

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

***Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii* ve BAZI ENDEMİK *DİGİTALİS* TÜRLERİNİN
EKSTRAKTLARINDA MEVCUT KARDİYAK GLİKOZİTLERİ VE FENOLİK
BİLEŞİKLERİN KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Emine AKYÜZ

**OCAK 2011
TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

***Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii* ve BAZI ENDEMİK *DİGİTALİS* TÜRLERİNİN
EKSTRAKTLARINDA MEVCUT KARDİYAK GLİKOZİTLERİ VE FENOLİK
BİLEŞİKLERİN KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ**

Emine AKYÜZ

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
“Doktor (Kimya)”
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Enstitüye Verildiği Tarih : 11.01.2011
Tezin Savunma Tarihi : 27.01.2011**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Münevver SÖKMEN
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Hasan Basri ŞENTÜRK
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Mehmet TÜFEKÇİ
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Nuri İhsan KALYONCU
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Muzaffer TUNÇEL**

Enstitü Müdürü: Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Trabzon 2011

ÖNSÖZ

Scrophulariaceae familyasından *Digitalis*' in Türkiye'ye endemik *davisiana*, *cariensis*, *trojana* ve *lamarckii* türleri ve endemik olmayan *ferruginea* türünün *ferruginea* ve *schischkinii* alt türlerinin farklı aylarda toplanan yapraklarındaki fenolik bileşiklerinin HPLC-UV ile belirlenmesi Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü ve Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalında çalışılmıştır.

Bu çalışma 2008-111-002-7 nolu KTÜ Bilimsel Araştırma Projesi tarafından desteklenmiştir, desteklerinden dolayı KTÜ BAP Birimine teşekkür ederiz.

HPLC-UV yöntemi ile tanımlanamayan fenoliklerin HPLC-MS ile karakterizasyonu Belçika'nın Ghent Üniversitesi, Pfizer Analitik Araştırma Merkezinde gerçekleştirilmiştir. Toplam fenolik madde içerikleri de spektrofotometrik olarak KTÜ, Fen Fakültesi, Kimya Bölümünde çalışılmıştır. *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii*' nin yaprak, çiçek ve petiyollerinde kardiyak glikozitlerinin HPLC-DAD ile belirlenmesi Bolu, Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünde gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmam boyunca bana destek olan danışman hocam Prof. Dr. Münevver Sökmen' e teşekkür ederim. Çalışmanın yürütülebilmesi için bana laboratuvar imkânlarını açan Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalı hocalarım Prof. Dr. Nuri İhsan Kalyoncu ve Yrd. Doç. Dr. Mine Kadioğlu Duman' a teşekkür ederim. Çalışmamda her türlü laboratuvar imkânlarını ve danışmanlığını sunan Prof. Dr. Patrick Sandra ve Öğretim Üyesi Dr. Frederic Lynen'e teşekkür ederim. Endemik türlerin arazi örneklerini bana sağlayan arkadaşım Arş. Gör. Buhara Yücesan'a ve *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii*' nin kardiyak glikozitlerini çalışmamızda destek olan Prof. Dr. Ekrem Gürel'e teşekkür ederim. Çalışmanın doku kültür örneklerini sağlayan Prof. Dr. Atalay Sökmen'e teşekkür ederim. Çalışmada bana yol arkadaşlığı yapan her an desteğini hissettiren kardeşim Arş. Gör. Hüseyin Şahin'e teşekkür ederim. Manevi desteklerinden dolayı arkadaşlarım Arş. Gör. İlknur Tatlıdil'e ve Bahar İbrahim' e teşekkür ederim.

Bana her zaman anlayış gösteren, çalışmalarına saygı duyup ellerinden gelen desteği esirgemeyen başta annem Hatice Akyüz olmak üzere tüm aileme teşekkür ederim.

Emine AKYÜZ
Trabzon 2011

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET	VI
SUMMARY	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLolar DİZİNİ.....	XI
SEMBOLLER DİZİNİ	XIII
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Bitkisel Biyoaktif Bileşikler.....	1
1.1.1. Fenolik Bileşikler	1
1.1.1.1. Fenolik Bileşiklerin Kimyasal Yapıları ve Sınıflandırılması.....	1
1.1.1.2. Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu	5
1.1.2. Kardiyak Glikozitleri	7
1.2. Bitki Bileşenlerinin Analizinde Kullanılan Yöntemler.....	8
1.2.1. Kromatografik Yöntemlerle Bitki Bileşenlerinin Analizi.....	8
1.2.1.1. Yüksek-Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	9
1.2.1.1.1. Ultraviyole Dedektör	10
1.2.1.1.2. Kütle Spektrometrik Dedektör	12
1.2.1.2. Fenolik Bileşiklerin LC ile Ayrılması ve Dedeksiyonu.....	15
1.2.2. Spektrofotometrik Toplam Fenolik Madde Tayini	16
1.3. <i>Digitalis</i> Türleri ve Özellikleri.....	17
1.4. Amaç	20
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	23
2.1. Bitkilerin Toplanması	23
2.2. Bitki Ekstraktlarından Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu	24
2.2.1. Ekstraksiyon Koşullarının Geri kazanımlarının Hesaplanması	24
2.2.2. <i>Digitalis</i> Türlerinden Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu	26
2.2.3. Örneklerin Kodlanması	27

2.3.	<i>Digitalis ferruginea</i> ssp. <i>schischkinii</i> Bitkisinden Kardiyak Glikozitlerinin Ekstraksiyonu	29
2.4.	Bitki Ekstraktlarında Fenolik Bileşiklerin HPLC-UV ve HPLC-UV-MS Analizleri.....	30
2.4.1.	Kimyasal Malzeme ve Materyaller	30
2.4.2.	Standartlar ve Kalibrasyon.....	31
2.4.3.	HPLC-UV Koşulları	31
2.4.4.	HPLC-UV İçin Dedeksiyon Limitinin (LOD) Belirlenmesi	32
2.4.5.	HPLC-UV-MS Koşulları	32
2.5.	Bitki Ekstraktlarındaki Kardiyak Glikozitlerinin HPLC-DAD İle Analizleri	34
2.5.1.	Materyaller	34
2.5.2.	Standartlar ve Kalibrasyon.....	34
2.5.3.	HPLC-DAD Koşulları	34
2.5.4.	HPLC-DAD İçin Dedeksiyon Limitinin (LOD) Belirlenmesi.....	34
2.6.	Bitki Ekstraktlarında Spektrofotometrik Toplam Fenolik Madde Tayini.....	35
3.	BULGULAR.....	36
3.1.	Fenolik Bileşiklerin Analizi İçin HPLC-UV Metot Optimizasyonu	36
3.2.	HPLC-UV-MS Metot Optimizasyonu	38
3.3.	Bitki Örneklerinden Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonunun Optimizasyonu	39
3.4.	Bitki Ekstraktlarında Fenolik Bileşiklerinin HPLC-UV Analizleri.....	42
3.4.1.	<i>Digitalis ferruginea</i> ssp. <i>schischkinii</i> Bitkisinin HPLC-UV Analizleri.....	42
3.4.2.	<i>Digitalis ferruginea</i> ssp. <i>ferruginea</i> Bitkisinin HPLC-UV Analizleri.....	44
3.4.3.	<i>Digitalis trojana</i> Bitkisinin HPLC-UV Analizleri.....	45
3.4.4.	<i>Digitalis davisiana</i> Bitkisinin HPLC-UV Analizleri	46
3.4.5.	<i>Digitalis lamarckii</i> Bitkisinin HPLC-UV Analizleri	47
3.4.6.	<i>Digitalis cariensis</i> Bitkisinin HPLC-UV Analizleri	48
3.4.7.	<i>Digitalis ferruginea</i> ssp. <i>schischkinii</i> Bitkisinin Doku kültürü Örneklerinin HPLC-UV Analizleri	49
3.5.	Bitki Ekstraktlarında Fenolik Bileşiklerinin HPLC-UV-MS Analizleri.....	50
3.5.1.	Fenolik Asitler	53
3.5.2.	Flavonoid Aglikonları	56
3.5.3.	Flavonoid Türevleri	60
3.6.	<i>Digitalis ferruginea</i> ssp. <i>schischkinii</i> Bitkisindeki Kardiyak Glikozitlerinin HPLC-DAD Analizleri	74
3.7.	Bitki ekstraktlarında Spektrofotometrik Toplam Fenolik Madde Tayini	75

4.	TARTIŞMA	79
4.1.	Fenolik Bileşiklerin Analizi İçin LC-UV Metot Optimizasyonu	79
4.2.	HPLC-UV-MS Metot Optimizasyonu	79
4.3.	Bitki Örneklerinden Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonunun Optimizasyonu	79
4.4.	Bitki Ekstraktlarında Fenolik Bileşiklerinin HPLC-UV Analizleri.....	81
4.4.1.	<i>Digitalis ferruginea</i> ssp. <i>schischkinii</i> Bitkisinin HPLC-UV Analizleri.....	82
4.4.2.	<i>Digitalis ferruginea</i> ssp. <i>ferruginea</i> Bitkisinin HPLC-UV Analizleri.....	82
4.4.3.	<i>Digitalis trojana</i> Bitkisinin HPLC-UV Analizleri.....	83
4.4.4.	<i>Digitalis davisiana</i> Bitkisinin HPLC-UV Analizleri	83
4.4.5.	<i>Digitalis lamarckii</i> Bitkisinin HPLC-UV Analizleri	83
4.4.6.	<i>Digitalis cariensis</i> Bitkisinin HPLC-UV Analizleri	83
4.4.7.	<i>Digitalis ferruginea</i> ssp. <i>schischkinii</i> Bitkisinin Doku kültürü Örneklerinin HPLC-UV Analizleri	84
4.4.8.	<i>Digitalis</i> Türlerinde Fenolik Bileşiklerin HPLC-UV Analizlerinin Karşılaştırılması	84
4.5.	Bitki Ekstraktlarında Fenolik Bileşiklerinin HPLC-UV-MS Analizleri.....	85
4.5.1.	Fenolik Asitler	86
4.5.2.	Flavonoid Aglikonları	88
4.5.3.	Flavonoid Türevleri	89
4.6.	<i>Digitalis ferruginea</i> ssp. <i>schischkinii</i> Bitkisindeki Kardenolitlerin HPLC-DAD Analizleri	92
4.7.	Bitki Ekstraktlarında Spektrofotometrik Toplam Fenolik Madde Tayini.....	93
5.	SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	95
6.	KAYNAKLAR	97
	ÖZGEÇMİŞ.....	104

ÖZET

Bu çalışmada kapsamında Scrophulariaceae familyasından *Digitalis*' in (Türkçe: Yüksük otu) Türkiye'ye endemik *davisiana*, *cariensis*, *trojana* ve *lamarckii* türleri ve endemik olmayan *ferruginea* türünün *ferruginea* ve *schischkinii* alt türlerinin farklı aylarda toplanan yapraklarındaki fenolik bileşikleri, optimize edilen koşullarda ekstre edilerek HPLC-UV ile belirlenmiştir. Ekstraksiyon optimizasyonu için üç farklı prosedür uygulanmıştır; doğrudan ekstraksiyon, hidrolizli ekstraksiyon ve pH=2' de ekstraksiyon. HPLC-UV yöntemi ile tanımlanamayan fenoliklerin HPLC-MS ile karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Toplam fenolik madde içerikleri spektrofotometrik olarak gallik asit ve kateşin cinsinden tayin edilmiş ve sonuçlar kromatografik sonuçlarla karşılaştırılmıştır. Fenolik bileşiklerin analiz sonuçları türlere, toplanma yeri ve zamanına göre karşılaştırılmıştır. Ayrıca kalp ilaçlarında etkin madde olarak kullanılan kardiyak glikozitleri bu türlerden *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii*' nin yaprak, çiçek ve petiyollerinde HPLC-DAD ile belirlenmiş, bu türün doku kültürleri de yapılarak fenolik içerikleri belirlenmiştir.

HPLC-UV analizleri kafeik, ferulik, ve p-kumarik asit açısından türlerin zengin olduklarını göstermiştir. HPLC-MS analizleri ile başlıca apigenin, kamferid, luteolin, fisetin ve ramnazin flavonoidleri ve bunların diheksöz, heksoz, glukuronit, asetil glikozit ve deoksiheksoz bağlı türevleri karakterize edilmiştir. *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii*' de lanatosit C, digoksin ve digitoksin kardiyak glikozitleri en bol olarak yaprak kısmında sırasıyla 86,14; 20,8; ve 15,43 mg/L bulunmuştur. Toplam fenolik bileşikler doğrudan metanol ekstraktlarında en yüksek *Digitalis davisiana* Eylül ayı örneğinde (34,105 mg GAE/g numune) iken hidroliz edilen örneklerde *Digitalis cariensis* Eylül ayı örneğinde (35,010 mg GAE/g numune) ve pH=2 ekstraktlarında *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii*' nin Eylül ayı örneğinde (7,198 mg GAE/g numune) bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii*, fenolik bileşikler, kardiyak glikozitleri, HPLC-UV, HPLC-UV-MS

SUMMARY

Determination of Cardiac Glycosides and Phenolic Compounds In The Extract of *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii* and Some Endemic Species of *Digitalis* By Chromatographic Methods

In this study, *davisiana*, *cariensis*, *trojana* ve *lamarckii* species of *Digitalis* from Scrophulariaceae family which are endemic in Turkey, (Turkish: Yüksük otu) and two subspecies of *ferruginea* (*ferruginea* and *schischkinii*) were investigated for their phenolic compounds of their leaves, collected at different seasons. The compounds were extracted in optimized conditions and analyzed by HPLC-UV. Three different procedure were carried out for optimization of the extraction; direct metanol, hydrolyzed and at pH=2 extraction. The phenolics could not be determined by HPLC-UV were characterized by HPLC-MS. Total phenolic constituents were determined using a spectrophotometric method assaying as gallic acid and catechin equivalent and the results were compared with chromatographic results. The analysis results of phenolic compounds were compared according to species, location and collection period of the plant. The cardiac glycosides were determined in the leaves, flowers and petiole of *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii* by HPLC-DAD.

Digitalis species were found quite rich for caffeic, ferulic and *p*-coumaric acids by HPLC-UV analysis. Apigenin, kaempferid, luteolin, fisetin, rhamnazin and their dihexose, hexose, glucuronide, acetyl glycoside and deoxyhexose attached derivatives were mainly characterized by HPLC-MS. Lanatoside C, digoxine and digitoxine were found major cardiac glycosides in the leaves of *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii*, 86,14; 20,8; and 15,43 mg/L respectively by HPLC-DAD analysis. Total phenolic constituent of *Digitalis davisiana* (September) (34,105 mg GAE/g sample) in metanolic extracts, *Digitalis cariensis* (September) (35,010 mg GAE/g sample) in the hydrolyzed extracts and *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii* (September) were the highest (7,198 mg GAE/g sample) in the pH=2 extracts.

Key Words: *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii*, phenolic compounds, cardiac glycosides, HPLC-UV, HPLC-UV-MS

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Flavonoid türleri için temsili bileşikler	4
Şekil 2. Apigenin-7-O-β-glikozit (Apigetrin)'in yapısı (flavon tip)	5
Şekil 3. Digitoksinin molekül yapısı	8
Şekil 4. HPLC-UV cihazının şematik gösterimi	11
Şekil 5. HPLC-MS cihazının yapısı	12
Şekil 6. Bir elektrosprey iyon kaynağının şematik diyagramı	13
Şekil 7. Bir iyon tuzak detektörün şematik diyagramı	14
Şekil 8. Rutin' in (kuersetin-3-rutinozit) HPLC-MS spektrumu	15
Şekil 9. Rutin' in (kuersetin-3-rutinozit) HPLC-MS/MS spektrumu.....	15
Şekil 10. <i>Digitalis ferruginea</i> ssp. <i>schischkinii</i> ' nin fotoğrafı.	17
Şekil 11. HPLC-UV tarafından 280nm ve 315nm' de 25 mg/L fenolik standartların piklerinin analizi için elde edilen kromatogramlar.....	36
Şekil 12. HPLC-UV-MS tarafından 280nm' de 5 mg/L fenolik standartların piklerinin analizi için elde edilen HPLC-UV kromatogramları.....	38
Şekil 13. Ortamın pH' sına göre fenolik standartların % geri kazanım değerlerinin grafiği	40
Şekil 14. <i>Digitalis trojana</i> ' nın Temmuz ayı örneğine ait doğrudan metanol ekstraktının HPLC-UV (280nm) ve HPLC-MS kromatogramları	40
Şekil 15. <i>Digitalis trojana</i> ' nın Temmuz ayı örneğine ait hidrolizli ve hidrolizsiz ekstraktlarının HPLC-UV (280nm) kromatogramları	41
Şekil 16. <i>Digitalis trojana</i> ' nın Haziran ayı örneğine ait hidrolizli ve hidrolizsiz ekstraktlarının HPLC-UV (280nm) ve HPLC-MS kromatogramları.....	41
Şekil 17. <i>Digitalis trojana</i> ' nın Ağustos ayı örneğine ait hidrolizli ve hidrolizsiz ekstraktlarının HPLC-UV (280nm) kromatogramları	42
Şekil 18. <i>Digitalis ferruginea</i> ssp. <i>schischkinii</i> bitkisinin çeşitli yer ve zamanlardaki örneklerinin HPLC-UV ile belirlenen fenolik içeriğinin grafiği.....	43
Şekil 19. <i>Digitalis ferruginea</i> ssp. <i>ferruginea</i> bitkisinin Haziran ve Temmuz ayı örneklerinin HPLC-UV ile belirlenen fenolik içeriklerinin grafiği.....	44

Şekil 20. <i>Digitalis trojana</i> bitkisinin Haziran, Temmuz ve Ağustos ayı hidrolizli ve hidrolizsiz ekstraktlarının HPLC-UV ile belirlenen fenolik içeriklerinin grafiği	45
Şekil 21. <i>Digitalis davisiana</i> bitkisinin Haziran, Temmuz ve Eylül ayı hidrolizli ve hidrolizsiz ekstraktlarının HPLC-UV ile belirlenen fenolik içeriklerinin grafiği	46
Şekil 22. <i>Digitalis lamarckii</i> bitkisinin Ağustos ve Eylül ayı hidrolizli ve hidrolizsiz ekstraktlarının HPLC-UV ile belirlenen fenolik içeriklerinin grafiği	47
Şekil 23. <i>Digitalis cariensis</i> bitkisinin Haziran, Temmuz ve Eylül ayı hidrolizli ve hidrolizsiz ekstraktlarının HPLC-UV ile belirlenen fenolik içeriklerinin grafiği	48
Şekil 24. <i>Digitalis ferruginea</i> ssp. <i>schischkinii</i> bitkisinden üretilen doku kültürlerinin hidrolizsiz ekstraktlarının HPLC-UV ile belirlenen fenolik içeriklerinin grafiği	49
Şekil 25. <i>Digitalis ferruginea</i> ssp. <i>schischkinii</i> ' nin Rize Verçenik Yaylası Ağustos ayı örneğinin hidrolizli ekstraktının HPLC-UV (280nm) ve HPLC-MS kromatogramı	50
Şekil 26. <i>Digitalis ferruginea</i> ssp. <i>schischkinii</i> ' nin Bolu Abant Gölü örneğinin Temmuz ayı hidrolizsiz ekstraktının HPLC-UV (280nm) ve HPLC-MS kromatogramı	51
Şekil 27. <i>Digitalis ferruginea</i> ssp. <i>schischkinii</i> ' nin Rize, Çayeli, Kaptanpaşa Köyü Haziran ayı hidrolizli ekstraktının HPLC-UV (280nm) ve HPLC-MS kromatogramı	51
Şekil 28. <i>Digitalis trojana</i> ' nın Haziran ayı örneğinin hidrolizsiz ekstraktının HPLC-UV (280nm) ve HPLC-MS kromatogramı.....	52
Şekil 29. <i>Digitalis trojana</i> ' nın Haziran ayı örneğinin hidrolizli ekstraktının HPLC-UV (280nm) ve HPLC-MS kromatogramı.....	52
Şekil 30. Protokatekuik asitin kütle spektrumu.....	53
Şekil 31. <i>p</i> -OH Benzoik asitin kütle spektrumu.....	53
Şekil 32. Kafeik asitin kütle spektrumu	54
Şekil 33. <i>p</i> -Kumarik asitin kütle spektrumu.....	54
Şekil 34. Ferulik asitin kütle spektrumu	55
Şekil 35. Fisetinin kütle spektrumu.....	57
Şekil 36. Luteolinin kütle spektrumu	57
Şekil 37. Apigeninin kütle spektrumu.....	58
Şekil 38. Kamferidin kütle spektrumu	58

Şekil 39. Ramnazinin kütle spektrumu	59
Şekil 40. <i>Digitalis trojana</i> 'nın Haziran ayı hidrolizsiz ekstraktına ait tam taramalı MS modu ile elde edilen kütle spektrumu.....	61
Şekil 41. <i>Digitalis lamarckii</i> 'nin Ağustos ayı hidrolizli ekstraktına ait tam taramalı MS modu ile elde edilen kütle spektrumu.....	61
Şekil 42. <i>Digitalis davisiana</i> 'nın Haziran ayı hidrolizli ekstraktına ait tam taramalı MS modu ile elde edilen kütle spektrumu.....	62
Şekil 43. <i>Digitalis trojana</i> 'nın Haziran ayı hidrolizsiz ekstraktının (Micromass) HPLC-UV-ESI-MS/MS sistemi ile elde edilen kromatogramı.....	62
Şekil 44. <i>Digitalis trojana</i> 'nın Haziran ayı hidrolizli ekstraktının (Micromass) HPLC-UV-ESI-MS/MS sistemi ile elde edilen HPLC-UV kromatogramı	63
Şekil 45. <i>Digitalis trojana</i> 'nın Temmuz ayı hidrolizsiz ekstraktının üzerinde piklerin karakterize edildiği (Micromass) HPLC-MS kromatogramı.....	63
Şekil 46. <i>Digitalis trojana</i> 'nın Temmuz ayı hidrolizli ekstraktının üzerinde piklerin karakterize edildiği (Micromass) HPLC-MS kromatogramı.....	64
Şekil 47. İsorhamnetin-diheksöz'un kütle spektrumu (%35 CID).....	64
Şekil 48. Luteolin-heksöz'un kütle spektrumu (%35 CID).....	65
Şekil 49. Apigenin-glukuronide ait kütle spektrumu (%35 CID)	65
Şekil 50. Kamferol-asetilglukozit-1' in kütle spektrumu (%35 CID).....	66
Şekil 51. Kamferol-heksöz-deoksiheksöz'un kütle spektrumu (%35 CID).....	66
Şekil 52. Luteolin-deoksiheksöz'a ait kütle spektrumu (%35 CID)	67
Şekil 53. İsorhamnetin-kuinik asit'in kütle spektrumu (%35 CID)	67
Şekil 54. Türlerin doğrudan metanol ekstraktlarının spektrofotometrik toplam fenolik madde tayininin gallik asit ve kateşin eşdeğeri cinsinden sonuçları	76
Şekil 55. Spektrofotometrik toplam fenolik madde tayininin pH=2' de ekstrakte edilen örneklerde gallik asit ve kateşin eşdeğeri cinsinden sonuçları	77
Şekil 56. Hidroliz edilen örneklerdeki spektrofotometrik toplam fenolik madde tayininin gallik asit ve kateşin eşdeğeri cinsinden sonuçları.....	78
Şekil 57. <i>Digitalis</i> türlerinin hidrolizli örneklerindeki fenolik bileşiklerin HPLC-UV analiz sonuçları.....	84
Şekil 58. <i>Digitalis</i> türlerinin pH=2' deki ekstraktlarındaki fenolik bileşiklerin HPLC-UV analiz sonuçları	85

