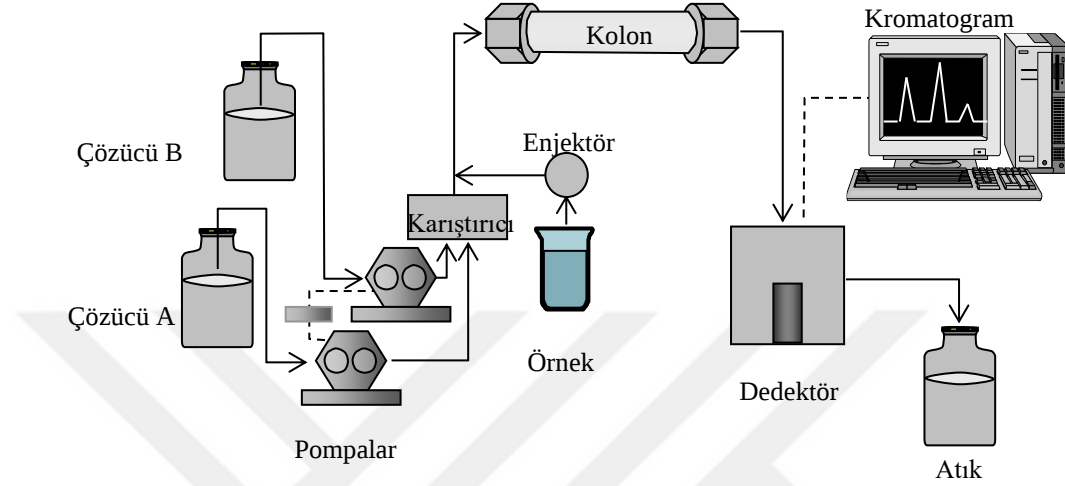
- 1) Düşük basınç gradient programlayıcı
- 2) Yüksek basınç gradient programlayıcı

1) Düşük basınç gradient programlayıcı: Bu sistemlerde, karıştırma işlemi pompadan önce gerçekleşir. Farklı çözücüler atmosfer basıncında karıştırıldıktan sonra yüksek basınçla pompalanır.



Şekil 2.9. Düşük basınç gradient sistemi

2) Yüksek basınç gradient programlayıcı: Yüksek basınç gradient sistemlerde, her bir çözücü ayrı yüksek basınç pompasıyla taşınır ve yüksek basınçta karıştırılır; yani karıştırma pompadan sonra gerçekleşir. Bu sistemin avantajı, kesin ve tekrarlanabilir bir karıştırma sağlaması ve konsantrasyon değişikliklerine hızlı cevap vermesidir.

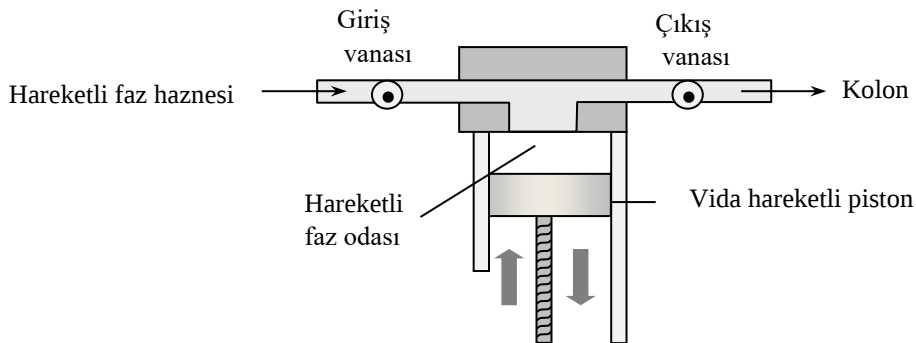


2.3.2. Pompa

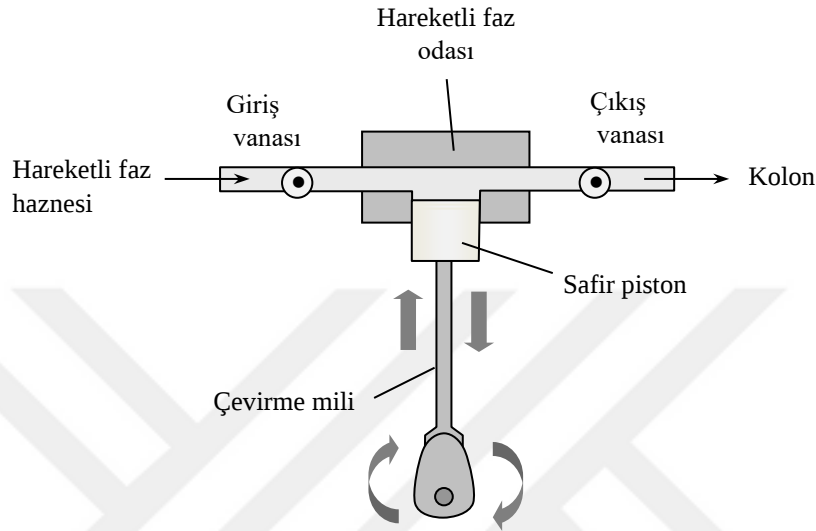
LC sisteminde başlıca iki tip pompa kullanılır:

1. Sürgülü pompalar (Şırınga tipi pompalar)
2. Pistonlu pompalar

1. Sürgülü pompalar: Şırınga tipi bir pistondan oluşur. Avantajı geri basınç ve viskoziteden bağımsız olarak bir akış vermesi ve vurusuz çıktı üretmesidir. Sınırlı çözücü kapasitesine sahip olması ise dezavantajıdır (27-29).



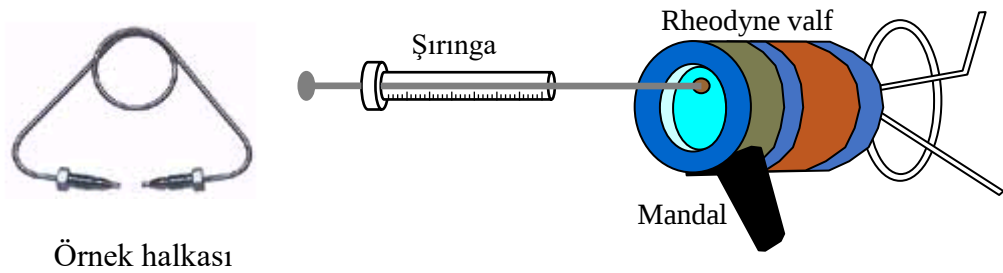
2. **Pistonlu pompalar:** Bu sistemde motor kontrollü ileri-geri hareket eden bir piston yardımıyla çözücü küçük bir bölmeden pompalanır (Şekil 2.12). Dezavantajı vurulu bir akış üretmeleridir. Modern cihazlarda, çift yönlü pompa başlıkları kullanılarak bu vurular azaltılmıştır. Gradient elüsyona uyumlu olmaları, çözücü kapasitesinin fazla olması avantajlarından bazılarıdır (27, 29).



Şekil 2.12. Pistonlu pompa (30)

2.3.3. Enjeksiyon Sistemi

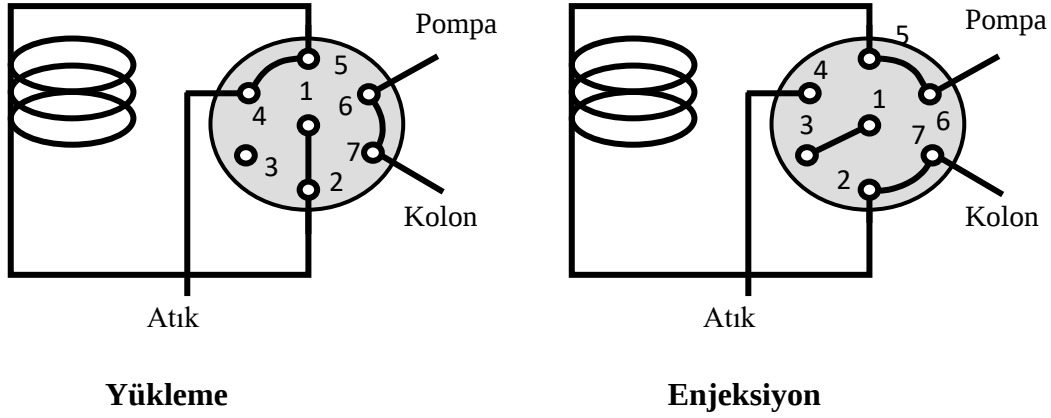
Yaygın kullanılan luplu enjektörlerde, enjeksiyon valfi ve numune lupundan oluşan enjeksiyon portları aracılığıyla numune uygulanır. Luplu enjektörlere bir örnek olarak (Rheodyne marka) 6 girişli (six-port) bir valf aşağıda görülmektedir



Şekil 2.13. Rheodyne marka luplu manuel enjeksiyon sistemi

Yükleme pozisyonunda, numune, bir şırıngayla örnek halkasının içine enjekte edilir (Port 1). Bu esnada hareketli faz pompadan kolona doğru geçmeye devam eder ve dedektörde sabit bir taban çizgisi oluşturur (Port 6 ve 7). Valfin enjeksiyon pozisyonuna çevrilmesiyle, hareketli fazın akış yolunu hızla değiştiririz (Port 5 ve 6). Pompadan gelen

hareketli faz örnek halkasının içinden geçerek örneği kolona taşır (Port 6 ve Port 7) (Şekil 2.14).



Şekil 2.14. Lupa örneğin enjekte edilmesi ve hareketli fazın örneği kolona doğru taşınması (31).

Günümüzde otomatik örnek enjeksiyon sistemleri, kısa sürede ve yüksek kesinlikle çok sayıda örneğin analiz edilmesine olanak sağlar (28).

2.3.4. Kolon Sistemi

Kolon, bileşiklerin ayrılmasından sorumlu olduğu için yüksek performanslı sıvı kromatografisinin analizindeki temel bileşendir. Örnek çözelti, hareketli faz ile birlikte kolon boyunca hareket eder ve bileşenlerine ayrılmış olarak kolonu terk eder.

HPLC Kolon Türleri

Bileşimlerine ve ayırma sistemlerine bağlı olarak sıvı kromatografisi için çeşitli HPLC kolon tipleri mevcuttur.

Ters faz HPLC kolonları: Ters fazlı kromatografide, apolar bir sabit faz ve polar bir hareketli faz bulunur. C8 ve C18 gibi bağlı hidrokarbonlar ve diğer polar olmayan hidrokarbonlar, ters faz kolonlarında sabit faz olarak kullanılırken, asit, tampon, metanol, asetonitril gibi sulu bir organik çözücü veya bunun uygun bir karışımları hareketli faz olarak kullanılır.

Normal faz HPLC kolonları: Bu tip kolonlar, hareketli fazdan daha fazla polar sabit faza sahiptir. Örneğin Silika polar bir materyaldir. Fakat su silikadan daha polar olduğu için hareketli faz olarak kullanılamaz. Bunun yerine metilen klorür, hekzan, kloroform gibi çözücüler kullanılabilir.

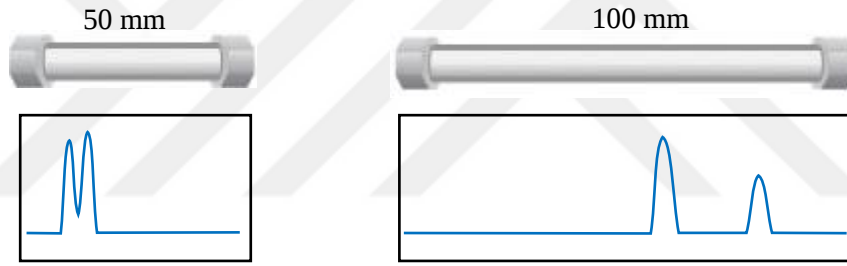
İyon değiştirici HPLC kolonlar: Kolay iyonlaşan moleküllerin analizinde bu kolonlar kullanılır. Çözünmeyen matrikse kovalent bağlarla bağlanmış olan iyon değiştirici

gruplar analitin yüküne göre pozitif veya negatif yüklü olurlar. Hareketli faz sulu bir tampondur. Elüsyon zamanı hareketli fazın pH'sına ve iyonik gücüne bağlıdır.

Boyut eleme HPLC kolonları: Bu kolonlar tipik olarak gözenekli polistiren divinilbenzen veya silika partiküller ile doldurulur. Gözenekli sabit faz, analitlerin boyutlarına göre ayrılmasını sağlar. Küçük çaplı moleküller, gözeneklere girerek daha uzun sürede kolonda kalmış olurlar. Büyük çaplı moleküller ise gözeneklere girmeden kolonu daha çabuk terkederler (28).

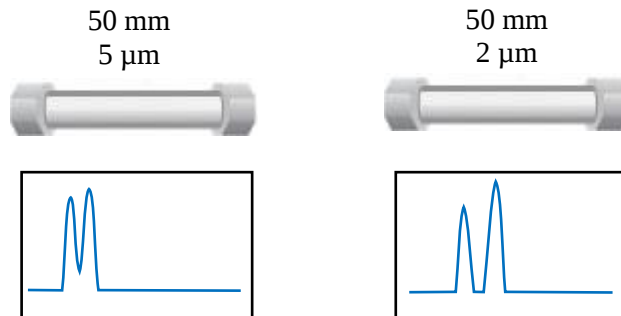
Mekanik Ayırım Gücü

Daha iyi bir ayırım için, daha uzun ve ince bir kolon ve aynı zamanda daha küçük partikül boyutu gerekir. Kolonun etkinliği ve teorik tabaka sayısı artacağından mekanik ayırma gücü artar. Bununla birlikte kolonun boyunun uzatılması ile analiz süresi, çözücü tüketimi ve kolonun geri basıncı artar. Kolon boyunun kısaltılması, mekanik ayırım gücünü azaltarak, analiz süresini kısaltır, geri basıncı düşürür. Geri basınca uygun bir pompa kullanılması gerekir.



Şekil 2.15. Kolon boyunun ayırma etkisi (32)

Kullanılan hareketli faz ve kolon boyu aynı kalmak şartıyla, dolgu materyalinin partikül büyüklüğü küçültüldüğünde kolonun mekanik ayırım gücü artar; geri basınç yükselir.



Şekil 2.16. Partikül boyutunun ayırma etkisi (32)

Kimyasal Ayırım Gücü

Kimyasal ayırım gücünü partikülün kimyası ve hareketli fazın bileşimi tayin eder. İki bileşiğin ayırımını yapabilmek için kullanılacak çok sayıda hareketli faz kombinasyonu olabilir.

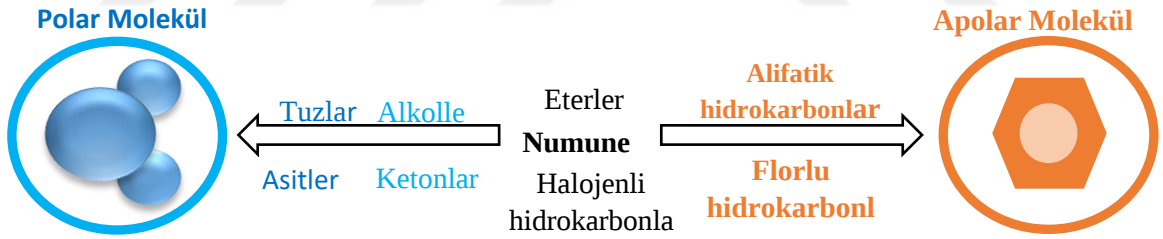
Sabit fazın üç karakteristiği önemlidir:

1. Partikül büyüklüğü
2. Yüzey alanı
3. Polarite özelliği

Partikül büyüklüğü: Büyük partiküllü olanların çapı 35-125 µm, küçük partiküllü olanların çapı ise 5-10 µm'dur. Son yıllarda partikül büyüklüğü 2-3 µm olan kolon materyalleri geliştirilmiştir.

Yüzey alanı: Partiküller porlu (gözenekli) veya peliküler (kabuklu) yapıdadır. Porlar mikro veya makro olabilir ve partikülün yüzey alanını genişletir. Porlu yapıya sahip kolon dolgu materyalleri preparatif amaçla, peliküler yapıya sahip olanlar ise analitik amaçla kullanılır.

Polarite özelliği: HPLC ile analiz yapabilmek için numunenin belli bir çözücünde çözünmesi ve belli polar veya apolar özellikleri taşıması gerekir.



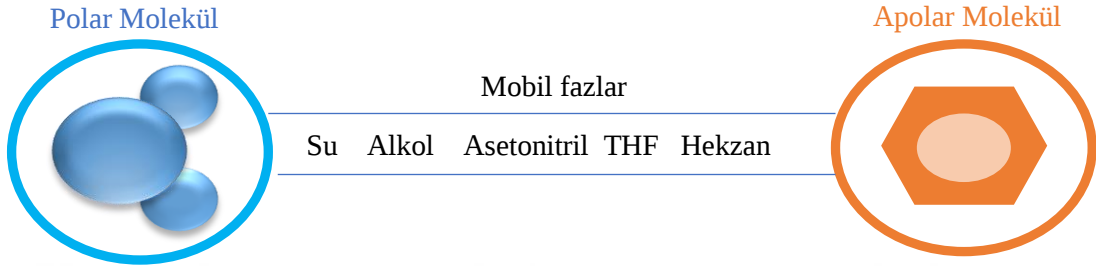
Şekil 2.17. Numunenin kromatografik polarite spektrumu (33)

Molekülün yapısına ve elektron yükü dağılımına dayanarak, moleküllerin bazıları polar, bazıları apolar, bunların dışında kalanlar ise farklı polarite derecelerine sahip olacağından, bir polarite sırası söz konusudur. Örneğin su çok polar sıvılara, parafin yağı ise çok apolar sıvılara örnektir.

HPLC’de ayırımlarında alıkonma mekanizmalarının oluşturulmasında kimyasal bileşiklerin polarite özelliklerinden yararlanır. Kromatografik ayırım sistemi oluşturmak için, farklı polarite özelliklerine sahip sabit faz ve hareketli faz kullanılarak, farklı numune molekülleri için bir yarış oluşturulur. Numune içindeki bileşenler farklı polarite özelliğine sahip olduğundan, kolon dolgu materyali ile aynı polarite özelliğine sahip olanlar sabit

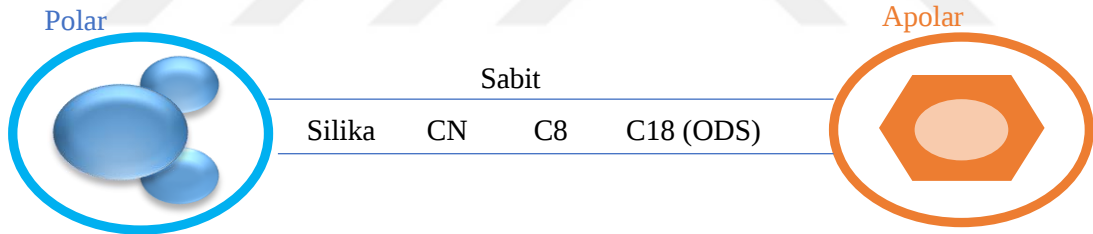
fazla etkileşmeye gireceğinden, kromatografide yavaş ilerleyeceklerdir. Hareketli fazla aynı polariteye sahip olan bileşikler, daha hızlı ilerler. Her bir bileşiğin göreceli etkileşimini değiştirerek, kromatografide ayırım sağlanabilir.

Numune karışımlarının HPLC ile bileşenlerine ayırımı için gerekli yarışmayı sağlamak için hareketli fazın ve sabit fazın polariteleri dikkatli seçilmelidir.



Şekil 2.18. Hareketli fazın kromatografik polarite spektrumu (33)

Şekil 'de gösterildiği gibi su polar, hekzan ise apolar bir çözücüdür. Birbiri ile karışabilir çözücüler farklı oranlarda karıştırılarak, istenilen ayırım performansı sağlanabilir.



Şekil 2.19. Sabit fazın kromatografik polarite spektrumu (33)

Şekil 2.20'de, sabit fazın yani paket materyalinin polaritesi gösterilmektedir. Saf silika, serbest hidroksil gruplarına bağlı süstitüent bulunmaması nedeniyle, çok polardır. Kolon üreticileri silikanın yüzeyini kimyasal olarak modifiye ederek, polaritesini değiştirebilirler. Örneğin silika yüzeyine 18 karbonlu alkil zinciri bağlayarak (C₁₈) silikaya hidrofobik özellik kazandırılabilir (oktadesilsilan, ODS). Günümüzde C₁₈ alkil bağlı-silika kolonlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Numune içinde bulunan bileşenlerin polaritesi farklı olacağından, hareketli fazla sabit faz arasındaki yarıştan yararlanarak numuneyi bileşenlerine ayırmak mümkündür.

Kolon Kullanımı için Önlemler

Kolon içerisinde bulunan sabit faz spesifik bir kimyasal yapıda olup, kolon materyalini taşıyan paslanmaz çelik kadar dayanıklı değildir. Kolon ömrü sınırlı olup, kullanan kişinin bilgisine, kullanım şekline bağlıdır. Kolon ömrünü uzatmak için kolonla enjektör arasına guard kolon (prekolon, ön kolon, protektör kolon, koruyucu kolon) bağlanmalıdır. Guard kolon analitik kolonla aynı dolgu materyalini taşımaktadır. Analitik kolona tersinmez olarak bağlanabilecek kirliliklerin ön kolona bağlanması sağlanarak, analitik kolonun ömrü uzatılmış olur.

Eğer kolon bakımı dikkate alınmazsa analitik kolon bozulabilir; zaman ve para gereksiz yere israf edilmiş olur. Uygun kolon bakımı ile bir kolon en az 6-12 ay dayanıklı kalabilir. Kolonun ömrünü bittiğini gösteren belirtiler:

1. Yüksek geri basınç,
2. Pik şeklinin bozulması (yarılmış pikler, omuzlar) veya kaybolması,
3. Zayıf ayırıcılık, yayvan pikler,
4. Kısalan veya yok olan alıkonma ile seyreden düşük kapasitedir.

Kolon performansını artırmak ve kolon ömrünü uzatmak için alınması gereken önlemler:

1. Fritlerin tıkanmasını önlemek için tüm numune ve standartların enjeksiyondan önce süzülmesidir. Numune ve standartlar tamamen çözünmüş olmalıdır; aksi takdirde pikler yayvan ve kuyruklu olur.
2. HPLC saflıkta çözücüler kullanılmalıdır. Numune ve mobil faz kolondan geçirilmeden önce süzülmesidir. Bir çözücü karışımından diğerine geçiliyorsa, geçimli olup olmadıkları dikkate alınmalıdır. Sabit fazın kimyasal bir şokla karşılaşmasını önlemek için çözücüler kademeli olarak, dikkatle karıştırılmalıdır.
3. Analitik kolonun numune ile kirlenmesini önlemek için sisteme mutlaka koruyucu kolon takılmalıdır. Koruyucu kolon kirli numunede ve mobil fazda bulunan partikülleri ve kuvvetli alıkonan bileşikleri tutarak analitik kolonun ömrünü uzatır.
4. Analize başlamadan önce kolonun tamamen dengeye gelmesi sağlanmalıdır. Ters faz kolonu yaklaşık 20, adsorpsiyon kolonunu ise yaklaşık 100 kolon hacmi çözücü dengeye getirir. Kolon hacmi kolonun içerdiği mobil faz hacmi olup, alıkonmamış bileşiğin alıkonma hacmi ile akış hızının çarpılması ile bulunur.

5. Kolon saklanmadan önce uygun mobil fazla yıkanmalı ve dengeye getirilmelidir. Özel taşıma kutusunda soğuk bir yerde saklanmalı ve kurumaması için her iki ucu sıkıca kapatılmalıdır.
6. Kolon mekanik sarsıntılardan korunmalıdır. Düşürmek veya şiddetli bir yere çarpmak paket yatağının yapısını bozabilir ve kolon performansını zayıflatır.
7. Silika kökenli ters faz kolonlar, polar bağlı fazlar ve iyon değiştirici kolonlarda pH<2 veya pH>7.5 olan çözücülerin kullanılması kolon ömrünü kısaltır.
8. Kolon basıncındaki hızlı değişiklikler veya 4000 psi'den yüksek basınca maruz kalma kolon ömrünü kısaltır.

2.3.5. Dedektörler

Sıvı kromatografide dedektörler iki gruba ayrılırlar.

1. Maddeye Yönelik Dedektörler: Mobil faz içinde bulunan maddenin absorpsiyon, floresans veya difüzyon akımı gibi özelliklerini tayin ederler.
2. Çözeltiye Yönelik Dedektörler: Mobil fazın özelliklerindeki değişmeye bağlı olarak madde tayin edilir. Bu özellikler hareketli fazın kırılma indisi veya iletkenliği gibi genel bir özelliğidir (28, 29).