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Bazı fenolik asitlerin yapısal tipleri	2
Tablo 2. Analiz edilen <i>Digitalis</i> türlerine ait özellikler.....	21
Tablo 3. Bitki örneklerinin arazi ve zaman bilgileri	23
Tablo 4. Örneklerin kodları, ekstraksiyon detayları ve mg kuru kalıntı/mL metanol cinsinden son ekstrakt konsantrasyonu	28
Tablo 5. Optimize edilen HPLC-UV metodunun parametreleri	37
Tablo 6. Ekstraksiyon yönteminin pH optimizasyon sonuçları	39
Tablo 7. <i>Digitalis ferruginea</i> ssp. <i>schischkinii</i> bitkisinin çeşitli yer ve zamanlardaki örneklerinin HPLC-UV analiz sonuçları.....	43
Tablo 8. <i>Digitalis ferruginea</i> ssp. <i>ferruginea</i> bitkisinin Haziran ve Temmuz ayı örneklerinin HPLC-UV analizleri.....	44
Tablo 9. <i>Digitalis trojana</i> bitkisinin Haziran, Temmuz ve Ağustos ayı örneklerinin hidrolizli ve hidrolizsiz ekstraktlarının HPLC-UV analiz sonuçları.....	45
Tablo 10. <i>Digitalis davisiana</i> bitkisinin Haziran, Temmuz ve Eylül ayı örneklerinin hidrolizli ve hidrolizsiz ekstraktlarının HPLC-UV analiz sonuçları.....	46
Tablo 11. <i>Digitalis lamarckii</i> bitkisinin Ağustos ve Eylül ayı örneklerinin hidrolizli ve hidrolizsiz ekstraktlarına ait HPLC-UV sonuçları	47
Tablo 12. <i>Digitalis cariensis</i> bitkisinin Haziran, Temmuz ve Eylül ayı örneklerinin hidrolizli ve hidrolizsiz ekstraktlarına ait HPLC-UV analiz sonuçları	48
Tablo 13. <i>Digitalis ferruginea</i> ssp. <i>schischkinii</i> bitkisinden üretilen doku kültürlerinin hidrolizsiz ekstraktlarının HPLC-UV analiz sonuçları	49
Tablo 14. Trans-ferulik asidin ekstraktların HPLC-MS kromatogramlarında tespit edilen pik alanı.....	55
Tablo 15. Flavonoid aglikonlarının ekstraktların HPLC-MS kromatogramlarında tespit edilen pik alanları	59
Tablo 16. <i>Digitalis ferruginea</i> ssp. <i>schischkinii</i> ' nin Verçenik ve Kaptanpaşa örneklerinin hidrolizli örneklerindeki şeker bağlı flavonoidlerin HPLC-MS kromatogramlarında tespit edilen alanları	68
Tablo 17. <i>Digitalis ferruginea</i> ssp. <i>schischkinii</i> ' nin Bolu, Rize (Abelat, Yeşiltepe, Soğukçeşme ve Salarha) ve Trabzon (Sis dağı) örneklerinin hidrolizsiz şeker bağlı flavonoidlerin HPLC-MS kromatogramlarında tespit edilen alanları	68
Tablo 18. <i>Digitalis ferruginea</i> ssp. <i>ferruginea</i> ' nin ekstraktlarında mevcut şeker bağlı flavonoidlerin HPLC-MS kromatogramlarında tespit edilen pik alanları.....	69
Tablo 19. <i>Digitalis trojana</i> ' nin ekstraktlarında mevcut şeker bağlı flavonoidlerin HPLC-MS kromatogramlarında tespit edilen alanları.....	70

Tablo 20. <i>Digitalis davisiana</i> ' nin ekstraktlarında mevcut şeker bağılı flavonoidlerin HPLC-MS kromatogramlarında tespit edilen alanları.....	71
Tablo 21. <i>Digitalis lamarckii</i> ' nin ekstraktlarında mevcut şeker bağılı flavonoidlerin HPLC-MS kromatogramlarında tespit edilen pik alanları.....	72
Tablo 22. <i>Digitalis cariensis</i> 'in ekstraktlarında mevcut şeker bağılı flavonoidlerin HPLC-MS kromatogramlarında tespit edilen pik alanları.....	72
Tablo 23. <i>Digitalis ferruginea</i> ssp. <i>schischkinii</i> ' nin doku kültürü örneklerinin pH=2' de elde edilen ekstraktlarının şeker bağılı flavonoidlerinin HPLC-MS kromatogramlarında tespit edilen pik alanları.....	73
Tablo 24. Kullanılan standart maddelere ait alıkonma zamanları (RT) ve pik alanlarına ait değerler	74
Tablo 25. Ağustos 2008'de toplanan <i>Digitalis ferruginea</i> ssp. <i>schischkinii</i> türüne ait çeşitli bitki kısımlarına ait ticari ve tıbbi öneme sahip kardenolitlerin analizleri.	74
Tablo 26. Doğrudan metanol ekstraktlarında Spektrofotometrik toplam fenolik madde tayininin gallik asit ve kateşin eşdeğeri cinsinden sonuçları.....	75
Tablo 27. Hidroliz edilen örneklerdeki spektrofotometrik toplam fenolik madde tayininin gallik asit ve kateşin eşdeğeri cinsinden sonuçları.....	78
Tablo 28. Spektrofotometrik toplam fenolik madde tayininin pH=2' de ektstrakte edilen örneklerde gallik asit ve kateşin eşdeğeri cinsinden sonuçları.....	76

SEMBOLLER DİZİNİ

AcOH	: Asetik asit
API	: Atmosferik basınçlı iyonlaştırma
C18	: Oktadesil
C ₆ H ₅ O ⁻	: Fenolat anyonu
C8	: Oktil
CH ₃ CN, ACN	: Asetonitril
DAD	: Diyot Serili Dedektör
ESI	: Elektrosprey İyonlaştırma
ESI-MS	: Elektrosprey İyonlaştırma- Kütle Spektrometrisi
GC-MS	: Gaz Kromatografisi- Kütle Spektrometrisi
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HPLC- MS	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi- Kütle Spektrometrisi
HPLC- UV	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi- Ultraviyole Dedektör
HCl	: Hidroklorik asit
H ₃ PO ₄	: Fosforik asit
IT	: İyon tuzaklı
kV	: Kilo Volt
L	: Litre
LOD	: Dedeksiyon limiti
LOQ	: Kantitatif ölçüm sınırı
M	: Molar
mg	: Miligram
µg	: Mikrogram
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
mL	: Mililitre
µL	: Mikrolitre
nL	: Nanolitre
N ₂	: Azot

TOF	: Uçuş zamanlı
UV	: Ultraviole Dedektör
vd.	: ve diğerleri
α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gama

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Bitkisel Biyoaktif Bileşikler

Doğal bileşiklerin bir kısmı bitkiler tarafından ikincil metabolizma ürünleri olarak sentezlenen moleküller olup, sinyal (haberci) olarak ve mikroorganizma, insektisit, herbisit ve serbest radikallere karşı koruyucu olarak rol oynarlar. Bu nedenle (karbohidratlar, proteinler ve yağların sentezinden sonra) bunlar "ikincil bitki ürünleri" veya "fitokimyasallar" diye adlandırılırlar. Bitkiler sınırsız aromatik ve alifatik madde sentezleyebilme kabiliyetine sahip olup bunların çoğu fenolik bileşikler veya bunların oksijen ile substitüye olmuş halleridir (Cordell vd., 2007).

1.1.1. Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler altı üyeli aromatik halkaya (benzen) direkt bağlı bir hidroksil grubu (-OH) içeren aromatik bileşiklerdir. Fenoller pek çok bakımdan karbon zincirine bağlı hidroksil grubu içeren alifatik yapıların alkollerine benzerler ancak aromatik halkanın varlığından da etkilenirler. Aromatik halkaya bağlı fenolik hidroksillerin hidrojeninin kararsız olması ve bu yüzden hidroksil grubundan bir hidrojen kaybetmeye meyilli olmalarından dolayı zayıf asidiktirler. Fenolik yapıdan hidrojenin kopmasıyla ve oluşan fenolat anyonunun ($C_6H_5O^-$) sudaki çözünürlüğü hayli yüksektir (Vermerris ve Nicholson, 2006). Fenolik bileşikler bitkilerin temel bileşenlerindedir ve bitkilerin ve onlardan türetilen ürünlerinin besinsel ve organoleptik özelliklerinde önemli rol oynarlar (Fabre vd., 2001; Borbalán vd., 2003; Fang vd., 2007). Bu bileşiklerin bazıları terpenoidler gibi bitkiye koku ve tat verirken bazıları kinonlar ve tanenler gibi bitki pigmentlerini oluştururlar. Pek çok bileşik, bitkinin tadından sorumlu olup bunlardan bazıları gıda ve bazıları ise tıbbi amaçlar için kullanılmaktadır.

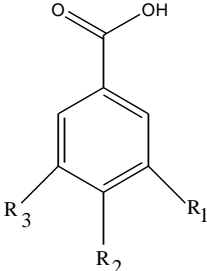
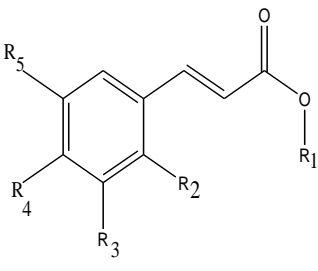
1.1.1.1. Fenolik Bileşiklerin Kimyasal Yapıları ve Sınıflandırılması

Fenolik bileşikler veya polifenoller bitkilerde en fazla bulunan yapılardan biri olup bitki aleminde 6000'den daha fazla fenolik yapının varlığı bilinmektedir (Bravo, 1998).

Polifenoller, bitkilerde çeşitli meyve, sebze, kuruyemiş, tohum, çiçek, kök ve gövde kısımlarında doğal olarak sentezlenen maddelerdir. (Wollgast ve Anklam, 2000). Fenolik bileşikler, fenolik asitler ve flavonoidler olmak üzere iki grupta toplanabilir.

Fenolik asitler yaygın olarak bitki taç kısmında bulunur ve antioksidan karaktere sahiptir. Fenolik asitler Tablo 1’ de gösterildiği gibi benzoik asit ya da sinnamik asidin hidroksillenmiş türevleridirler. Özellikle kafeik asit ile onun esteri olan klorojenik asit ve ferulik asit gibi sinnamik asit türevleri çok yaygındır. Klorojenik asit pek çok çeşit meyve, sebze ve kahvede bulunmaktadır (Spacil vd., 2008).

Tablo 1. Bazı fenolik asitlerin yapısal tipleri

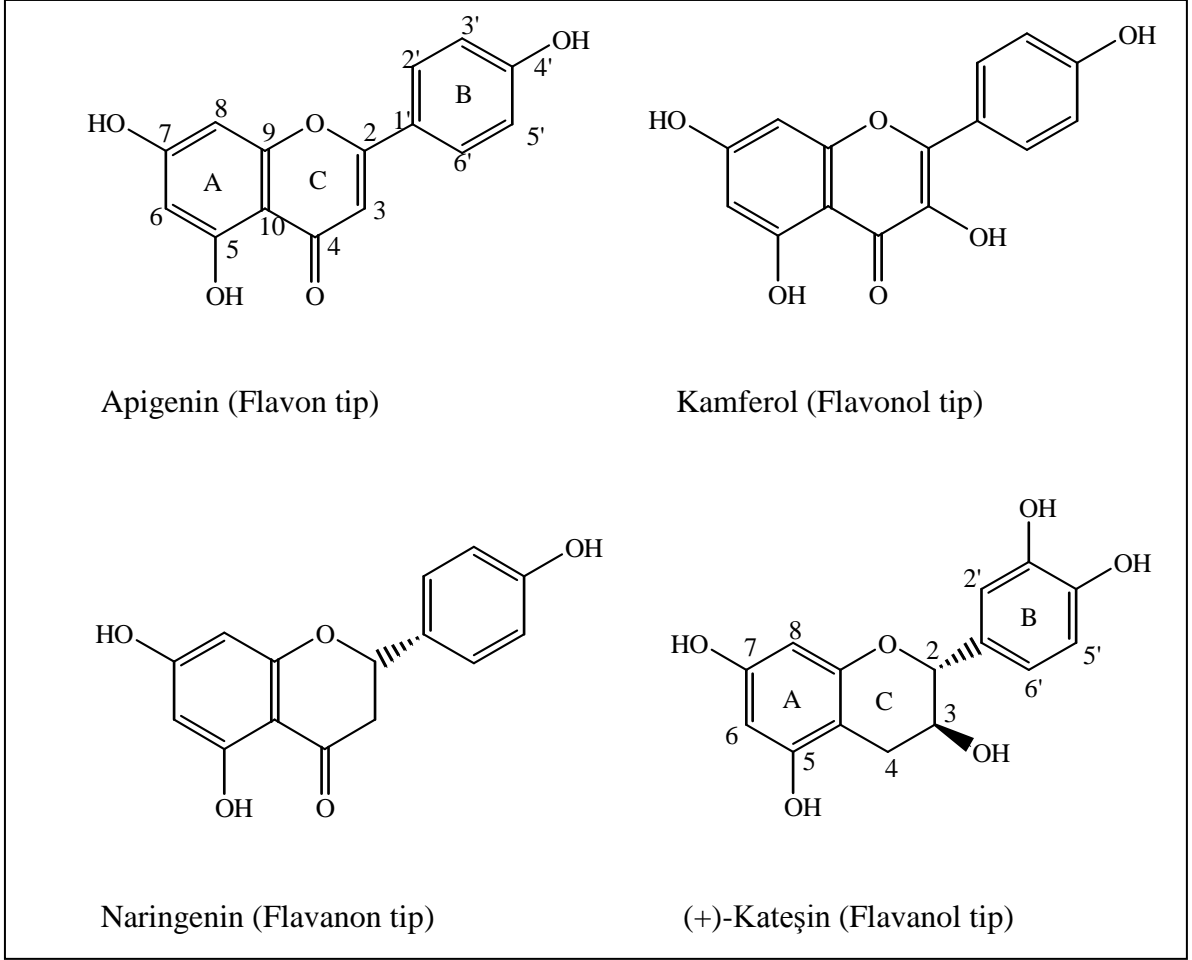
Fenolik Bileşik tipleri	Genel yapıları	Adları	R ₁	R ₂	R ₃		
Benzoik tip		Gallik asit	OH	OH	OH		
		Protokatekuik asit	OH	OH	H		
		<i>p</i> -OH Benzoik asit	H	OH	H		
		Vanilik asit	OCH ₃	OH	H		
		Siringik asit	OCH ₃	OH	OCH ₃		
Sinnamik tip		Adları	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
		Sinamik asit	H	H	H	H	H
		<i>p</i> -Kumarik asit	H	H	H	OH	H
		<i>o</i> -Kumarik asit	H	OH	H	H	H
		Klorojenik asit	kuinik asit	H	OH	OH	H
		Kafeik asit	H	H	OH	OH	H
		Ferulik asit	H	H	OCH ₃	OH	H
		Sinapik asit	H	H	OCH ₃	OH	OCH ₃

Kafeik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit ve sinapik asit, meyvelerde dağılım gösteren en yaygın hidrokisinnamik asitlerdir (Macheix vd., 1990). Genellikle çeşitli konjuge formlarında bulunan hidrokisinnamik asitlerin serbest formları, kimyasal yada enzimatik hidroliz ürünleridir. Konjuge formları şeker türevlerinin yanısıra kuinik, şikimik ve tartarik asit gibi hidrokisiasitlerin esterleridir (Schuster ve Herrmann, 1985).

Flavonoidler çeşitli besin ve tıbbi bitkilerde bulunan ikincil metabolitlerin en yaygın grupları arasında olan fenolik bileşiklerdir. Bu bileşikler renk, tat ve koku gibi organoleptik özelliklerden sorumlu oldukları için, bu tür ürünlerin kalitesiyle yakından ilgilidirler ve analizleri büyük önem taşımaktadır (Fabre vd., 2001; Borbalán vd., 2003).

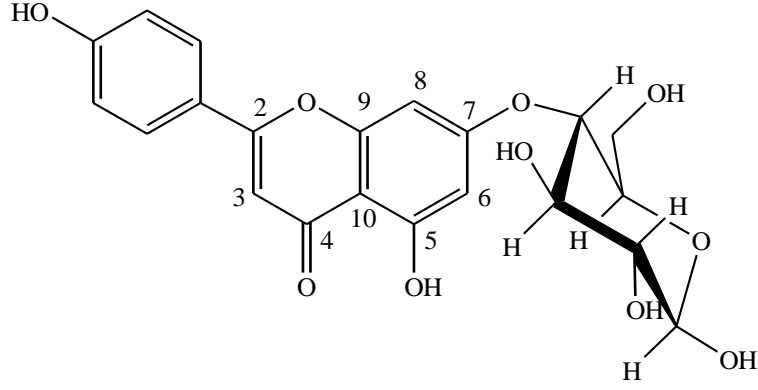
Ayrıca son yıllarda pek çok araştırma çalışmaları polifenoller bakımından zengin besinlerin tüketimiyle onların antioksidan özellikleri sayesinde kardiovasküler hastalıklar, belli kanser tipleri ve diğer yaşlanmayla ilgili hastalıklardan korunmayı ilişkilendirmişlerdir (Rise-Evans ve Packer, 1998; Fabre vd., 2001; Chang ve Kinghorn, 2001; Borbalán vd., 2003). Flavonoidlerin antioksidan olarak davranma kapasiteleri genellikle molekül yapılarına bağlıdır. Hidroksil gruplarının pozisyonu ve sayısı kadar flavonoidlerin kimyasal yapılarındaki diğer özellikler de antioksidan ve serbest radikal temizleme aktiviteleri için önemlidir (Suschetet vd., 1998). Örneğin kuersetin diyetlerde en bol bulunan flavonol olup serbest radikal temizleme aktivitesi açısından tüm temel yapısal özelliklere sahip olduğu için potansiyel bir antioksidandır (Pietta, 2000; Erkoç v.d., 2003). Flavonoidler insan vücudu tarafından üretilemezler ve bundan dolayı da günlük diyetler ile dışarıdan alınmalıdırlar.

Flavonoidler büyük düzlemsel moleküllerdir ve yapılarının çeşitliliği hidroksilasyon, metoksilasyon veya glikozilasyon gibi süstitüsyon modellerinden kaynaklanır. Flavonoid aglikonlar C-4 de bir karbonil grubu, C-3 de bir hidroksil grubu ve C-2 ve C-3 arasında doymuş bir tekli bağın bulunduğu ve bulunmadığı hallerinin kombinasyonlarına bağlı olarak flavon, flavonol, flavanon ve flavanol tipleri içinde alt gruplara ayrılırlar (Şekil 1). İzoflavonoidler C halkasının C-3 pozisyonuyla B halkasına bağlı flavonoidlerdir. Tüm yapılar ana bileşik olan flavon (2-fenil benzopiron) ile ilişkilidir (Prasain vd., 2004).



Şekil 1. Flavonoid türleri için temsili bileşikler

Bazen aglikonları halinde mevcut olmalarına rağmen flavonoidler genellikle onların sudaki çözünürlüğünü artıran ve inaktif formda depolanmalarına müsaade eden glikozit formlarında bulunurlar ve *O*- ve *C*- olmak üzere iki glikozidik bağ tipi vardır (Cuyckens ve Claeys, 2004). *C*-Glikozilasyon bölgesi aglikonun C-6 veya C-8 pozisyonuyla sınırlıyken, *O*-glikozilasyon bölgesi genelde aglikonun fenolik hidroksil grubunda bulunur (Şekil 2) (Becchi ve Fraisse, 1989). Aglikonların bir ya da daha fazla hidroksil grupları asit-kararsız glukozidik O-C bağıyla oluşan bir şekere bağlıdır. Flavonoidlerde genellikle glikozillenen belli hidroksil grupları vardır. Bunlar flavonlar, flavanonlar ve izoflavonlarda 7-hidroksil grubu ve flavonoller ve flavanollerde 3- ve 7-hidroksil gruplarıdır (Şekil 2). 5-hidroksil grubu C-4 de bitişik karbonil grubuyla hidrojen bağına katıldığı için C-4 de karbonil gruplu bileşikler için 5-*O*-glikozitler nadirdir (Prasain vd., 2004).



Şekil 2. Apigenin-7-*O*- β -glikozit (Apigetrin)'in yapısı (flavon tip)

1.1.1.2. Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu

Fenolik bileşiklerin izolasyonunda ayrılmak istenen gruplara bağlı olarak pek çok farklı yöntem uygulanmaktadır. Bitkilerden fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu, matriks etkisinin yanısıra; bitkinin kimyasal doğası, partikül boyutu, saklanma koşul ve süresi ve ekstraksiyon yönteminin işleyişinden etkilenir.

Fenolik bileşiklerin çözünürlüğü kullanılan çözücünün polaritesine bağlıdır. Genellikle %60-80 (v/v) oranında sulandırılmış aseton, etanol, etil asetat veya metanol çözelti karışımları kullanılır. Uygun bir ekstraksiyon sistemi ile birlikte kullanıldığında bu çözelti sistemleri bitki hücre duvarını parçalar. Sulu metanol çözeltileri özellikle fenolik asitler ve flavonoidlerin meyve ve sebzelerden ekstraksiyonu için kullanılmaktadır. Çünkü bu bileşikler metanol çözeltileri içinde oldukça karardır. Örneğin, flavon ve flavonollerin metanol içinde + 4 °C' de üç aydan daha fazla kararlı kalabildiği rapor edilmiştir (Hertog vd., 1992; Häkkinen, 2000).

Fenolik maddelerin bitkisel materyallerden ekstraksiyonunda ultrason destekli, mikrodalga destekli, süperkritik ve hızlandırılmış ekstraksiyon sistemleri gibi yeni teknikler oldukça hızlı ve etkilidir. Bu tekniklerde yüksek basınç ve/veya yüksek sıcaklıklarda çalışma imkanının olması ekstraksiyon süresini büyük oranda azaltmaktadır (Pérez-Serradilla vd., 2007). Son zamanlarda oldukça yaygın kullanılan ultrasonikatörlerde hızlı ve verimli ekstraksiyon yapılabilmektedir (Herrera ve Luque de Castro, 2005). Ultrason etkisiyle bitkinin hücre duvarları hasar görecük doku içindeki ekstrakte edilebilir bileşenlerin ortaya çıkması kolaylaşmaktadır. Böylece çözücü fazına bu maddelerin kütle transferi ile aktarımı artmaktadır (Tavman vd., 2009).

Bitkilerden elde edilen fenolik ekstraktlar çözücü sistemde çözünebilen farklı fenolik bileşiklerin bir karışımıdır. Bu nedenle istenmeyen fenoliklerin ve vaks, yağlar ve terpenler gibi fenolik olmayan grupların uzaklaştırılması için ekstraksiyonda ilave aşamalar gereklidir (Naczka ve Shahidi, 2004). Pek çok fenolik bileşik doğal olarak glikozitleri veya esterleri şeklinde bulduklarından numune hazırlama kısmında alkali, asidik veya enzimatik hidroliz işlemi serbest fenoliklerin izole edilebilmesi için gereklidir. Aksi takdirde kantitatif analiz için çok sayıda farklı glikozit veya ester formlarında bulunabilecek fenolik bileşik standartlarının temin edilmesi oldukça güçtür (Häkkinen, 2000; Nuutila vd., 2002). Hidroliz aynı zamanda kromatografik analizlerde, kromatogramlardaki girişimlerin de minimize edilmesini sağlar.