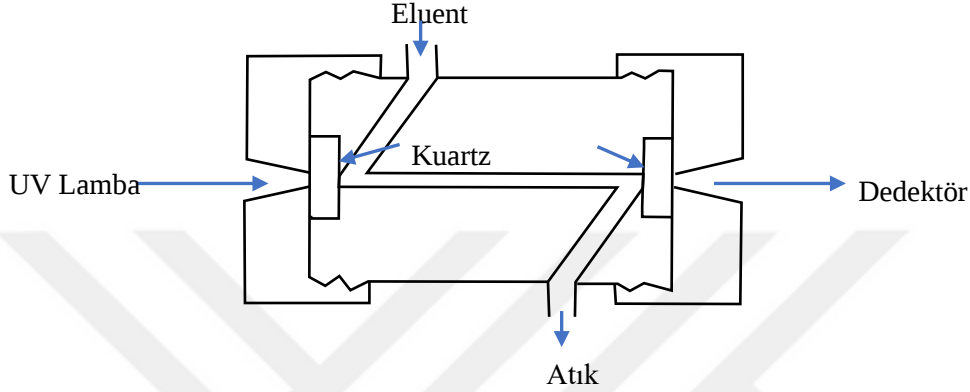
Tablo 2.2. Yaygın olarak kullanılan HPLC dedektörleri (34)

Dedektör	Analit/Özellikler	Duyarlılık
UV/GB absorbans	Maddeye Yönelik: UV kromofor gruplu bileşikler	ng
Diyot dizisi	Maddeye Yönelik: UV/GB dedektörleriyle aynı, UV spektrumu da sağlar	ng
Floresans	Maddeye Yönelik: Doğal floresans maddeler veya floresan etiketli bileşikler	fg-ng
Kırılma indisi	Çözeltiye Yönelik: Polimerler, şekerler, trigliseritler, organik asitler, ilaç katkı maddeleri.	0.1-10 µg
Evaporatif ışık-saçma	Çözeltiye Yönelik: Uçucu olmayan veya yarı uçucu bileşikler, gradiente uyumludur	ng'dan düşük
Elektrokimyasal	Maddeye Yönelik: Elektro-aktif bileşikler	pg
İletkenlik	Maddeye Yönelik: Anyonlar ve katyonlar, organik asitler, yüzey aktif maddeler	ng ppm-ppb
Radyoaktivite	Maddeye Yönelik: Radyoaktif-etiketlenmiş bileşikler	Düşük düzeyler
Kütle spektrometre	Hem Maddeye Yönelik hem Çözeltiye Yönelik: Kesin tespit	fg-pg-ng

UV/GB Absorbans Dedektörleri

UV dedektörü, güvenilirliği, kullanım kolaylığı ve çoğu ilaç molekülü de dahil olmak üzere kromoforik bileşiklere cevabı nedeniyle günümüzde en fazla kullanılan dedektördür.

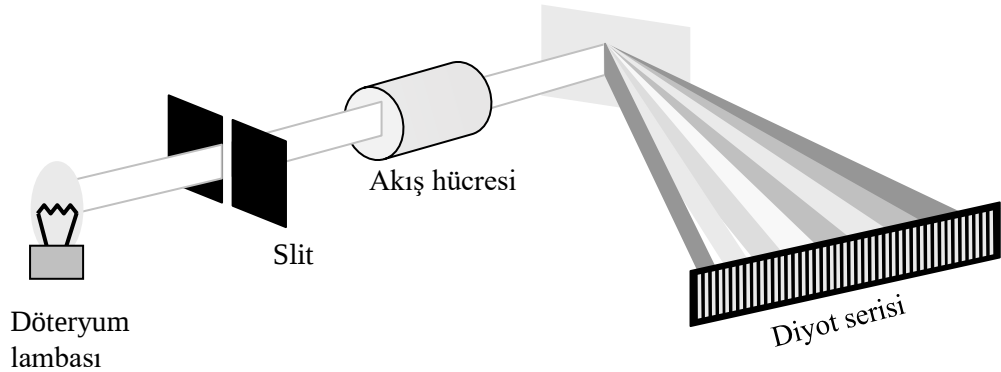
Şekil 2.20’de sıvı akış hücresi şematik olarak gösterilmiştir. Küvet hacmi 1-10 μL ’ye azaltılarak pik genişlemesinin önüne geçilmiştir.



Şekil 2.20. Sıvı akış hücresi (28)

Fotodiyot Dizisi Dedektörü (PDA)

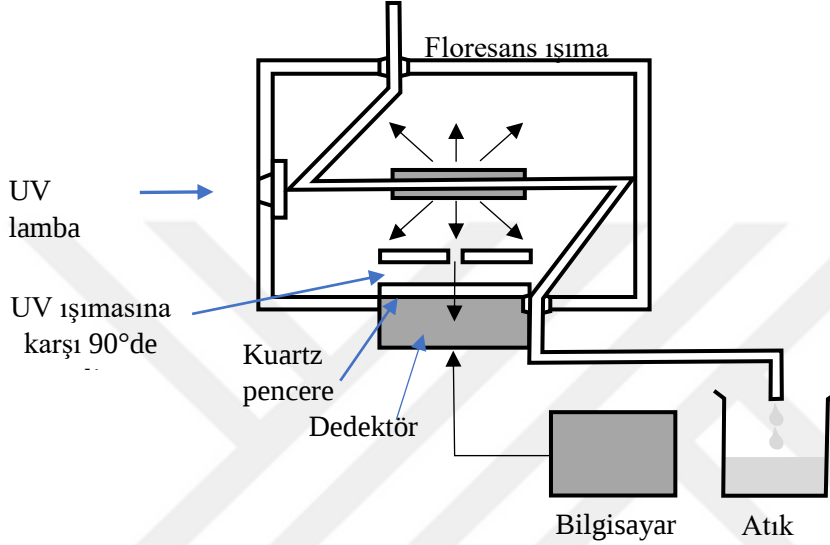
Bir UV-GB dedektörü yalnızca bir numune alma bölümüne sahipken, fotodiyot dizisi dedektörünün özelliği çoklu (512-1024) fotodiyot dizisine sahip olması ve böylece tek seferde geniş bir dalga boyu aralığında bilgi verebilmesidir (Şekil 2.22). (34). PDA’nın UV-VIS dedektörlerinden farkı, lambalardan gelen ışığın doğrudan akış hücresine yansıtılması, akış hücresinden geçen ışığın kırınım ızgarası tarafından dağıtılması ve dağılan ışığın miktarının fotodiyot dizisindeki her dalga boyu için tahmin edilmesidir (35).



Şekil 2.21. PDA’nın şematik gösterimi

Floresans Dedektörleri

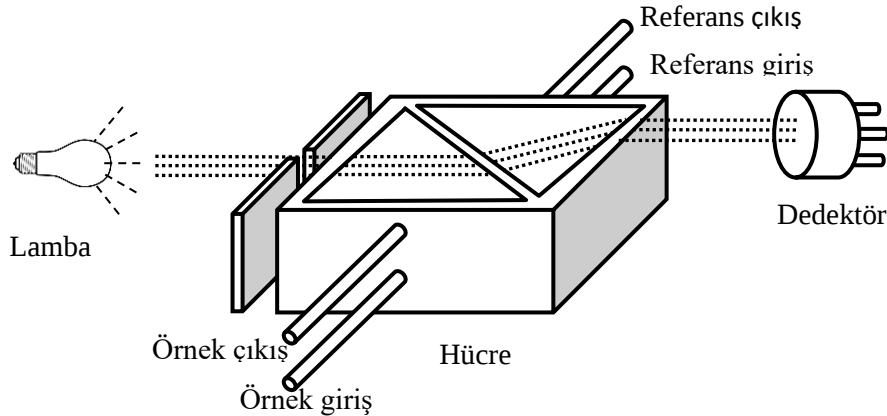
Bu dedektörün kullanımı UV-GB dedektörü kadar yaygın değildir. Belirli bir molekül için hem uyarma hem de emisyon dalga boyları spesifik olduğundan, floresan dedektörleri çok seçici olabilir. Genellikle yüksek hassasiyet ve seçiciliğe sahip olması nedeniyle eser analizi için uygundur (28,34). Her molekülün floresans vermemesi dezavantajıdır. Floresans dedektör kullanılarak steroidler, çok sayıda vitamin, flavanoitler, proteinler, penisilin ve prokain gibi maddeler tayin edilebilir.



Şekil 2.22. Floresans dedektörün şematik gösterimi

Kırılma İndisi Dedektörleri

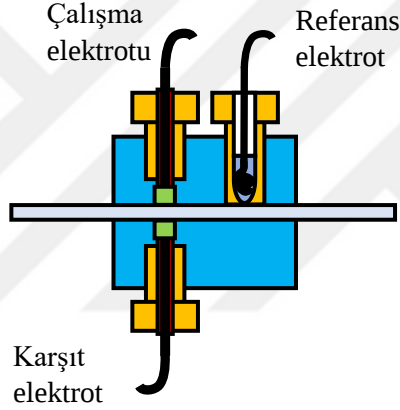
Bir kırılma indisi dedektörünün çalışma prensibi, saf hareketli faz ile örnek bileşenini içeren hareketli faz arasındaki kırılma indisi farkını ölçmektir. Mobil faz analit içerdiğinde iki çözelti arasında kırılma indisi farkı olacağı için gelen ışında kırılma olur (28,29,34).



Şekil 2.23. Kırılma indisi dedektörü

Elektrokimyasal Dedektörler

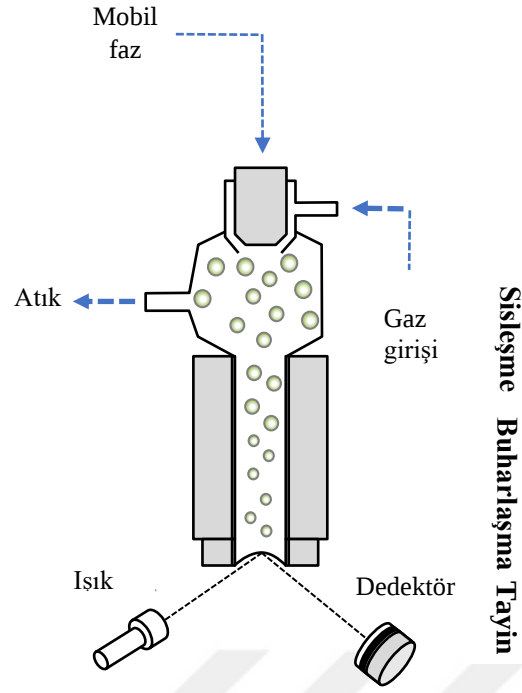
Elektrokimyasal dedektörler, oldukça duyarlı dedektörlerden bir tanesidir. Yükseltgenebilen ve indirgenebilen maddeler bu dedektörle tayin edilebilir (36). Maddenin yükseltgenme-indirgenme reaksiyonu sonucu ortaya çıkan akımın ölçülmesi esasına göre tayin yapılır (Şekil 2.25). Hareketli faz elektrolit içermeli ve iletken olmalıdır. Akımın miktarı maddenin konsantrasyonu ile orantılı olduğundan kantitatif analiz için uygundur. Seçicilik ve hassasiyet yüksektir. Basit ve ucuz bir dedektördür. Uygulama alanı yükseltgenebilen ve indirgenebilen maddelerle sınırlıdır. Elektrokimyasal tayin için amperometri, voltametri, klorimetri ve kondüktometriden faydalanılabilir. Bu dedektörlerin başlıca dezavantajı, gradient elüsyona uyumlu olmamasıdır (28,29).



Şekil 2.24. Elektrokimyasal dedektör

Evaporatif Işık Saçma Dedektörü (ELSD)

Bu dedektörde, üç ana işlem vardır: (1) sisleştirme, (2) buharlaşma ve (3) tayin. Sisleştirmede kolondan gelen eluent, inert bir gazla karıştırılır ve homojen bir sis oluşturmak için bir nebulizörün dar ağzından geçer. Bu ince sis, ilgilenilen bileşiği içeren hareketli faz damlacıklarından oluşur. Buharlaştırma basamağında nebulize edilmiş eluent, hareketli fazı buharlaştırmak için ısıtılmış bir sürüklenme borusundan geçer. Tayin basamağında katı parçacıkların akışı, bir ışık kaynağı ve bir fotoçoğaltıcı veya bir fotodiyot içeren bir akış hücresine girer. Parçacıklar tarafından saçılan ışığın şiddeti, ayrıştırılan bileşiğin kütlesi ile doğrudan ilişkilidir (Şekil 2.26) (34,35).



Şekil 2.25. Evaporatif ışık saçma dedektörünün şematik gösterimi

Kütle Spektrometresi (MS)

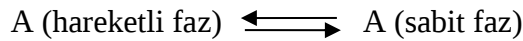
Sıvı kromatografisinin ayırma gücü ve kütle spektrometresinin teşhis gücü birleştirilmiştir (34). Fakat kütle spektrometresi için, örneğin gaz fazında olması gerekir. Bu yüzden ilk olarak sıvı kromatografisinden gelen çözücü buharlaştırılmalıdır. Fakat oluşan gaz hacmi kütle spektrometresi için fazla olduğunda dolayı, büyük bir kısmının MS'e girmeden önce uzaklaştırılması gereklidir. Son yıllarda, iki veya daha fazla kütle analizörü bağlanarak, tandem kütle spektrometreleri oluşturulmuştur (29).

2.4. Sistem Uygunluk Parametreleri

Analiz yaparken sistemin doğru bir şekilde çalıştığını göstermek için sistem uygunluk parametreleri hesaplanmalıdır (37).

2.4.1. Dağılma Katsayısı

Analizi yapılacak maddelerin her iki fazdaki madde derişimi önemlidir. Maddeler bu iki faz arasında dağılır ve bir süre sonra bir dengeye ulaşır. Buna göre, A türünün hareketli faz ile sabit fazdaki derişimleri arasında,



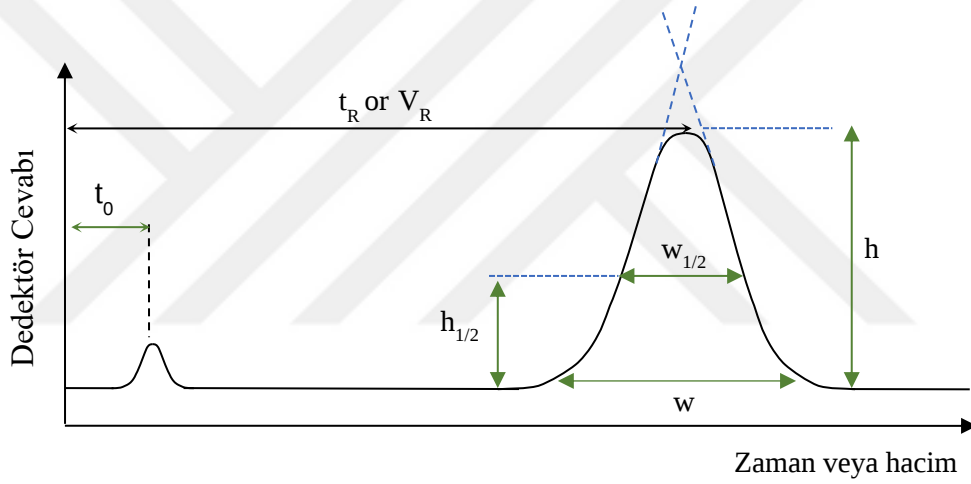
şeklinde bir denge oluşur.

Bu dengenin sabiti, K dağılma katsayısı olarak adlandırılır.

$$K(\text{dağılma katsayısı}) = \frac{C_s(\text{sabit fazdaki madde derişimi})}{C_h(\text{hareketli fazdaki madde derişimi})}$$

2.4.2. Alıkonma zamanı

Kromatografik bir pik alıkonma zamanı (t_R), pik genişliği (w) ve pik yüksekliği (h) ile tanımlanır. Numunenin kolona enjekte edilmesinden dedektöre ulaşmasına kadar geçen zamana **alıkonma zamanı** (t_R) denir. Bir kolondan bir bileşiğin elue edilmesi için gereken hareketli fazın hacmine, **alıkonma hacmi** (V_R) denir. **Ölü zaman** (t_0) kolonda tutulmayan maddenin dedektöre ulaşmasına kadar geçen zamandır (Şekil 2.26). Başka bir deyişle kolonda tutulmayan türün kolonda ilerleme hızı, hareketli faz moleküllerinin ortalama hızına eşittir.



Şekil 2.26. Örnek kromatogram

2.4.3. Kapasite faktörü

Bir bileşenin, sabit ve hareketli fazlardaki mol sayılarının oranına kapasite faktörü, k' , denir. Aşağıdaki formülle hesaplanır.

$$k' = \frac{KV_s}{V_m} = \frac{V_R - V_m}{V_m} = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

K = Analitin dağılma katsayısı

V_s =Kolondaki sabit fazın hacmi

V_m =Mobil fazın hacmi

V_R =Analitin alıkonma hacmi

t_R = Analitin alıkonma zamanı

t_0 = alıkonmayan bileşiklerin alıkonma zamanı

t_R ve t_0 değerleri bir kromatogramdan kolaylıkla bulunabilir. Eğer, bir tür için kapasite faktörü, k' , 1'den küçükse, elüsyon süresi çok kısa olur. Bu durumda türün alıkonma zamanı t_R doğru olarak ölçülemez. Tam tersine, kapasite faktörünün 10-15 civarında olması elüsyon süresinin çok uzun olduğunu gösterir. Uzayan elüsyon süresi, genişleyen pikler demektir. İdeal bir kromatografik ayırma için kapasite faktörlerinin 2 ile 5 arasında olması beklenir.

2.4.4. Seçicilik faktörü:

Seçicilik faktörü α ile gösterilir. İki bileşenli bir numunenin seçicilik faktörü,

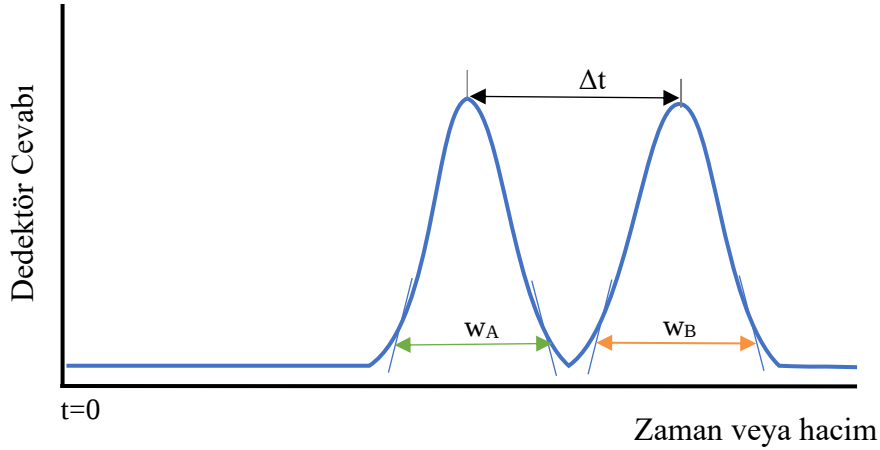
$$\alpha = \frac{K_B}{K_A} = \frac{(t_R)_A - t_0}{(t_R)_B - t_0}$$

formülüyle hesaplanır. K_B sabit faz tarafından daha kuvvetle tutulan ve daha yavaş elüe olan B türüne ait dağılma katsayısıdır. K_A ise sabit faz tarafından daha zayıf tutulan ve daha hızlı kolonu terkeden A türüne ait dağılma katsayısıdır. Bu durumda α daima 1'den büyük olmalıdır.

2.4.5. Kolon Ayırma Gücü

Bir kolonun ayırma gücü R ile gösterilir. Bir numunede bulunan her bir bileşenin birbirinden yeterince ayrılıp ayrılmadıklarını gösteren kantitatif bir ifadedir. Kromatogramdan kolaylıkla hesaplanabilir (Şekil 2.29)

$$R = \frac{K_B}{K_A} = \frac{(t_R)_A - (t_R)_B}{(w_A + w_B)/2} = \frac{2\Delta t}{w_A + w_B}$$



Şekil 2.27. İki bileşenli bir karışımdan elde edilen kromatogram

Kromatografik ayırma gücü kolon etkinliği, seçicilik ve kapasite faktörünün bir fonksiyonudur.

$$R_s = 1/4\sqrt{N} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'}{k' + 1} \right)$$

R değerinin 1.5 olan iki bileşik birbirinden tamamen ayrılmış demektir.

2.4.6. Kromatografik Kolon Etkinliği

Pik genişliği, kolon etkinliğini gösterir. Dar pikler veren kolonlar etkinliği yüksek olan kolonlardır. Çünkü bu kolonlarda maddeler birbirinden daha kolay ayrılabilir. İyi bir kromatografik metot geliştirmek demek, dar kromatografik bantlar elde etmek demektir. Kromatografik kolon etkinliğini kantitatif olarak ifade etmek amacıyla genel olarak iki terim kullanılmaktadır. Bu terimler:

1. Tabaka yüksekliği, H
2. Teorik tabaka sayısı, N

dir.

Tabaka yüksekliği ve tabaka sayısı arasında,

$$N = L/H$$

şeklinde bir eşitlik vardır.

$$L = \text{Kolon uzunluğu}$$

Bir kromatografik kolonun etkinliği tabaka sayısının artmasıyla artar. Tabaka sayısının artması da, tabaka yüksekliğinin azalması anlamına gelir. Kolon etkinliğinin ölçüsü olan kolonun eşdeğer kuramsal tabaka sayısı N,

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{w} \right)^2 = 5.5 \left(\frac{t_r}{w_{1/2}} \right)^2$$

eşitliği ile hesaplanır.

N değeri, kromatogramlardan kolaylıkla hesaplanabilir. Kromatogram üzerinden okunan alıkonma zamanı ve pik genişliği değerleri formülde yerine konulur. İdeal olarak N değerinin 2000'den daha büyük olması istenir. Kolon etkinliği, hem kolon uzunluğunun, hem tanecik boyutunun hem de akış hızının bir fonksiyonudur.

Kuyruklanma Faktörü (T) ve Asimetri Faktörü

Kuyruklanma faktörü pik asimetrisini gösterir.

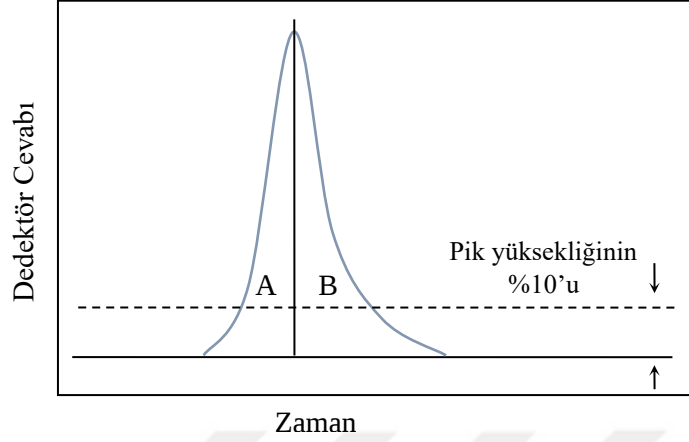
Pik kuyruklanma faktörü = $(A+B)/2A$ 'dır.

Pik kuyruklanma faktörünün 1 olması pikin simetrik olduğunu gösterir. Bu değer, $0.5 \leq T \leq 2$ aralığında olmalıdır,

$$\text{Pik asimetri faktörü} = B/A$$

ile hesaplanır.

Pik asimetri faktörü değerinin 1.5' dan daha büyük olması durumunda artık kolonun değışmesi gerekir.



Şekil 2.28. Kuyruklanma ve asimetri faktörünün hesaplaması için parametrelerin kromatogram üzerinde gösterilmesi

2.4. HPLC ile Nicel Analiz

2.5.1. Örnek hazırlanması

Enjeksiyonu yapılacak numunenin hazırlanması önemlidir. Numune ideal olarak hareketli fazda çözünmelidir. Eğer çözünmüyorsa, hareketli faz ile karışabilir diğer bir çözücüde çözünmelidir. Enjeksiyondan önce kolona çözünmeyen maddelerin girişini önlemek için numunenin süzülmesi tavsiye edilir. Aksi takdirde çözünmeyen maddeler hareketli faz akışının düşmesine, kolon geri basıncında artışa, kolon veriminde azalmaya ve piklerin bölünmesine neden olurlar. Bu amaçla piyasada bulunan ufak, tek kullanımlık, şırınga ile iğne arasına yerleştirilen özel disk filtreler kullanılır (Şekil 2.29).



Şekil 2.29. Örnek süzme filtresi

Büyük hacimde veya aşırı konsantre numune tatbiki önerilmez. Şırıngaya çekilen numune çözeltisinde hava kabarcığı olmamalıdır; eğer varsa enjeksiyondan önce uzaklaştırılmalıdır.

Eğer örnekler istenen çözücü içinde değilse veya derişimi çok düşük olduğundan enjekte edilse bile pikler gözlenemiyorsa, çözücü uçurulmalıdır. Uçurularak kurutulan madde, düşük hacimde hareketli faz içinde tekrar çözülerek önderiştirme yapıldıktan sonra sisteme enjekte edilmelidirler.

2.5.2. Kalibrasyon Teknikleri

HPLC ile nicel analizde, analiz edilecek bileşenin olabildiğince saf olarak ayrılması için en uygun tüketme yöntemi bulunur. Tüketme yöntemine karar verildikten sonra, analiz için uygun kolon, hareketli faz bileşimi, akış hızı ve dedektör seçilmelidir.

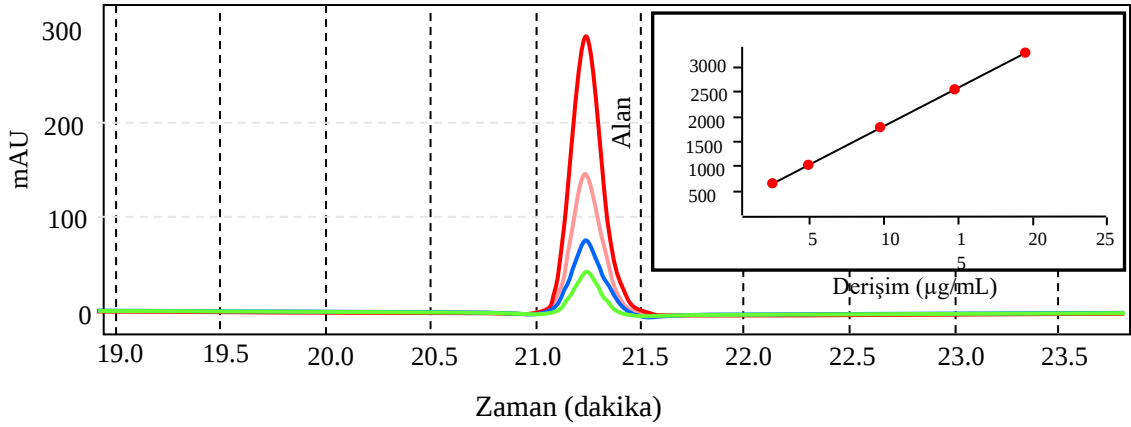
Kullanılan standart yüksek saflıkta olmalı ve kromatogramda tek pik gözlenmelidir. Standartın alıkonma zamanı belirlenir. Analiz edilecek çözelti sisteme standart ile aynı koşullarda enjekte edilir. Kromatogramda değişik zamanlarda gelen birden fazla pik olabilir. Ancak, standardın alıkonma süresi ile aynı alıkonma süresine sahip olan pik kromatogramda aradığımız piktir.

Önce derişimi bilinen standart pikinin altında kalan alan veya pik yüksekliği kromatogramdan bulunur. Numune kromatogramından da yeri belirlenen bileşen pikinin altında kalan alan veya pik yüksekliği hesaplanır. Derişimi bilinen standardın alanı ile numunenin alanı karşılaştırılarak derişim tayin edilir.

Genel olarak bütün analitik çalışmalarda olduğu gibi HPLC’de de kalibrasyon eğrisi kullanılarak, numune çözeltisi için hesaplanan alandan derişim hesaplanır. Miktar tayini için doğrudan kalibrasyon, iç standart kalibrasyon ve standart ekleme olmak üzere kalibrasyon teknikleri vardır.

Doğrudan Kalibrasyon Tekniğı

Analiz edilecek maddeyi içeren standart çözeltisi değişik derişimlerde hazırlanır. Bunlar için hesaplanan alan değerleri, derişimlere karşı grafiğı geçirilerek kalibrasyon doğrusu oluşturulur. Numune çözeltisi için hesaplanan alan değeri bu grafikte yerine konarak, numunedeki analiz maddesinin derişimi bulunur.



Şekil 2.30. Kromatogramdan kalibrasyon eğrisinin oluşturulması

İç Standart Kalibrasyon Tekniği

İç standart kalibrasyon tekniğinde, analizi yapılacak örneğe yapısal olarak benzeyen bir madde belirlenir. Bu maddenin alıkonma zamanı örnekten farklı olmalıdır. Bilinen miktardaki madde standart ve numune çözeltilerine eklenir. Bu metotla numune enjeksiyonunda, akış hızı ve kolon şartlarındaki değişimlerle oluşan belirsizlikler, numune hazırlama sürecinden, cihazdan kaynaklanan hatalar en aza indirilir. Standartın pik alanı (veya yükseklik) değerinin iç standart pik alanı (veya yüksekliğinin) değerine oranı kalibrasyon eğrisini hazırlamada kullanılır.

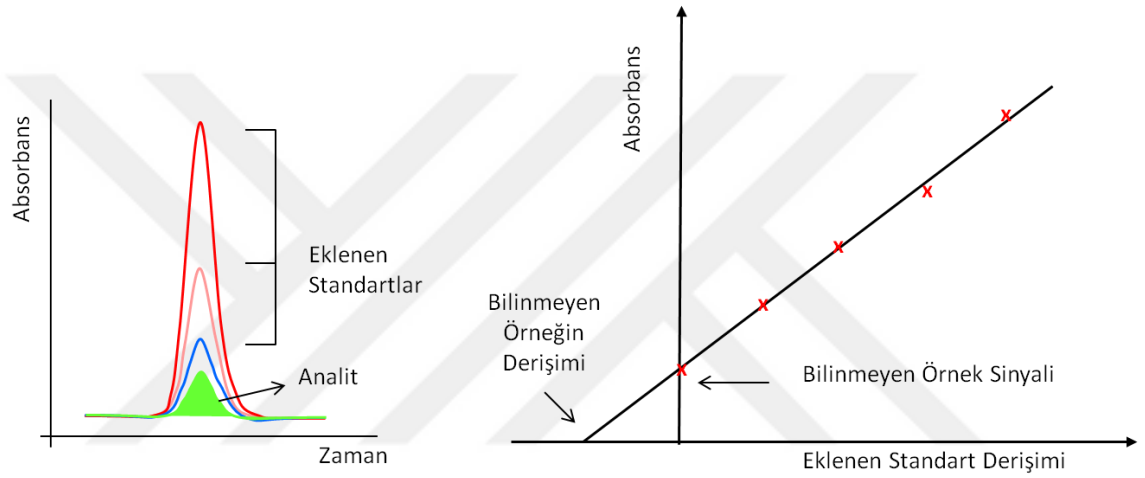
Bir iç standart için gerekli koşullar şunlardır:

1. Tek bir maddenin analizi yapılacaksa, iç standart piki numunedeki diğer bileşen piklerinden belirgin şekilde ayrılmalı, alıkonma zamanı, ama numunenin alıkonma pikine de yakın alıkonma zamanına sahip olmalıdır.
2. Numunedeki maddelerle reaksiyon vermemelidir.
3. Numune piki ya da pikleri ile benzer derişime sahip olmalıdır ve yakın dedektör cevabı vermelidir.
4. Yüksek saflıkta olmalı ve kolayca temin edilebilmelidir.

İç standart yönteminde, bilinen derişimlerde standart çözeltilerin her birisine aynı oranda ve bilinen derişimlerde iç standart ilave edilir. Daha sonra enjeksiyon işlemine geçilir. Standartın pik alanının, iç standart pik alanına oranı, derişim değerlerine karşı grafiğe geçirilir. Numune çözeltisine de aynı derişim ve miktarda iç standart eklenir. Kalibrasyon doğrusu kullanılarak, elde edilen pik alanları oranından, numune miktarı hesaplanır.

Standart Ekleme Tekniği

Bazı numuneler için standart çözeltiyi numune çözeltisi ile tamamen aynı şartlarda hazırlamak çok zordur. Bu durumda bazı maddeler girişime sebep olabilir. Standart ekleme tekniğinde, numune çözeltisi eşit hacimlerde birkaç tüpe konur. Bunlardan birincisi hariç, diğerlerine artan derişimlerde standart çözelti eklenir. Toplam hacim çözücü ile sabit bir değere tamamlanır. Bütün çözeltilerin absorbands değerleri ölçülerek, eklenen standart derişimlerine karşı grafiğe geçirilir. Eğrinin absisi kestiği nokta, numunedeki analiz elementinin derişimini verir. Bu teknikte, matriks etkisi numunedeki ile aynı olacağından gelecek girişimler engellenmiş olacaktır.



Şekil 2.31. Standart ekleme tekniği

2.6. Analitik Yöntem Validasyonu Parametreleri

Biyoanalitik yöntem geliştirmenin amacı, yöntemin tasarımı, çalışma koşullarını, sınırlamalarını ve amacına uygunluğunu tanımlamak ve yöntemin validasyon için optimize edilmesini sağlamaktır (38).

Bir biyoanalitik yöntem geliştirilmeden önce, ilgilenilen analitin fizikokimyasal özellikleri, *in vitro* ve *in vivo* metabolizması ve proteinlere bağlanma özelliği araştırılmalı ve uygulanabilir önceki analitik yöntemler dikkate alınmalıdır. Yöntem geliştirme, analitin ekstrakte edilmesi ve tayin edilmesiyle ilgili prosedürlerin ve koşulların optimize edilmesini içerir. Biyoanalitik metot validasyonu; kan, plazma, serum veya idrar gibi biyolojik matrikslerdeki analitlerin nicel ölçümü için kullanılan, güvenilir ve özel bir metodu gösteren, tüm prosedürleri içerir (39,40). Biyolojik bir matriksteki ilaçların veya bunların metabolitlerinin analizi, matrikse referans standartları ilave edilerek hazırlanan kalibrasyon çözeltileri ve kalite kontrol (QC) numuneleri kullanarak gerçeleştirilir. Bu

nedenle kullanılan referans standardın saflığı, çalışma verileri için çok önemlidir. Bilinen derişimlerde çözeltilerin hazırlanabilmesi için, aynılığı ve saflığı belgeyle doğrulanmış analitik referanslar kullanılmalıdır.

Metot geliştirme, metodun validasyona uygun olmasını sağlamak bazı biyoanalitik parametrelerin optimizasyonunu içerir.

2.6.1. Seçicilik, Özgünlük

Biyolojik bir matrikste potansiyel girişim yapan maddeler metabolitler, bozunma ürünleri gibi endojen matriks bileşenleri ile gerçek çalışmada kullanılan ilaçlar ve diğer ksenobiyotiklerdir. Örnek toplama sırasında bir stabilizatör veya enzim inhibitörü kullanılacak olursa, analitin miktar tayininde girişim yapıp yapmayacağı değerlendirilmelidir. Eğer bu metot, birden fazla analitin nicel analizini amaçlıyorsa, her bir analit için, girişim olup olmadığı saptanmalıdır (41). Bir metodun seçiciliği, kompleks bir karışımda istenen analit ve/veya analitlerin, karışımdaki diğer bileşenlerin girişimi olmaksızın tayin edilebilmesidir. Bir analit veya analit grubu için tamamen seçici olan bir metodun, spesifik (özgün) olduğu ifade edilir (42).

2.6.2. Kesinlik

ICH (Uluslararası Uyum Konferansı) Q2 (R1) (Analitik Yöntemlerin Validasyonu: Metni ve Metodolojisi)'e göre kesinlik, “aynı homojen örnekten alınan çoklu örneklerden elde edilen bir seri ölçüm arasındaki uyuşmanın yakınlığı” olarak tanımlanır. Biyoanalitik bir metodun kesinliği, rastgele hatanın bir ölçüsüdür. Yüzde varyasyon katsayısı (CV) veya tekrarlanan ölçümlerin relatif standart sapması olarak ifade edilir (43-45).

$$\%CV = (\text{standart sapma} / \text{ortalama}) \times 100$$

Tekrarlanabilirlik (Repeatability); aynı çalışma koşullarında kısa bir zaman aralığındaki kesinlik olarak ifade edilir. Tekrarlanabilirlik, aynı analizcinin, aynı metodolojiyi, aynı ekipmanı ve aynı reaktifleri kullanarak, aynı zaman aralığında, örnek olarak gün içinde tekrar etme kabiliyetini olarak tanımlanır. Tekrarlanabilirlik, deneme içi kesinlik (*intra-assay (batch) precision*) olarak da tanımlanır (46).

Ara Kesinlik (Intermediate precision); laboratuvar içi değişiklikler (varyasyonlar) olarak ifade edilir. Farklı günler, farklı analizciler, farklı ekipman gibi, aynı metodolojinin farklı koşullarda tekrarlanma kabiliyetidir.

Tekrar üretilebilirlik (Reproducibility); laboratuvarlar arası kesinlik olarak ifade edilir. Tekrar üretilebilirliğin gerçekleştirildiği durumlarda, ara kesinliğe ihtiyaç olmaz.

FDA dokümanı, tek bir analitik çalışma esnasındaki kesinliği “*within-run, intra-batch precision veya repeatability*” olarak ve farklı zamanı, farklı analizcileri, farklı ekipmanı, farklı reaktifleri ve farklı laboratuvarları kapsayan kesinliği “*between-run, inter-batch precision veya reproducibility*” olarak ayırmıştır.

Kesinlik hesaplanırken, derişim başına minimum 5 tayin yapılmalıdır. Çalışılan konsantrasyon aralığında en az 3 derişim önerilir. Her bir derişim seviyesinde tayin edilen kesinlik %15 CV’i geçmemelidir (43,47).

2.6.3. Doğruluk

ICH Q2R1 dokümanında; doğruluk (accuracy), yüzde geri kazanım olarak veya güven aralığıyla birlikte ortalama ve kabul edilen gerçek değer arasındaki fark olarak rapor edilmiştir. Doğruluk, analitin bilinen miktarlarını içeren örneklerin analizinin tekrarlanmasıyla tayin edilir. Doğruluk, konsantrasyon başına en az 5 tayin yapılarak ölçülmelidir. Ortalama değer gerçek değer %15’i içerisinde olmalıdır (43, 48).

Doğruluk için gerçek değer birçok farklı yoldan elde edilebilir:

- ⇒ Sertifikalı referans materyal (CRM) ile,
- ⇒ Yeterlilik testi örneği ile,
- ⇒ “spiked” örneklerle (geri alma-recovery testleri) yapılabilir.

2.6.4. Geri Kazanım

Analitin geri kazanımı, yüksek saflıkta, güvenilir , doğru konsantrasyonda bir standartın dedektör cevabı ve matrikse eklenen, oradan özütlenen analitin dedektör cevabının mukayese edilmesidir. Analitin geri kazanımı tutarlı, kesin ve tekrarlanabilir olmalıdır.

$$\text{Geri kazanım} = \frac{\text{Matrikse eklenen analitin cevabı (işlem görmüş)}}{\text{Saf standart analitin cevabı (işlem görmemiş)}}$$

2.6.5. Kalibrasyon/ Standart Eğrisi

Bir kalibrasyon eğrisi, bilinen konsantrasyonlardaki analitin ve cihazın okuduğu sinyal arasındaki ilişkidir. Kalibrasyon eğrisi oluşturmak için en az beş veya daha fazla sayıda standart kullanılmalıdır. Ölçüm aralığı; yöntemin kesinlik, gerçeklik gibi kriterleri kabul edilebilir düzeylerde karşılayabildiği analit konsantrasyonu aralığıdır. Bir kalibrasyon eğrisi örnekteki her bir analit için oluşturulmalıdır. Cevap ve konsantrasyon arasındaki ilişkiyi tanımlamak için yeterli sayıda standart kullanılmalıdır. Bir kalibrasyon eğrisi bir kontrol örneği (blank veya boş örnek, işleminden geçmiş, standart içermeyen

matriks örneği), standart eklenmiş işleminden geçmiş matriks örneği ve alt tayin sınırını (LLOQ) da içeren 6-8 örneği kapsamalıdır. Ölçüm aralığının alt sınırı LOQ'dur (49).

2.6.6. Hassasiyet

Analitik bir metodun hassas olup olmadığı kalibrasyon eğrisinin eğiminden tayin edilir. İncelenen analitin konsantrasyonundaki küçük artışlar, cihazın okuduğu sinyalde daha büyük artışlara neden oluyorsa, metodumuz hassastır.

$$\text{Hassasiyet} = \frac{\text{Ölçüm sinyali}}{\text{Konsantrasyon}}$$

2.6.7. Saptama Alt Sınırı (LOD)

LOD'nin tayini, görerek sinyal:gürültü oranının ölçülmesiyle veya blank örneğinin cevabının standart sapmasının ölçülmesiyle gerçekleştirilir. 3:1 ve 2:1 arasındaki sinyal:gürültü oranı genellikle kabul edilebilir olarak düşünülür.

Kabul kriteri: Saptama alt sınırı, sistemin gürültü seviyesinin üzerinde sinyal oluşturan en düşük madde derişimidir. Genellikle gürültü düzeyinin üç katı olarak kabul edilir. Kesinliği (%CV) nin %20'den küçük veya eşit olması gerekir. Elde edilen pikler, uygun pik şekli ve pik simetrisine sahip olmalıdır (50).

LOD kromatografi gibi sürekli kayıt alan teknikler için, gürültü seviyesinin 3 katı olarak alınır. Diğer taraftan IUPAC'a göre LOD,

$$Y_{\text{LOD}} = Y_{\text{blank}} + 3\sigma_{\text{blank}}$$

eşitliğini kullanarak hesaplanır (51).

$$Y_{\text{blank}} = \text{blank sinyalinin ortalama değeri}$$

$$\sigma_{\text{blank}} = \text{blank sinyalinin standart sapması}$$

Bu değerler en az 10 bağımsız blank örneğinden alınan ölçümler kullanılarak hesaplanır. Eğer blank örneği, herhangi bir sinyal vermiyorsa (örneğin voltametri), kabul edilebilir en düşük analit derişimine getirilen 10 bağımsız blank örneği ölçülür.

$$Y_{\text{LOD}} = 3\sigma$$

olarak hesaplanır. σ alınan bir set ölçümün standart sapmasıdır.

LOD'nin sinyal birimi olarak ifade edilmesi doğru değildir. LOD'nin derişim biriminde kullanılması önerilir. Bu yüzden, Y_{LOD} değerleri, kalibrasyon fonksiyonu kullanılarak Z_{LOD} ye çevrilir.

$$Y = a + bZ$$

a: kesim noktası

b: eğim

$$Z_{LOD} = \frac{Y_{LOD} - a}{b}$$

LOD değeri, doğrunun sıfır noktasından geçtiği düşünülerek hesaplanır.

$$Z_{LOD} = \frac{3\sigma_{blank}}{b}$$

dir (52).

2.6.8. Alt Tayin Sınırı (LOQ)

Genellikle gürültü düzeyinin 10 katı olarak kabul edilir. Burada temel problem şudur: Ölçülen sinyal, analitin miktarını tayin etmek için kullanılan sinyal değildir. Örneğin, kromatografide spektral tayin yapılıyorsa, ölçülen sinyal absorpsiyon birimini yani sinyal yüksekliğini gösterir; fakat nicel analiz için genellikle alanlar kullanılır. Bu yüzden, tayin sınırı analitin en düşük seviyesi değil, nicel olarak ölçülen en düşük absorbanstır (52).

ICH Q2R1 tarafından önerilen diğer yaklaşımlar “örneğin standart sapması ve eğim” e dayanır. Alt tayin sınırı,

$$Z_{LOQ} = \frac{10\sigma}{b}$$

olarak ifade edilir.

σ = cevabın standart sapması
 b = kalibrasyon eğrisinin eğimi

2.7. Literatür Özeti

Liu ve arkadaşları 11 nükleositi (urasil, sitidin, üridin, inosin, adenin, timin, adenosin, guanosin, 2'-deoksiüridin, 2'-deoksiadenosin ve 3'-deoksiadenosin) tıbbi bir makrofungus olan *Cordyceps taii*'de eş zamanlı olarak tayin etmek için ters faz-yüksek performanslı sıvı kromatografisi-diyot dizisi dedektörü (RHPLC-DAD) metodu geliştirmişlerdir (53). Ayırma işlemi 14 dakika sürede metanol/su hareketli fazıyla gradient elüsyonla yapılmıştır. 0.1 g kurutulmuş toz mantar 5 mL metanol:su (1:5, h/h) çözeltisi ile ultrasonik prob kullanarak oda sıcaklığında 10 dakika ekstrakte edilmiştir. Geliştirilen bu yöntemle göre en fazla bulunan nükleotitlerin adenosin, üridin ve urasil olduğu bulunmuştur.

Peng ve arkadaşları 13 nükleosit ve nükleobazın (sitozin, urasil, sitidin, hipoksantin, üridin, timin, 2'-deoksiüridin, adenin, inosin, guanozin, timidin, adenosin, 2'-

deoksiadenosin) *Ganoderma lucidum* ve ilgili türlerde eş zamanlı tayini için HPLC-DAD metodu geliştirmiştir (54). Analiz Phenomenex C18 kolonda (250 mm × 4.6 mm i.d., 5 µm) asetonitril /su mobil fazıyla 0.6 mL/dak akış hızında 260 nm dalgaboyunda gradient olarak gerçekleştirilmiştir. Analiz süresi yaklaşık 45 dakikadır. Başlıca nükleositler inosin, guanosin ve adenosin olarak belirlenmiştir.

Ranogajec ve arkadaşları 11 nükleosit ve mono fosfat nüleotiti (sitidin 5'-monofosfat, üridin 5'-monofosfat, ksantozin 5'-monofosfat, guanosin 5'-monofosfat, inosin 5'-monofosfat, sitidin, üridin, adenosin 5'-monofosfat, ksantosin, guanosin ve adenosin) mantarda tayin etmek için ters faz HPLC metodu geliştirmişlerdir (55). Hırvatistan'ın 2 farklı bölgesinden 10 yabancı mantar örneği toplanmıştır. Örnekler gölgede kurutulmuştur. Homojenize edildikten sonra 500 mg'ı 50 mL su ile 100°C'deki su banyosunda 1 dakika ve vorteks ile 30 s ekstrakte edilmiştir. 0.20 µm'lik naylon membran filtre ile süzülen örnekler HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Ayırım 0.05 M fosfat tamponu ve metanol hareketli fazıyla, 0.4 mL/dak akış hızında, gradient olarak 254 nm dalgaboyunda gerçekleştirilmiştir.

Yang ve arkadaşları, *Cordyceps*'de nükleotidlerin, nükleositlerin ve bunların dönüşüm ürünlerinin belirlenmesi için iyon çifti ters faz sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi metodu geliştirmişlerdir (56). Pentadekaflorooktanoik asit iyon çifti ajanı olarak kullanılmıştır. Kullanılan hareketli faz, iyon çifti ajanı içeren su ve asetonitrildir. Ayırım 0.5 mL.dk⁻¹ akış hızında, 50°C'de Zorbax SB-Aq kolonunda, gradient elüsyon yapılarak, 260 nm dalgaboyunda (5 µm, 4.6 mm × 250 mm) ve 60 dakikada gerçekleştirilmiştir. Üç nükleotit, üridin-5-monofosfat (UMP, 0.638–10.200 µg.mL⁻¹), adenosine-5'-monophosphate (AMP, 0.24–7.80 µg.mL⁻¹) ve guanosine-5'-monophosphate (GMP, 0.42–13.50 µg.mL⁻¹); yedi nükleosit adenosin (0.55–8.85 µg.mL⁻¹), guanosin (0.42–6.75 µg.mL⁻¹), uridin (0.33–10.50 µg.mL⁻¹), inosin (0.21–6.60 µg.mL⁻¹), sitidin (0.48–15.30 µg.mL⁻¹), timidin (0.20–6.30 µg.mL⁻¹) and kordisepin (0.09–1.50 µg.mL⁻¹) ve altı nükleobaz, adenin (0.22–6.90 µg.mL⁻¹), guanin (0.26–4.20 µg.mL⁻¹), urasil (0.38–12.15 µg.mL⁻¹), hipoksantin (0.13–4.20 µg.mL⁻¹), sitozin (0.39–12.45 µg.mL⁻¹) ve timin (0.26–8.25 µg.mL⁻¹) olmak üzere 16 bileşik verilen derişim aralıklarında eş zamanlı olarak ayrılmıştır.