Hidroliz işlemi esas olarak su ile bir kimyasal bağın parçalanmasıdır. Bu parçalanma sırasında parçalanan kısımlardan birine H^+ , diğerine ise OH^- grubu bağlanır. Hidroliz işleminin gerçekleşmesi için molekülün bir şekilde suyun içine geçmesi gerekmektedir. Bunun için çeşitli katalizörlere ihtiyaç duyulmaktadır. Enzimatik katalizlerin yanı sıra kuvvetli asit ya da bazların ortama eklenmesi ile hidrolizin katalizlenmesi oldukça yaygın olarak uygulanmaktadır. Asidik ve bazik katalizler sayesinde çeşitli şeker grupları ile glikozidik bağ kuran flavonoidlerin aglikonlarına dönüşmeleri sağlanabilmektedir. Ayrıca kararsız yapıdaki dimerik polifenoller ve glikozidik fenolik asitlerin de aglikonlarına dönüşmeleri mümkündür. Böylece analizleri güç olan karmaşık yapıdaki polifenoller çekirdek yapılarına dönüştürülerek kolaylıkla tanımlanabilmektedirler. Glikozitlerin asit-baz hidroliz oranı onların asit-baz kuvvetine, bileşiğin doğasına ve fenolik bileşik çekirdeğine bağlanma pozisyonuna göre değişir. Çeşitli glikozitlerin hidroliz koşulları birbirinden farklı olup her bileşik için özel hidroliz koşulları gereklidir. Örneğin hidrolize karşı dayanıklılık glukuronit > glikozit > galaktozit > ramnozit sırasıyla azalır. Diğer yandan şeker grubunun flavonoid çekirdeğine bağlanma pozisyonuna bağlı olarak hidrolize karşı dayanıklılık 7-O-glikozit < 4'-O-glikozit < 3-O-glikozit sırasıyla artar. Flavonoid C glikozitler O glikozitlerin hidrolizlenme koşullarında hidrolizlenmezler. Farklı glikozid bağlarının asidik hidroliz koşullarında dayanıklılığına göre molekülde bulunan glikozit bağlarının seçici hidrolizlenmesini sağlamak mümkündür. Şöyle ki, asidik hidrolizin optimal koşullarını belirleyerek, yapıda değişik pozisyonlarda bulunan iki şeker grubunun birini hidrolizleyip, diğerini ise korumak olasıdır. Bu ise glikozit yapısında bulunan şekerlerin aglikona bağlanma pozisyonunun tayinine yardımcı olur (Robards ve Antolovich, 1997; Bilaloğlu ve Harmandar, 1999).

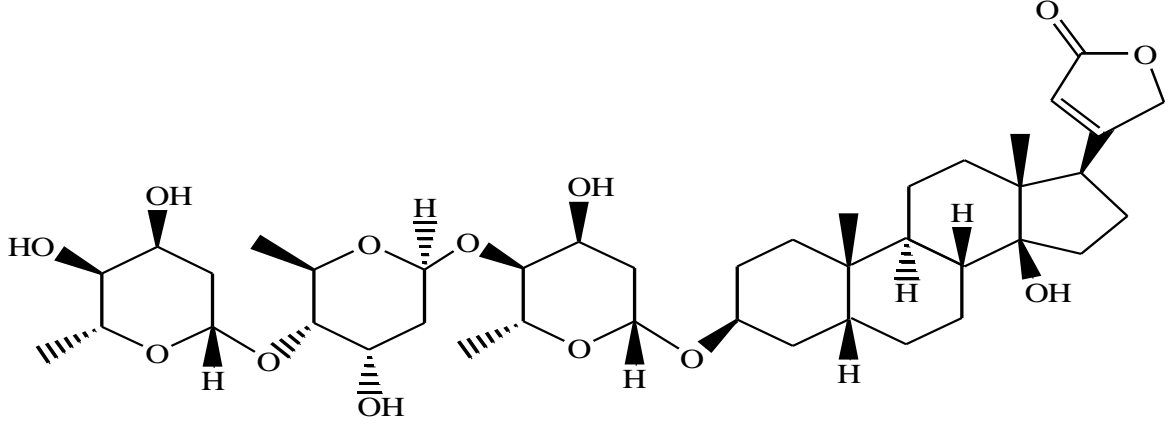
Fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda ilave edilebilecek diğer önemli bir aşama da seçimli ekstraksiyondur. Seçimli ekstraksiyon fenolik bileşiklerin alıkonabilecekleri aktif gruplar içeren katı faz kartuşları kullanılarak yapılabileceği gibi fenolik bileşikleri farklı bir faza kuvvetli şekilde çekebilecek çözücü sistemleri ile de yapılabilmektedir. Bu şekilde sıvı ortamdan bir çözücü vasıtası ile istenen bileşiklerin ekstrakte edilmesi olayına sıvı-sıvı ekstraksiyonu denmektedir. Fenolik bileşiklerin bitki matrisinden ekstraksiyonunda en yaygın olarak etil asetat ve dietil eter kullanılır (Kader vd., 1996; Endale vd., 2005; Kim vd., 2006). Dietil eter ve etil asetatın ekstraksiyonu da bileşiklerin türüne göre değişmektedir. Örneğin; Fernández de Simón ve arkadaşlarının (1990) fenoliklerin etkin ekstraksiyonu üzerine yaptıkları bir çalışmada *p*-kumarik asitin dietil eter ile geri kazanımının etil asetata göre daha yüksek olduğu belirtilirken diğer fenolik asitler ve flavonoidler için etil asetatın geri kazanımı daha yüksek bulunmuştur. Bu organik çözücülerin ardışık olarak birlikte kullanımı sayesinde fenolik asitler ve flavonoidlerin birlikte ekstraksiyonu mümkündür.

1.1.2. Kardiyak Glikozitleri

Kardiyak glikozitleri geleneksel olarak kalp yetmezliği ve kardiyak aritmileri olan hastalarda kalp kasılma gücünü artırmada kullanılan ve steroid ilaçların bir sınıfı olan sekonder metabolitlerdir (Abarquez, 2001). Kardiyak glikozitlerinin yapısında bulunan ve moleküllerinde en az bir çifte bağ içeren aglikonlara kardenolidler denir. Kardenolidler 23 C'lu C-10 ve C-13'de metil grupları ve C-17'de 5 üyeli γ -lakton (butenolit) halkasına sahip steroidlerdir. Steroidler, birbiriyle kaynaşmış dört halkadan oluşan karbon iskeletli 10,13-dimetilsiklopentanoperhidrofenantren halka sisteminde lipitlerdir. Farklı steroidler bu halkalara bağlı olan fonksiyonel gruplar bakımından birbirlerinden ayrılırlar. Kardenolidler, kardadienolid ve kardatrianolidleri içerirler. Tarih boyunca kardiyak glikozitleri içeren bitkiler veya onların ekstraktları ok ucu zehiri, kusturucu ve idrar söktürücü ilaç olarak kullanılmışlardır (Kinne-Saffran ve Kinne, 2002).

Digitalis kardiyak glikozitleri basit bir steroid genin iskeletine sahiptirler; digitoksigenin (Seri A), gitoksigenin (Seri B) veya digoksigenin (Seri C) (Roca-Pérez vd., 2004). Glikozidik ve glikozidik olmayan olarak iki çeşit kardiyak glikozitleri mevcuttur. Bazı kardiyak glikozitleri; digitoksin, asetildigitoksinler, digitoksigenin, digoksin,

asetildigoksin, digoksinenin, medigoksin, strofantin, simarin, ouabain ve strofantidin olarak sayılabilir.



Şekil 3. Digitoksinin molekül yapısı

1.2. Bitki Bileşenlerinin Analizinde Kullanılan Yöntemler

1.2.1. Kromatografik Yöntemlerle Bitki Bileşenlerinin Analizi

Kromatografi diğer yöntemler tarafından ayrılmaları çoğunlukla mümkün olmayan pek çok karmaşık karışımlardaki benzer bileşenlerinin ayrılmalarına izin veren çeşitli ve önemli yöntemler grubudur. Tüm kromatografik ayırmalarda numune bir gaz, sıvı ya da süperkritik akışkan olabilen hareketli bir fazda çözülür. Ardından bu hareketli faz uygun bir sabit faz boyunca geçirilir. Bu iki faz öyle seçilir ki numunenin bileşenleri hareketli faz ve sabit faz arasında kendiliklerinden farklı derecelerde dağılırlar. Sabit faz tarafından güçlü bir şekilde tutulan bileşikler hareketli fazın akışıyla sadece yavaşça hareket ederler. Öte yandan sabit faz tarafından zayıfça tutulan bileşikler ise hızlıca hareket ederler. Hareketlilikteki bu farklılıkların bir sonucu olarak numunenin bileşenleri kalitatif ve/veya kantitatif olarak analiz edilebilen ayrı bantlar içinde ayrılırlar (Skoog vd., 1998). Kromatografi hareketli fazın özelliklerine bağlı olarak başlıca üç forma ayrılabilir:

- Gaz kromatografisi (GC)
- Sıvı kromatografisi (LC)
- Süperkritik akışkan kromatografisi (SFC)

Kromatografik işlemler aşağıdakilere göre sınıflandırılabilirler:

- Adsorpsiyon kromatografisi

- Dağılma (paylaşım) kromatografisi
- İyon-değişim kromatografisi
- Boyut eleme kromatografisi

Sıvı kromatografide tüm bu dört form uygulanabilir. Bileşenlerin uçuculuğunun gerekli oluşunun bir sonucu olarak gaz kromatografisinde yalnızca adsorpsiyon kromatografisi ve dağılma kromatografisi uygulanabilir (Sandra, 2004).

1.2.1.1. Yüksek-Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Yüksek-performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) özellikle biyolojik, farmakolojik, besinsel, çevresel ve endüstriyel v.b. numunelerde organik ve anorganik bileşiklerin ayrılma ve belirlenmesi için uygulanan analitik bir tekniktir. Numunelerdeki bileşikler sıvı hareketli faz ve sabit faz arasında dağılım davranışlarındaki farklılıklardan dolayı kolon boyunca farklı hızlarda geçerler.

HPLC cihazları bir hareketli faz deposu, bir pompa, bir enjektör, bir ayırma kolonu (seçimli ön-kolon), bir kolon ısıtıcısı, bir dedektör ve bir integratör veya bilgisayarlı dijital sinyal alıcısı içerirler.

Tipik bir HPLC çalışması tek bir çözücü veya karıştırılan iki veya daha fazla çözücünün kolon boyunca belli bir akış hızında geçmesini içerir. Çözücülerin değişikliği ve ilaveler ayırmanın seçiciliğini optimize etmek için kullanılır. Çözücülerin bulunduğu hareketli faz depoları kolonda ve dedektör sisteminde gaz oluşturarak bozucu etkilere neden olan çözünmüş gazların (genellikle oksijen ve azot) giderilmesi için bir cihazla donatılmıştır (Skoog vd., 1998). Pompa yüksek basınçta sabit akışı sağlar ve ayırma esnasında çözücülerin çeşitli oranlarda karıştırılmasına programlanabilir. Akış hızı kolonun iç çapına bağlıdır; kolonda küçük iç çapı küçük akış hızı gerektirir. Analitik HPLC için tipik olarak 0,5–5 ml/dk akış hızı 400 bar'a kadar çalışan pompalar tarafından üretilebilir.

Genellikle modern HPLC için en faydalı ve yaygın kullanılan örnek verme düzeneği bir enjeksiyon valfi ile sağlanır. Bu valfler akış önemli derecede bozulmadan basınçlı kolonun içinde numunenin girişi için kullanılır. Valfli enjeksiyon hızlı, tekrarlanabilir ve özellikle 400 bar' a kadar %0.2' den daha az hata ile numune hacminin (60 nL'den birkaç mililitrelere kadar) geniş bir aralıkta operatör bağımsız olarak dağıtımına olanak sağlar (Skoog vd., 1999).

HPLC ile ayırmalar farklı operasyon tipleri kullanılarak başırlır. Özel bir uygulama için seçilen tip, ayrılacak analit(ler)in özelliklerine bağılı olacaktır (Lindsay, 1987). Çoğıu HPLC ayırmalar dağılıma tipinde çalışılır. Dağılıma kromatografisi hareketli ve sabit fazlarının bağılı polarlığına dayalı olarak iki temel forma ayrılabilir (Skoog, 1998). Normal faz (NP) durumunda, sabit faz hareketli fazdan daha polardır ve en apolar analitler ilk elue edilirler. Analit tutunması hareketli fazın polaritesi arttıkça azalır. Ters faz kromatografide (RP), sabit faz hareketli fazdan daha az polardır. En polar analitler ilk elue edilirler ve analitin tutunması hareketli fazın hidrofobikliği arttıkça azalır. Yaklaşık olarak HPLC analizlerinin yüzde sekseni RP tipinde gerçekleştirilir.

Ters faz kolonlar silikondan modifiye edilirler. Silika jelde modifiye olan oktil (C8) ve oktadesil (C18) en yaygın kullanılan fazlardır.

HPLC kolonlar (genelde 3-5 μm) dar bir boyut dağılımına sahip küçük partiküllerden oluşur ki bunlar apolar fonksiyonel grupların kullanımıyla modifiye edilirler. Mikro partiküllü materyaller için yüksek basınçlı hareketli faz gerektirir. Kolonlar laboratuarda hazırlanabilir fakat çoğıu analizci ticari olarak satılan hazır kolonlar kullanır. Analitik kolonun bozulmalardan korunması için bir koruyucu kolon, kolon ile enjeksiyon aletinin arasına kurulur.

Farklı boyutlardan kolonlar kullanılabilmesine rağmen, günümüzde 100–250 mm boyunda, 3–5 mm iç çaplı 5 μm sabit faz materyaliyle paketlenmiş kolonlar makul bir analiz süresinde yeterli ayırımı sağlamaktadır.

Son otuz yılda farklı ölçüm ilkelerine dayanan pek çok yeni dedektör geliştirilmiştir. Yaklaşık on iki tane dedektör LC analizleri için kullanılabilmesine rağmen bunların yalnızca dördü yaygın olarak kullanımdadır. LC analizinde UV dedektörü (sabit ve değışebilen dalga boyu), refraktif indeks dedektörü, floresans dedektör ve kütle spektrometresi yaygın olarak kullanılmaktadır (Skoog vd., 2007). Mevcut çalışmada yalnızca UV ve MS dedektörler kullanıldığı için burada yalnızca onlar tartışılacaktır.

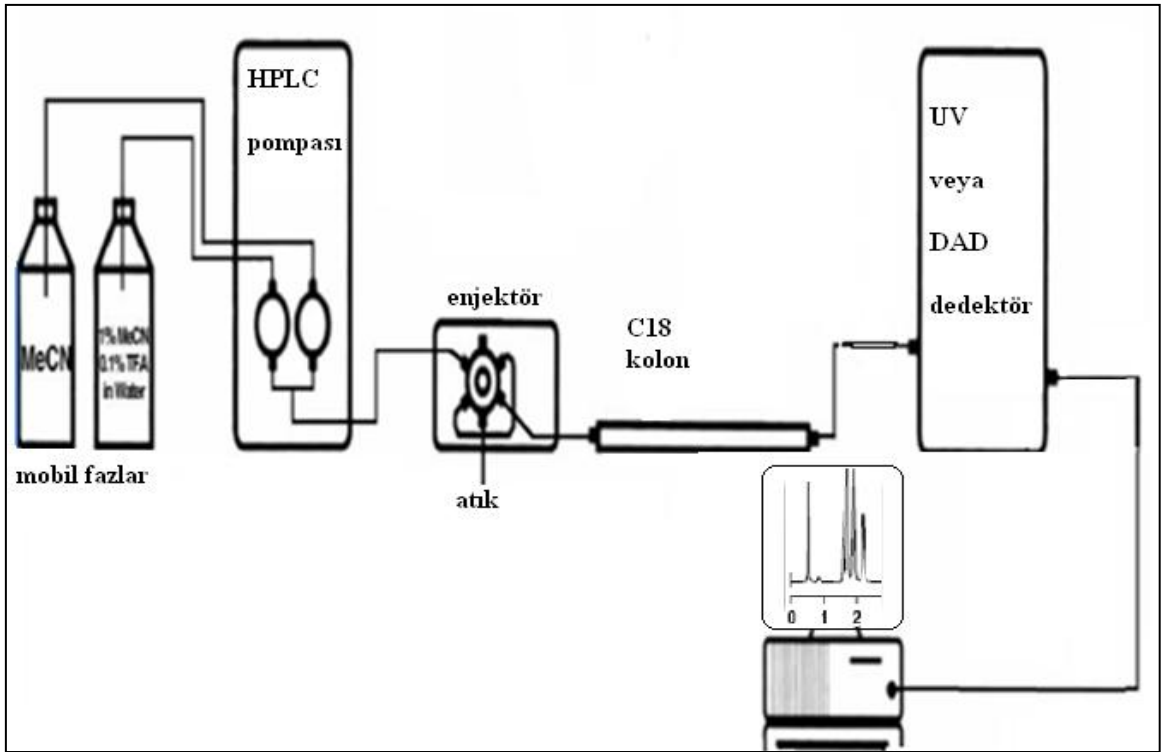
1.2.1.1.1. Ultraviyole Dedektör

Pek çok organik molekül ve fonksiyonel grup 190 nm'den 800 nm'ye kadar olan ultraviyole (UV) ve/veya görünür (Vis) alanda elektromagnetik enerji absorplar. Çözeltiden sürekli olarak ışın geçerken analitler tarafından ışının bir kısmı absorbe edilebilir (Harwey, 2000). Bu absorpsiyon daha çok moleküllerdeki bağı elektronlarının

uyarılmasından kaynaklanır, bunun sonucu olarak moleküler absorpsiyon spektroskopisi bir moleküldeki fonksiyonel grupların tanımlanmasında ve aynı zamanda fonksiyonel grupları taşıyan bileşiklerin kantitatif tayininde kullanılır. Absorpsiyon spektroskopisi:

1. Hem organik hem de inorganik sistemlere yaygın uygulanabilirlik,
2. 10^{-4} M'dan 10^{-5} M'a kadar değişen tipik duyarlılık değerleri,
3. Orta-derecede seçimlilik,
4. İyi bir doğruluk,
5. Veri toplama kolaylığı ve elverişliliği gibi özelliklerinden dolayı kantitatif analiz için elverişli olan en yararlı ve en yaygın kullanılan araçlardan biridir.

Bir Ultraviyole dedektörüne bağlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC-UV) cihazı şematik olarak Şekil 4' de gösterilmiştir.



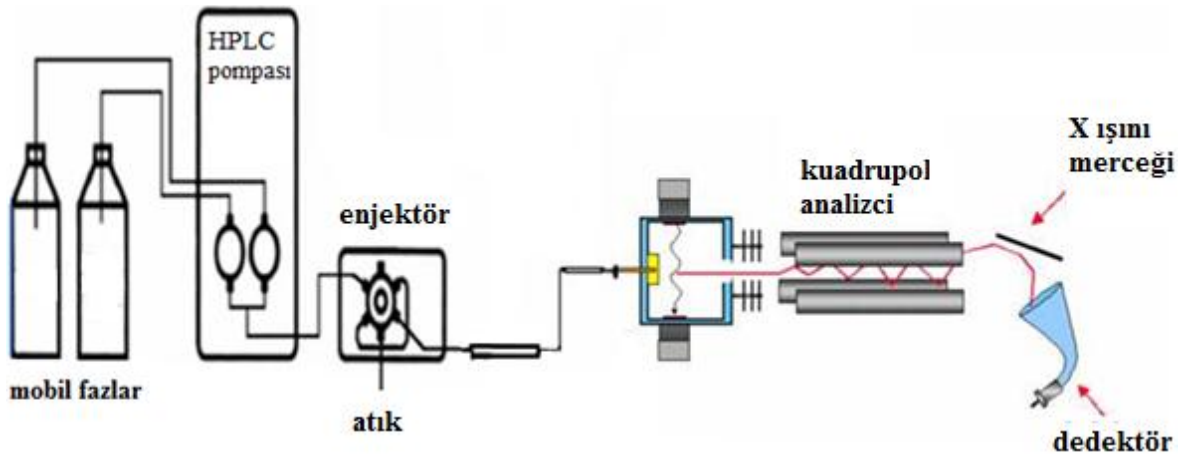
Şekil 4. HPLC-UV cihazının şematik gösterimi

Geleneksel spektrofotometre üzerine modern bir gelişme diyot serili spektrofotometredir (DAD). Bu sistemin UV/Vis dedektörden farkı, 512 diyotdan oluşan bir yüzeyde, her diyodun ayrı bir dalga boyundaki absorbansı eş zamanlı olarak ölçebilmesidir. Bu sayede 3 boyutlu kromatogramlar almak ve istenilen her pikin çok hızlı

spektrum taramasını görebilmek olasıdır. Ayrıca istenilen dalga boyu aralığında çalışılabilmesi bu dedektörün sağladığı bir diğer önemli avantajdır. Kullanılan ışık kaynağı döteryum veya tungsten lambadır (Yıldız ve Genç, 1993). HPLC-DAD kombine sistemi ile analitlerin HPLC ile alıkonma zamanlarına ilave olarak eş zamanlı alınabilen spektrumları sayesinde doğru tanımlanmaları mümkündür.

1.2.1.1.2. Kütle Spektrometrik Dedektör

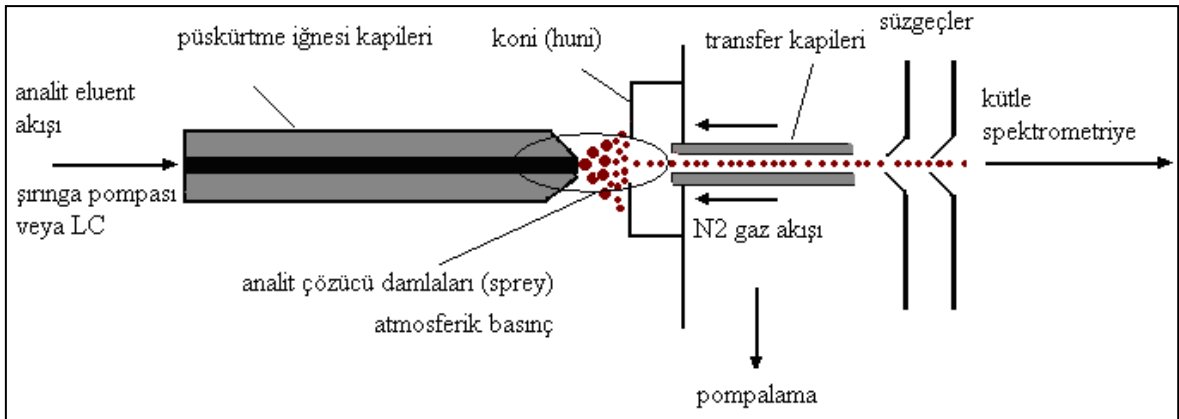
Yüksek-performanslı sıvı kromatografi-kütle spektrometri (HPLC-MS) oldukça çok yönlü bir enstrümantal tekniktir. HPLC-MS' in GC-MS' e nispeten başlıca avantajı çok daha geniş bir yelpazede bileşiklerin analizini gerçekleştirebilme kapasitesine sahip olmasıdır. Yüksek polarite gösteren veya yüksek molekül kütleli termal olarak kararsız bileşikler hatta proteinler bile rutin şekilde HPLC-MS kullanılarak tamamen analiz edilebilirler. Cihaz temel olarak örnek girişi (bir sıvı kromatografisi), iyonlaşma bölümü, kütle analizci ve dedektör içerir (Şekil 5).



Şekil 5. HPLC-MS cihazının yapısı

HPLC kolonunda elue edilen bileşikler bir iyonlaştırıcı basamağından sonra kütle spektrometresine gönderilir. HPLC-MS için kullanılan en yaygın iki iyonlaştırıcı elektrosprey iyonlaştırma (ESI) ve atmosferik basınç kimyasal iyonlaştırma (APCI)' dir. ESI ve APCI' nin her ikisi de iyonlaşmanın atmosferik basınçta gerçekleştiği yumuşak iyon kaynaklarıdır. Kütle spektrumu fragmentasyon teknikleri kullanılmadığı sürece esas olarak molekül kütlesi bilgisini sağlar.