Ying ve arkadaşları, *Tricholoma matsutake* (Tm) mantarının sulu ekstraktındaki ana bileşenleri, HPLC-DAD/TOF-MS ve HPLC-DAD/Trap-MSn yöntemleriyle tayin etmişlerdir (57). Tirozin, sitidin, üridin, eritadenin, fenilalanin, nikotinamid, inosin,

guanosin, triptofan, adenosin, 5'-deoksi- 5 metiltiyoadenosin ve riboflavin dahil olmak üzere 12 bileşen tanımlanmıştır. Ayırım hareketli faz olarak amonyum asetat ve asetonitril çözeltileri ve C18 kolon kullanılarak, 1mL/dak akış hızında 60 dakikada gerçekleştirilmiştir.

Ikeda ve arkadaşları, *Cordyceps* türlerinde adenosine, kordisepin, 2'-deoksiadenosin, guanosin ve üridin tayini için HPLC-UV metodu geliştirmişlerdir. Adenosin, kordisepin, 2'-deoksiadenosin ve guanosin C18 kolonda 1 mL.dk⁻¹ akış hızında, asetonitril-su (5:95, h/h) hareketli fazı kullanılarak; hipoksantin ve üridin ise, hacimce 2:98 asetonitril-su kullanılarak 260 nm dalgaboyunda ayrılmışlardır. Adenosin, kordisepin, 2'-deoksiadenosin, guanosin ve üridin miktarları sırasıyla 0.28–14.15; 0.006–6.36; 0.01–0.14; 0.68–14.79 ve 0.19–20.29 mg.g⁻¹ olarak bulunmuştur (58).

Liu ve arkadaşları, Tuber türlerinin meyve veren gövdesinde ve fermante köklerinde, adenin, hipoksantin, üridin, adenosin, guanin, guanosin ve inosin tayini için dispersif katı faz ekstraksiyonuna (DSPE) dayalı LC-MS yöntemi geliştirmişlerdir (59). DSPE'nin kullanılmasının amacı örnek çözeltilerine protein girişimini engellemektir. DSPE sorbent olarak D3520 makro gözenekli reçine seçilmiştir. Bunun nedeni protein girişimlerini yüksek oranda uzaklaştırma kabiliyeti ve analitler üzerinde düşük adsorplama oranıdır. Hareketli fazda hacimce 1:99 olacak şekilde metanol ve pH'sı formik asitle 2'ye ayarlanmış 5 mM amonyum asetat karıştırılarak izokratik elüsyon yapılmıştır. Ayırma 30°C sıcaklıkta, 1mL.dak⁻¹ akış hızında 254 nm dalgaboyunda 15 dakika sürede gerçekleştirilmiştir.

Gao ve arkadaşları Lingzhi'deki 11 nükleosit ve nükleobazın kalitatif ve kantitatif analizleri için bir HPLC-DAD-MS yöntemi geliştirmişlerdir (60). Ayırma Agilent ZORBAX Eclipse XDB C18 kolonda (3.5 µm, 4.6 mm × 150 mm), 5 mM amonyum asetat ve metanol mobil fazlarıyla gradient elüsyon yapılarak 26 dakika gerçekleştirilmiştir. Akış hızı 0.5 mL.dk⁻¹, sıcaklık 25°C, dalgaboyu 254 nm ve enjeksiyon hacmi 10 µL'dir.

Yuan ve arkadaşları yedi nükleosit (adenosin, kordisepin (3'-deoksiadenosin), sitidin, guanozin, timidin, üridin ve inosin) ve beş nükleobazın (adenin, sitozin, timin, urasil ve hipoksantin) yenilebilir mantarlarda (*Cordyceps sinensis*, *Cordyceps militaris*, *Ganoderma lucidum*, *Agrocybe aegerita*, *Termitornyces albuminosus* ve *Lentinus edodes*) tayini için ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi geliştirmişlerdir (61). On iki nükleosit ve nükleobaz, ZORBAX Eclipse XDB-C18 kolonunda ve 20 mmol.L⁻¹ sodyum dihidrojen fosfat ve 20 mmol.L⁻¹ disodyum hidrojen

fosfat ve ve metanol hareketli fazı kullanılarak 1mL.dk^{-1} akış hızında 260 nm dalgaboyunda yaklaşık 30 dakikada ayrılmışlardır.



3. MATERİYAL VE METOT

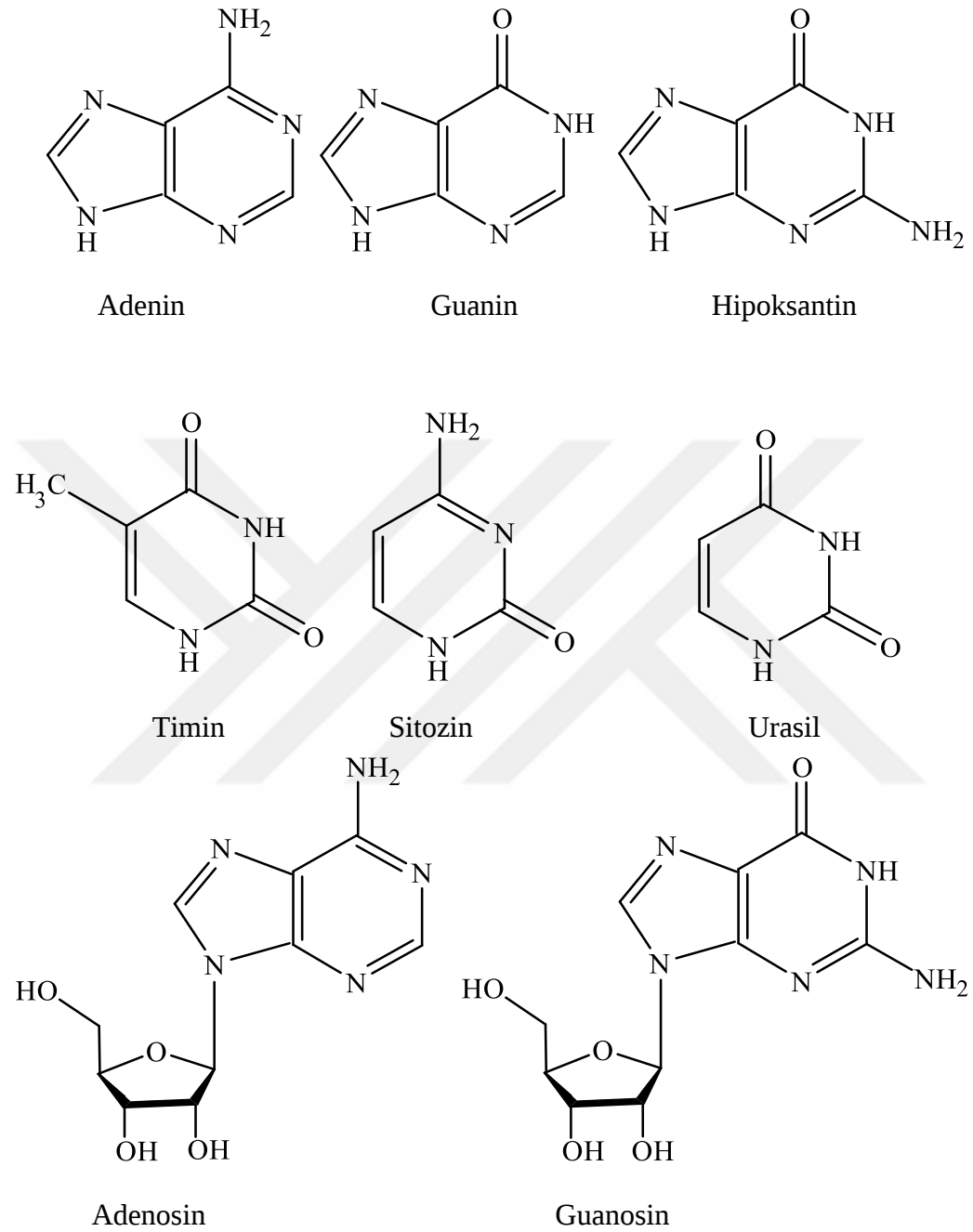
3.1. Reaktif ve Materyaller

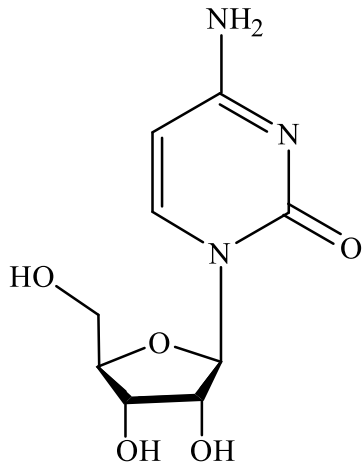
Çalışmamızda kullanılan etken maddeler Tablo 3.1 ve reaktifler Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan etken maddeler

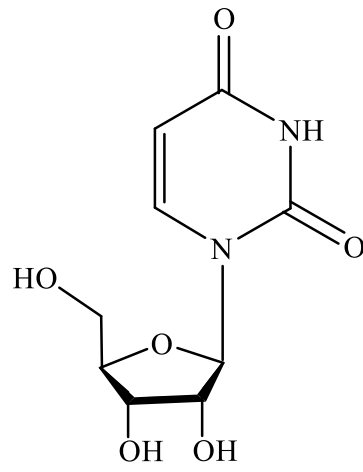
Reaktifin Adı	Özellikler	Firmanın Adı	Cas No
Adenin	%99	J&K	73-24-5
Guanin	%99	Boston USA Chemistry	73-40-5
Hipoksantin	%99	Boston USA Chemistry	68-94-0
Timin	%98	Boston USA Chemistry	65-71-4
Sitozin	%99	Boston USA Chemistry	71-30-7
Urasil	%99	Boston USA Chemistry	66-22-8
Adenosin	%99	Boston USA Chemistry	58-61-7
Guanosin	%99	Boston USA Chemistry	118-00-3
Sitidin	%99.90	BLD pharm	
Üridin	%99	Boston USA Chemistry	58-96-8
İnosin	>%98	Alfa Aesar	58-63-9
Timidin	%99	Boston USA Chemistry	50-89-5
Ksantosin	>%99	Boston USA Chemistry	5968-90-1
2-deoksiadenosin	%99.9	Chem-Impex	16373-93-6

Analizi yapılan nükleotidlerin kimyasal yapıları Şekil 3.1’de verilmiştir.

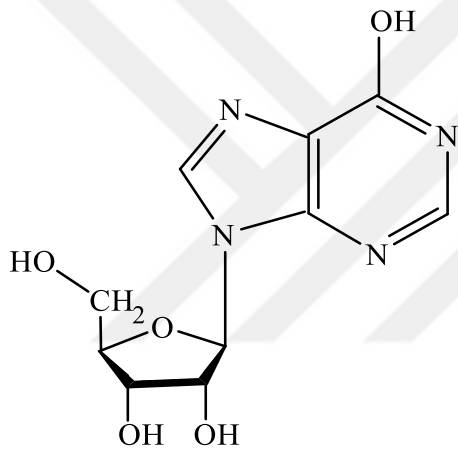




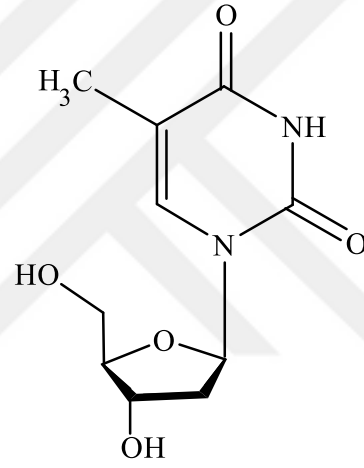
Sitidin



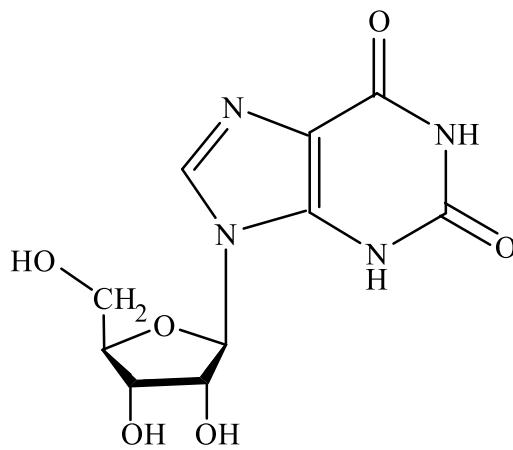
Üridin



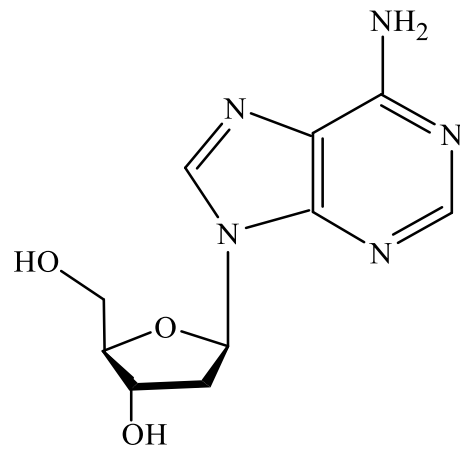
İnosin



Timidin



Ksantosin



2-deoksiadenosin

Şekil 3.1. Nükleotidlerin kimyasal yapıları

Tablo 3.2. Çalışmada Kullanılan Reaktifler

Reaktifin Adı	Özellikler	Firmanın Adı	CAS No
Metanol	HPLC saflıkta	Supelco	67-56-1
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	≥%99	ISO Lab	231-449-2
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	≥%99.5	AFG Bioscience	10028-24-7
Formik asit	%98-%100	Sigma Aldrich	64-18-6
NaOH	%99-%100	Supelco	1310-73-2

Analizini yaptığımız mantarlar Tekirdağ ilinden sakliorman.com aracılığıyla temin edilmiştir. Analizi yapılan mantar türleri sırasıyla Trüf (*Tuber borchii*), Trüf (*Tuber aestivum*), Borazan, Kuzu Göbeği, Porçini, Sığır Dili, Sarı Kız ve Kanlıca mantarlarıdır. Mantarlar liyofilize edildikten sonra -20°C’de muhafaza edilmişlerdir (Şekil 3.1).



Trüf (*Tuber Aestivum*)



Trüf (*Tuber Borchii*)



Borazan (*Craterellus fallax*)



Sığır Dili (*Hydnum repandum*)



Porcini (*Boletus edulis*)



Kuzu Göbeği (*Morchella esculenta*)



Sarıkız (*Cantharellus cibarius*)



Kanlıca (*Lactarius salmonicolor*)

Şekil 3.2. Analizi yapılan mantar türleri

3.1. Cihazlar

Çalışmada kullanılan HPLC sistemi Agilent 1100 G serisi yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazıdır. Cihaz G1379A model degazör, G1311A model dörtlü pompa, G1315B model diyot dizisi dedektörü (DAD), 20 µL enjeksiyon halkasına sahip 7725I model Rheodyne enjeksiyon bloğu ve kolon fırını ile donatılmıştır. Ayırma işleminde, SWEA C18 analitik kolon (4.6 mm x 250 mm, 5µm) kullanılmıştır.

Analiz esnasında kullanılan diğer cihazlar şunlardır:

- pH metre (Hanna instruments pH 211 microprocessor)
- Dionex ASE 200 basınçlı sıvı ekstraksiyonu sistemi
- Sıcaklık ve zaman ayarlı sonikatör (Sonorex dijital 10p, Bandelin)
- Vorteks karıştırıcı (Velp scientifica)
- Magnetik karıştırıcı (RO5 power IKA-Werke)
- Hassas terazi (Sartorius AX 224)
- Su saflaştırma sistemi (New Human Power I, Korea)
- Liyofilizatör (Christ Alpha 1-2 LC)
- Soğutmalı santrifüj cihazı (Sigma 2-16KL)

3.2. Yöntem

3.3.1 Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Analitik saflıktaki standart maddeler hassas terazide 0.01 g tartılmıştır. Hacimce 1:1 (h/h) formik asit:su çözücüsünde çözüldükten sonra balon jojede su ile 10 mL'ye seyreltilmiştir. Böylece 1000 ppm konsantrasyonda ana stok çözeltileri hazırlanmıştır. Stok çözeltiler buzdolabında +4°C'de saklanmıştır. Ara stok çözeltileri günlük olarak, hazırlanmıştır. Ara stok çözeltileri hazırlanırken seyreltmeler mobil faz çözeltisi kullanılarak yapılmıştır.

3.3.2. Kromatografik Şartların Optimizasyonu

Mantarda bulunan nükleotidlerin analizi ters faz sıvı kromatografisi yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Pürin ve pirimidin bazlarının amfiprotik özellikleri ve çözücü ile reaksiyonları nedeniyle hareketli faz için uygun pH seçimi çok önemlidir.

Etken maddelerin ayrılması gradient elüsyonla gerçekleştirilmiştir. A çözücüsü olarak pH'sı 3.7 olan MeOH: 50 mM sodyum fosfat tamponu (1:99, h/h) karışımı; B çözücüsü olarak pH'sı 6.2 olan MeOH: 50 mM sodyum fosfat tamponu (20:80, h/h) kullanılmıştır (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. Optimum ayırma koşulları

Cihaz	Agilent 1100G serisi
Kolon	SWEA C ₁₈ kolonu (4.6 mm x 250 mm, 5µm)
Dedektör	Diyot dizisi dedektörü (DAD)
Hareketli Faz	A: MeOH: 50 mM sodyum fosfat tamponu (1:99, h/h) (pH:3.7) B: MeOH: 50 mM sodyum fosfat tamponu (20:80, h/h)
Dalgaboyu	254 nm
Akış Hızı	1 mL. dak ⁻¹
Analiz Süresi	25 dakika
Enjeksiyon Hacmi	20 µL

3.3.3. Mantar Örneklerinin Ekstraksiyonu

Liyofilize edilerek saklanan örnekler, ekstraksiyon öncesinde havanda öğütülerek toz haline getirilmiştir. Ekstraksiyon verimi örnek yüzey alanının artmasıyla artmaktadır (58).

Ses dalgaları destekli sıvı ekstraksiyonu ve basınçlı sıvı ekstraksiyonu olmak üzere iki farklı ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır.

Ultrasonik Ekstraksiyon

Ultrasonik ekstraksiyon yönteminde ultrasonik banyo kullanılmıştır (Şekil 3.2). Liyofilize edilen ve havanda toz haline getirilen 1 gramlık mantar örneklerine sırasıyla 10 mL deiyonize su, asitlendirilmiş su, MeOH:H₂O (30:70, h/h) ilave edilmiştir. En iyi sonuçlar su ile alındığından, ekstraksiyon çözücüsü olarak su kullanılmıştır. Sıcaklık ve zaman taranarak ekstraksiyon yöntemi optimize edilmiştir. Isıtma sıcaklığı ve suyun örneğe oranı ekstraksiyonda kritik ve önemli bir faktördür. Bileşiklerin verimlerini çarpıcı biçimde etkilemiştir. Ekstraksiyon zamanı arttıkça işlemin hücre duvarını kırarak veya hızlandırarak bileşiklerin ekstraksiyonunu iyileştireceği beklenmektedir.

Ekstraksiyon işleminden sonra numune 12.000 rpm hızında santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatant 0.20 µm gözenek çapına sahip bir membran yardımıyla süzildikten sonra HPLC sistemine enjekte edilmiştir.

Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonu

Dionex ASE 200 basınçlı sıvı ekstraksiyonu sistemi kullanılmıştır. Bu sisteme ultrasonik ekstraksiyonda optimize edilen koşullar uygulanmıştır. Liyofilize edilen ve toz haline getirilen 1 gramlık mantar örnekleri Şekil 3.3’de gösterilen çelik ekstraksiyon hücrelerine konulmuştur. Örneklerin alt ve üst kısmına silika boncuklar yerleştirilmiştir. Bu boncuklar ekstraksiyon hücresi çıkışının ve bağlantıların (tubing) tıkanmasına engel olmaktadır. Örnekler çok küçük tanecik boyutlarına sahiplerdir ve su ile birlikte şişmektedirler. Yüksek basınç altında birbirlerine sıkıca yapışabilirler. 1500 psi basınç altında, 70°C sıcaklıkta ve yarım saatlik sürede çözücü olarak su kullanılarak ekstraksiyon Şekil 3.4.’de gösterilen cihazda gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.3. Çelik ekstraksiyon hücreleri

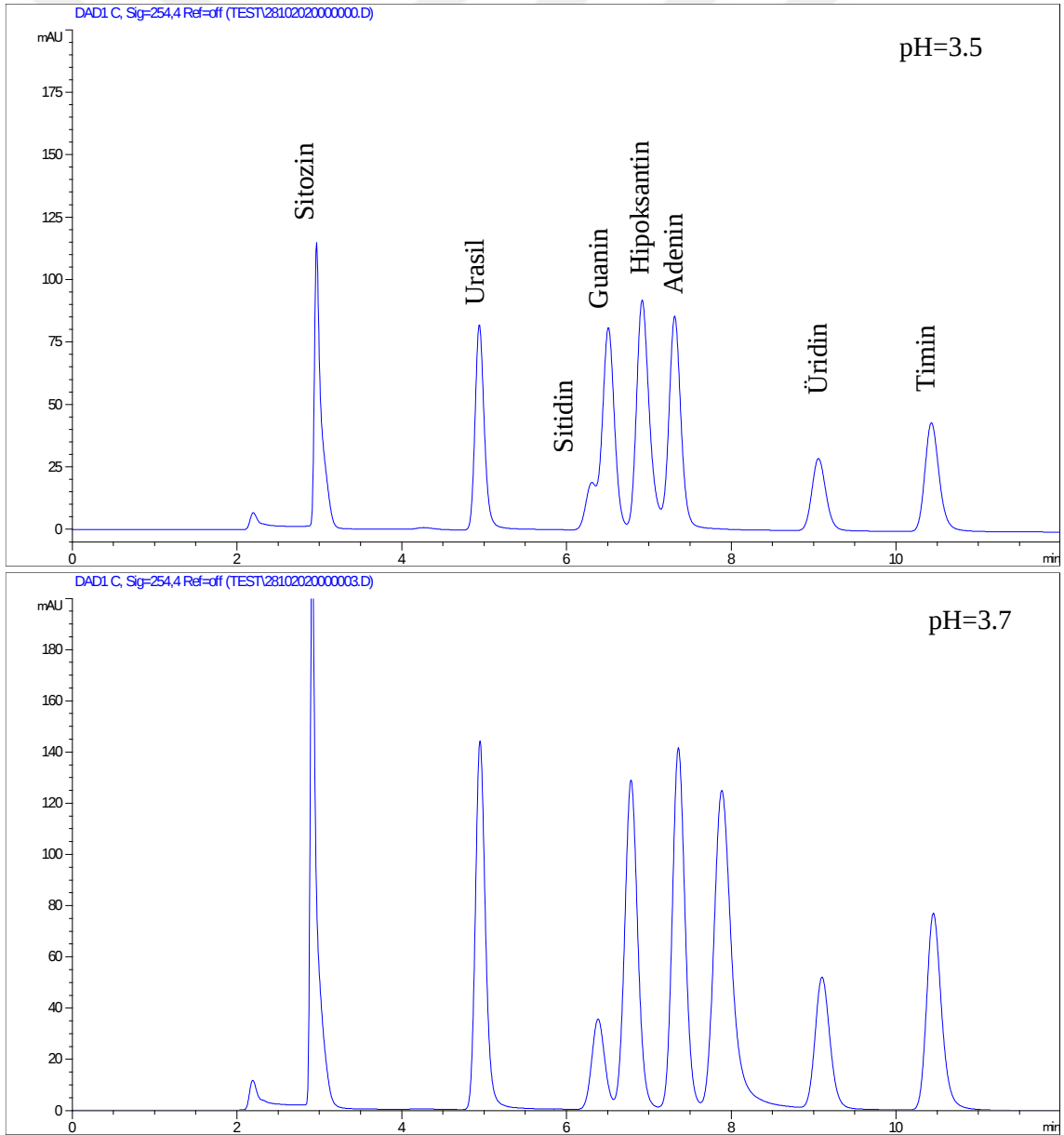


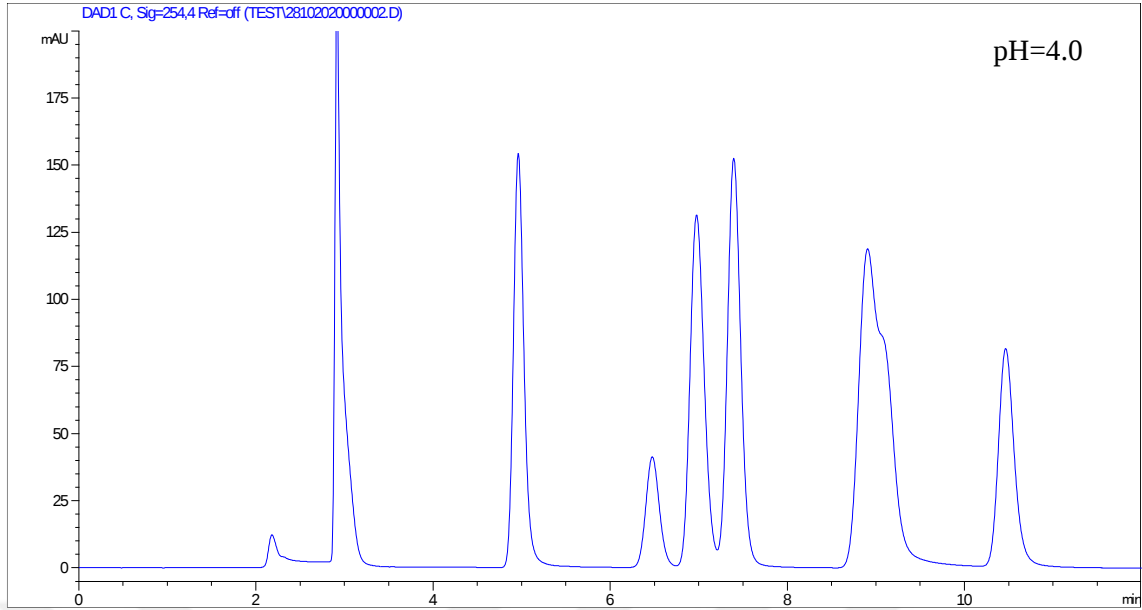
Şekil 3.4. Dionex ASE 200 basınçlı sıvı ekstraksiyonu sistemi

4. BULGULAR

4.1. Etken Madde Ayrımının Foto Diyot Dizisi Dedektörü Kullanarak Optimize Edilmesi

Nükleotidlerin ayrılması için ters faz sıvı kromatografisi yöntemi kullanılmıştır. Hareketli faz metanol ve 50 mM sodyum fosfat tamponu karışımıdır. İlk olarak sitosin, urasil, sitidin, guanin, hipoksantin, adenin, üridinin ve timinin ayrılması için hacimce 1:99 oranında metanol ve tampon çözelti içeren hareketli faz hazırlanmıştır. Sitidin, guanin, hipoksantin, adenin ve üridinin tam olarak ayrılmadığı gözlemlenmiştir. Daha sonra bu çözeltinin pH'sı formik asit çözeltisiyle sırasıyla 3.5, 3.7 ve 4.0 olacak şekilde ayarlanmıştır. Elde edilen kromatogramlar Şekil 4.1'de gösterilmektedir.





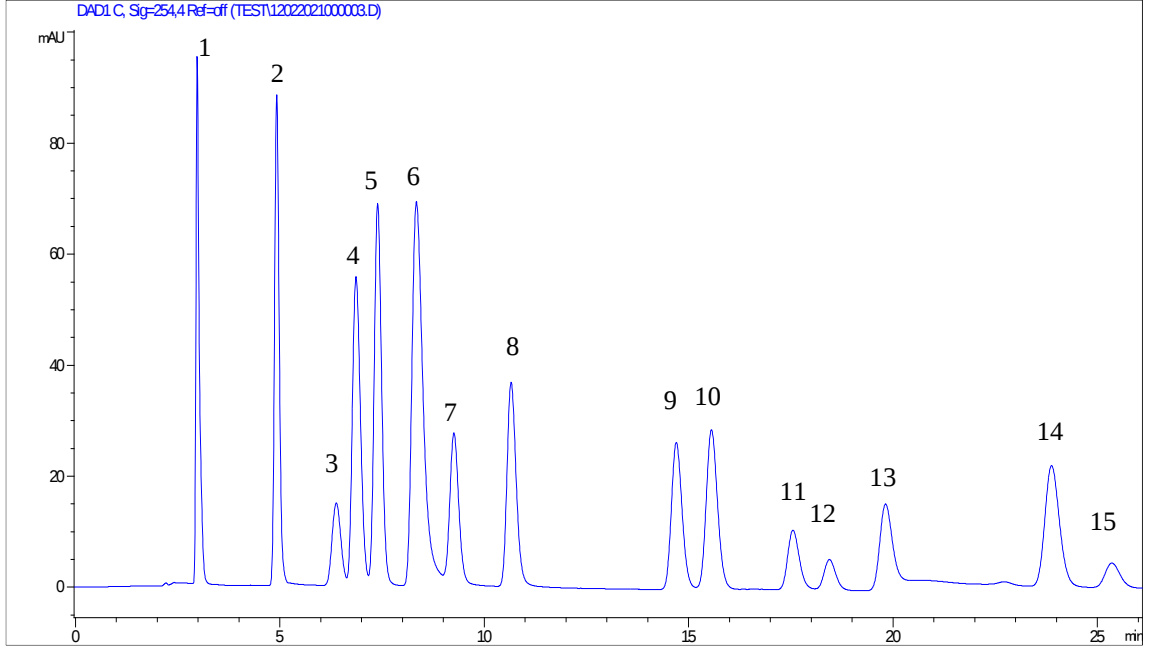
Şekil 4.1. Hareketli fazın pH'sının ayırma etkisi

pH 3.5'da sitidin ve guanin ayırlamazken, pH 4'de ise adenin ve üridinin ayrıldığı gözlemlenmiştir. pH 3.7'ye ayarlandığında ise 8 bileşik de ayrılmıştır. Daha sonra. inosin, guanosin, ksantosin, timidin, adenosin, 2-deoksiadenosin (2-DAO) gibi daha apolar olan bileşiklerin ayrılması için metanol oranı artırılmıştır. Bunun için gradient elüsyon yapılmıştır. A çözeltisi bileşimi hacimce 1:99 oranında pH'sı 3.7 olan metanol-tampon karışımıdır. B çözeltisinin bileşimi ise 20:80 oranında olan metanol-tampon karışımıdır (pH =6.2). Tablo 4.1'de uygulanan gradient programı verilmiştir.

Tablo 4.1. Gradient programı

Zaman	Mobil faz	pH
0	MeOH: 50 mM sodyum fosfat tamponu (1:99, h/h)	3.8
35 dak	MeOH: 50 mM sodyum fosfat tamponu (20:80, h/h)	6.2

Uygulanan gradient programı ile sitosin, urasil, sitidin, guanin, hipoksantin, adenin, uridin, timin, inosin, guanosin, ksantiosin, timidin, adenosin, 2-deoksiadenosin olmak üzere 14 nükleotit 25 dakika sürede 254 nm dalgaboyunda eş zamanlı olarak ayrılmıştır. İç standart olarak 3-metil ksantin kullanılmıştır. Şekilde nükleotitlere ait kromatogram görülmektedir.



Şekil 4.2. Etken maddelerin kromatografik ayrımının gösterimi ($\lambda = 254$ nm)

1. Sitosin, 2. Urasil, 3. Sitidin, 4. Guanin, 5. Hipoksantin, 6. Adenin, 7. Uridin, 8. Timin,
9. İnosin, 10. Guanosin, 11. İç standart, 12. Ksantin, 13. Timidin, 14. Adenosin,
15. 2-deoksiadenosin

Bağıl alıkonma zamanları hesaplanırken, her bir etken maddenin alıkonma zamanı, iç standardın alıkonma zamanına oranlanmıştır ($n=5$)(Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Nükleotitlerin bağıl alıkonma zamanları (n=5)

Pik	Standartlar	Bağıl Alıkonma zamanı	% BSS
1	Sitozin	0.171	1.015
2	Urasil	0.278	3.026
3	Sitidin	0.362	2.794
4	Guanin	0.392	1.308
5	Hipoksantin	0.423	0.657
6	Adenin	0.468	3.253
7	Üridin	0.529	0.596
8	Timin	0.610	0.367
9	İnosin	0.838	0.249
10	Guanosin	0.886	0.229
11	Ksantosin	1.053	0.177
12	Timidin	1.128	0.0629
13	Adenosin	1.346	1.601
14	2-Deoksiadenosin	1.431	1.376

4.2. Sistem Uygunluk Parametrelerinin Hesaplanması

4.2.1. Kapasite Faktörü (k')

Hareketli fazdan gelen pik t_0 zamanı olarak kabul edilmiştir ve 2.212 ± 0.045 dk olarak bulunmuştur. Tablo 4.3' de görüldüğü gibi her bir madde için kapasite faktörleri hesaplanmıştır. Sitozin haricinde kapasite faktörleri $0.4 < k' < 10$ aralığında bulunmuştur.

Tablo 4.3. Kapasite Faktörleri

Standartlar	Kapasite Faktörü (k')
Sitozin	0.358
Urasil	1.225
Sitidin	1.884
Guanin	2.102
Hipoksantin	2.341
Adenin	2.770
Üridin	3.185
Timin	3.818
İnosin	5.645
Guanosin	6.033
İç standart	6.935
Ksantosin	7.338
Timidin	7.960
Adenosin	9.795
2-Deoksiadenosin	10.462

4.2.2. Seçicilik Faktörü (α) ve Ayırıcılık (R)

Tablo 4.4’ de hesaplanan seçicilik faktörü ve ayırıcılık değerleri gösterilmiştir.

Tablo 4.4. Seçicilik faktörleri ve ayırıcılık değerleri

Standartlar	Seçicilik Faktörü(α)	Ayırıcılık (R)
Sitozin-Urasil	3.54	5.63
Urasil-Sitidin	1.54	3.09
Sitidin-Guanin	1.12	1.6
Guanin-Hipoksantin	1.11	1.07
Hipoksantin-Adenin	1.18	3.8
Adenin-Uridin	1.15	1.27
Uridin-Timin	1.20	2.44
Timin-İnosin	1.48	6.27
İnosin-Guanosin	1.07	1.18
Guanosin-ISTD	1.15	2.69
ISTD-Ksantosin	1.06	1.24
Ksantosin-Timidin	1.09	2.00
Timidin-Adenosin	1.23	4.82
Adenosin-2-deoksiadenosin	1.07	1.61

4.2.3. Teorik Tabaka Sayısı (N), Kuyruklanma ve Asimetri Faktörü

Kuyruklanma faktörü değerleri tüm maddeler için $0.5 \leq T \leq 2$ aralığında hesaplanmıştır. Asimetri faktörü değerlerinin tüm maddeler için 1.5’ den küçük olduğu bulunmuştur. Teorik tabaka sayısı değerleri 2000’den büyük olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.5).

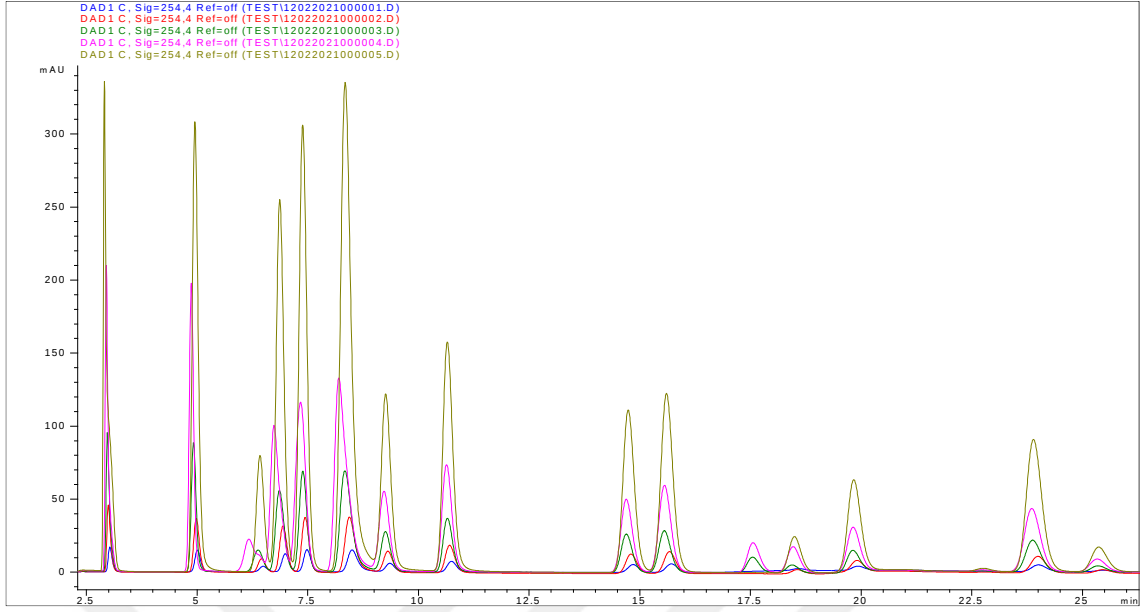
Tablo 4.5. Teorik tabaka sayısı ve asimetri faktörü değerleri

Standartlar	Teorik Tabaka Sayısı (N)	Asimetri Faktörü
Sitozin	2368.4	1.30
Urasil	2227.84	1.25
Sitidin	2567.11	1.28
Guanin	2546.37	1
Hipoksantin	3287.11	1.16
Adenin	2089.79	1.22
Üridin	3951.02	1.13
Timin	6060.02	1.30
İnosin	6666.24	1.25
Guanosin	7456.83	1.00
İç standart	8464.00	1.20
Ksantosin	11826.56	1.20
Timidin	10862.27	1.40
Adenosin	11500.01	1.16
2-deoksiadenosin	11302.05	1.16

4.3. Metot Validasyonu

4.3.1. Kalibrasyon Eğrisi

Her bir maddenin, çalışma aralıkları tespit edilmiştir. Pik alanları gözönüne alınarak kalibrasyon eğrileri çizilmiştir. Şekil 4.3’de farklı derişimlerde hazırlanmış bileşiklerin kromatogramları üst üste çakıştırılarak gösterilmektedir. Kalibrasyon eğrilerinin denklemleri Tablo 4.5’ de gösterilmektedir. Bu denklemler, 5 farklı günde, beş farklı konsantrasyonda gerçekleştirilen enjeksiyonlar sonucu elde edilmiştir. Kalibrasyon eğrilerinin açıklayıcılık katsayıları $R^2 > 0.99$ olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.3. 1-40 ppm derişim aralığında elde edilen kromatogramlar

Tablo 4.6. Nükleotid bileşiklerinin kalibrasyon eğrileri (DAD dedektör)

Standartlar	Çalışma Aralığı (mg.L ⁻¹)	Kalibrasyon Denklemi (y=mx+b)	R ²	%BSS (Eğim)	LOQ (mg/L)	LOD (mg/L)
Sitozin	1-40	y=69.816+8.5639	0.9998	0.421	1	0.4
Urasil	1-40	y=87.932x+2.4355	0.9997	3.186	1	0.5
Sitidin	5-40	y= 24.052x-1.7189	0.9960	4.209	5	1.5
Guanin	1.5-40	y=80.848+0.5189	0.9999	5.655	1.5	0.5
Hipoksantin	1-40	y=92.545+7.8753	0.9988	3.496	1	0.4
Adenin	1-40	y=106.849x- 20.40	0.9987	1.264	1	0.5
Üridin	3-40	y=47.673x+4.8551	0.9996	2.329	3	1
Timin	2-40	y=60.871x-4.1036	0.9996	1.921	2	0.7
İnosin	4-40	y=51.802x-1.7167	0.9993	4.183	4	1
Guanosin	4-40	y=57.685x+4.375	0.9996	1.479	4	1
Ksantosin	10-40	y=25.738+7.239	0.9998	7.136	10	2
Timidin	5-40	y=31.655-11.487	0.9992	3.427	5	2
Adenosin	5-40	y=58.939+0.5663	0.9996	1.293	5	1
2-Deoksiadenosin	5-40	y=57.501x-0.3624	0.9993	1.569	5	1.5

Nükleotid bileşikleri, S/G oranı yaklaşık olarak 3 olacak şekilde seyreltilerek, her bir türün saptama alt sınırı belirlenmiştir. Aynı şekilde, S/G oranı yaklaşık olarak 10 olacak şekilde seyreltilerek, her bir tür için alt tayin sınırı belirlenmiştir. Etken maddelerin LOD

ve LOQ değerlerinin belirlenmesi için; her bir madde tekrar sayısı 5'tir ve % BSS değerleri %1.50'nin altında bulunmuştur.

4.3.2. Kesinlik ve Doğruluk

Yöntemin doğruluğu Trüf'deki nükleosit bileşiklerinin analiz edilerek %geri kazanımının hesaplanmasıyla belirlendi. Mantar örneğine ekstraksiyondan önce 10 ppm olacak şekilde standart analitler eklendi. Ekstrakte edilmiş örnekteki her bir nükleosit bileşiğinin toplam miktarı kalibrasyon eğrisinin konsantrasyon aralığındaydı ve 3 tekrar yapıldı. Nükleosit bileşiklerinin elde edilen ortalama içerikleri, eklenmiş geri kazanımlarını hesaplamak için "gerçek değerler" olarak kullanıldı. Tablo 4.7'de elde edilen gerikazanım değerleri görölmektedir.

Tablo 4.7. Etken maddelerin doğruluk değerleri (n=3)

Analit	Orijinal (mg.L ⁻¹)	Eklenen (mg.L ⁻¹)	Bulunan	Geri Kazanım	%BSS
Sitozin	-	10	10.46	104.60	3.76
Urasil	23.76	10	32.45	96.12	4.28
Sitidin	-	10	10.87	108.70	5.73
Guanin	-	10	10.96	109.60	4.72
Hipoksantin	10.24	10	19.79	97.78	6.31
Adenin	5.59	10	14.67	94.10	5.27
Üridin	28.02	10	39.41	103.66	4.95
Timin	-	10	9.73	97.30	7.44
İnosin	20.41	10	29.54	97.14	6.56
Guanosin	22.66	10	32.06	98.16	8.93
Ksantosin	-	10	10.23	102.30	5.96
Timidin	-	10	9.50	95.00	7.68
Adenosin	23.07	10	32.71	98.91	8.21
2-DAO	-	10	11.68	116.80	3.59

Kesinlik değerlerini hesaplamak için 3 farklı konsantrasyonda hazırlanan kontrol örneklere 5 farklı günde enjekte edilmiştir. Elde edilen değerlerin bağlı standart sapması hesaplanarak (%BSS) kesinlik bulunmuştur (Tablo 4.8). Kesinlik için %BSS değerlerinin %10'un altında olduğu görölmektedir.

Tablo 4.8. Etken maddelerin kesinlik değerleri (günlerarası) (n=5)

Bileşik	Derişim (µg/mL)	Kesinlik (% BSS)
Sitozin	2	6.47
	5	2.31
	10	2.92
Urasil	2	7.91
	5	2.49
	10	5.29
Sitidin	5	8.46
	10	8.61
	20	4.49
Guanin	2	5.82
	5	1.59
	10	5.44
Hipoksantin	2	3.96
	5	3.52
	10	7.93
Adenin	2	4.38
	5	5.13
	10	6.38
Üridin	5	6.97
	10	7.86
	20	5.74
Timin	2	5.57
	5	5.59
	10	4.07
İnosin	2	8.50
	5	5.85
	10	3.91
Guanosin	2	6.33
	5	5.85
	10	3.90
Ksantosin	10	2.63
	20	8.09
	40	9.34
Timidin	5	2.45
	10	1.34
	20	6.08
Adenosin	5	5.29
	10	8.44
	20	7.36
2-deoksiadenosin	10	8.49
	20	8.91
	40	8.48

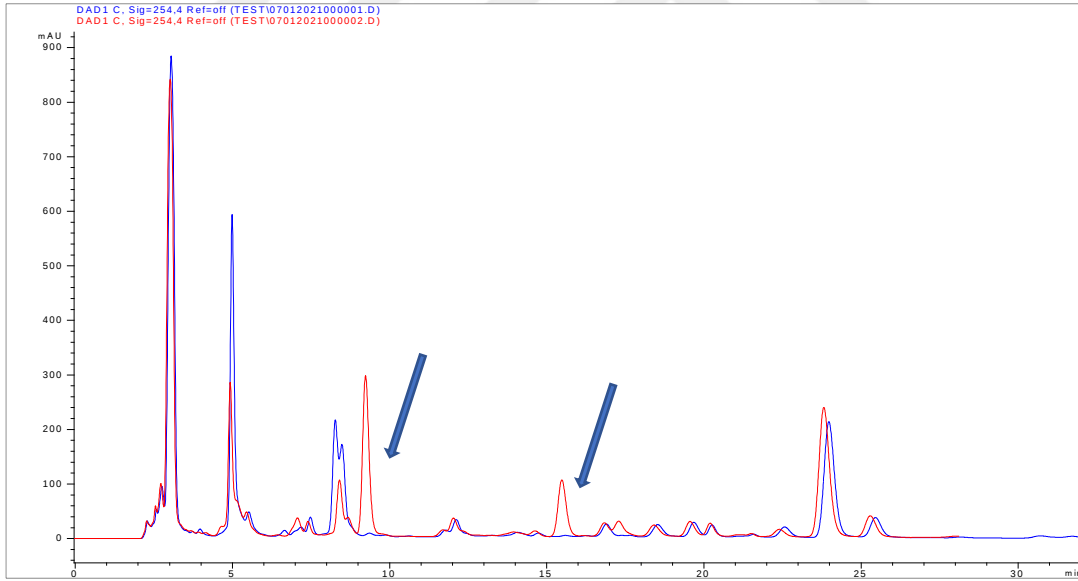
4.4. Mantar Örneklerindeki Nükleotidlerin Tayini

Piyasadan alınan mantar örnekleri liyofilize edildikten sonra, ses dalgaları destekli sıvı ekstraksiyonu ve basınçlı sıvı ekstraksiyonu olmak üzere iki farklı ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakte edilmiştir.

4.4.1. Ses Dalgaları Destekli Sıvı Ekstraksiyonun Yönteminin Optimize Edilmesi

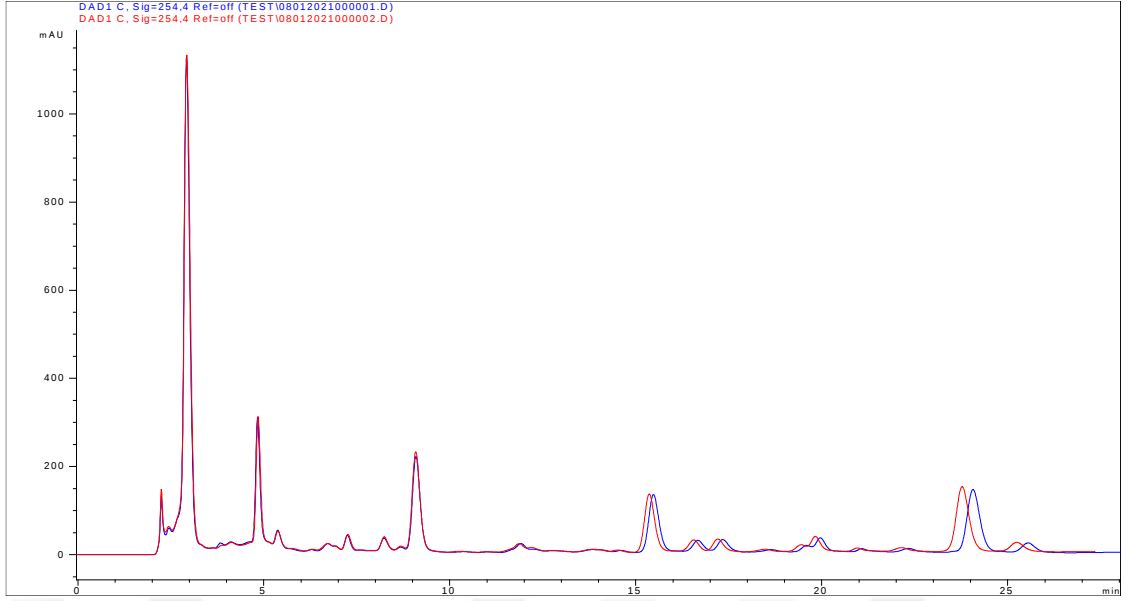
1 gram liyofilize edilmiş mantar örneğine (*Tuber aestivum*) 10 mL deiyonize su ilave edilerek ultrasonik banyoya konulmuştur. 30°C ve 70°C’de 30 dakika boyunca ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon işleminden sonra numune 12.000 rpm hızında santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatant 0.20 µm gözenek çapına sahip bir membran filtre yardımıyla süzöldükten sonra HPLC sistemine enjekte edilmiştir.

Şekil 4.2. de iki farklı sıcaklıkta elde edilen kromatogramlar üst üste çakıştırılmıştır. 30°C sıcaklıkta gözlenmeyen guanosin ve üridinin pikleri 70°C’de ekstraksiyon sıcaklığında gözlenmiştir. Bu yüzden ekstraksiyon sıcaklığı 70°C olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.4. Sıcaklığın ekstraksiyona etkisi

Daha sonra ekstraksiyon zamanı taranmıştır. Mantar numunesi (*Tuber Aestivum*) 70°C’de 30 dakika ve 45 dakikalık sürelerle ultrasonik banyoda ekstrakte edilmiştir. Şekil 4.3’de görüldüğü gibi 30 dakika ve 45 dakikalık sürelerde elde edilen kromatogramlar arasında bir fark yoktur. Zamanın 30 dakika olmasına karar verilmiştir.