HPLC-ESI-MS' de analit 20–500 $\mu\text{L}/\text{dk}$ tipik akış hızında kaynağa gönderilir. Kolondan çıkan eluat tipik olarak 2,5 kV' dan 4 kV' luk alanda zıt elektroda karşı yüksek bir potansiyel farkına sahip elektrosprey iğneden geçer. Isıtılan buharlaştırma gazı (genellikle azot) iğnenin polaritesi kadar bir yüzey yükü ile iğneden yüklü damlaların iyi bir püskürtme oluşturması için kullanılır. Damlalar iğneden zıt elektrot üzerinde kaynak numune hunisine doğru püskürtülür. Damlalar iğne tepesi ve huni arasındaki alanda çapraz geçerek çözücü buharlaşır. Bu damlaların yüzey gerilimi yüke dayanamayacak kadar küçülmelerine neden olur ki bu noktada Coulomb patlaması gerçekleşir ve damlalar parçalanır. Bu süreç öyle küçük damlalar üretir ki sonunda yüklü analit molekülleri gaz haline gelinceye kadar tekrarlanır. Bu yüklü analit molekülleri tek ya da çok yüklü olabilirler (Covey ve Devanand, 2002). Elektrosprey süreci Şekil 6'da şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 6. Bir elektrosprey iyon kaynağının şematik diyagramı

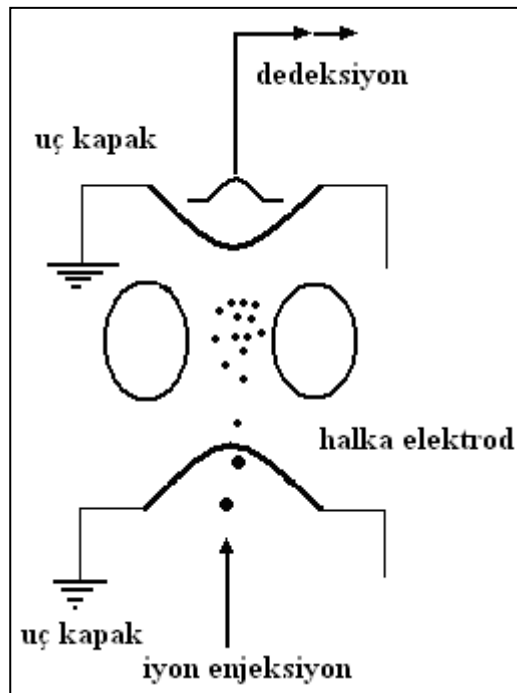
HPLC-MS' de en yaygın kullanılan kütle analizörleri kuadrupol (tekli ya da çoklu), iyon tuzaklı (Ion Trap, IT) ve uçuş-zamanlı (Time of Flight, TOF) kütle analizörleridir. İyon tuzaklı kütle analizörleri, GC-MS cihazlarında kullanılmakla birlikte atmosferik basınçlı iyonlaştırma (API) kaynağı ile birleştirildiğinde HPLC-MS analizlerinde de uygundur.

Tuzağın prensibi, iyonların bir halka ve iki uç kapak elektrottan oluşan bir alette depolanmasıdır (Şekil 7). İyonlar halka elektrot üzerine bir RF voltajı uygulanarak tuzakta biriktirilirler. Maksimum etkinlik (çözünürlük ve duyarlılık) için iyonlar ideale en yakın alanda tuzağın merkezine yakın odaklanmalıdırlar. Bu çarpışmalı olarak enjekte edilen

iyonları kararlı hale getirinceye kadar salınımlar bir gaz (%99.998 helyum) girişiyle düşürülür (Covey ve Devanand, 2002).

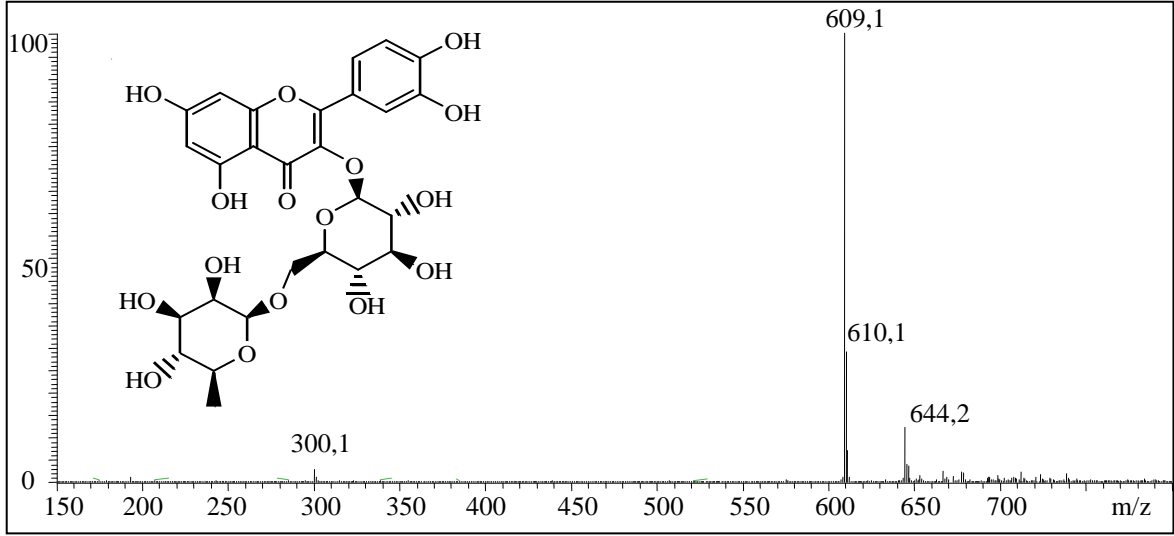
Uç kapak elektrotlarda RF voltajının yükselmesiyle ya da uygulanan destek voltajıyla ya da bu ikisinin kombinasyonuyla:

- İyonlar kararsızlaşır ve m/z oranlarına göre ayrılarak tuzaktan detektöre ulaşır (HPLC-MS).
- Tuzakta tek bir iyon tutulur, titreşimlerle fragmentlerine parçalanır (HPLC-MS/MS).

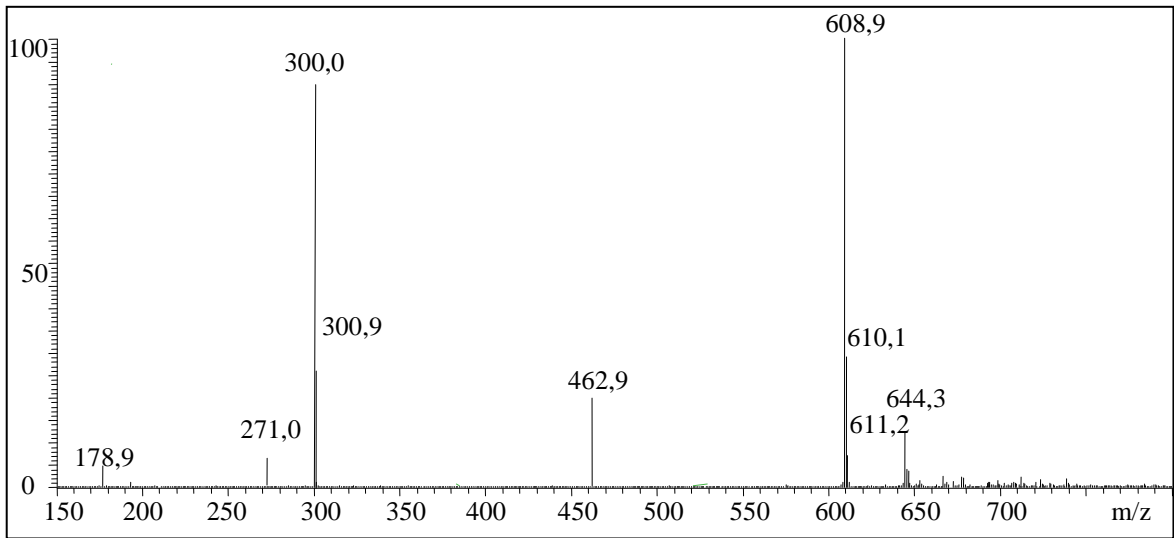


Şekil 7. Bir iyon tuzak detektörünün şematik diyagramı

Bir flavonoid olan rutin HPLC-MS ve HPLC-MS/MS sistemleri ile elde edilen kütle spektrumları Şekil 8 ve 9'da verilmiştir. MS dedektörü ile gözlenen moleküler iyonun ilaveten MS/MS sistemi ile analitin tanınmasına olanak sağlayan parçalanma ürünleri yani fragmentler elde edilmiştir. Rutin 609 akb olan $[M-H]^-$ moleküler iyonuna sahiptir. Deoksiheksoz'a karşılık gelen 146 akb kaybı ile 463 akb ve heksoz'a karşılık gelen 162 akb kaybı ile 301 akb olan kuersetin $[M-H]^-$ iyonu gözlenmiştir (Häkkinen ve Auriola, 1998).



Şekil 8. Rutin' in (kuersetin-3-rutinozit) HPLC-MS spektrumu



Şekil 9. Rutin' in (kuersetin-3-rutinozit) HPLC-MS/MS spektrumu

1.2.1.2. Fenolik Bileşiklerin Sıvı Kromatografisi ile Ayrılması ve Dedeksiyonu

Ultraviyole dedeksiyonuyla birlikte RP-LC (ters faz-sıvı kromatografisi) bitki ekstraktlarının fenolik bileşimleri için seçilen bir yöntemdir. Fenollerin ayrılması genellikle metanol (MeOH) veya asetonitril (CH_3CN , ACN) ve modifiye edici olarak az miktarda asit içeren su hareketli fazlarıyla çalışan C18 kolonlarında gerçekleştirilir. Mobil fazda fenolik asitlerin protonlaşmalarını garantilemek için formik asit (HCOOH), asetik asit (AcOH), trifloroasetik asit (TFA) ve fosforik asit (H_3PO_4) gibi asitler modifiye edici

olarak kullanılırlar ve böylece pik şekli ve çözünürlüğün iyileştirilmesi sağlanır (Wu vd., 2004).

On-line UV spektrum bileşiklerin tanımlanmasını kolaylaştırırken, diyot serili dedektörler (DAD) seçicilik ve duyarlılığı optimize etmek için farklı dalga boylarının eş zamanlı olarak görüntülenmesi için kullanılırlar. RP-LC-DAD (ters faz-sıvı kromatografisi-diyot serili dedektör), pek çok fenolik bileşik için güçlü bir analiz yöntemi olarak gösterilmiştir. Fakat yinede UV dedeksiyonu belli uygulamalar için yeterince duyarlı ve spesifik değildir. Kütle dedektörü ile kombine olarak HPLC (LC-MS) gibi seçiciliği mükemmel olan ve duyarlı teknikler sayesinde bu dezavantajların üstesinden gelinebilir (Chilla vd., 1996; Goldberg vd., 1996; Bovanová ve Brandšteterová, 2000; Malovaná vd., 2001). UV dedeksiyonu ile seri olarak MS' in kullanımı bitki ekstraktlarında polifenollerin analizi için çarpıcı bir alternatif sunar. Böylece RP-LC ile sağlanan yüksek çözünürlükte ayırma sonrası MS tarafından analitlerin kesin tanımlanması yapılabilmektedir.

Fenoliklerin LC-MS karakterizasyonu için çeşitli iyonlaştırma yöntemleri kullanılmaktadır. Son zamanlarda, ilave yapısal bilgi sağlamak için pozitif veya negatif MS modunda elektrosprey iyonlaştırma (ESI) ile bu bileşikler tanımlanabilmektedir (Wu vd., 2004).

1.2.2. Spektrofotometrik Toplam Fenolik Madde Tayini

Toplam fenolik madde tayini basit bir yöntem olup çalışılan materyaldeki fenolik bileşenlerin miktarı ile ilgili olarak kaba bilgi sağlar. Bu nedenle kromatografik analizlere geçmeden önce veya kromatografik analizler ile birlikte gerçekleştirilir.

Yöntem, suda ve diğer organik çözücülerde çözülmüş olan fenolik bileşiklerin Folin-Ciocalteu reaktifi ile alkali ortamda renkli kompleks oluşturması esasına dayanır. Bu yöntem aslında numunenin indirgeme kapasitesinin ölçülmesine dayanır. Fosfomolibdat (MoO_4^{2-}) ve fosfotungstat (WO_4^{2-}) karışımını içeren Folin-Ciocalteu reaktifine alkali ortamda fenolik hidroksil grubundan elektron transferi gerçekleşir ve indirgenmiş kompleksin oluşturduğu koyu mavi renk 760 nm' de maksimum absorbans oluşturur ki, rengin şiddeti fenolik maddelerin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. (Slinkard ve Singleton, 1977; Ainsworth ve Gillespie, 2007; Vermerris ve Nicholson, 2006).

Temsili olarak seçilen bir fenolik asit veya flavonoid standardının bu yöntemle elde edilen kalibrasyon grafikleri kullanılarak örneklerin toplam fenolik bileşimi mg standart/ gr katı numune cinsinden verilmektedir. Genellikle fenolik asit standardı için gallik asit ve flavonoid standardı olarak da kateşin kullanılmaktadır (Javanmardia vd., 2003). Fenolik bileşikler antioksidan karakterde olduklarından numunelerin toplam fenolik bileşimlerini tayin eden bu yöntem aynı zamanda bir antioksidan tayin yöntemidir.

1.3. *Digitalis* Türleri ve Özellikleri

Geleneksel olarak Scrophulariaceae familyasında yer alan *Digitalis* L. cinsi, son yıllarda yapılan filogenetik çalışmalar ışığında Plantaginaceae ve Veronicaceae familyaları içinde gösterilmektedir (Olmstead vd., 2001; Bräuchler vd., 2004). Türkçe adı yüksükotu, İngilizce adı Foxglove olarak kullanılmaktadır. İki yıllık ve ömürlü, pembe, mor, kırmızı, sarı veya beyaz renklerde türleri vardır. Tohum olarak ekildiğinde ilk yıl kalın, oval, rozet şeklinde büyüyen yapraklar çıkarır. Ertesi yıl rozetin ortasından kalın bir sap uzar. Sapın üzerinde tomurcuklar sıralanmıştır. Çiçekler aşağıdan başlayarak açarlar. Borazana benzer biçimli çiçeklerin açık ağızları aşağı doğru bakar. Çoğunun iç kısımları beyaz çerçeveli bordo beneklerle kaplıdır. Örnek olarak *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii*' nin fotoğrafı Şekil 10' da verilmiştir.



Şekil 10. *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii*' nin fotoğrafı

Yüksük otunun kalıcı bir türü de vardır. Dünyada 19 tür ile temsil edilen bu cinsin doğal yayılış alanları Avrupa, Batı ve Orta Asya ve Kuzeybatı Afrika' dır (Werner, 1964; Bräuchler vd., 2004).

Digitalis türleri hayvanlara zarar veren digitalis veya digitoksin olarak isimlendirilen kalp glikozitleri (kardenolitler) yönünden oldukça zengindir (Hagimori vd., 1982; Stuhlemmer, 1993; Cousins, 1994; Theurer, 1998; Baytop, 2002). Bu açıdan genel olarak bu türün ihtiva ettiği glikozitler kalp yetmezliğine karşı ilaç aktif maddesi olarak kullanılmaktadır. Son zamanlarda bu türlerde mevcut olan glikozitlerin potasyel antikanser etkileri de rapor edilmiştir (Lopez-Lazaro vd., 2003). Ayrıca bu türden bitkilerde yaygın olarak bulunan ikincil metabolitlerden feniletanoid ve fenilpropanoid glikozitleri moleküler olarak sahip oldukları antioksidan ve serbest radikal temizleme aktivitelerinden dolayı koruyucu olarak enfeksiyon, yaralanma, UV ışınına maruz kalma ve çevre kirliliğine karşı oluşan biyotik ve abiyotik strese cevap vermektedir (Korkina, 2007).

Türkiye'de birçok *Digitalis* türü yetişmesine karşılık halk arasında kullanıldığına rastlanmamıştır. Bitkinin kullanımına ait ilk bilgiler İngiltere' den gelmektedir. 1785 yılından bu yana *Digitalis purpurea* L. türü başta olmak üzere *Digitalis lanata* ve *Digitalis lutea*'nın kurutulmuş bitki yaprakları çeşitli kalp rahatsızlığı tedavilerinde kullanılmış, Avrupa ve Amerika'da özel olarak yetiştirilmiştir. Son yıllarda özellikle Yeşil Devrim olarak adlandırılan süreç içerisinde bitkinin yetiştirilmesi ve üretilmesi in vitro çalışmalar ile hızlandırılmıştır (Bucay, 1999; Paranhos, 1999; Ikeda ve Fujii, 2003).

Dünyada en çok bilinen *Digitalis* türü, *Digitalis purpurea*'dır fakat bu tür Türkiye' de doğal olarak bulunmamaktadır. *Digitalis* cinsi, ülkemizde 8 tür ve 2 alttürle (toplamda 9 takson) ile temsil edilmektedir;

1. *Digitalis cariensis* Boiss. Ex Jaub. et Spach,
2. *Digitalis davisiana* Heywood,
3. *Digitalis ferruginea* L. ssp. *ferruginea* L.,
4. *Digitalis ferruginea* L. ssp. *schischkinii* (Ivan.) Werner,
5. *Digitalis grandiflora* Miller,
6. *Digitalis lamarckii* Ivan,
7. *Digitalis lanata* Ehrh.,
8. *Digitalis trojana* Ivan ve
9. *Digitalis viridiflora* Lindley' dir.

Bunlardan dört tür (*Digitalis trojana* Ivan., *Digitalis davisiana* Heywood, *Digitalis cariensis* Boiss. ex Jaub. et Spach ve *Digitalis lamarckii* Ivan.) ülkemize endemik olup, endemizm oranı %44.4'tür (Davis, 1978).

Digitalis türlerinin kardiyak glikozitleri üzerine yüzlerce çalışma yapılmış olmasına rağmen ve fenolik bileşimlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar sınırlıdır. Dinan ve arkadaşlarının (2001) yaptıkları bir review çalışmasında bitki steroidlerinden kardenolitlerin bitkilerde oldukça yaygın ve özellikle de Scrophulariaceae familyasından *Digitalis* cinsi de dahil olmak üzere bazı bitki cinslerinde buldukları belirtilmiştir. Bitkilerde kardenolitlerin 3-*O*-glikozitlerinin baskın olduğu ve bununla birlikte 2,3 çift glikozit bağlı formlarının da mevcut olduğu belirtilmektedir. Kardenolit ekstraksiyonunda genellikle etanol, metanol ve sulu metanol kullanılmakta olup bunu takiben sulu çözüldüden etil asetat ile kardenolitlerin seçimli ekstraksiyonu da uygulanmaktadır. HPLC-UV analizlerinde asetonitril ve su mobil fazları kullanılarak uygulanan gradient elüsyonu ile gerçekleştirilen ayırma sonrasında 220nm' de ölçüm yapılmaktadır.

Digitalis türlerinde fenolik bileşenlerin tayinine yönelik çalışmalar genel olarak bitkiden izole edilen feniletanoid ve fenilpropanoidlerin yapı aydınlatılması şeklindedir.

Çok eski çalışmalardan biri olan Matsumoto ve arkadaşlarının (1987) "Phenolic Glycoside Composition of Leaves And Callus Cultures of *Digitalis purpurea*" adlı çalışmalarında *purpurea* türünün yapraklarında kafeik asidin feniletanoid glikozitlerinin belirlendiği rapor edilmiştir.

Baudouin ve arkadaşlarının (1988) "Lugrandoside: a new phenylpropanoid glycoside from various *Digitalis* species" adlı çalışmalarında *Digitalis lutea* L. ve *Digitalis grandiflora* Miller' in yapraklarından izole edilen lugrandosit' in (3,4-dihidroksi- β -fenilethoksi-*O*- β -D-glikopiranozil-(1 \rightarrow 6)-4-*O*-trans-kafeoil- β -D-glikopiranozit) kimyasal ve spektral özelliklerine dayanan yöntemlerle yapısı aydınlatılmış ve yeni bir bileşik olarak litaretüre girmiştir.

Zhou ve arkadaşlarının (1998) "Phenylethanoid Glycosides from *Digitalis purpurea* and *Penstemon linarioides* with PKC α -Inhibitory Activity" adlı yayınlarında *Digitalis purpurea*' nın diklorometan-metanol ekstraktları silika jel kolondan geçirilerek çeşitli fraksiyonlarına ayrılmıştır. Ayrılan fraksiyonlara uygulanan saflaştırma işlemlerinden sonra nükleer magnetik rezonans (NMR), ultraviole spektroskopisi (UV) ve kütle spektroskopisi (MS) ile yapı aydınlatılması yapılmıştır. Çalışmada yeni bir bileşik olan fenilethanoid glikozit, 2-(3-hidroksi-4-metoksi-fenyl)-ethyl-*O*-(α -L-rhamnosyl)-(1 \rightarrow 3)-

O-(α -L-rhamnosyl)-(1 \rightarrow 6)-4-*O*-*E*-feruloyl- β -D-glikopiranozit ve bilinen dört bileşik; kalseolariozit A, kalseolariozit B, forsitasit, and plantainozit D yapısı aydınlatılmıştır. Yeni tanımlanan bileşik ferulik asitin feniletanoid türevi olup diğerleri kafeik asitin şeker grubu içeren feniletanoid türevlerinden oluşmaktadır.

Çalış ve arkadaşlarının (1999) “Phenylethanoid Glycosides from *Digitalis ferruginea* subsp. *ferruginea* (=D. aurea Lindley) (Scrophulariaceae)” adlı çalışmalarında lugrandozit and *trans* ferulik asit gibi iki bilinen bileşiğin yanısıra ferruginozit A (3,4-dihidroksi- β -feniletoksi-*O*- β -D-glikopiranozil-(1 \rightarrow 6)-2-*O*-kafeoil- β -D-glikopiranozit) ve ferruginozit B (3,4-dihidroksi- β -feniletoksi-*O*- β -D-glikopiranozil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glikopiranozit) olarak iki yeni feniletanoid glikopiranozitleri izole edilmiştir. Açılasyon, metilasyon ve alkali hidroliz ile yapılan kimyasal transformasyon ile tek ve iki boyutlu NMR ve FAB-MS kullanılarak yapısal aydınlatma yapılmıştır.

Taskova ve arkadaşlarının (2005) “Chemotaxonomic markers in Digitalideae (Plantaginaceae)” başlıklı çalışmalarında *Digitalis purpurea* ve *Digitalis thapsi* de dahil olmak üzere benzer familyalardan olan altı türün kemotaksonomik markırları olarak karbohidratları, iridoitleri ve kafeoil feniletanoid glikozitleri incelenmiştir.

Lee ve arkadaşlarının (2006) “Screening of new chemopreventive compounds from *Digitalis purpurea*” adlı çalışmalarında *Digitalis purpurea* yapraklarından izole edilen dört farklı glikozit; akteozit, purpleazit A, kalseolariozit B ve plantainozit D’nin glutatyon S-transferaz (GST)’ ı indüklenme kuvvetleri ve H4IIE hücrelerinde aflatoksin B1 ile indüklenmiş sitotoksitesiye karşı koruyucu etkileri incelenmiştir. Burada izole edilen dört bileşik de kafeik asit feniletanoid türevlerindedir.

1.4. Amaç

Digitalis türlerinden izole edilen fenolik glikozitlerin çeşitli yapı aydınlatılması yöntemleri ile analizleri üzerine pek çok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar bitkinin biyolojik aktiviteye sahip ikincil bileşenlerinin tayin edilmesi amacıyla yapıldığı gibi kemosistematik açıdan bitkinin incelenmesi için de önem arz etmektedir. Bu çalışmada yurdumuza endemik olan *Digitalis* türleri ve yaygın olarak yurdumuzda yetişen ancak endemik olmayan iki *Digitalis* türünün ikincil bileşenlerinin analizleri hedeflenmiştir.

Çalışmada kullanılan *Digitalis* türleri ve özellikleri Tablo 2’ de verilmiştir.

Tablo 2. Analiz edilen *Digitalis* türlerine ait özellikler

No	Türün Adı	Yetiştirme Alanı	Renk	Ömür
1	* <i>Digitalis cariensis</i> Boiss. Ex Jaub. et Spach	Güneybatı Anadolu Antalya	Sarı	Çok yıllık
2	* <i>Digitalis davisiana</i> Heywood	Güneybatı Anadolu	Kahverengi	Bir veya iki yıllık
3	* <i>Digitalis lamarckii</i> Ivan	Kuzey Anadolu	Kahverengi-beyaz	Çok yıllık
4	* <i>Digitalis trojana</i> Ivan	Çanakkale ve Balıkesir arasında yer alan Kaz Dağlarında	Kırmızımsı kahverengi	İki yıllık
5	<i>Digitalis ferruginea</i> L. subsp. <i>schischkinii</i> (Ivan.) Werner	Batı Kafkasya ve Kuzeydoğu Karadeniz	Sarı	İki yıllık
6	<i>Digitalis ferruginea</i> L. subsp. <i>ferruginea</i> L.	Kuzey Anadolu ve Trakya	Pembemsi kahverengi	İki veya çok yıllık

*: Endemik tür

Bu çalışmada Tablo 2’ de belirtilen türlerin fenolik bileşikleri ve *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii*’ nin kardiyak glikozitlerinin bitkisel materyalden izolasyonu sonrasında kromatografik analizleri hedeflenmiştir. Çoğunluğu Türkiye’ ye endemik olan bu türler için fenolik bileşen profillerinin belirlenmesi ilk kez bu çalışmada gerçekleştirilecektir. Öncelikli olarak ekstraksiyon için koşullar optimize edilerek en yüksek geri kazanım sağlayan koşulların belirlenmesi hedeflenmiştir. Pek çok ikincil metabolitte olduğu gibi fenolik bileşiklerin bitkide sentezi ve birikimi mevsimsel olarak değişmektedir. Bu nedenle aynı türün farklı dönemlerde örneklenmesi yapılarak izlenmesi de amaçlanmıştır. Bu çalışmada kullanılan *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii* türünün bir Tübitak projesi (Proje no: 106O470) kapsamında doku kültürü yoluyla üretimi gerçekleştirildiğinden üretilen doku kültürlerinin fenolik içeriklerinin belirlenmesi de araştırmaya dahil edilmiştir. Zira bu tezden üretilecek sonuçlar, doku kültürü çalışmalarıyla birleştirilerek değerlendirilecek olup aynı türün doku kültürü ve doğadan toplanan kısımları arasında fenolik bileşen yönünden herhangi bir bağıntı olup olmadığı değerlendirilecektir.

Bitkisel materyalden izole edilen fenolik bileşiklerin analizinde RP-HPLC tekniğinin kullanılması amaçlanmış olup standart fenolik bileşikler kullanılarak farklı dedektör tiplerinde analiz koşulları da amaçlanmıştır.

Fenolik bileşiklerin RP-HPLC-UV dedeksiyon sistemi ile iki farklı dalga boyunda ölçümle optimizasyonu yapılarak hidrolizsiz ve hidrolizli ekstraksiyon için dedeksiyon limitleri belirlenmesi hedeflenmiştir. Ayrıca UV dedeksiyonu ile tanımlanamayan flavonoid grubu fenolik bileşiklerin analizi için RP-HPLC-MS yönteminin uygulanabilirliği de elektrosprey iyonlaşma (ESI) modunda değerlendirilecektir.

Çalışmada fenolik bileşikleri çalışılan endemik türlerin ve *Digitalis ferruginea* ssp. *ferruginea* türünün kardiyak glikozitleri başka bir doktora tezi olarak çalışılmaktadır. Bundan dolayı burada sadece *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii*' nin çiçek, yaprak ve petiyollerinde kardiyak glikozitlerinin daha önce optimize edilen bir yöntem ile ekstraksiyonları gerçekleştirilerek HPLC-DAD ile kantitatif olarak belirlenmeleri hedeflenmiştir (Gürel vd., 2010).

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Bitkilerin Toplanması

Çalışmada Scrophulariaceae familyasından bir cins olan *Digitalis*' e ait *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii*, *Digitalis ferruginea* ssp. *ferruginea* olarak iki endemik olmayan ve *Digitalis trojana*, *Digitalis davisiana*, *Digitalis lamarckii* ve *Digitalis cariensis* olmak üzere 4 endemik türün yapraklarında ve ayrıca *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii* bitkisine ait 5 farklı doku kültürü örneklerinde mevcut olan fenolik bileşiklerin HPLC-UV ve HPLC-MS analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu türlerin farklı bölge ve aylardaki örnekleri de ayrı ayrı incelenerek karşılaştırma yapılmaya çalışılmıştır. *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii* bitkisinin kardiyak glikozitleri HPLC-DAD ile analiz edilerek değerlendirilmiştir. Toplam fenolik madde içerikleri spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Çalışmada kullanılmak üzere toplanan bitki örneklerinin arazi ve zaman bilgileri Tablo 3' de verilmiştir.

Tablo 3. Bitki örneklerinin arazi ve zaman bilgileri

No	ADI	BÖLGE, İL	YÜKSEKLİK	TARİH
1	<i>D. ferruginea</i> ssp. <i>schischkinii</i>	Kaptanpaşa, Çayeli, Rize	650m	7 Haziran 2009
2	<i>D. ferruginea</i> ssp. <i>schischkinii</i>	Salarha, Rize	300m	20 Haziran 2009
3	<i>D. ferruginea</i> ssp. <i>schischkinii</i>	Sis Dağı, Trabzon	1550m	2 Temmuz 2009
4	<i>D. ferruginea</i> ssp. <i>schischkinii</i>	Abant Gölü, Bolu	1350m	Temmuz, 2009
5	<i>D. ferruginea</i> ssp. <i>schischkinii</i>	Soğukçeşme, Rize	550m	20 Temmuz 2009
6	<i>D. ferruginea</i> ssp. <i>schischkinii</i>	Verçenik Yaylası, Çamlıhemşin, Rize	1800m	9 Ağustos 2008
7	<i>D. ferruginea</i> ssp. <i>schischkinii</i>	Abelat Yaylası, Çamlıhemşin, Rize	2000m	15 Eylül 2009

Tablo 3' ün devamı

No	ADI	BÖLGE, İL	YÜKSEKLİK	TARİH
8	<i>D. ferruginea</i> ssp. <i>schischkinii</i>	Yeşiltepe, Çayeli, Rize	650m	12 Ekim 2009
9	<i>D. ferruginea</i> ssp. <i>ferruginea</i>	Abant Gölü, Bolu	1350m	Haziran, Temmuz 2009
10	<i>D. trojana</i>	Kaz Dağı, Milli Park	345m	Haziran, Temmuz , Ağustos 2009
11	<i>D. davisiana</i>	Alanya-Hadım arası, Antalya	1100m	Haziran, Temmuz, Eylül 2009
12	<i>D. lamarckii</i>	Gerede-Kızılcahamam arası, Ankara	1520m	Ağustos, Eylül 2009
13	<i>D. cariensis</i>	Alanya-Taskent arası, Antalya	1041m	Haziran, Temmuz, Eylül 2009

D. Digitalis

2.2. Bitki Ekstraktlarından Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu

Açık havada, güneş almayan nemsiz ortamda kurutulan bitki örneklerinin yaprak kısımları ayrılarak blender ile toz haline getirildi.

Bitkisel materyallerden fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu giriş kısmında detaylarıyla tartışılmıştır. Deneysel çalışmalarda toplanan örneklerin metanol ile ekstraksiyonu sonrasında uygulanan hidroliz aşamalarında genellikle sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemleri gerekmektedir. Bu nedenle uygulanacak olan ara ayırma işlemlerinin ekstraksiyon verimleri ve geri kazanımları önemli hale gelmektedir. Örnek içinde mevcut olan fenoliklerin tam olarak ekstraksiyonu için optimize edilmiş bir seri sisteme ihtiyaç duyulmuştur. Ekstraksiyon sisteminin geri kazanım oranlarını belirlemek amacıyla ekstraksiyon ortamına standart fenolik bileşikler ilave edilerek ekstraksiyon sonrası derişimleri belirlenmiştir. Bu amaçla yapılan çalışmalar aşağıda detaylarıyla verilmiştir.

2.2.1. Ekstraksiyon Koşullarının Geri kazanımlarının Hesaplanması

Ekstraksiyon işlemlerine başlamadan önce *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii*' nin yaprak kısmında ekstraksiyon koşullarının değerlendirilmesi için geri kazanım deneyleri

yapıldı. Bunun için 15 g numune ultrasonik banyoda 60°C' de 3 saat 150 mL MeOH ile reflaks edildi. Santifüj edilerek alınan berrak ekstraktan geriye kalan kuru kısım metanol ile her defasında santrifüj edilip berrak kısım alınmak suretiyle yıkanarak çözelti 250 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan metanol ekstraktından her defasında 6,25 mL alınarak 0,65 mL hacimli 62,5 mg/L standart karışımı eklendi ve evapore edilerek aşağıdaki dört farklı işlem ikişer tekrarlı olarak uygulandı:

1. Doğrudan metanolik ekstraktın analizi için; 5 mL metanol ile çözüldü.

2. Nötr pH' daki sıvı-sıvı ekstraksiyonu için; 6,25 mL ultra saf su eklenip karıştırılan ekstrakt 3x3 mL dietileter ve 3x4 mL etil asetat ile sıvı-sıvı ekstraksiyonuna tabi tutuldu. Alınan organik kısımlar birleştirilip evapore edildikten sonra 5 mL MeOH ile çözüldü.

3. pH= 2' deki sıvı-sıvı ekstraksiyonu için 6,25 mL pH=2 olan su ilave edilip karıştırılan ekstrakt 3x3 mL dietileter ve 3x4 mL etil asetat ile sıvı-sıvı ekstrakte edildi. Alınan organik kısımlar birleştirilerek evapore edildikten sonra, 5 mL MeOH ile çözüldü.

4. Asidik hidroliz ve ardından sıvı-sıvı ekstraksiyonu için; genel olarak asidik hidroliz, metanolik 2M HCl' li ortamda 90-100°C' de 2 saat geri soğutucu altında uygulanmakta olup bu çalışmada 2 mL metanol eklenerek HCl konsantrasyonu 2M olacak şekilde 4,25 mL HCl eklenerek 2 saat 90 °C'de asidik hidrolize tabi tutuldu (Kuninori ve Nishiyama, 1986; Kader vd., 1996; Endale, vd., 2005; Kim vd., 2006; Ma vd., 2009). Ardından soğutulan sulu karışım 3x3 mL dietileter ve 3x4 mL etil asetat ile ekstrakte edildi. Alınan organik kısımlar evapore edilip, 5 mL MeOH ile çözüldü.

Elde edilen tüm metanolik ekstraktlardan eşit miktarda alınan bir kısım, su, %5 asetonitril ve 10 mg/L olacak şekilde eklenen iç standart (IS) propil paraben ile birlikte %70 seyreltildikten sonra filtreden geçirilip HPLC-UV ile analiz edildi.

Standart karışımı ise derişimi 2,4 mg/L olacak şekilde su, %5 asetonitril ve derişimi 10 mg/L olacak şekilde eklenen IS ile birlikte %70 seyreltildikten sonra filtreden geçirilip HPLC-UV ile analiz edildi.

Ekstraksiyonların yüzde geri kazanımları (GK);

% GK= (standart eklenen numune/standart)*100 formülüne göre hesaplandı (Tekelioğlu vd., 2010).

2.2.2. *Digitalis* Türlerinden Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu

Ekstraksiyon koşullarının optimizasyonunun ardından asit hidrolizi uygulanmış ekstraksiyon işlemi *Digitalis* türlerinden fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için uygun görülmüştür. Böylece ekstraktlar optimizasyonda kullanılan katı numune/mL çözücü oranları sabit tutularak aşağıdaki şekilde hazırlanmışlardır:

1. 0,6 g örnek ultrasonik banyoda 10 mL metanol ile geri soğutucu altında 60°C' de 3 saat ekstrakte edildi.

2. Santrifüjlenerek berrak kısmı balona alınan ekstraktın geri kalan kuru kalıntısı 5 kez 2 mL metanol ile her defasında ultrasonik banyoda 60°C'de 3 dakika bekletmek koşuluyla temizlendi ve tüm metanol ekstraktları aynı balonda birleştirildi.

3. Elde edilen metanol ekstraktı evaporatörde deriştirilip son hacim 10 mL'ye getirildi.

4. Ekstraktların 3,75mL'leri toplam fenolik madde tayini için +4 °C'de saklandı.

5. Geri kalan 6,25 mL ekstraktlar, çözücüleri evaporatörde kuruluğa kadar buharlaştırılıp önceden de belirtildiği gibi 2 mL metanol eklenerek HCl konsantrasyonu 2 M olacak şekilde 4,25 mL HCl eklenip 2 saat 90 °C'de asidik hidrolize tabi tutuldu. Hidrolizin ardından soğutulan sulu karışım 3x3 mL dietileter ve 3x4 mL etil asetat ile ekstrakte edildi.

6. Tek bir balonda toplanan organik kısımların çözücüleri evaporatörde uçuruldu.

7. Kalan kuru kısım 5 mL metanol ile çözülüp bu çözeltilen alinan bir miktar ekstrakt su, %5 asetonitril ve 10 mg/L olacak şekilde eklenen IS ile birlikte %70 seyreltikten sonra filtreden geçirilip HPLC-UV ile analiz edildi.

8. HPLC-MS deneyleri için ise alınan bir miktar ekstrakt su ve metanol ile %25 oranında seyreltilerek filtreden geçirilip analiz edildi.

Ayrıca karşılaştırmanın kolaylığı açısından başlangıç miktarı ile son çözücü hacmi arasındaki oran her zaman aynı tutulacak şekilde alınan 0,2 g örneklerden aynı yöntemle hazırlanan metanolik ekstraktlar çözücüleri uçurularak pH=2 olan sulu çözeltiliye alındı. Seçimli ekstraksiyon ilk ekstraksiyonlar ile eşit orantılı olacak şekilde dietileter ve etil asetat ile gerçekleştirildi. Bir balonda toplanan organik kısımların çözücüleri evaporatörde uçuruldu. Kalan kuru kısım 2,67 mL metanol ile çözülüp hidroliz edilen örneklerle aynı şekilde HPLC-UV ve HPLC-MS deneyleri için hazırlandı.

2.2.3. Örneklerin Kodlanması

Çalışmada *Digitalis* türlerinden elde edilen ekstraktlar tür adı, alt tür adı, farklı yerlerden toplanan aynı türler için toplandıkları yer, toplandıkları ay ve ekstraksiyon koşulları bilgisini içerecek şekilde kısaca kodlanmıştır. Örneğin *Digitalis trojana*'nın Haziran ayına ait hidroliz sonucunda elde edilen ekstraktının kodu DTH-H; ilk harf *Digitalis*' in D'si ikinci harf *trojana*'nın T'si, üçüncü harf Haziran'ın H' si olarak DTH ve en son hidrolizli ekstrakt olduğunun anlaşılması için H harfi eklenmiştir. Bu durumda pH=2' deki ekstraktı DTH-2 olarak kodlanmıştır. *Digitalis trojana*, *davisiana*, *lamarckii*, *cariensis* endemik türleri ve *Digitalis ferruginea* ssp. *ferruginea* alt türünün bitki örneklerinin tamamı aynı yerden toplandığı için yer bilgisi kodlarda verilmemiştir. Sadece *Digitalis ferruginea* ssp. *ferruginea* için alt tür kodu olarak f küçük harf olarak koda eklenmiştir. Böylece Haziran ayında toplanan *Digitalis ferruginea* ssp. *ferruginea* hidrolizli ekstraktı DFfH-H olarak kodlanmıştır. Öte yandan *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii* alt türünün çeşitli yerlerden toplanan örnekleri için yer bilgisi de kodlara eklenmiştir. Örneğin; DfsVA-H kodu *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii*' nin Verçenik'ten toplanan Ağustos ayı örneğinin hidrolizli ekstraktına aittir. *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii*' nin Rize, Çamlıhemşin, Abelat yaylası ve Bolu Abant Gölü çevresinden toplanan iki örneğinin yer bilgileri Abelat ve Abant'ın baş harfleri aynı olduğundan Bolu Abant örneği için Bolu'nun baş harfi B kullanılarak DFsB olarak kodlanmıştır. Doku kültürü örneklerinin tamamı *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii*' nin Trabzon, Sis Dağı' nda yetişen örneklerinden elde edildiği için hepsi kültürün baş harfi olan K ile başlamaktadır ve farklılaşmış örnekler için F harfi yaprak için Y ve yeşil örnek için Ye harfleri kodlamalarda kullanılmıştır. Tüm bu açıklamalar ışığında Tablo 4' de her örneğin toplanma yeri, zamanı, kodu ve ekstraksiyon bilgisi ile birlikte son ekstrakt konsantrasyonu mg kuru kalıntı/mL metanol cinsinden verilmiştir.

Tablo 4. Örneklerin kodları, ekstraksiyon detayları ve mg kuru kalıntı/mL metanol cinsinden son ekstrakt konsantrasyonu

Ad	Yer	Kod	İşlem	Ekstrakt konsantrasyonu (mg/mL)
<i>Digitalis ferruginea</i> ssp. <i>schischkinii</i>	Kaptanpaşa (Haziran)	DfsKH-H	Hidroliz	5,52
	Salarha (Haziran)	DfsSH-2	pH=2	3,97
	Sis Dağı (Temmuz)	DfsSiT-2	pH=2	3,26
	Abant (Temmuz)	DFsBT-2	pH=2	3,86
	Soğukçeşme (Temmuz)	DfsSoT-2	pH=2	4,23
	Verçenik (Ağustos)	DfsVA-2	pH=2	1,32
		DfsVA-H	Hidroliz	3,2
	Abelat (Eylül)	DfsAE-2	pH=2	4,75
	Yeşiltepe (Ekim)	DfsYEk-2	pH=2	3,86
<i>Digitalis ferruginea</i> ssp. <i>ferruginea</i>	Abant (Haziran)	DFfH-2	pH=2	4,31
		DFfH-H	Hidroliz	3,84
	Abant (Temmuz)	DFfT-2	pH=2	3,74
		DFfT-H	Hidroliz	5,4
<i>Digitalis trojana</i>	Kaz Dağı (Haziran)	DTH-2	pH=2	3,11
		DTH-H	Hidroliz	6,72
	Kaz Dağı (Temmuz)	DTT-2	pH=2	3,71
		DTT-H	Hidroliz	6,34
	Kaz Dağı (Ağustos)	DTA-2	pH=2	2,88
		DTA-H	Hidroliz	5,2
<i>Digitalis davisiana</i>	Antalya (Haziran)	DDH-2	pH=2	3,18
		DDH-H	Hidroliz	5,58
	Antalya (Temmuz)	DDT-2	pH=2	4,61
		DDT-H	Hidroliz	5,52
	Antalya (Eylül)	DDE-2	pH=2	19,58
		DDE-H	Hidroliz	7,68
<i>Digitalis lamarckii</i>	Ankara (Ağustos)	DLA-2	pH=2	2,4
		DLA-H	Hidroliz	7,54
	Ankara (Eylül)	DLEy-2	pH=2	4,08
		DLEy-H	Hidroliz	6,88

Tablo 4'ün devamı

Ad	Yer	Kod	İşlem	Ekstrakt konsantrasyonu (mg/mL)
<i>Digitalis cariensis</i>	Antalya (Haziran)	DCH-2	pH=2	4,01
		DCH-H	Hidroliz	6,86
	Antalya (Temmuz)	DCT-2	pH=2	3,82
		DCT-H	Hidroliz	4,24
	Antalya (Eylül)	DCE-2	pH=2	2,62
		DCE-H	Hidroliz	9,76
<i>Digitalis ferruginea</i> ssp. <i>schischkinii</i> bitki doku kültürü örnekleri	Farklılaşmamış siyah	KS	pH=2	3.89
	Farklılaşmış yaprak	KFY	pH=2	2.96
	Farklılaşmamış yeşil	KYe	pH=2	4.19
	Köklenmiş	KK	pH=2	2.81
	Farklılaşmış siyah	KFS	pH=2	2.96

2.3. *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii* Bitkisinden Kardiyak Glikozitlerinin Ekstraksiyonu

Farklı bölgelerden farklı zamanlarda toplanan *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii* türünün hem bitkiden hemde doku kültürlerinden fenolik bileşenleri ekstre edilmesi ve analizlerinin yapılması hedeflenmiştir. Bu türün içerdiği kardiyak glikozitleri de ilk kez bu çalışmada belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii*'nin 2008 yılı Ağustos ayında Rize'nin Verçenik yaylasından toplanan örneğinin çiçek, yaprak ve petiyol kısımları Gürel ve arkadaşlarının (2010), Wiegrebe ve Witch (1993)'den değiştirilerek geliştirilmiş oldukları yöntem ile aşağıda sırasıyla belirtildiği gibi özütlenmiştir:

1. 2 mL' lik tüp içindeki 50 mg kurutulmuş yaprak üzerine 1 mL %70' lik metanol eklenerek 30 dakika süreyle 60-65°C' ye ayarlanmış ultrasonik temizleme banyosunda bekletildi.
2. Tüp 2-5 dakika süreyle buz dolu bir kaptaki bekletildi.
3. 5 dakika 12000 rpm de santrifüj edildi.
4. Üst kısım (sıvı ekstrakt) mikropipet ile yeni tübe aktarıldı ve üzerine 250 mL %15' lik kurşun asetat eklenerek karıştırılıp 1 dakika vortekslendi. 1 Dakikalık dinlenme

süresinden sonra tekrar 30 saniye vorteks yapıldı ve 1 dakika bekletildi (ekstrakt içindeki istenmeyen bazı maddeleri temizleme safhası).

5. 5 dakika 12000 rpm de santrifüj edildi.

6. Ekstrakt yeni tübe alınıp üzerine 500 mL % 4' lük (doymuş) Na₂PO₄ eklendi ve karıştırıldıktan sonra 1 dakika dinlendirildi. 30 Saniye vortekslelendikten sonra tekrar 1 dakika bekletildi.

7. 8 dakika 12000 rpm de santrifüj edildi.

8. Ekstrakt yeni tübe alınıp 2 mL' ye kadar saf su ilave edildi, vortekslelendikten sonra 2 adet 1,5 mL lik tübe ayrıldı.

9. Tüplerin herbirine 500 µL kloroform/isopropanol (3/2) çözeltisi eklendi ve 1 dakika vortekslelendi.

10. Tüpler 5 dakika 12000 rpm de santrifüj edildi.

11. Tüpte oluşan 2 fazdan alt kısım pipet ile alındı ve yeni tübe aktarıldı. Bu birinci ekstraksiyondur.

12. İkinci ekstrasyonda metanol fazı ayrı bir tüpte 500 µL kloroform ile karıştırıldı, 10 ve 11. maddeler tekrar edildi.

13. Numunelere sodyum sülfat ekleyerek çözeltideki su ortamdan uzaklaştırıldı.

14. Santrifüj tüpleri vakum sistemine alınarak kloroformun uçması sağlandı.

15. İkinci numuneye 500 µL HPLC grade MeOH eklenerek yaklaşık 1 dakika mini çalkalayıcıda karıştırıldı ve birinci ekstraksiyonla birleştirildi.