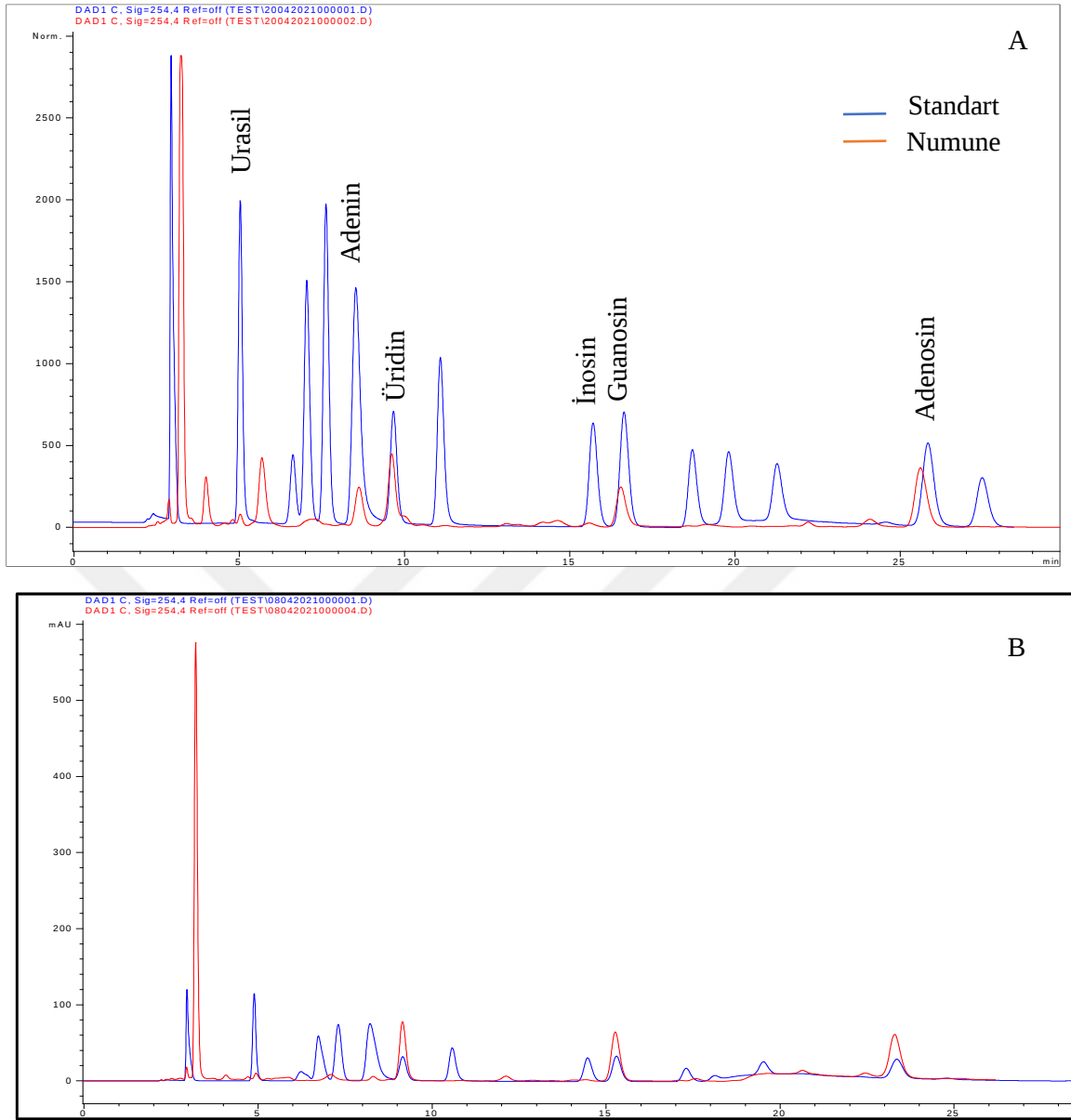
Şekil 4.5. Zamanın ekstraksiyona etkisi (30-45 dakika)

4.4.2. Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonu Yönteminin Uygulanması

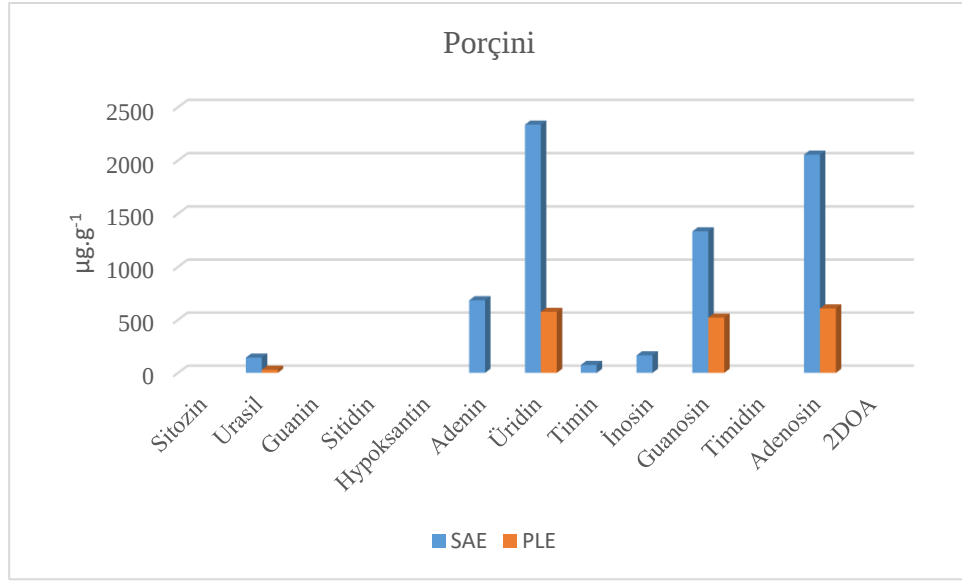
1 gramlık mantar örnekleri çelik ekstraksiyon hücrelerine konulmuştur. 1500 psi basınç altında, 70°C sıcaklıkta ve yarım saatlik sürede su kullanılarak ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.6’da Porçini (*Boletus edulis*)’ye ait sırasıyla ses dalgaları ve basınçlı sıvı ekstraksiyonu yöntemleri uygulanarak elde edilen kromatogramlar gösterilmektedir.

Kromatogramlardan görüldüğü Porçini’de urasil, adenin, üridin, guanosin ve adenosin bulunmaktadır. Her iki ekstraksiyon yöntemi ile bulunan bileşikler aynı olmasına rağmen, basınçlı sıvı ekstraksiyonundan elde edilen derişim değerleri ultrasonik ekstraksiyona göre oldukça düşüktür. Bunun nedeni basınçlı sıvı ekstraksiyonunun kapalı bir sistem olması ve ekstraksiyon çözücüsünün matrisle etkin bir etkileşime girememiş olmasıyla açıklanabilir. Grafikte iki yöntem karşılaştırılmıştır (Şekil 4.5).



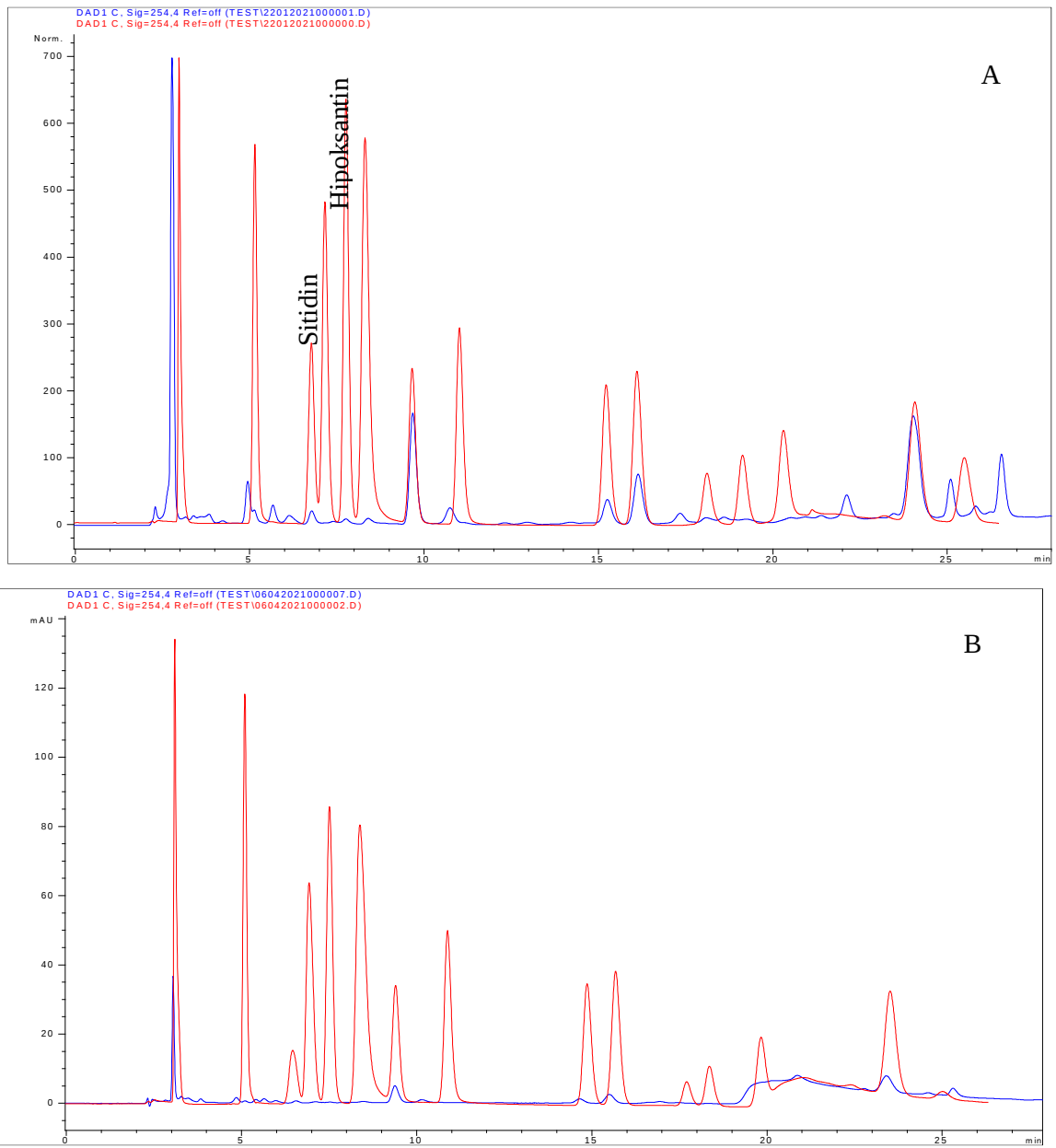
Şekil 4.6. Porçini (*Boletus edulis*) A. Ultrasonik ekstraksiyon B. Basınçlı sıvı ekstraksiyonu



Şekil 4.7. İki yöntemden elde edilen sonuçların gösterilmesi

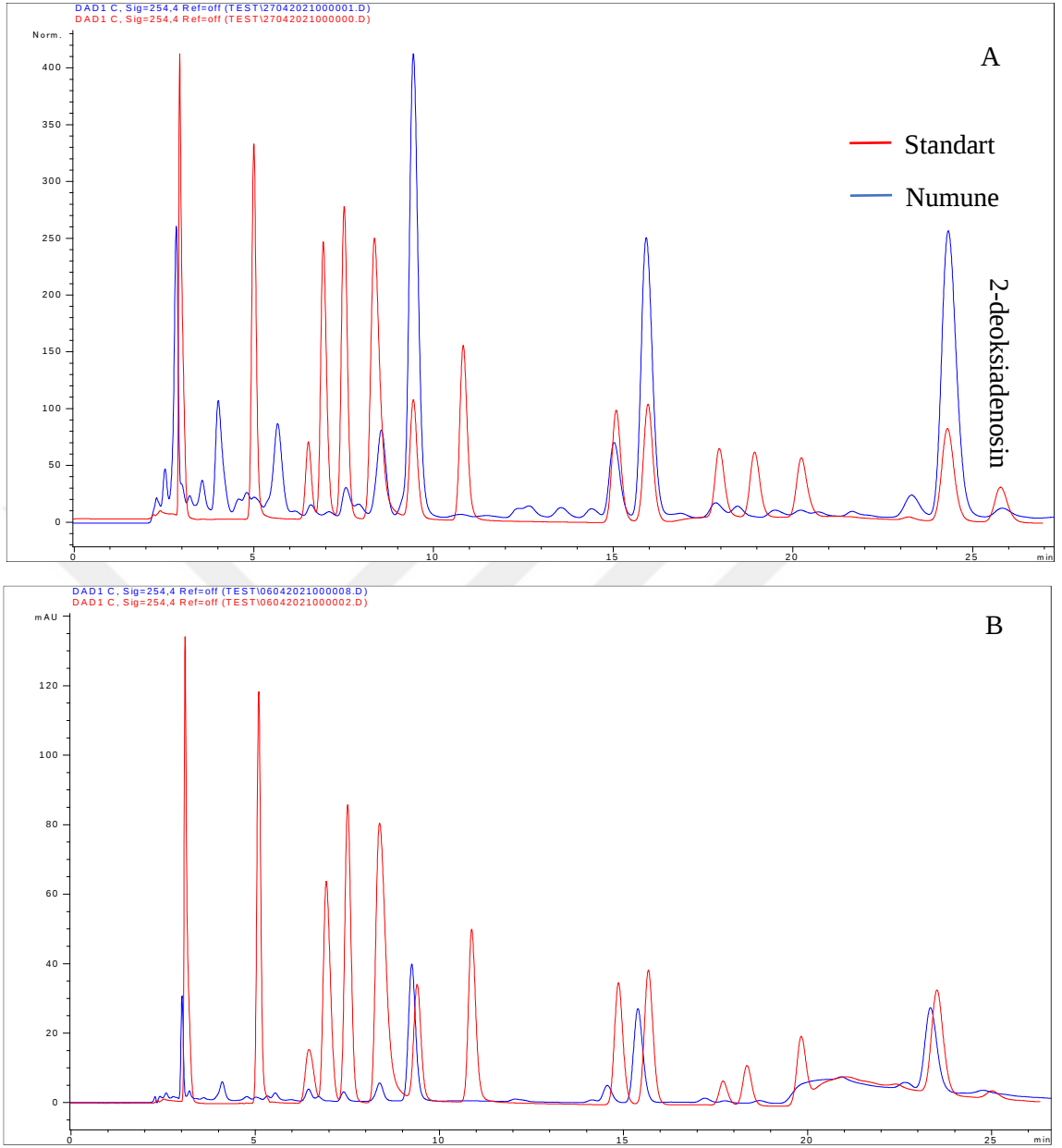
Şekil 4.8’de Sarıkız (*Cantharellus cibarius*)’a ait ultrasonik ve basınçlı sıvı ekstraksiyonu yöntemleri uygulanarak elde edilen kromatogramlar gösterilmektedir.

Sarıkız’da Porcini’de bulunan urasil, adenin, üridin, inosin, guanosin ve adenosinden farklı olarak sitidin ve hipoksantin bulunduğu saptanmıştır.



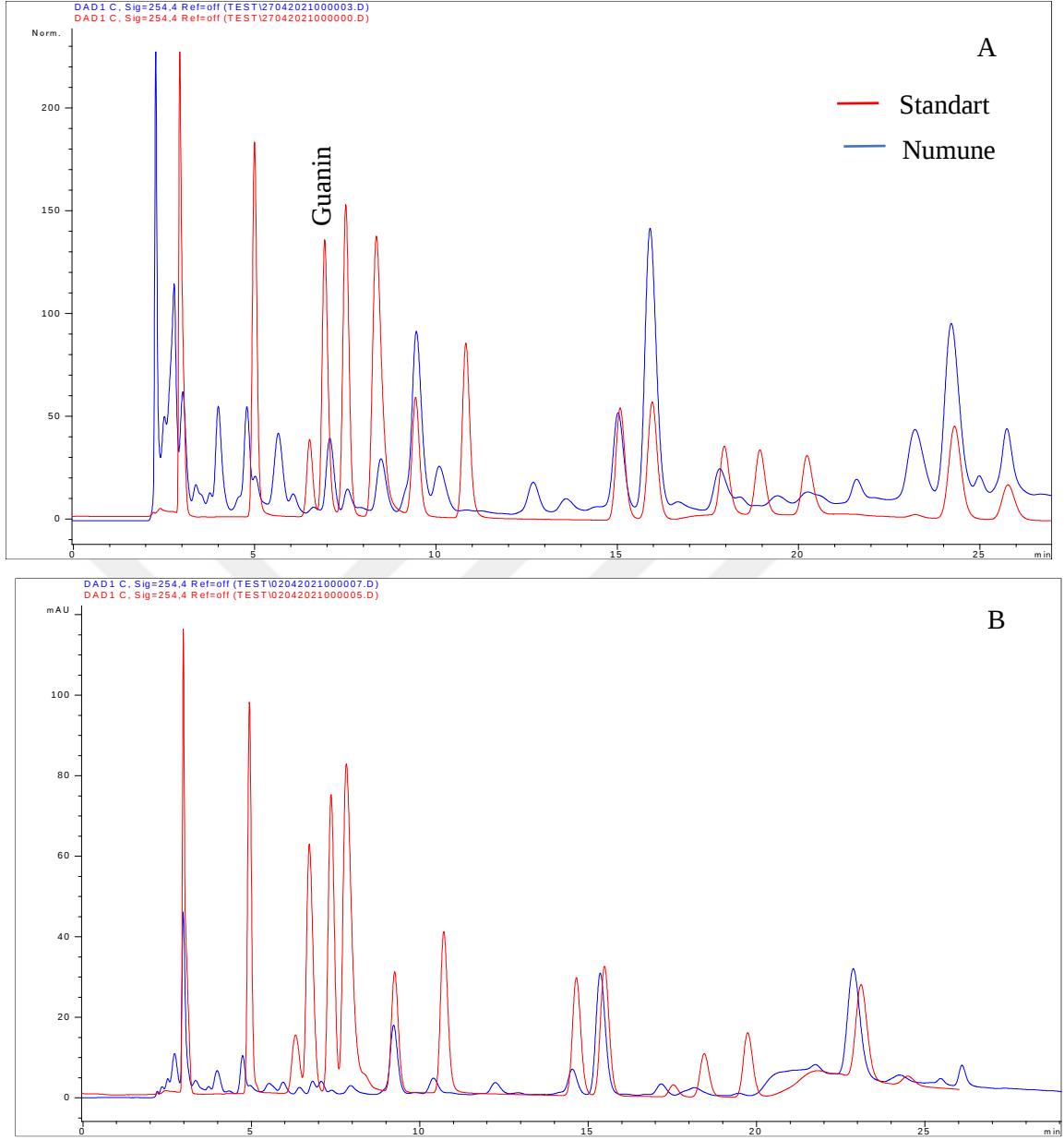
Şekil 4.8. Sarıkız (*Cantharellus cibarius*) A. Ultrasonik ekstraksiyon B. Basınçlı sıvı ekstraksiyonu

Şekil 4.9’de Kanlıca (*Lactarius Salmonicolor*)’ya ait ultrasonik ve basınçlı sıvı ekstraksiyonu yöntemleri uygulanarak elde edilen kromatogramlar gösterilmektedir. Kanlıcada diğer iki türden farklı olarak 2-deoksiadenosin bulunmuştur.



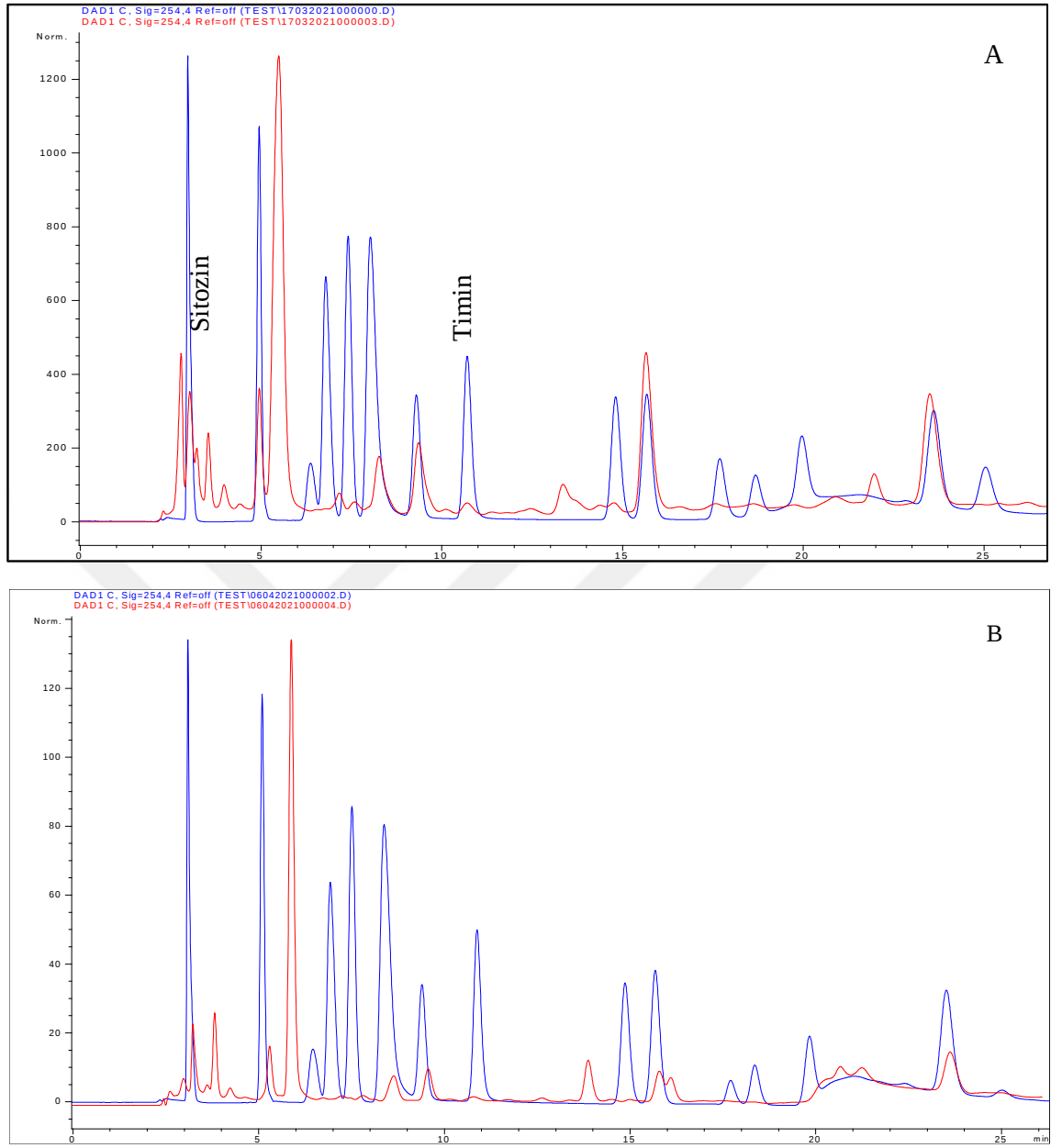
Şekil 4.9. Kanlıca (*Lactarius Salmonicolor*) A. Ultrasonik ekstraksiyon B. Basıncılı sıvı ekstraksiyonu

Şekil 4.10'de Borazan (*Craterellus fallax*)'ya ait ultrasonik ve basıncılı sıvı ekstraksiyonu yöntemleri uygulanarak elde edilen kromatogramlar gösterilmektedir. Borazan'da diğer türlerden farklı olarak Guanin bulunduğu saptanmıştır.