Numuneler HPLC' den önce, 0,22 µm' lik porlara sahip şırınga filtreleri kullanılarak süzüldü.

2.4. Bitki Ekstraktlarında Fenolik Bileşiklerin HPLC-UV ve HPLC-UV-MS Analizleri

2.4.1. Kimyasal Malzeme ve Materyaller

Analitik saflık derecesinde 17 fenolik standart; gallik asit, protokatekuik asit (3,4-dihidroksi benzoik asit), *p*-OH benzoik asit, kateşin, klorojenik asit, vanilik asit, kafeik asit, siringik asit, epikateşin, *p*-kumarik asit, benzoik asit, *o*-kumarik asit, *cis,trans*-absisik asit, *trans*-sinnamik asit, rutin, ferulik asit, kuersetin ve iç standart olarak kullanılan propilparaben, numune hazırlamada ve kromatografik analizde kullanılan HPLC saflıkta

asetonitril, metanol, asetik asit ve hidroliz deneyleri için kullanılan HCl Sigma-Aldrich'den satın alındı. HPLC şırınga filtreleri (RC-membrane, 0.45 µm) Filtre Sartorius Minisart RC 25, Sartorius (Almanya)'dan satın alındı. Analizler esnasında pH ayarlama için Hanna (pH 213 microprocessor) marka pH metre ve spektroskopik analizler için Spectro UV-Vis (Double PC-8 Auto cell) Labomed inc. marka UV/Vis spektrofotometre kullanıldı.

2.4.2. Standartlar ve Kalibrasyon

Tüm stok çözeltiler %100 metanolde 1000 mg/L konsantrasyonda hazırlandı. Bu stok çözeltilerden 30:70 metanol/su olacak şekilde seyreltme yoluyla onyeddi standardın 2,5, 5, 10, 20 ve 25 mg/L'lik kalibrasyon örnekleri hazırlandı. İç standart olan propil parabenin stok çözeltisinden herbir kalibrasyon çözeltisine son konsantrasyonu 10 mg/L olacak şekilde eklendi. Klorojenik asit, kafeik asit, *p*-kumarik asit, rutin, ferulik asit ve kuersetin haricinde iç standart propil paraben gibi 280nm' de maksimum absorbans veren her bir standardın konsantrasyonuna karşı oluşan pik alanı iç standardın pik alanına bölünerek elde edilen oranlar kullanılarak kalibrasyon grafikleri hazırlandı. Klorojenik asit, kafeik asit, *p*-kumarik asit, rutin, ferulik asit ve kuersetin için konsantrasyonlarına karşı 315nm' de elde edilen pik alanları grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafikleri hazırlandı.

2.4.3. HPLC-UV Koşulları

HPLC-UV analizleri iki dalga boyunda aynı anda cevap alınabilen UV dedektör ile donanımlı Shimadzu HPLC-UV sisteminde yapıldı. Enstrüman Class VP programı ile kontrol edildi. Tüm analizler için bir ters faz C18 kolon (150 mm × 4,6 mm i.d., 5 µm partikül; Agilent) kullanıldı. Kullanılan gradient elüsyonu De Villiers ve arkadaşlarının (2004) kullandıkları yöntemden modifiye edilmiştir. Hareketli faz (A) %2 asetik asitin sudaki çözeltisi ve (B) 80:20 asetonitril/su çözeltilerinden oluşmaktaydı. Yüksek polarite ve düşük pH dan düşük polarite ve yüksek pH ya doğru gradient elüsyon çalışıldı. Enjeksiyon hacmi 50 µL ve kolon sıcaklığı kolon fırınında 30°C' ye ayarlandı. Akış hızı 1 mL/dk olarak ayarlandı, dedektör 280 ve 315nm' de çalıştırıldı.

2.4.4. HPLC-UV İçin Dedeksiyon Limitinin (LOD) Belirlenmesi

EPA metoduna göre dedeksiyon limiti hesaplandı (US EPA, 1984). Tüm 17 standardın 2 mg/L' lik karışımı LC-UV ile analiz edildi. Her bir analitin sinyalinin gürültüye oranına (S/N) dayanan değer belirlendi, 3 seviyesinde bir S/N sağlamak için gerekli konsantrasyon hesaplandı. Sonuç olarak, 0,02 mg/L'de trans-sinamik asit, 0,03 mg/L'de *o*-kumarik asit *p*-kumarik asit, ferulik asit ve cis,trans-absisik asit, 0,06 mg/L'de gallik asit, kafeik asit ve sirinik asit, 0,1mg/L' de protokatekuik asit, *p*-OH benzoik asit, klorojenik asit ve vanilik asit, 0,2 mg/L'de kuersetin, 0,3 mg/L'de kateşin, epikateşin ve rutin, 0,5 mg/L'de benzoik asiti içeren kalibrasyon zeltisi hazırlandı ve 7 kez analiz edildi. Ardından her bir bileşik için dedeksiyon limiti (LOD) pik yüksekliklerinin standart sapmalarının 3 katı olarak ve yüzde bağıl standart sapması (%BSS) pik alanı ve alıkönma zamanlarından hesaplandı. Kantitatif (nicel) olarak analitlerin belirlenme limiti (LOQ) ise yine pik yüksekliklerinin standart sapmalarının 9 katı olarak hesaplandı.

2.4.5. HPLC-UV-MS Koşulları

Gallik asit, protokatekuik asit, *p*-OH benzoik asit, kateşin, vanilik asit, klorojenik asit, kafeik asit, sirinik asit, epikateşin, *p*-kumarik asit, ferulik asit, rutin, kuersetin, luteolin, apigenin, kamferol ve ramnetin olarak 17 fenolik madde standardı kullanıldı. Benzoik asit, *o*- kumarik asit, absisik asit ve t-sinamik asit standartları numunelerde UV dedektörü ile ve MS dedektörü varlığında yapılan ön analizlerde gzlenmedikleri için HPLC-UV-MS sisteminde standart karışım içine alınmadı. HPLC-UV-MS analizleri için iki farklı sistem kullanıldı.

1. Bir HPLC-UV sistemine (Waters) bağlı LCQ iyon tuzaklı ESI-MS enstrüman (Thermo Electron, Brussels, Belgium) kullanıldı. Tüm analizler için bir Luna C18 kolon (250 × 2.00mm i.d., 5µm) Phenomenex Torrance (USA) kolonu kulanıldı. LC ayırmaları için mobil faz A: suda %0,2 formik asit, mobil faz B: suda %70 asetonitril (ACN) ve temizlik için C mobil fazı: %100 asetonitril olarak üç faz kullanıldı. Uygulanan gradient; A ve B mobil fazları ile başladı ve 45-56 dk aralığında %100 ACN içeren C mobil fazı ile temizleme yapılarak tekrar başlangıç gradientine dönüldü ve 15 dakika kolonun takip eden analiz için koşullanması sağlandı; 0-2 dk, %85 A; 2-10 dk, %85-70 A; 10-20 dk, %70-60 A; 20-40 dk, %60-50 A; 40-45 dk, %50-40 A; 45-50dk, %0 A, %0 B, %100 C; 56. dk, %0

A, %0 B, %100 C; 56-60 dk, %85 A; 60- 75dk %85 A. Enjeksiyon hacmi 20 µL ve kolon sıcaklığı 25°C olarak ayarlandı. Çarpışma gazı olarak ultra yüksek saflıkta helyum (He) kullanıldı ve buharlaştırıcı gaz olarak yüksek saflıkta azot (N₂) kullanıldı.

Kütle spektrometrenin optimizasyonu için mobile faz A' da hazırlanan 10 mg/L rutin temsili standart olarak kullanıldı. Tüm LC-MS analizleri için Luna C18 kolon (250×2.00 mm i.d., 5 µm) kullanıldı. Optimize edilen negatif elektrosprey iyonlaştırma (ESI) takip eden koşullar kullanılarak elde edildi: İyon sprej voltaj, 4 kV; kılıf gaz (N₂), 70 arbitrary birimi; yardımcı gaz (N₂), 30 birim; kapiler sıcaklık, 180°C; kapiler voltaj, -32 V. Tam taramalı MS analizleri için, m/z 150-800 aralığında spektrum kaydedildi. Çarpışmadan kaynaklanan dissosiyasyon (CID) enerjisi %35' e ayarlandı.

2. HPLC-UV sistemine (Waters) bağlı bir Quattro ESI triple quadrupole mass spektrometer (Micromass) kullanıldı. Tüm analizler için bir Luna C18 kolon (250 × 2.00 mm i.d., 5 µm) Phenomenex, Torrance (USA) kolonu kullanıldı. LC ayırmaları için mobil faz A: suda %2 asetik asit, mobil faz B: suda %70 asetonitril (ACN) ve temizlik için C mobil fazı: %100 asetonitril olarak üç faz kullanıldı. Uygulanan gradient; A ve B mobil fazları ile başladı ve 35-40 dk aralığında %100 ACN içeren C mobil fazı ile temizleme yapılarak tekrar başlangıç gradientine dönüldü ve 15 dakika kolonun takip eden analiz için koşullanması sağlandı; 0-3 dk, %95 A; 3-8 dk, %95-92 A; 8-15 dk, %92-82 A; 15-20 dk, %82-80 A; 20-25 dk, %80- 62 A; 25-35 dk, %62-25 A; 35-40 dk, %0 A, %0 B, %100 C; 40-50 dk, %95 A; 50- 65 dk %95 A. Enjeksiyon hacmi 20 µL ve kolon sıcaklığı 25°C olarak ayarlandı.

Kütle spektrometrenin optimizasyonu için %2 asetik asit içeren %50 asetonitril/su içerisinde herbir standardın 5 mg/L'lik çözeltileri kullanıldı. Optimize edilen negatif elektrosprey iyonlaştırma (ESI) takip eden koşullar kullanılarak elde edildi: Kapiler voltaj, 2,8 kV; kon voltaj, 25V; desolvasyon gaz (N₂) akışı, 400L/sa; kon gaz akışı 50L/sa; desolvasyon sıcaklığı, 350°C; kapiler sıcaklığı, 110°C; çarpışma enerjisi, 1. Tam taramalı MS analizleri için, m/z 100-800 aralığında spektrum kaydedildi.

2.5. Bitki Ekstraktlarındaki Kardiyak Glikozitlerinin HPLC-DAD İle Analizleri

2.5.1. Materyaller

HPLC-DAD deneylerinde ve numune hazırlamada kullanılan HPLC saflıkta asetonitril ve metanol Sigma-Aldrich' den satın alındı. HPLC şırınga filtreleri (RC-membrane, 0.45 µm) Filtre Sartorius Minisart RC 25, Sartorius (Almanya)' dan satın alındı.

2.5.2. Standartlar ve Kalibrasyon

Kardiyak glikozit standartları olarak lanatosit C, digoksin ve digitoksin kullanılarak HPLC-DAD ile yöntem optimize edilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda (5, 10, 20, 30, 40 ve 50 mg/L) standart karışımları hazırlanarak çeşitli zaman aralıklarında enjeksiyonlar yapılarak kalibrasyon grafikleri elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar kardiyak glikozitlerinin alıkonma süreleri ve pik alanları olarak verildi.

2.5.3. HPLC-DAD Koşulları

HPLC analizleri için çift piston pompa, degasser, UV-DAD ve kolon fırın modüllerini içeren manuel enjeksiyonlu Agilent 1100 model HPLC sistemi kullanılmıştır. Sistem aynı zamanda HP (Hewlett Packard) marka masa üstü bilgisayara bağlı olup veri aktarımı ve HPLC operasyonu buradan kumanda edildi. Verilerin sayısal değerlendirilmesi Agilent ChemStation LC/MS adlı software ile yapıldı. Çalışmalar için uygun ZORBAX Eclipse XDB-C18 marka ters faz (150 mm × 4.6 mm i.d., 5 µm partikül) kolon kullanıldı. Örnekler 220nm UV dalga boyunda, 40°C'de, akış hızı 1,2 mL/dk' da HPLC grade asetonitril (CH₃CN) ve ultra saf su içeren hareketli faz 0-20 dk %80 su, 20-30 dk %70 su ve 30-40 dk %60 su ayarlı gradient elüsyon yapılarak yürütüldü.

2.5.4. HPLC-DAD İçin Dedeksiyon Limitinin (LOD) Belirlenmesi

Dedeksiyon limitleri (LOD) yani örneğin ancak tespit edilebildiği fakat miktarının kesin olarak belirlenemeyeceği en az limit değeri standartlar için ayrı ayrı tespit edildi.

Standartların 5 mg/L derişimlerinde buldukları karışım 10 kez ardışık analiz edilerek her bir bileşik için dedeksiyon limiti (LOD) pik yüksekliklerinin standart sapmalarının 3 katı olarak hesaplandı (Skoog vd., 2007).

2.6. Bitki Ekstraktlarında Spektrofotometrik Toplam Fenolik Madde Tayini

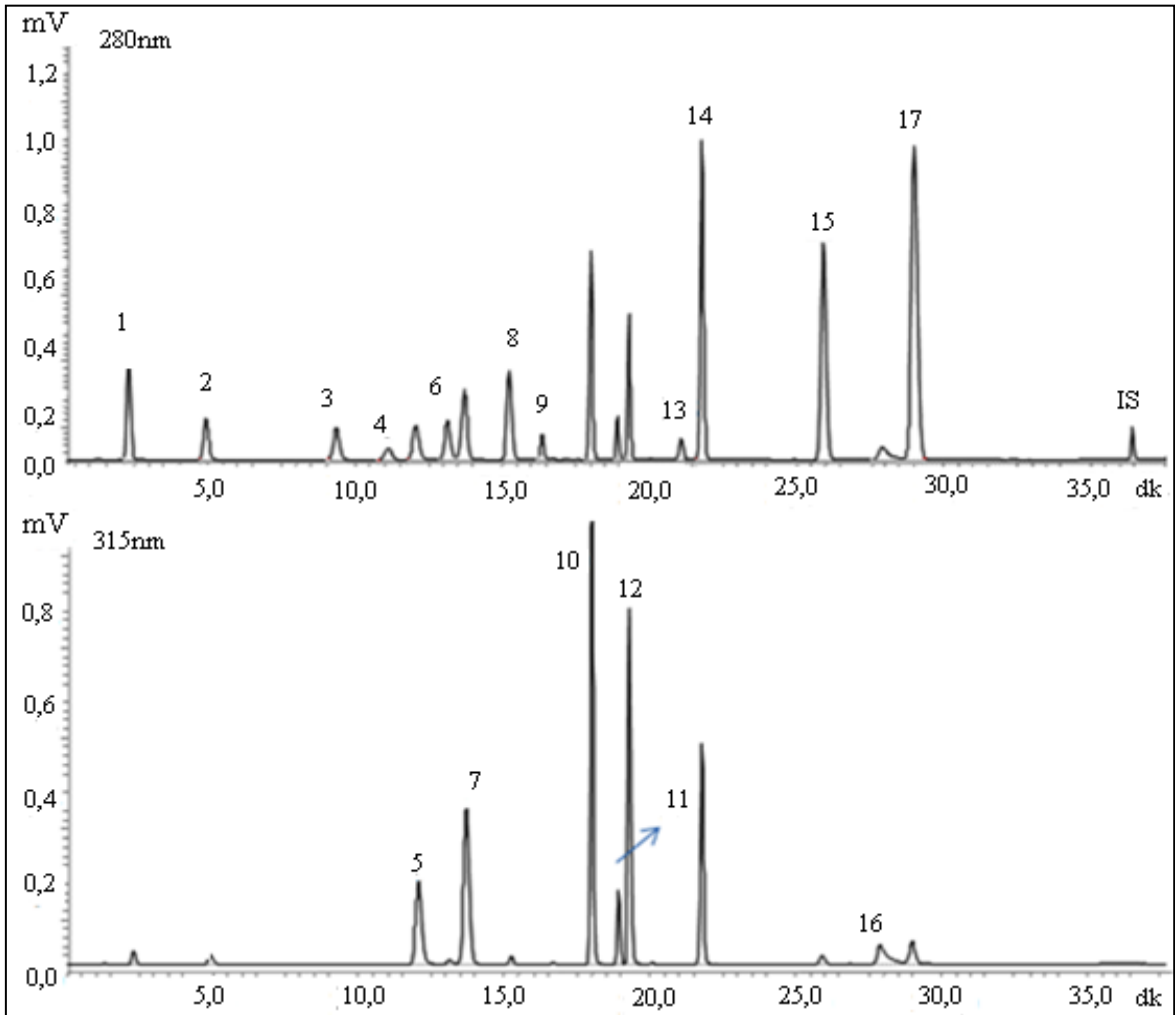
Folin-Ciocalteu reaktifi ile toplam fenolik madde tayini gallik asit ve kateşin standartları kullanılarak elde edilen kalibrasyon grafiklerine göre değerlendirildi (Slinkard ve Singleton, 1977). Metoda göre 20 µL çeşitli konsantrasyonlarda (1; 0,5; 0,025; 0,0125 ve 0,00625 mg/mL) gallik asit veya kateşin standardı, 400 µL 0,5 N Folin-Ciocalteu reaktifi ve 680 µL destile su karıştırılarak vortekslenildi ve 3 dakika bekletildi. Karışıma 400 µL Na₂CO₃ (10%) eklenerek vortekslenip 2 saat oda koşullarında bekletildi. Bekletmenin ardından 760 nm' de absorbansları ölçüldü ve kalibrasyon grafikleri çizildi. Aynı işlemler 1mg/mL 20 µL metanolik numuneler kullanılarak yapıldı ve absorbans değerleri ile gallik asit ve kateşin kalibrasyon grafikleri kullanılarak toplam fenolik madde içerikleri gallik asit yada kateşin eşdeğeri olarak mg gallik asit/g numune veya mg kateşin/g numune cinsinden hesaplandı.

Toplam fenolik madde tayini hidrolizli ve pH=2'de elde edilen ekstraktların yanısıra doğrudan metanol ekstraktlarına da uygulanarak sonuçlar karşılaştırılmıştır. Tüm numunelerin analizleri 3 tekrarlı olarak yapıldı.

3. BULGULAR

3.1. Fenolik Bileşiklerin Analizi İçin HPLC-UV Metot Optimizasyonu

Optimize edilen HPLC-UV metodu kullanılarak 17 standart fenolik bileşimin analizine bir örnek Şekil 10’ da görülmektedir.



Şekil 11. HPLC-UV tarafından 280nm ve 315nm’ de 25 mg/L fenolik standartların piklerinin analizi için elde edilen kromatogramlar. Koşullar: Kolon: C18 kolon (150 mm × 4.6 mm i.d., 5 µm), hareketli faz: (A) suda %2 asetik asit, (B) 80:20 asetonitril/su. Enjeksiyon hacmi: 50 µL, sıcaklık: 30°C.

HPLC-UV ile 17 fenolik standardın analiz edildiği metot hassasiyet ve güçlülük açısından değerlendirildi. Alıkonma zamanı ve pik alanlarının tekrarlanabilirliği LOD için hazırlanan standart karışımının 7 kez enjeksiyonu ile belirlendi. Ayrıca analitin mevcut olup olmadığını belirlemek için gerekli en küçük miktar LOQ ve güvenilir kantitatif analiz yapabilmek için gerekli en küçük miktar olan dedeksiyon limit (LOD) değerleri Tablo 5’de mevcuttur.

Tablo 5. Optimize edilen HPLC-UV metodunun parametreleri

No	RT	Standartlar	R ²	%BSS(RT)	%BSS(Alan)	LOD ^{*,**}	LOQ [*]
1	2,97	Gallik Asit	0,999	0,320	2,377	0,042	0,126
2	5,77	Protokatekuik Asit	0,999	0,183	3,842	0,048	0,144
3	10,35	<i>p</i> -OH Benzoik Asit	0,999	0,119	4,966	0,038	0,114
4	12,06	Kateşin	0,999	0,115	2,124	0,028	0,085
5	12,97	Klorojenik Asit	0,999	0,107	8,732	0,039	0,119
6	14,13	Vanilik Asit	0,999	0,094	2,692	0,029	0,088
7	14,62	Kafeik Asit	0,999	0,094	1,928	0,037	0,112
8	16,08	Siringik Asit	0,999	0,085	2,474	0,046	0,138
9	17,02	Epikateşin	0,999	0,073	5,222	0,036	0,108
10	18,61	<i>p</i> -Kumarik Asit	0,999	0,054	0,517	0,104	0,312
11	19,42	Rutin	0,999	0,077	3,709	0,032	0,097
12	19,83	Ferulik Asit	0,999	0,745	0,897	0,054	0,162
13	21,63	Benzoik Asit	0,999	0,075	1,854	0,033	0,101
14	22,29	<i>o</i> -Kumarik Asit	0,999	0,076	1,687	0,036	0,109
15	26,45	cis,trans-Absisik Asit	0,999	0,089	2,138	0,024	0,072
16	28,41	Kuersetin	0,999	0,131	3,956	0,027	0,083
17	29,53	trans-Sinnamik Asit	0,999	0,114	4,554	0,036	0,109
18	36,91	Propilparaben (IS)		0,026	3,193	0,293	0,880

*: mg/L cinsinden

** : LOD ve LOQ değerleri, anlamlı rakam sayısı virgülden sonra 3 haneli olarak verilmiştir

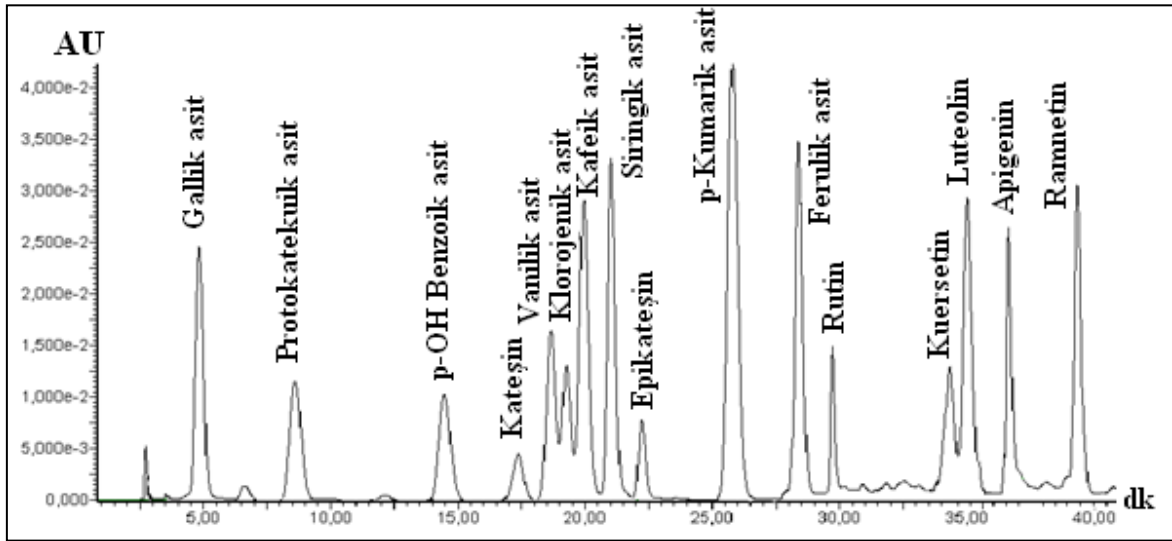
Tablo 5’ de analit konsantrasyona karşı elde edilen absorbans değerlerinin doğrusallığı R² olarak değerlendirildi. Yüzde bağıl standart sapmalar (%BSS) alıkonma

zamanları ve pik yükseklikleri için hesaplandı. Dedeksiyon limitleri LOD ve LOQ değerleri mg/L cinsinden verildi.

3.2. HPLC-UV-MS Metot Optimizasyonu

HPLC-UV-MS analizlerinde gallik asit, protokatekuik asit, *p*-OH benzoik asit, kateşin, vanilik asit, klorojenik asit, kafeik asit, siringik asit, epikateşin, *p*-kumarik asit, ferulik asit, rutin, kuersetin, luteolin, apigenin, kamferol ve ramnetin olarak 17 fenolik madde standardı kullanıldı.

Analizler kalitatif olarak gerçekleştirildi ancak kalitatif analiz için ayırımın iyi olması açısından HPLC-UV’deki gradient kullanılan cihaz ve kolon koşullarına göre yeniden optimize edildi ve Şekil 12’deki kromatogram elde edildi.



Şekil 12. HPLC-UV-MS tarafından 280nm’de 5 mg/L fenolik standartların piklerinin analizi için elde edilen LC-UV kromatogramları. Koşullar: Kolon: C18 kolon (250 mm × 2.0 mm i.d., 5 µm), hareketli faz: (A) suda %2 asetik asit, (B) 70:20 asetonitril/su. Enjeksiyon hacmi: 20 µL, sıcaklık: 25 °C.

HPLC-UV ve HPLC-UV-MS ile analiz edilen tüm *Digitalis* türlerine ait ekstraktlarda gözlenen fenolik bileşiklerin analizleri mevcut standartların alıkonma zamanları ve kütle spektrumları karşılaştırılarak yapıldığı gibi standardı olmayan bileşiklerin karakterizasyonu alıkonma zamanları ve kütle spektrumlarının literatürdeki verilerle karşılaştırması ile gerçekleştirildi.

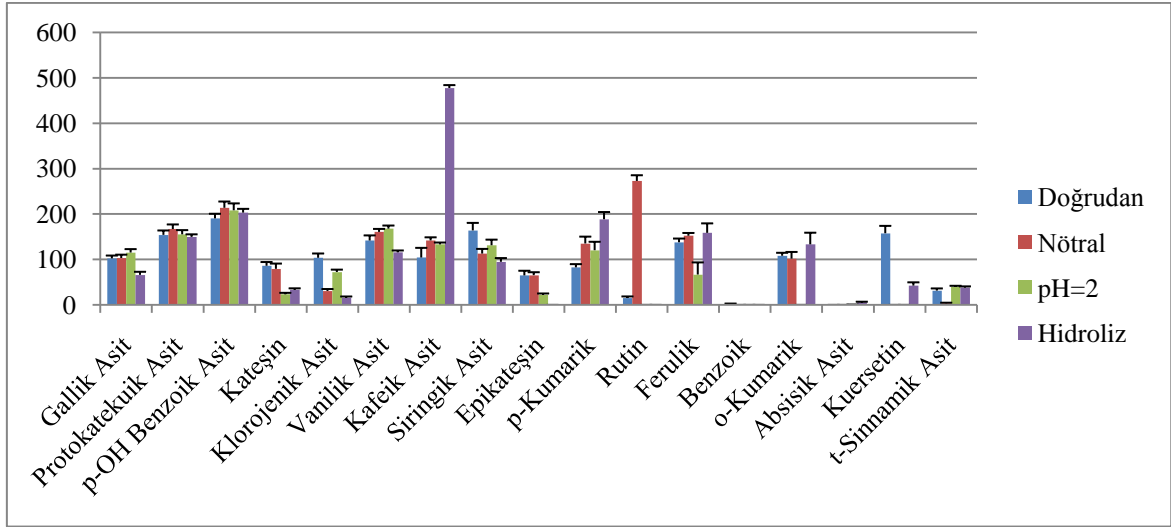
3.3. Bitki Örneklerinden Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonunun Optimizasyonu

Fenolik standartlar kullanılarak HPLC-UV metodunun optimizasyonunun ardından Bölüm 2.2.' de detayları verilmiş olan ekstraksiyon koşullarında *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii*' nin yaprak kısmında belirlenen ekstraksiyon yönteminin optimizasyonu yapıldı. İki dalga boylu HPLC-UV analiz sonuçları Tablo 6' da ve daha net incelenmesi için Şekil 13' de grafik halinde verilmiştir.

Tablo 6. Ekstraksiyon yönteminin pH optimizasyon sonuçları

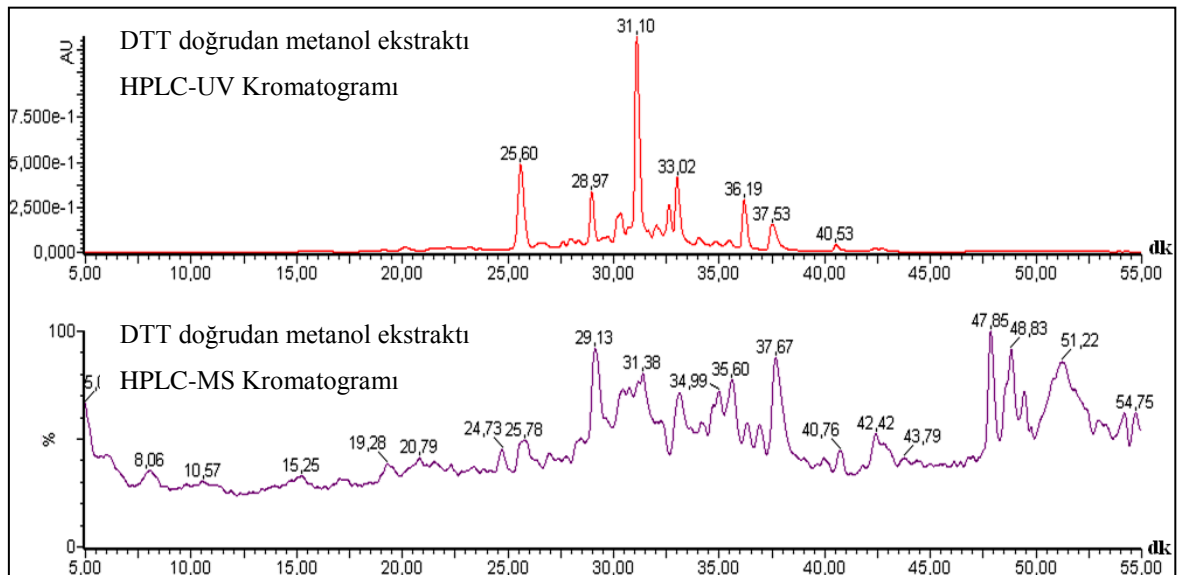
Standartlar	%Geri Kazanım			
	Doğrudan	Nötral	pH=2	Hidroliz
Gallik Asit	102,45 (±6,17)	103,21 (±7,34)	115,21 (±7,55)	66,09 (±6,76)
Protokatekuik Asit	154,11 (±9,65)	166,90 (±10,12)	155,27 (±9,25)	149,63 (±5,65)
p-OH Benzoik Asit	190,33 (±10,18)	213,69 (±13,78)	208,22 (±15,12)	203,11 (±8,24)
Kateşin	86,10 (±8,24)	79,37 (±11,56)	23,23 (±3,31)	33,20 (±3,22)
Klorojenik Asit	103,73 (±9,37)	30,68 (±4,23)	72,45 (±5,15)	16,03 (±2,43)
Vanilik Asit	141,70 (±11,20)	160,69 (±6,51)	167,76 (±6,85)	115,63 (±4,12)
Kafeik Asit	104,28 (±21,22)	141,88 (±6,80)	133,22 (±4,05)	477,23 (±6,43)
Siringik Asit	163,86 (±16,57)	112,93 (±10,26)	131,27 (±12,32)	94,88 (±8,15)
Epikateşin	64,9 (±10,20)	65,36 (±6,52)	21,85 (±3,25)	<LOD
p-Kumarik Asit	82,58 (±7,09)	135,12 (±15,10)	120,36(±18,50)	188,50(±15,85)
Rutin	15,03 (±3,58)	272,76 (±12,51)	<LOD	<LOD
Ferulik Asit	137,8 (±8,2)	152,23 (±6,03)	66,78(±26,70)	158,53(±20,87)
Benzoik Asit	2,13 (±0,82)	<LOD	<LOD	<LOD
o- Kumarik Asit	108,16 (±6,49)	101,87 (±14,64)	<LOD	133,32(±25,57)
Absisik Asit	<LOD	<LOD	0,62 (±0,15)	5,76 (±1,22)
Kuersetin	157,62 (±16,25)	<LOD	<LOD	42,49 (±7,15)
t-Sinamik Asit	31,47 (±4,72)	3,93 (±0,86)	39,88 (±2,17)	38,40 (±2,34)
Toplam	2936,42	1835,45	1216,89	1750,78

<LOD: Dedeksiyon limitinden küçük

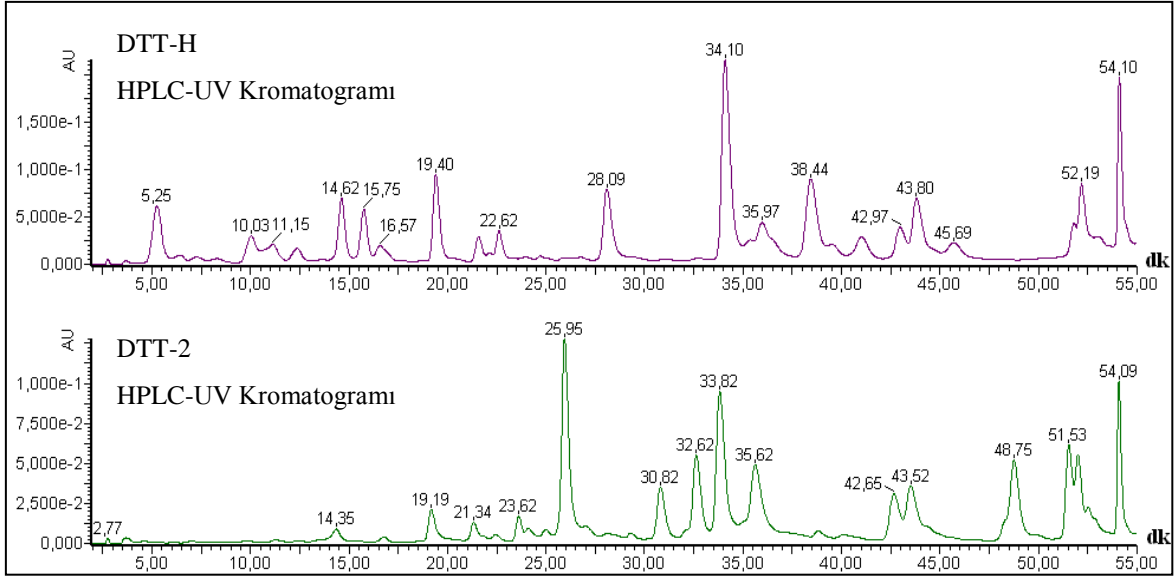


Şekil 13. Ortamın pH' sına göre fenolik standartların % geri kazanım değerlerinin grafiği

Ekstraksiyon koşullarına göre fenolik bileşimin değişimini daha net görebilmek için örnek olarak *Digitalis trojana*'nın Temmuz ayı örneğine ait doğrudan metanolik ekstraktının HPLC-UV (280nm) ve HPLC-MS kromatogramları Şekil 14'de ve asit hidrolizli ve hidrolizsiz (pH=2) örneğine ait HPLC-UV kromatogramları Şekil 15' de verilmiştir.

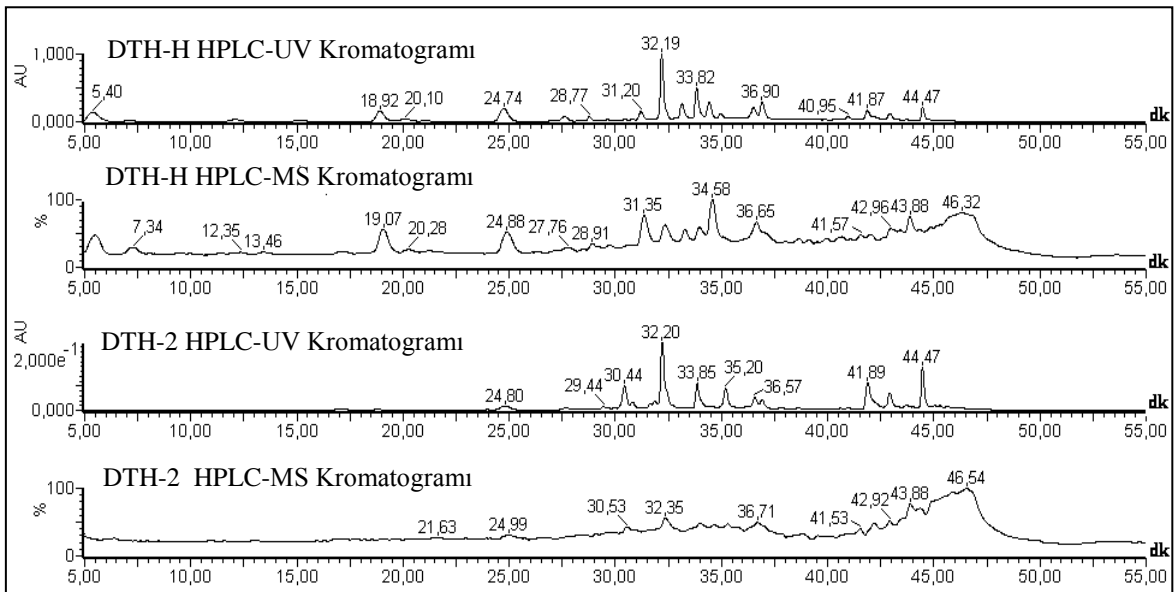


Şekil 14. *Digitalis trojana*'nın Temmuz ayı örneğine ait doğrudan metanol ekstraktının HPLC-UV (280nm) ve HPLC-MS kromatogramları

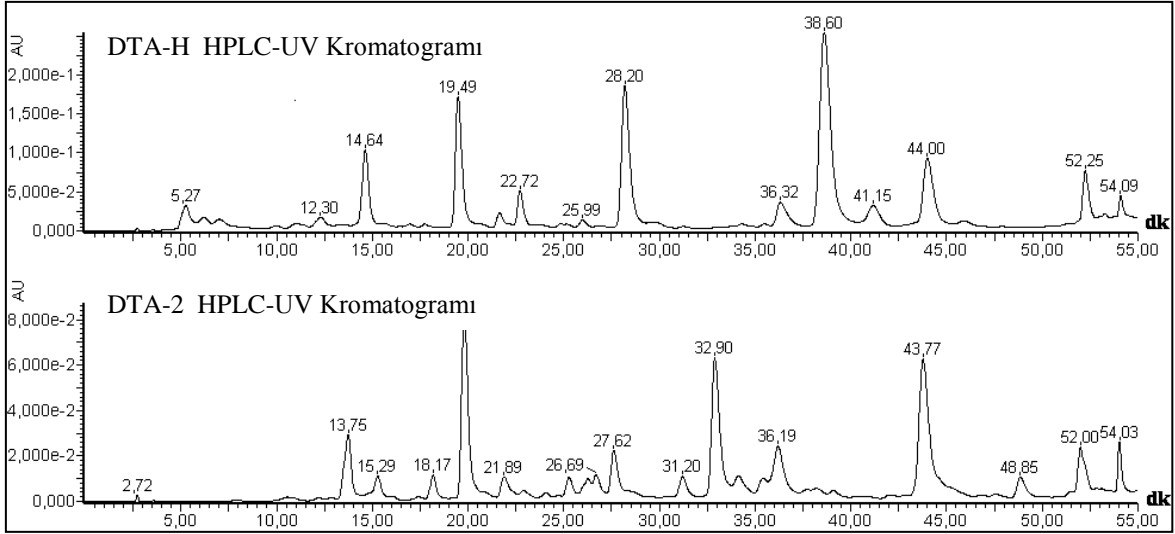


Şekil 15. *Digitalis trojana*'nın Temmuz ayı örneğine ait hidrolizli ve hidrolizsiz ekstraktlarının HPLC-UV (280nm) kromatogramları

Digitalis trojana'nın Haziran ayı örneğine ait asit hidrolizli ve hidrolizsiz elde edilen ekstraktlarının HPLC-UV ve HPLC-MS kromatogramları Şekil 16'da ve Ağustos ayı örneklerine ait asit hidrolizli ve hidrolizsiz elde edilen ekstraktlarının HPLC-UV kromatogramları Şekil 17' de verilmiştir.



Şekil 16. *Digitalis trojana*'nın Haziran ayı örneğine ait hidrolizli ve hidrolizsiz ekstraktlarının HPLC-UV (280nm) ve HPLC-MS kromatogramları.



Şekil 17. *Digitalis trojana*'nın Ağustos ayı örneğine ait hidrolizli ve hidrolizsiz ekstraktlarının HPLC-UV (280nm) kromatogramları

Tüm *Digitalis* türlerinde aynı kromatografik analizlerin iki tekrarlı olarak elde edilen verileri ilgili bölümlerde tartışılmıştır.

3.4. Bitki Ekstraktlarında Fenolik Bileşiklerinin HPLC-UV Analizleri

Optimize edilen HPLC-UV metoduna göre *Digitalis*'e ait *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii*, *Digitalis ferruginea* ssp. *ferruginea* olarak iki endemik olmayan ve *Digitalis trojana*, *Digitalis davisiana*, *Digitalis cariensis* ve *Digitalis lamarckii* olmak üzere 4 endemik türün yapraklarında mevcut olan fenolik bileşiklerin HPLC-UV yöntemine göre analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.4.1. *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii* Bitkisinin HPLC-UV Analizleri

Digitalis ferruginea ssp. *schischkinii* bitkisinin Rize' nin çeşitli bölgelerinden, Trabzon Sis Dağı ve Bolu Abant Gölü'nden çeşitli aylarda toplanan örneklerinin hidrolizli ve/veya hidrolizsiz ekstraktlarının fenolik bileşimi HPLC-UV yöntemine göre analiz edilmiştir. *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii*'nin, Verçenik ve Kaptanpaşa örnekleri haricinde Salarha, Sis Dağı, Bolu, Soğukçeşme, Abelat ve Yeşiltepe örneklerinin yalnızca pH=2' de ekstrakte edilen numuneleri mevcuttur.

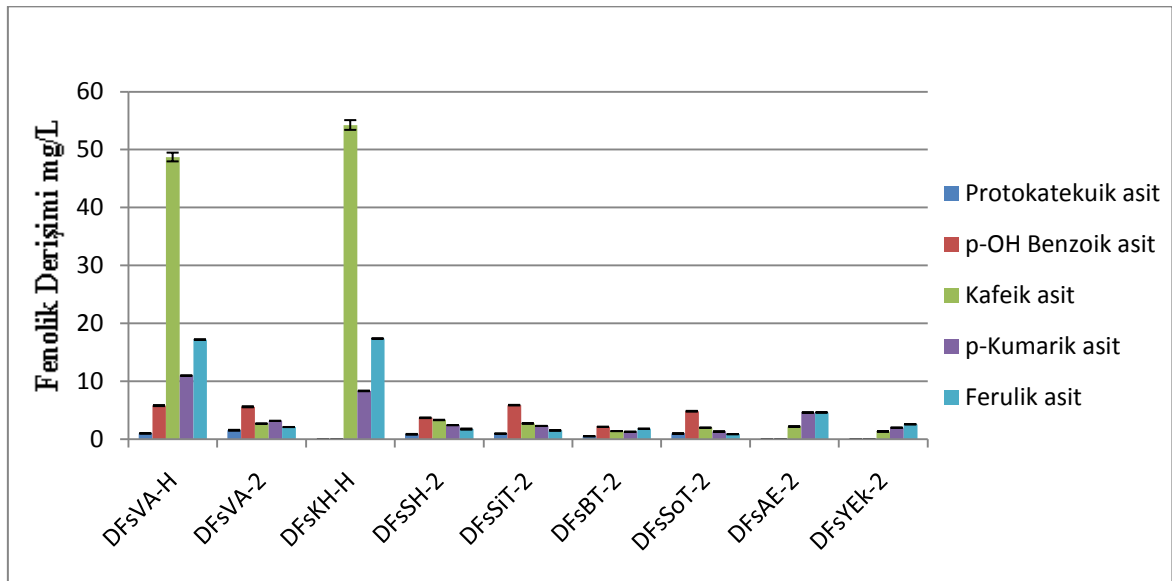
Tablo 7' de bu türe ait tüm ekstraktların HPLC-UV analiz sonuçları verilmiştir.

Tablo 7. *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii* bitkisinin çeşitli yer ve zamanlardaki örneklerinin HPLC-UV analiz sonuçları

Ekstraktlar	Standartlar					Yükseklik m
	Protokatekuik asit	p-OH Benzoik asit	Kafeik asit	p-Kumarik asit	Ferulik asit	
	mg/L					
DFsVA-H	0,99 (±0,07)	5,80 (±0,09)	48,72 (±0,76)	10,97 (±0,06)	17,19 (±0,03)	1800
DFsVA-2	1,53 (±0,08)	5,59 (±0,09)	2,68 (±0,03)	3,16 (±0,01)	2,09 (±0,01)	1800
DFsKH-H	<LOD	<LOD	54,25 (±0,84)	8,33 (±0,06)	17,37 (±0,04)	650
DFsSH-2	0,83 (±0,07)	3,69 (±0,06)	3,31 (±0,04)	2,42 (±0,01)	1,74 (±0,09)	300
DFsSiT-2	0,95 (±0,05)	5,87 (±0,05)	2,71 (±0,03)	2,28 (±0,01)	1,50 (±0,01)	1550
DFsBT-2	0,51 (±0,03)	2,13 (±0,02)	1,39 (±0,01)	1,28 (±0,01)	1,79 (±0,01)	1350
DFsSoT-2	0,972 (±0,06)	4,82 (±0,07)	1,98 (±0,02)	1,31 (±0,01)	0,86 (±0,01)	550
DFsAE-2	<LOD	<LOD	2,18 (±0,03)	4,59 (±0,05)	4,61 (±0,03)	2000
DFsYEK-2	<LOD	<LOD	1,33 (±0,02)	1,98 (±0,01)	2,57 (±0,01)	650

<LOD: Dedeksiyon limitinden küçük

Farklı bölge ve zamanlarda toplanan *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii* türünün örneklerdeki fenolik içeriklerin dağılımı Şekil 18' de grafik halinde verilmiştir.



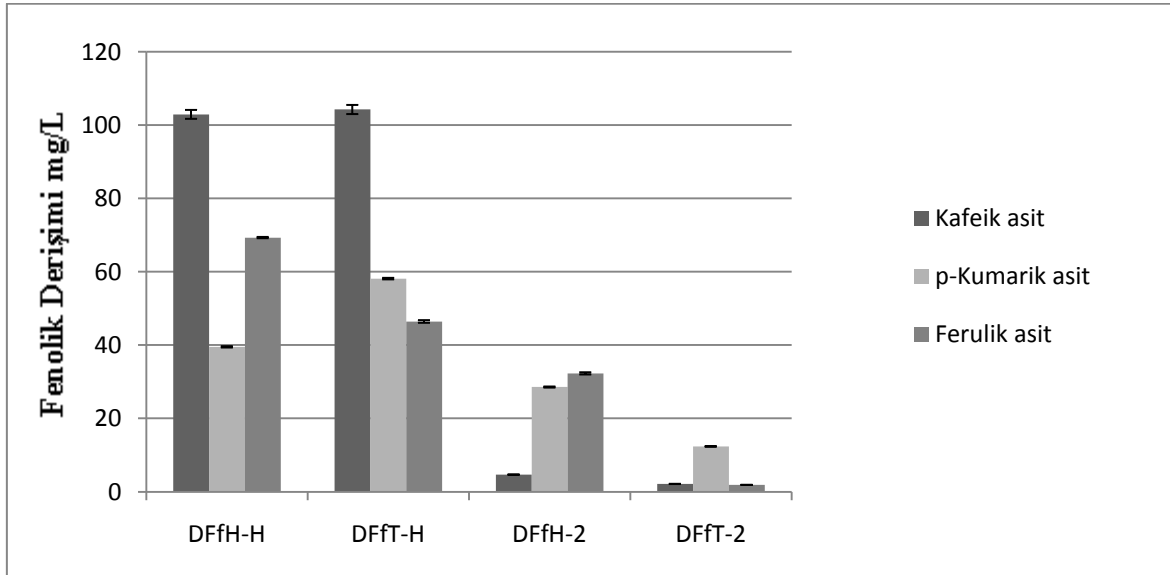
Şekil 18. *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii* bitkisinin çeşitli yer ve zamanlardaki örneklerinin HPLC-UV ile belirlenen fenolik içeriklerinin grafiği

3.4.2. *Digitalis ferruginea* ssp. *ferruginea* Bitkisinin HPLC-UV Analizleri

Bolu Abant Gölü'nden Haziran ve Temmuz aylarında toplanan *Digitalis ferruginea* ssp. *ferruginea* bitki örneklerinin hidrolizli ve hidrolizsiz ekstraktlarının HPLC-UV analiz sonuçları Tablo 8'de ve HPLC-UV ile belirlenen fenolik içeriklerinin dağılımı Şekil 19'da grafik halinde verilmiştir.