Şekil 4.10. Borazan(*Craterellus fallax*) A. Ultrasonik ekstraksiyon B. Basınçlı sıvı ekstraksiyonu

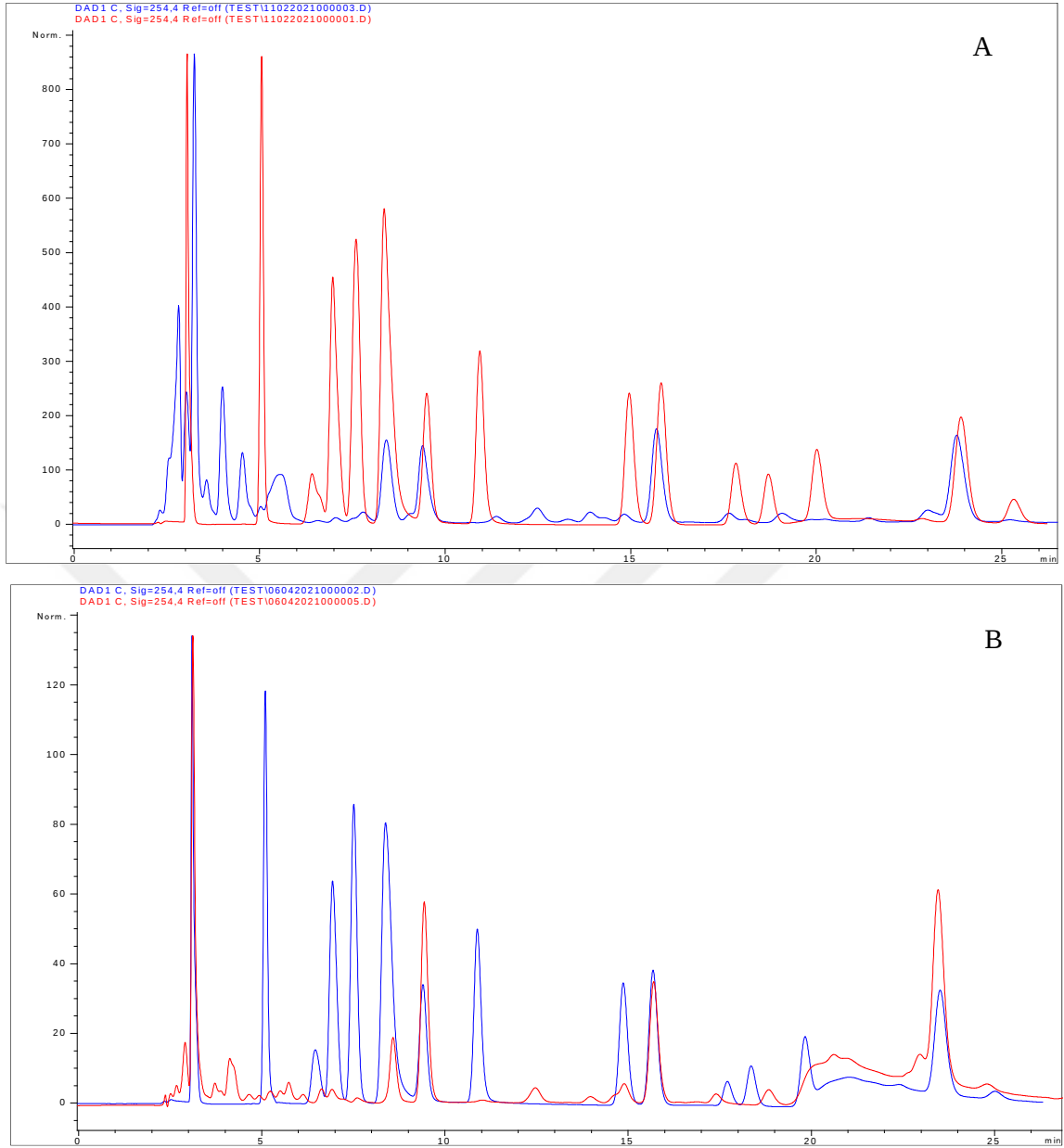
Şekil 4.11’de Kuzu Göbeği (*Morchella esculenta*)’ne ait ultrasonik ve basınçlı sıvı ekstraksiyonu yöntemleri uygulanarak elde edilen kromatogramlar gösterilmektedir.



Şekil 4.11. Kuzu Göbeği (*Morchella esculenta*) A. Ultrasonik ekstraksiyon B. Basınçlı sıvı ekstraksiyonu

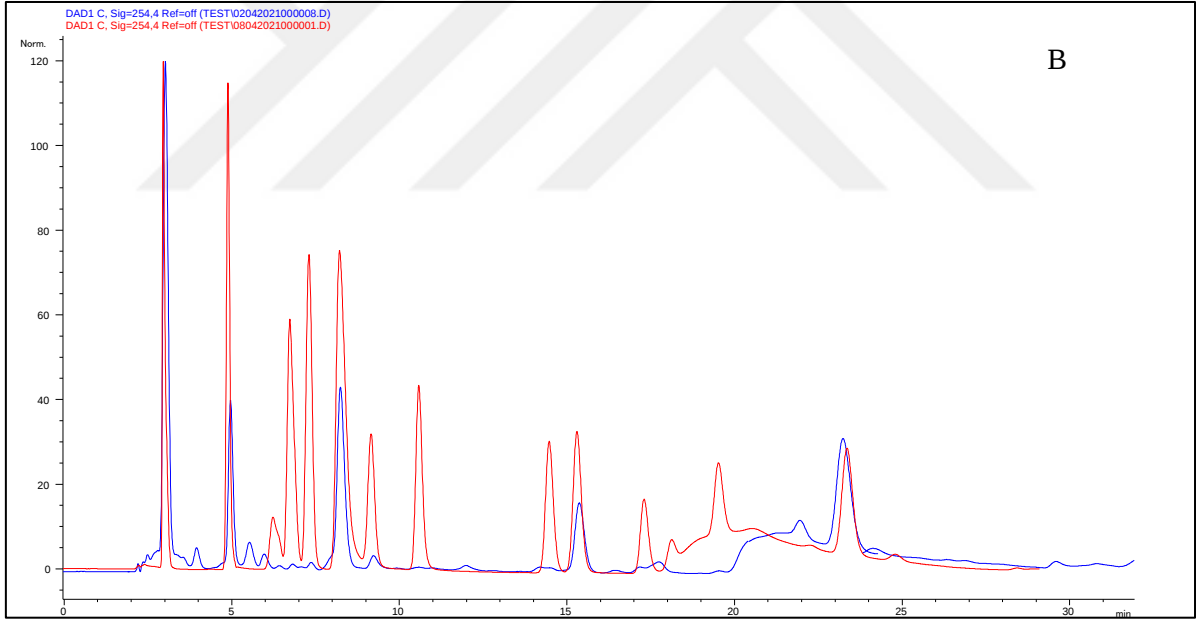
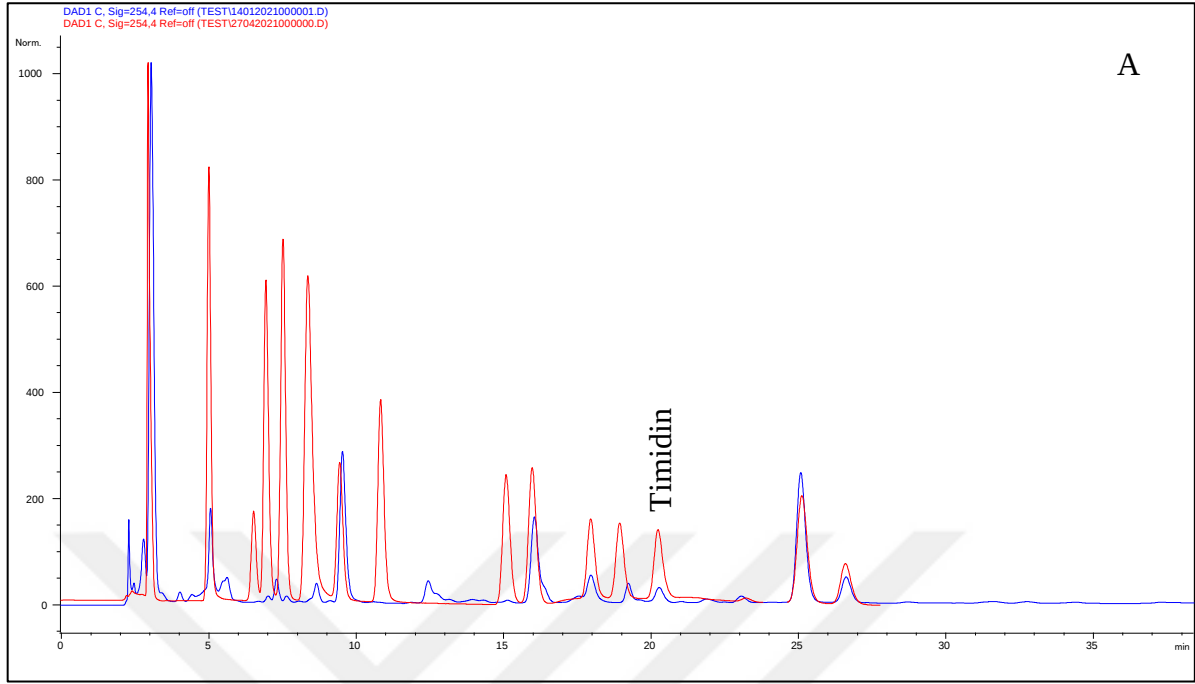
Kuzu Göbeği'nde diğer mantar türlerinden farklı olarak sitozin ve timin olduğu saptanmıştır.

Şekil 4.12'da Sığır Dili (*Hydnum repandum*)'ne ait ultrasonik ve basınçlı sıvı ekstraksiyonu yöntemleri uygulanarak elde edilen kromatogramlar gösterilmektedir.



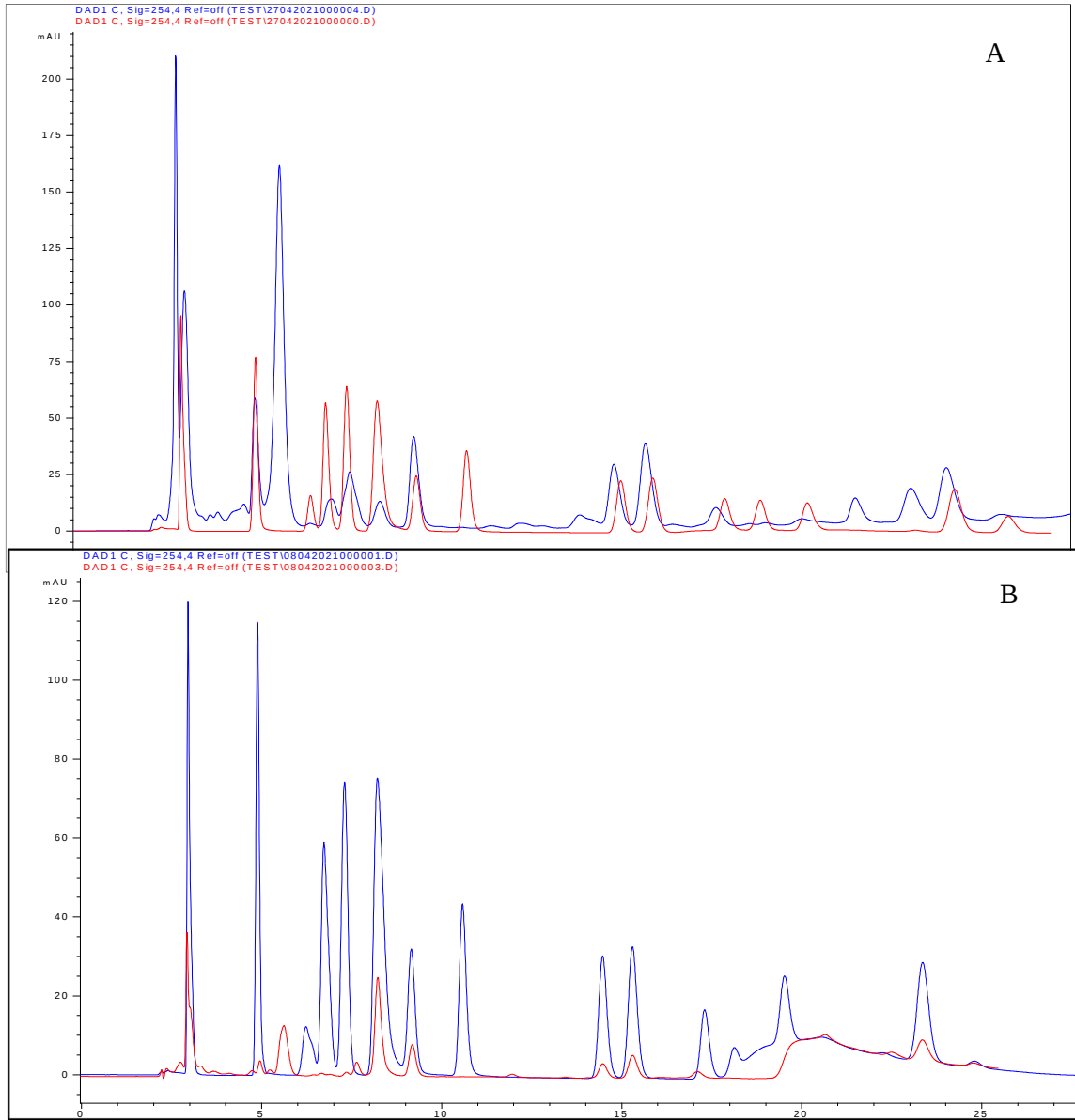
Şekil 4.12. Sığır Dili (*Hydnum repandum*) A. Ultrasonik ekstraksiyon B. Basıncılı sıvı ekstraksiyonu

Şekil 4.13’da Trüf (*Tuber Aestivum*)’ e ait ultrasonik ve basınçlı sıvı ekstraksiyonu yöntemleri uygulanarak elde edilen kromatogramlar gösterilmektedir. *Tuber Aestivum*’da diğer türlerden farklı olarak Timidin olduğu görülmüştür.



Şekil 4.13. Trüf (*Tuber Aestivum*) A. Ultrasonik ekstraksiyon B. Basıncılı sıvı ekstraksiyonu

Şekil 4.14’da Trüf (Tuber Borchii)’ e ait ultrasonik ve basınçlı sıvı ekstraksiyonu yöntemleri uygulanarak elde edilen kromatogramlar gösterilmektedir.



Şekil 4.14. Trüf (Tuber Borchii) A. Ultrasonik ekstraksiyon B. Basınçlı sıvı ekstraksiyonu.

Ultrasonik ekstraksiyon ve basınçlı sıvı ekstraksiyonu ile üç tekrarlı olarak analiz edilen yenilebilir mantarlar türlerinin nükleosit ve nükleobaz içerikleri Tablo 4.9 ve 4.10’da verilmiştir.

Tablo 4.9. Mantarlarda ultrasonik ekstraksiyon yöntemiyle bulunan nükleosit ve nükleobaz miktarları ($\mu\text{g.g}^{-1}$)(n=3)

Bileşik	Porcini (<i>Boletus edulis</i>)	Sarıköz (<i>Cantharellus cibarius</i>)	Kanlıca (<i>Lactarius salmonicolor</i>)	Borazan (<i>Craterellus fallax</i>)	Kuzu Göbeği (<i>Morchella esculenta</i>)	Sığır Dili (<i>Hydnum repandum</i>)	Trüf (<i>Tuber aestivum</i>)	Trüf (<i>Tuber borchii</i>)
Sitozin	-	-	-	-	57.01±1.22	-	-	-
Urasil	144.05±5.16	22.55±2.67	20.04±1.03	38.74±1.29	478.10±8.29	50.51±5.42	280.04±24.76	237.61±15.78
Sitidin	-	114.97±10.52	114.67±13.87	-	-	+	-	+
Guanin	-	-	-	78.22±7.64	-	32.04±1.61	-	-
Hipoksantin	-	19.10±1.98	42.93±4.53	34.24±5.66	-	+	18.39±2.32	102.44±8.64
Adenin	684.37±114.05	26.77±3.15	157.04±14.24	124.50±9.32	462.69±17.45	436.95±8.56	67.18±0.92	55.93±6.82
Uridin	2335.38±121.46	472.27±50.39	1605.20±67.10	387.46±25.27	1130.74±45.02	707.38±56.60	943.14±37.43	280.16±21.66
Timin	55.49±4.27	-	-	-	248.85±12.51	-	-	-
İnosin	164.80±26.18	156.65±11.68	367.66±49.89	190.63±10.34	359.12±23.56	90.91±6.65	63.10±4.78	204.07±10.17
Guanosin	1333.94±56.42	218.87±32.90	943.05±43.88	586.40±5.03	1980.14±47.64	673.93±25.01	490.91±44.32	226.65±16.02
Ksantin	-	-	-	-	-	-	-	-
Timidin	-	-	-	-	-	-	276.60±19.65	-
Adenosin	2054.10±145.33	640.48±93.81	1210.93±104.05	742.91±54.51	2291.05±135.27	944.03±98.23	865.82±75.87	230.66±25.92
2-DOA	-	-	119.23±13.72	252.67±27.47	-	96.58±7.34	277.39±33.43	+
Toplam	6772.13	1671.66	4580.75	2435.77	7007.70	3032.33	3282.57	1337.52

NOT: + ile belirtilen bileşikler mantarda mevcut olan, fakat S/G oranı <10 olduğu için miktarı hesaplanamayan bileşiklerdir.

Tablo 4.10. Mantarlarda basınçlı sıvı ekstraksiyonu yöntemiyle bulunan nükleosit ve nükleobaz miktarları ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)(n=3)

Bileşik	Porcini (<i>Boletus edulis</i>)	Sarıköz (<i>Cantharellus cibarius</i>)	Kanlıc (<i>Lactarius salmonicolor</i>)	Borazan (<i>Craterellus fallax</i>)	Kuzu Göbeği (<i>Morchella esculenta</i>)	Sığır Dili (<i>Hydnum repandum</i>)	Trüf (<i>Tuber aestivum</i>)	Trüf (<i>Tuber borchii</i>)
Sitozin	-	-	-	-	64.03±3.84	-	-	-
Urasil	29.22±1.98	+	+	+	65.19±6.81	+	81.66±5.32	+
Sitidin	-	+	+	-	-	+	-	-
Guanin	-	-	-	+	-	+	-	-
Hipoksantin	-	+	+	+	-	+	+	-
Adenin	+	+	+	+	66.95±4.72	44.09±5.37	77.39±7.47	79.26±7.14
Uridin	575.02±7.95	+	289.49±33.41	149.87±21.32	125.60±8.33	234.39±16.34	50.32±4.76	51.70±6.34
Timin	-	-	-	-	+	-	-	-
İnosin	-	+	+	+	+	45.39±4.10	63.10±4.78	+
Guanosin	521.01±10.10	+	207.47±9.63	241.57±12.54	94.83±5.09	146.35±14.23	90.38±8.54	+
Ksantin	-	-	-	-	-	-	-	-
Timidin	-	-	-	-	-	-	-	-
Adenosin	693.67	+	252.29±13.76	395.46±18.45	278.26±8.57	380.42±33.46	289.68±32.65	+
2-DOA	-	-	+	+	-	+	+	+

5. TARTIŞMA

Liu ve arkadaşları Tuber türlerini dondurarak kurutmuş ve toz haline getirilen numuneler 250 µm'lik elekten geçirilmiştir (59). 100.0 mg numune tartılmış ve ardından ultrasonik hücre parçalama aparatı ile 120 s (400W güç, 2 s ultrason, 2 sn aralıklı ve 60 kez) ekstrakte edilmiştir. Fermantasyon misellerindeki toplam nükleosit ve nükleobaz miktarı 4881.5 - 12.592.9 µg g⁻¹ aralığında iken, meyve veren gövdeler bu miktar 498.1-2274.1 µg.g⁻¹'dir. Aralarında 2-25 katlık bir fark vardır. Tablo 5.3'de Tuber türlerinin meyve veren gövdesinde nükleosit ve nükleobaz miktarları verilmiştir.

Tablo 5.1. Tuber türlerinin meyve veren gövdesindeki nükleosit ve nükleobaz içerikleri (µg.g⁻¹)

Analit	Meyve veren gövdesinde				
	<i>T.sinense</i>	<i>T.indicum</i>	<i>T.himalayense</i>	<i>T.aestivum</i>	<i>T.borchii</i> var
Adenin	318.3 ± 17.9	172.3 ± 3.3	346.3 ± 7.1	265.0 ± 12.1	n.d
Hipoksantin	161.2 ± 2.1	37.0 ± 2.2	31.8 ± 1.6	126.2 ± 6.7	175.9 ± 2.3
Üridin	274.5 ± 8.4	309.2 ± 5.7	260.1 ± 6.2	137.3 ± 2.5	n.d.
Adenosin	241.8 ± 10.9	415.6 ± 10.0	542.1 ± 9.6	50.1 ± 2.4	58.6 ± 1.3
Guanin	185.8 ± 9.8	376.0 ± 12.7	481.2 ± 9.5	200.0 ± 7.1	49.1 ± 3.6
Guanosin	238.6 ± 7.2	404.8 ± 11.7	544.5 ± 2.6	226.2 ± 3.6	95.7 ± 5.5
İnosin	85.9 ± 3.4	77.2 ± 5.3	68.1 ± 2.1	215.5 ± 10.1	118.8 ± 3.8
Toplam	1506.1 ± 64.2	1792.1± 79.2	2274.1± 106.5	1220.3 ± 71.9	498.1 ± 24.7

Bu çalışmadaki adenosin, guanosin ve üridin miktarları bizim çalıştığımız Trüf (*Tuber borchii*), Trüf (*Tuber aestivum*) türlerine göre oldukça düşüktür. Bunun nedeni ekstraksiyonu oda sıcaklığında yapılmasından ve protein girişimini engellemek için sorbent olarak kullanılan D3520 makro gözenekli reçinenin nükleotidleri adsorplamasından kaynaklanabilir.

Ying ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *Tricholoma matsutake* (Tm) ultrasonik destekli ekstraksiyon ile 10 dakika boyunca ekstrakte edilmiş, ardından 1 saat boyunca 60 °C'de su banyosu ısıtılmıştır (57). Bulunan yabancı ve kültür mantarındaki bileşiklerin içerikleri Tablo 5.1’de verilmiştir. Burada da bizim çalışmamızla paralel olarak en fazla bulunan bileşiklerin üridin, adenin ve guanosin olduğu görülmektedir.

Tablo 5.2. Tm’nin sulu ekstraktındaki bileşiklerin içerikleri (mg/g)

Bileşikler	Yabani Tm	Kültür Tm
Tirosin	2.55 ± 0.08*	1.78 ± 0.05
Sitidin	1.24 ± 0.03	0.73 ± 0.05
Üridin	1.98 ± 0.11	2.01 ± 0.16
Fenilalanin	1.82 ± 0.07	1.06 ± 0.05
İnosin	0.12 ± 0.01	0.09 ± 0.01
Guanosin	1.58 ± 0.04	1.07 ± 0.08
Triptofan	0.54 ± 0.01	0.39 ± 0.04
Adenosin	1.72 ± 0.04	1.23 ± 0.02

*Ortalama±SS (n=6)

Yang ve arkadaşları *Cordyceps* türlerinde adenosine-5'-monophosphate (AMP) guanosine-5'- monophosphate (GMP), guanosin, uridin, inosin, sitidin, timidin, kordisepin adenin, guanin, urasil , hipoksantin, sitozin ve timini olmak üzere 16 bileşiği iyon çifti ters faz sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi yöntemiyle tayin etmişlerdir (56). 0.2 g toz halindeki örnek 10 mL kaynayan su (100 °C) ile Syncore Reaktöründe geri soğutucuyla 100 °C’de 30 dakika boyunca muamele edilmiştir. 12 farklı mantar numunesinde sitozin 88.1-195.2 µg.g⁻¹, sitidin 72.9-618.5 µg.g⁻¹, urasil 184.5-399.9 µg.g⁻¹, üridin 182.6-6872.2 µg.g⁻¹, hipoksantin 33.9-220.2 µg.g⁻¹, guanin 98.2-1211.5 µg.g⁻¹, inosin 41.5-445.0 µg.g⁻¹, guanosin 150.3-4097.9 µg.g⁻¹, adenin 37.9-571.3 µg.g⁻¹, timidin 41.1-160.1 µg.g⁻¹ ve adenosin 339.6-5235.8 µg.g⁻¹ aralığında bulunmuştur. Bu yöntemin dezavantajı 60 dakika gibi uzun bir analiz zamanına sahip olmasıdır.

Liu ve arkadaşları 0.1 g kurutulmuş toz haline getirilmiş *Cordyceps taii* ‘yi 5 mL metanol:su (1:5, h/h) çözeltisi ile karıştırmış ve oda sıcaklığında ultrasonik hücre bozucu ile 10 dakika aralıklı olarak ekstrakte etmişlerdir (53). Bu işlem 2 kere tekrar edilmiştir. Daha sonra 3000 rpm’de 10 dakika santrifüjlenmiştir. 0.22 µm gözenek boyutuna sahip membranlarda süzülerek HPLC analizinden önce 4°C’de muhafaza edilmiştir. Tablo 5.2’de µg.g⁻¹ cinsinden nükleosit miktarları verilmiştir. En fazla bulunan türün adenosin

olduğu görülmektedir. Genellikle mantarlarda en fazla bulunan bileşik olan üridin bu çalışmada tayin edilmemiştir. Bulunan guanosin miktarının literatürdeki diğer *Cordyceps* türlerinden daha düşük olması ekstraksiyonun oda sıcaklığında yapılmasına bağlanabilir.

Tablo 5.3. İncelenen nükleositlerin *Cordyceps taii*'deki miktarları

Bileşik	Miktar ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
Urasil	1295.28 $\pm$ 56.41
Sitidin	279.18 $\pm$ 11.22
2'-deoksiüridin	1600.66 $\pm$ 52.04
İnosin	194.01 $\pm$ 16.90
Guanosin	708.91 $\pm$ 18.75
Adenin	141.19 $\pm$ 13.08
Timin	233.81 $\pm$ 11.31
Adenosin	2388.45 $\pm$ 93.83
2'-deoksiadenosin	52.62 $\pm$ 5.39

Ikeda ve arkadaşları, *Cordyceps* türlerini araştırmışlardır (58). Kültürlü *Cordyceps* örnekleri 0.5 g tartılmış, doğal *Cordyceps* örnekleri ise meyve veren gövdesi ve tırtıl kısmı ayrılarak 0.1 g olacak şekilde tartılmıştır. Şişeye hacminin yaklaşık %90'ına kadar su ilave edilip ve 1 saat sonike edilmiştir. 25°C'de 4000 g'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra HPLC sistemine süzülerek enjekte edilmiştir. Adenosin, kordisepin, 2'-deoksiadenosin, guanosin ve üridin miktarları sırasıyla 0.28–14.15; 0.006–6.36; 0.01–0.14; 0.68–14.79 ve 0.19–20.29 mg.g⁻¹ olarak bulunmuştur. Yöntemin dezavantajı adenosin, kordisepin, 2'-deoksiadenosin ve guanosinin ayrılması için asetonitril–su (5:95, h/h) hareketli fazı kullanılmış ve ayırım 20 dakikada gerçekleşmiştir. Hipoksantin ve üridinin ayrılması için ise, hareketli faz olarak hacimce 2:98 asetonitril–su kullanılmış ve ayırım 16 dakikada 260 nm dalgaboyunda gerçekleşmiştir. Mantar örneklerinin nükleotid içeriklerini tayin etmek için iki farklı izokratik elüsyon uygulanmış ve örnekler iki defa enjekte edilmiştir. Eş zamanlı tayin yapılmamıştır.

Yuan ve arkadaşları mantarları şapka, lamel veya sporlar ve sap olmak üzere 3 bölüme ayırarak analiz etmişlerdir. Kurutulmuş ve toz haline getirilmiş 0.1-0.3 g miktarda yenilebilir mantar numunelerini 5 mL su ile karıştırılarak 10 dakika sonikasyondan sonra 10000 g'de 5 dakika santrifüj etmişlerdir (60). Ekstraksiyon işlemi 3 kez tekrarlandıktan sonra toplanan ekstraktlar HPLC'de analiz edilmiştir. Analiz süresi 30 dakikadır. *A. Aegerita* türünde ana nükleositlerin guanosin, üridin ve sitidin olduğu ve toplam nükleosit

ve nükleobazların %81.6'sından fazla olduğu bulunmuştur. Üridin, guanosin ve adenosin *T. albuminosus* (>%77.6), *L. edodes* (>%72.9) ve *C.sinesis* (>%62.0).’deki başlıca nükleositlerdir. *C. militaris* için, kordisepin, üridin, ve adenosin (>%86,9) ana nükleositlerdir. *G. lucidum* için, üridin ve inosin (>%60.1) ana nükleositlerdir. Spor üreten hücreleri içeren kısımlardaki toplam nükleosit miktarının diğer kısımlara göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Yapılan analizle mantarlardaki nükleosit ve nükleobaz miktarının sabit olmadığını, mantarın türüne ve gelişim aşaması bağlı olduğunu söylemişlerdir. Çalışmamızda üridin, adenosin, ve guanosin Porçini(>%84.5), Sarıkız (>%79.6), Kanlıca (>%82.06), Borazan (>%70.48), Kuzu Göbeği (>%77.09), Sığır Dili(>%76.68), *Tuber aestivum* (>%70.06)’da ana nükleositlerdir. *Tuber borchii*’de üridin, adenosin, ve guanosin yanında urasil de ana nükleosittir (>%72.90).

Peng ve arkadaşları *Ganoderma lucidum* örneklerinin meyve kısmını 1 g tartarak ultrasonik banyoda 20 mL su ile 45 dakika ekstrakte etmişlerdir (54). Ekstrakt 3000 g de 5 dakika santrifüjlendikten sonra, süpernatant 0.45 µm’lik membran filte ile süzülerek HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Toplam nükleosit ve nükleobaz içerikleri 8.1 ila 216.94 mg.100g⁻¹ olarak bulunmuştur. Bu içerik farklı *Ganoderma* türleri belirgin farklılıklar göstermektedir. Başlıca nükleositler inosin, guanosin ve adenosin olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda da iki farklı Trüf mantarı olan *Tuber aestivum* ve *Tuber borchii* arasında toplam nükleosit içeriği bakımından önemli fark vardır. *Tuber aestivum*’da toplam nükleosit içeriği 3282.57 µg.g⁻¹ iken *Tuber borchii* 1337.52 µg.g⁻¹ olarak bulunmuştur.

Chen ve arkadaşları 16 nükleosit ve nükleobazın farklı *Ganoderma* türlerindeki tayini için zwitter iyonik hidrofilik etkileşim kromatografi (ZIC-HILIC) yöntemini geliştirmiştir (61). 1 g mantar örneği 20 mL bidistile su ile karıştırılmıştır. Ardından oda sıcaklığında 10 dakika ultrasonik ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. 4000 g’de 30 dakikalık santrifüj işleminden sonra üst faz, 0.20 µm’lik bir membran filtreden süzölmüş ve HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Analiz süresi 40 dakikadır. Uzun analiz süresi önemli bir dezavantajdır. Tablo 5.4’de elde edilen sonuçlar görülmektedir.

Tablo 5.4. Farklı Genoderma türlerinin nükleosit ve nükleobaz içerikleri ($\mu\text{g.g}^{-1}$)

Analitler	<i>G.atrum</i>			<i>G.lucidum</i>			<i>G.sinense</i>	
	Jiangxi	Zhejiang	Anhui	Shandong	Hubei	doğal	Fujian	doğal
Timin	-	-	-	-	-	-	-	-
Urasil	1.26	145.4	62.87	210.65	406.12	645.43	25.91	30.67
Timidin	-	138.23	117.90	260.22	474.44	235.96	23.77	15.57
2-DAO	-	-	-	-	-	-	-	-
2-deoksiüridin	-	25.15	28.75	52.83	173.05	105.66	6.10	10.99
Adenin	-	56.54	46.80	67.65	147.29	202.80	12.27	11.25
Adenosin	39.76	26.32	8.17	17.14	53.87	-	25.67	7.40
Üridin	3.64	-	-	8.40	-	41.42	4.36	-
Guanin	44.26	-	-	21.03	-	-	45.65	6.38
2-deoksinosin	10.23	-	-	-	-	-	24.78	18.49
sitozin	10.94	8.31	43.39	19.65	-	88.41	34.00	34.01
2-deoksisitidin	6.05	12.36	23.30	9.99	-	-	7.91	13.97
inosin	3.25	13.48	27.55	42.65	-	-	13.23	-
2-deoksiguanosin	3.36	-	-	-	-	6.36	2.25	1.29
sitidin	-	-	-	-	-	-	5.39	2.91
guanosin	4.36	4.89	3.28	14.00	25.47	7.05	11.37	1.60
toplam	127.11	430.69	362.01	724.01	1270.24	1333.11	242.66	154.53

Gao ve arkadaşları 1 gram toz haline getirilmiş 6 örneği, 15 mL Milli-Q su ekleyerek 45 dakika ultrasonik işlemci ile ekstrakte etmişlerdir (62). Alınan supernatantlar azot atmosferinde 1mL'ye kadar deriştirilmiş ve 0.45 μm 'lik bir filtreden süzülerek HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Üridinin, iki Lingzhi türünde (*Ganoderma lucidum* ve *G. sinense*) tayin edilen bileşikler arasında en fazla bulunan bileşik olduğu bulunmuştur. Tablo 5.5'de 6 türün içerdiği bileşiklerin hangi aralıklarda olduğu $\mu\text{g.g}^{-1}$ olarak verilmiştir.

Tablo 5.5. *Ganoderma lucidum* ve *G. sinense* türlerinin meyve veren gövdesindeki nükleosit ve nükleobaz içerikleri ($\mu\text{g.g}^{-1}$)

Bileşik	$\mu\text{g.g}^{-1}$
Urasil	7.38-73.11
Sitidin	3.04-200.57
Hipoksantin	1.33-110.83
Üridin	61.49-264.93
Timin	3.62-17.19
İnosin	1.83-96.06
Guanosin	4.18-214.62
Timidin	5.51-36.02
Adenosin	1.76-269.03

Bu çalışmada $\mu\text{g.g}^{-1}$ olarak bulunan nükleosit ve nükleobaz içerikleri literatürdeki değerlerden daha düşüktür. Bu durum mantar türlerinin farklı olmasından kaynaklanabileceği gibi, ekstraksiyonun oda sıcaklığında yapılmasından da kaynaklanabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Farklı yenilebilir mantar türlerinde nükleosit ve nükleobazların tayin edilmesi için ters faz sıvı kromatografisi yöntemi kullanılmıştır. Analiz edilen mantar türleri Trüf (*Tuber borchii*), Trüf (*Tuber aestivum*), Trüf (*Tuber borchii*), Trüf (*Tuber aestivum*), Borazan (*Craterellus fallax*), Kuzu Göbeği (*Morchella esculenta*), Porçini (*Boletus edulis*), Sığır Dili (*Hydnum repandum*), Sarı Kız (*Cantharellus cibarius*) ve Kanlıca (*Lactarius Salmonicolor*)'dır.

Sitosin, urasil, sitidin, guanin, hipoksantin, adenin, uridin, timin, inosin, guanosin, ksantiosin, timidin, adenosin, 2-deoksiadenosin olmak üzere 14 nükleotit C18 kolon kullanılarak, 1 mL.dak⁻¹ akış hızında, 25 dakika sürede 254 nm dalgaboyunda eş zamanlı olarak ayrılmıştır. Hareketli faz olarak metanol ve 50 mM sodyum fosfat tamponu kullanılarak gradient elüsyon yapılmıştır. Bunun için hareketli fazın pH'sı ve organik çözücü miktarı taranarak en iyi ayırma koşullarında A çözeltisi bileşimi hacimce 1:99 oranında pH'sı 3.7 olan metanol-tampon karışımıdır. B çözeltisinin bileşimi ise 20:80 oranında olan metanol-tampon karışımıdır (pH =6.2).

Liyofilize edilen mantar örneklerini analiz etmek için ses dalgaları destekli sıvı ekstraksiyonu ve basınçlı sıvı ekstraksiyonu olmak üzere farklı ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Ses dalgaları destekli sıvı ekstraksiyonunda yüksek geri kazanım oranları elde edilmiştir. Basınçlı sıvı ekstraksiyonundaki düşük geri kazanımın nedeni sisteminin kapalı bir sistem olması ve mantarların ekstraksiyon esnasında şişmelerinden dolayı ekstraksiyon çözücüsünün matrisle etkin bir etkileşime girememesi olduğu düşünülmektedir.

Mantarlarda en fazla bulunan türlerin adenosin, guanosin ve üridin olduğu saptanmıştır. Çalışılan mantar türlerinde ksantosine rastlanmamıştır. En fazla nükleotit içeriğine sahip olan mantar türünün Kuzu Göbeği olduğu bulunmuştur. Daha sonra Porçini gelmektedir. En düşük nükleotit içeriğine sahip mantar türü ise Trüf (*Tuber borchii*)'dür. Çalıştığımız mantarlarda adenosin miktarı 230.66 ve 2291.05 µg.g⁻¹ ; guanosin miktarı 218.87 ve 1980.14 µg.g⁻¹; üridin miktarı 280.16 ve 2335.38 µg.g⁻¹; inosin miktarı 63.10 ve 367.66 µg.g⁻¹; urasil miktarı 20.04 ve 478.10 µg.g⁻¹; 2-DOA 96.58 ve 277.39 µg.g⁻¹; hipoksantin miktarı 18.39 ve 102.44 µg.g⁻¹ aralığında bulunmuştur. Sitidin yalnız iki mantar türünde 114.97 ve 114.67 µg.g⁻¹; guanin iki mantar türünde 32.04

ve 78.22 $\mu\text{g.g}^{-1}$; timidin bir mantar türünde 276.60 $\mu\text{g.g}^{-1}$ ve sitozin bir mantar türünde 57.01 $\mu\text{g.g}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

Nükleositler ve / veya nükleotidler beyin fonksiyonunu geliştirdiği, bağışıklık cevabını artırdığı, bağırsakta demir emilimine katkıda bulunduğu dair pek çok çalışma mevcuttur. Yüksek besleyici ve fonksiyonel değere sahip önemli besin kaynakları olan mantarların düzenli olarak tüketilmesi önemlidir.



KAYNAKLAR

1. Valverde ME, Hernandez-perez T, Paredes-lopez O. Edible mushrooms: improving human health and promoting quality life. *Int J Microbiol* 2015, 376387: 1-14.
2. Chang ST, Miles PG. *Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact*, CRC Press, Boca Raton, Fla, USA, 2nd edition, 2008.
3. Phan CW, David P, Tan YS, Naidu M, Wong KH, Kuppusamy UR, Sabaratnam V. Intrastrain comparison of the chemical composition and antioxidant activity of an edible mushroom, *Pleurotus giganteus*, and its potent neuritogenic properties. *Sci World J* 2014, 378651:1-10.
4. Mattila P, Könkö K, Eurola M, Pihlava JM, Astola J, Vahteristo L, Hietaniemi V, Kumpulainen J, Valtonen M, Piironen V. Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. *J. Agric. Food Chem* 2001, 49 (5): 2343–8.
5. Kalac P. A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms, *J. Sci. Food Agric* 2013, 93 (2): 209–18.
6. Kalac P, Svoboda L. A review of trace element concentrations in edible mushrooms, *Food Chem* 2000, 69: 273-81.
7. Alonso J, Garcia MA, Perez-Lopez M, Melgar MJ. Macrofungi as potential bioremediation agent in compost material contaminated with heavy metals. *Rev. Toxicol* 2004, 21: 11-5.
8. Barros L, Baptista P, Estevinho LM, Ferreira ICFR. Bioactive properties of the medicinal mushroom *Leucopaxillus giganteus* mycelium obtained in the presence of different nitrogen sources. *Food Chem* 2007, 105: 179–86.
9. Sarikurkcu C, Tepe B, Yamac M. Evaluation of the antioxidant activity of four edible mushrooms from the Central Anatolia, Eskisehir–Turkey: *Lactarius deterrimus*, *Suillus collitinus*, *Boletus edulis*, *Xerocomus chrysenteron*. *Bioresour Technol* 2008, 99: 6651–5.
10. Wang Z, Luo D, Liang Z. Structure of polysaccharides from the fruiting body of *Herichium erinaceus* Pers. *Carbohydrate Polym* 2004, 57:241247.
11. Kim SH, Song YS, Kim SK, Kim BC, Lim CJ, Park EH. Anti-inflammatory and related pharmacological activities of the n-BuOH subfraction of mushroom *Phellinus linteus*. *J Ethnopharmacol* 2004, 93:141–6.

12. Synytsya A, Mickova K, Synytsya A, Jablonsky I, Spevacek J, Erban V. Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: structure and potential prebiotic activity. *Carbohydr Polym.* 2009, 76:548–56.
13. Patel S and Goyal A. Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics: a review. *Biotech* 2012, 2:1–15.
14. Jacobson KA, Constanzi S, Ohno M, Joshi BV, Besada P, Xu B, Tchilibon S. Molecular recognition at purine and pyrimidine nucleotide (P2) receptors. *Curr Top Med Chem.* 2004, 4:805–19.
15. Kilfoil PJ, Tipparaju SM, Barski OA, Bhatnagar A. Regulation of ion channels by pyridine nucleotides. *Circ Res* 2013, 112:721-41.
16. Phana CW, Wang JK, Cheah SC, Naidu M, David P and Sabaratnam V. A review on the nucleic acid constituents in mushrooms: nucleobases, nucleosides and nucleotides. *Crit. Rev. Biotechnol* 2018, 38 (5): 762–77.
17. Capelo JL, Mota, AM. Ultrasonication for analytical chemistry. *Curr. Anal. Chem* 2005, 1(2): 193-201.
18. Huertas-Perez JF, Iruela, MD, Garcia-Campana, AM, Gonzalez-Casado A, Sanchez-Navarro A. Determination of the herbicide metribuzin and its major conversion products in soil by micellar electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr A* 2006, 1102(1-2): 280-6.
19. Lesueur C, Gartner M, Mentler A, Fuerhacker M. Comparison of four extraction methods for the analysis of 24 pesticides in soil samples with gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-ion trap-mass spectrometry. *Talanta* 2008, 75(1): 284-93.
20. Tadeo JL, Sanchez-Brunete C, Albero B, Garcia-Valcarcel AI. Application of ultrasound-assisted extraction to the determination of contaminants in food and soil samples. *J. Chromatogr. A* 2010, 1217(16): 2415-40.
21. Richter BE, Jones BA, Ezzell, JL, Porter, NL, Avdalovic N, Pohl C. Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation. *Anal. Chem* 1996, 68(6): 1033-9.
22. Moreno E, Reza J, Trejo A. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil using water under subcritical conditions. *Polycycl Aromat Compd* 2007, 27(4):239-60.

23. Lundstedt S, Bavel B, Haglund P, Tysklind M, Oberg L. Pressurised liquid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils. *J. Chromatogr. A* 2000, 883(1-2): 151-62.
24. Rostagno MA, Villares A, Guillaumon E, Garcia-Lafuente A, Martinez, JA. Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods. *J. Chromatogr. A* 2009, 1216(1): 2-29.
25. Bjorklund E, Nilsson T. Pressurised liquid extraction of persistent organic pollutants in environmental analysis. *Trends Analyt Chem* 2000, 19(7): 434-45.
26. Camel V. Recent extraction techniques for solid matrices-supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. *Analyst* 2001, 126(7): 1182-93.
27. Cazes J. *Ewing's Analytical Instrumentation Handbook*, 3. Baskı, New York, Marcel Dekker, 2005: 698-704.
28. Mermet JM, Otto MV, Valcárcel M, Widmer HM. *Analytical Chemistry: A Modern Approach to Analytical Science*, 2.baskı. Wiley-VCH, 2004.
29. Skoog DA, Holler EJ, Crouch SR. *Principles of Instrumental Analysis*, 6.baskı, Kanada, Thomson Brooks / Cole, 2007.
30. David S. Hage JD. Carr. *Analytical Chemistry and Quantitative Analysis*, International Edition. New Jersey: Pearson, 2011.
31. Kenkel J. *Analytical Chemistry for Technicians*, 2.nd edition. Washington, D.C: Lewis Publishers, 1994.
32. https://legacy-stage.waters.com/waters/fr_BE/HPLC_ColumnHardware/nav.htm?locale=fr_BE&cid=10049068 Son Erişim Tarihi: 27.04.2022
33. https://www.waters.com/waters/en_TR/HPLC-Separation-Mode/nav.htm?cid=10049076&locale=en_TR Son Erişim Tarihi: 27.04.2022
34. Ahuja S, Dong MW. *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC*, 6.th edition. New York, North Carolina: Elsevier, Academic Press. 2005.
35. Snyder LR, Kirkland JJ, Glajch JL. *Practical HPLC Method Development* 2nd edition. Kanada: A Wiley-Interscience Publication. 1997:59-99.
36. Cazes J. *Ewing's Analytical Instrumentation Handbook* 3th edition. New York, U.S.A, Marcel Dekker, 2005:687-724.
37. Zakeri-Milani, P, Barzegar-Jalali, M, Tajerzadeh, H, Azarmi, Y, Valizadeh, H. Simultaneous Determination of Naproxen, Ketoprofen and Phenol Red in Samples

- from Rat Intestinal Permeability Studies: HPLC Method Development and Validation. *J. Pharm. Biomed* 2005, 39: 624-30.
38. Chan CC, Lam H, Lee YC, Zhang XM. *Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification*, 1st edition. New Jersey, Wiley-Interscience. 2004.
 39. Lang JR, Bolton SA, Comprehensive method validation strategy for bioanalytical applications in the pharmaceutical industry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1991, 5: 357-61.
 40. Nash RA, Wachter AE, *Pharmaceutical Process Validation*, 3rd edition New York-Basel and Marcel Dekker Inc. 2003.
 41. EURACHEM Guide, *A laboratory guide to method validation and related topics*. 1998.
 42. WELAC, Western European Laboratory Accreditation Cooperation, *Guidance Documents*, 1993.
 43. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, *Validation of analytical procedures*, Q2A, Geneva. 1995.
 44. Rodriguez LC, Campana AM, Linares CJ, Ceba MR. Estimation of performance characteristics of an analytical method using the data set of the calibration experiment, *Anal. Lett.* 1993, 26: 1243-58.
 45. Causon R, Validation of chromatographic methods in biomedical analysis viewpoint and discussion. *J. Chromatogr. B* 1997, 689:175-80.
 46. Gardner JA, Coleman S, Farrow SG. Why worry about your analytical methods? *Anal. Proc* 1993, 30: 183-5.
 47. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, *Validation of analytical procedures: Methodology*, Q2B, 1996.
 48. US FDA, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), *General principles of validation* Rockville, Maryland, 1987.
 49. Agalloco J, Carleton FJ, *Validation of Pharmaceutical Processes*, 2nd edition. Informa Healthcare USA, Inc. 2008.
 50. Jimé'Neza C, Venturaa R., Seguraa, J. Validation of Qualitative Chromatographic Methods: Strategy in Q Antidoping Control Laboratories. *J. Chromatogr. B* 2002, 767: 341-51.

51. IUPAC, *Compendium of Analytical Nomenclature, Definitive Rules 1997*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, 1998.
52. González AG, Herrader MÁ. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *Trends Analyt Chem* 2007, 26(3): 227-38.
53. Liu R, Zhang X, Li X., Xiao J, Zhong J. Simple and Rapid Method for Simultaneous Determination of Eleven Nucleosides and Nucleobases in Medicinal Macrofungus *Cordyceps taii*. *Lat. Am. J. Pharm* 2015, 34 (2): 283-90.
54. Peng JL, Peng QX, Lin LM, Dong WW, Liu TS, Xia XH, Yang DJ. Simultaneous Determination of 13 Nucleosides and Nucleobases in *Ganoderma lucidum* and Related Species by HPLC-DAD, *Asian J. Chem.* 2014, 26 (12): 3477-82.
55. Ranogajec A, Beluhan S, Smit Z, Analysis of nucleosides and monophosphate nucleotides from mushrooms with reversed-phase HPLC, *J Sep Sci* 2010, 33(8), 1024-33.
56. Yang FQ, Li DQ, Fenga K, Hua DJ, Li SP. Determination of nucleotides, nucleosides and their transformation products in *Cordyceps* by ion-pairing reversed-phase liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2010, 1217: 5501–10.
57. Ying X, Ma J, Liang Q, Wang Y, Bai G, Lu G. Identification and Analysis of the Constituents in an Aqueous Extract of *Tricholoma Matsutake* by HPLC Coupled with Diode Array Detection/ Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Food Sci.* 2013, 78(8): 1173-82.
58. Ikeda R, Nishimura M, Sun Y, Wada M, and Nakashima K. Simple HPLC-UV determination of nucleosides and its application to the authentication of *Cordyceps* and its allies. *Biomed. Chromatogr* 2008, 22: 630–6.
59. Liu P, Li YY, Li H M, Wana DJ, Tang YJ. Determination of the nucleosides and nucleobases in Tuber samples by dispersive solid-phase extraction combined with liquid chromatography–mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 2011, 687:159–67.
60. Yuan JP, Zhao SY, Wang JH, Kuang HC, Liu X. Distribution of Nucleosides and Nucleobases in Edible Fungi. *J. Agric. Food Chem* 2008, 56 (3):809-15.
61. Chen Y, Bicker W, Wu JY, Xie M, Lindner W. Simultaneous Determination of 16 Nucleosides and Nucleobases by Hydrophilic Interaction Chromatography and Its Application to the Quality Evaluation of *Ganoderma*. | *J. Agric. Food Chem.* 2012, 60: 4243-52.

- 62.** Gao JL, Leung KSY, Wang YT, Lai CM, Li SP, Hu LF, Lu GH, Jiang ZH, Yu ZL. Qualitative and quantitative analyses of nucleosides and nucleobases in *Ganoderma* spp. by HPLC–DAD–MS. *J. Pharm. Biomed.* 2007, 40: 807–11.



EKLER

EK 1.



EK-2.