Tablo 8. *Digitalis ferruginea* ssp. *ferruginea* bitkisinin Haziran ve Temmuz ayı örneklerinin HPLC-UV analiz sonuçları

Ekstraktlar	Standartlar		
	Kafeik asit	p-Kumarik asit mg/L	Ferulik asit
DFfH-H	102,94 ($\pm 1,21$)	39,53 ($\pm 0,18$)	69,34 ($\pm 0,17$)
DFfT-H	104,28 ($\pm 1,24$)	58,14 ($\pm 0,21$)	46,45 ($\pm 0,36$)
DFfH-2	4,67 ($\pm 0,07$)	28,56 ($\pm 0,14$)	32,29 ($\pm 0,30$)
DFfT-2	2,13 ($\pm 0,03$)	12,37 ($\pm 0,06$)	1,87 ($\pm 0,01$)



Şekil 19. *Digitalis ferruginea* ssp. *ferruginea* bitkisinin Haziran ve Temmuz ayı örneklerinin HPLC-UV ile belirlenen fenolik içeriklerinin grafiği

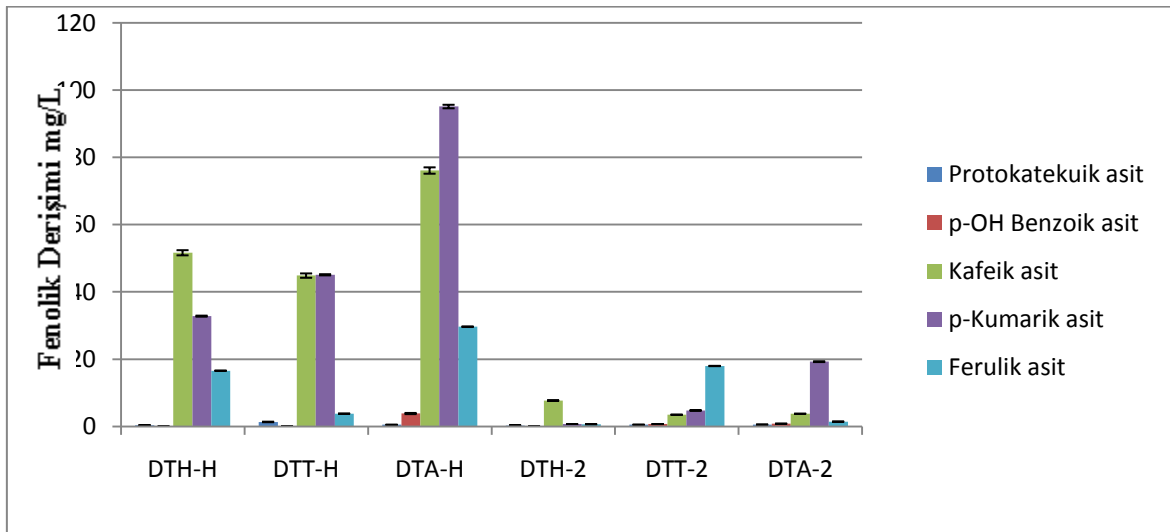
3.4.3. *Digitalis trojana* Bitkisinin HPLC-UV Analizleri

Kaz Dağı Milli Park' dan toplanan *Digitalis trojana* bitki örneklerinin Haziran, Temmuz ve Ağustos aylarına ait hidrolizli ve hidrolizsiz ekstraktlarının HPLC-UV analiz sonuçları Tablo 9' da ve HPLC-UV ile belirlenen fenolik içeriklerinin dağılımı Şekil 20' de grafik halinde gösterilmiştir.

Tablo 9. *Digitalis trojana* bitkisinin Haziran, Temmuz ve Ağustos ayı hidrolizli ve hidrolizsiz ekstraktlarının HPLC-UV analiz sonuçları

Ekstraktlar	Standartlar				
	Protokatekuik asit	p-OH Benzoik asit	Kafeik asit	p-Kumarik asit	Ferulik asit
	mg/L				
DTH-H	0,36 (±0,01)	<LOD	51,65 (±0,76)	32,79 (±0,15)	16,57 (±0,04)
DTT-H	1,35(±0,08)	<LOD	44,85 (±0,65)	45,09 (±0,17)	3,79 (±0,01)
DTA-H	0,49 (±0,03)	3,85 (±0,17)	76,09 (±0,95)	95,12 (±0,52)	29,66 (±0,09)
DTH-2	0,29 (±0,02)	<LOD	7,71 (±0,12)	0,73 (±0,01)	0,67 (±0,01)
DTT-2	0,52 (±0,04)	0,71 (±0,03)	3,49 (±0,05)	4,76 (±0,02)	17,98 (±0,05)
DTA-2	0,54 (±0,04)	0,82 (±0,03)	3,77 (±0,06)	19,26 (±0,12)	1,43 (±0,01)

<LOD: dedeksiyon limitinden düşük



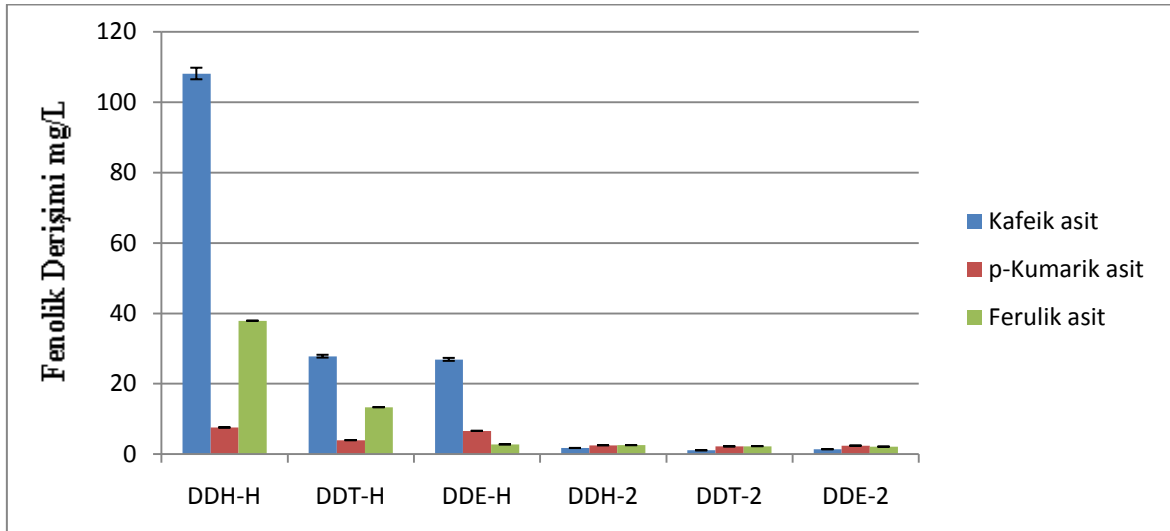
Şekil 20. *Digitalis trojana* bitkisinin Haziran, Temmuz ve Ağustos ayı hidrolizli ve hidrolizsiz ekstraktlarının HPLC-UV ile belirlenen fenolik içeriklerinin grafiği

3.4.4. *Digitalis davisiana* Bitkisinin HPLC-UV Analizleri

Antalya’da Alanya-Hadım arasında deniz seviyesinden 1100 metre yükseklikten toplanan *Digitalis davisiana* bitkisinin Haziran, Temmuz ve Eylül aylarına ait hidrolizli ve hidrolizsiz ekstraktlarının HPLC-UV analiz sonuçları Tablo 10’ da ve HPLC-UV ile belirlenen fenolik içeriklerinin dağılımı Şekil 21’ de grafik halinde gösterilmiştir.

Tablo 10. *Digitalis davisiana* bitkisinin Haziran, Temmuz ve Eylül ayı hidrolizli ve hidrolizsiz ekstraktlarının HPLC-UV analiz sonuçları

Ekstraktlar	Standartlar		
	Kafeik asit	p-Kumarik asit	Ferulik asit
	mg/L		
DDH-H	108,12 (\pm 1,64)	7,55 (\pm 0,05)	37,87 (\pm 0,07)
DDT-H	27,80 (\pm 0,40)	3,94 (\pm 0,01)	13,31 (\pm 0,03)
DDE-H	26,89 (\pm 0,42)	6,58 (\pm 0,03)	2,75 (\pm 0,01)
DDH-2	1,72 (\pm 0,03)	2,50 (\pm 0,01)	2,53 (\pm 0,01)
DDT-2	1,07 (\pm 0,02)	2,18 (\pm 0,01)	2,24 (\pm 0,01)
DDE-2	1,37 (\pm 0,02)	2,38 (\pm 0,02)	2,09 (\pm 0,01)



Şekil 21. *Digitalis davisiana* bitkisinin Haziran, Temmuz ve Eylül ayı hidrolizli ve hidrolizsiz ekstraktlarının HPLC-UV ile belirlenen fenolik içeriklerinin grafiği

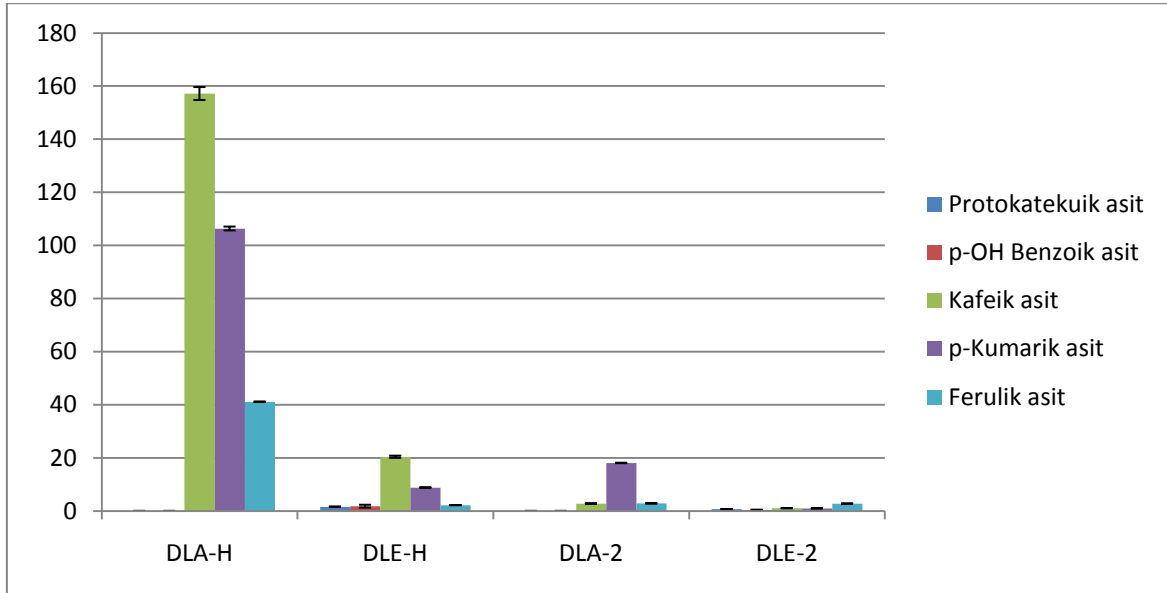
3.4.5. *Digitalis lamarckii* Bitkisinin HPLC-UV Analizleri

Ankara' da Gerede-Kızılcahamam arasından Ağustos ve Eylül aylarında toplanan *Digitalis lamarckii* bitkisinin hidrolizli ve hidrolizsiz ekstraktlarına ait HPLC-UV sonuçları Tablo 11' de ve HPLC-UV ile belirlenen fenolik içeriklerinin dağılımı Şekil 22' de grafik halinde verilmiştir.

Tablo 11. *Digitalis lamarckii* bitkisinin Ağustos ve Eylül ayı hidrolizli ve hidrolizsiz ekstraktlarına ait HPLC-UV sonuçları

Ekstraktlar	Standartlar				
	Protokatekuik asit	p-OH benzoik asit	Kafeik asit	p-Kumarik asit	Ferulik asit
	mg/L				
DLA-H	<LOD	<LOD	157,15 ($\pm 2,43$)	106,33 ($\pm 0,72$)	41,10 ($\pm 0,11$)
DLE-H	1,58 ($\pm 0,09$)	1,77 ($\pm 0,54$)	20,39 ($\pm 0,42$)	8,79 ($\pm 0,06$)	2,18 ($\pm 0,01$)
DLA-2	<LOD	<LOD	2,77 ($\pm 0,04$)	18,06 ($\pm 0,08$)	2,84 ($\pm 0,01$)
DLE-2	0,68 ($\pm 0,05$)	0,41 ($\pm 0,03$)	1,03 ($\pm 0,01$)	0,98 ($\pm 0,01$)	2,74 ($\pm 0,01$)

<LOD: dedeksiyon limitinden düşük



Şekil 22. *Digitalis lamarckii* bitkisinin Ağustos ve Eylül ayı hidrolizli ve hidrolizsiz ekstraktlarına ait HPLC-UV ile belirlenen fenolik içeriklerinin grafiği

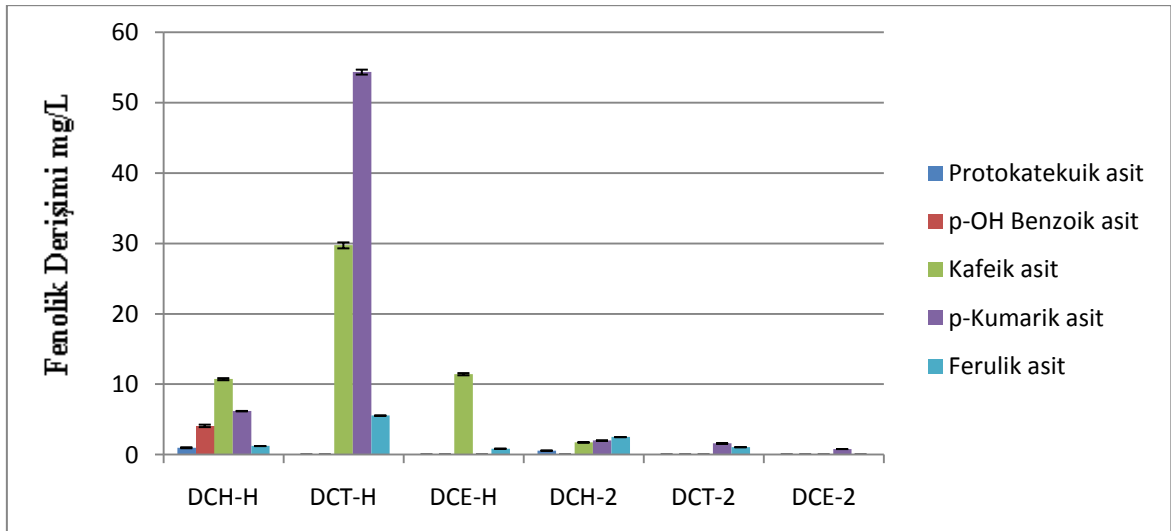
3.4.6. *Digitalis cariensis* Bitkisinin HPLC-UV Analizleri

Antalya ili Alanya-Taskent arasında 1041m yükseklikten Haziran, Temmuz ve Eylül aylarında toplanan *Digitalis cariensis* bitkisinin hidrolizli ve hidrolizsiz ekstraktlarına ait HPLC-UV analiz sonuçları Tablo 12' de ve HPLC-UV ile belirlenen fenolik içeriklerinin dağılımı Şekil 23' de grafik halinde verilmiştir.

Tablo 12. *Digitalis cariensis* bitkisinin Haziran, Temmuz ve Eylül ayı hidrolizli ve hidrolizsiz ekstraktlarına ait HPLC-UV analiz sonuçları

Ekstraktlar	Standartlar				
	Protokatekuik asit	p-OH Benzoik asit	Kafeik asit	p-Kumarik asit	Ferulik asit
	mg/L				
DCH-H	0,99 ($\pm 0,07$)	4,09 ($\pm 0,17$)	10,73 ($\pm 0,15$)	6,19 ($\pm 0,03$)	1,23 ($\pm 0,01$)
DCT-H	<LOD	<LOD	29,74 ($\pm 0,42$)	54,35 ($\pm 0,35$)	5,55 ($\pm 0,01$)
DCE-H	<LOD	<LOD	11,44 ($\pm 0,16$)	<LOD	0,85 ($\pm 0,01$)
DCH-2	0,57 ($\pm 0,04$)	<LOD	1,75 ($\pm 0,03$)	2,01 ($\pm 0,01$)	2,50 ($\pm 0,01$)
DCT-2	<LOD	<LOD	<LOD	1,59 ($\pm 0,01$)	1,07 ($\pm 0,01$)
DCE-2	<LOD	<LOD	<LOD	0,81 ($\pm 0,01$)	<LOD

<LOD: Dedeksiyon limitinden düşük



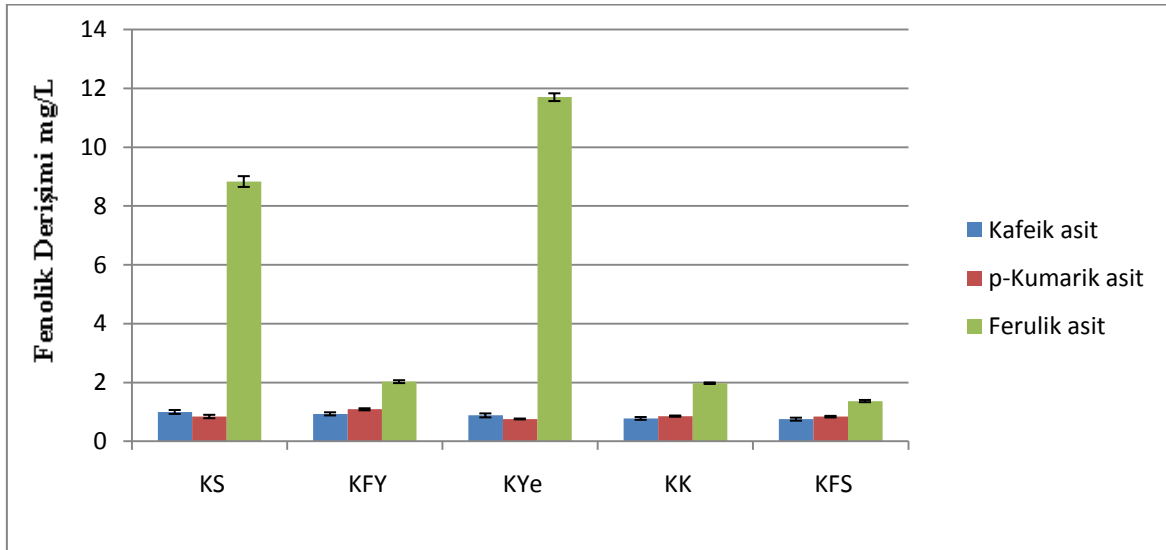
Şekil 23. *Digitalis cariensis* bitkisinin Haziran, Temmuz ve Eylül ayı hidrolizli ve hidrolizsiz ekstraktlarına ait HPLC-UV ile belirlenen fenolik içeriklerinin grafiği

3.4.7. *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii* Bitkisinin Doku kültürü Örneklerinin HPLC-UV Analizleri

Digitalis ferruginea ssp. *schischkinii* bitkisinden üretilen doku kültürlerinin ekstraksiyonu yalnızca pH=2' de gerçekleştirilmiş olup doğadan toplanan örneklerin ekstraktları ile aynı koşullarda gerçekleştirilen HPLC-UV analizleri sonucunda belirlenen fenolik bileşik miktarları Tablo 13 ve Şekil 24' de verilmiştir.

Tablo 13. *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii* bitkisinden üretilen doku kültürlerinin hidrolizsiz ekstraktlarının HPLC-UV analiz sonuçları

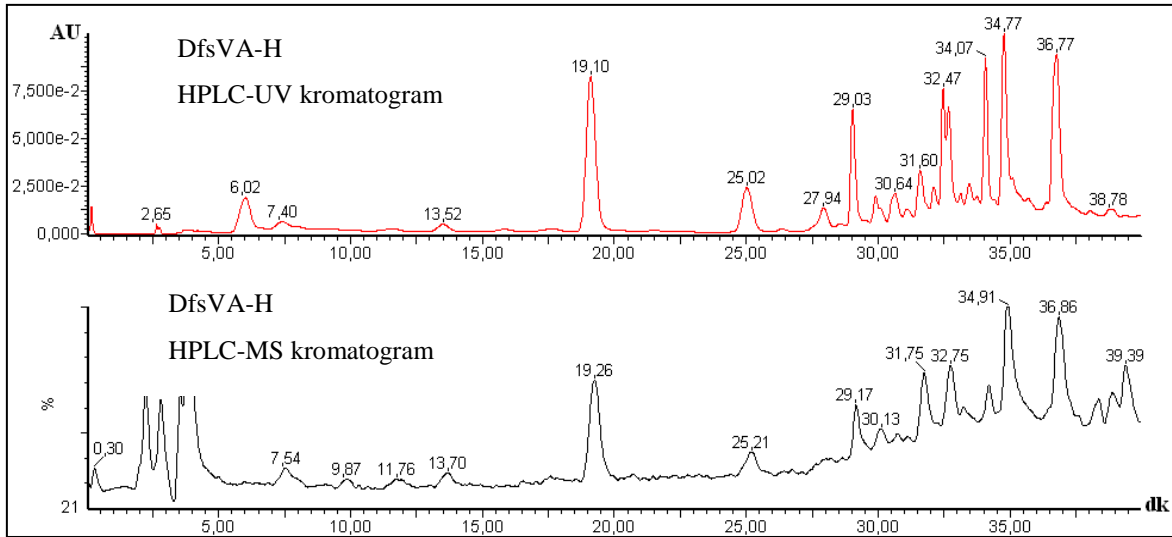
Ekstraktlar	Standartlar (mg/L)		
	Kafeik asit	p-Kumarik asit	Ferulik asit
KS	0,99 ($\pm 0,07$)	0,84 ($\pm 0,06$)	8,83 ($\pm 0,18$)
KFY	0,93 ($\pm 0,05$)	1,09 ($\pm 0,04$)	2,03 ($\pm 0,05$)
KYe	0,88 ($\pm 0,07$)	0,76 ($\pm 0,02$)	11,70 ($\pm 0,13$)
KK	0,78 ($\pm 0,05$)	0,86 ($\pm 0,02$)	1,97 ($\pm 0,03$)
KFS	0,75 ($\pm 0,05$)	0,84 ($\pm 0,03$)	1,37 ($\pm 0,04$)



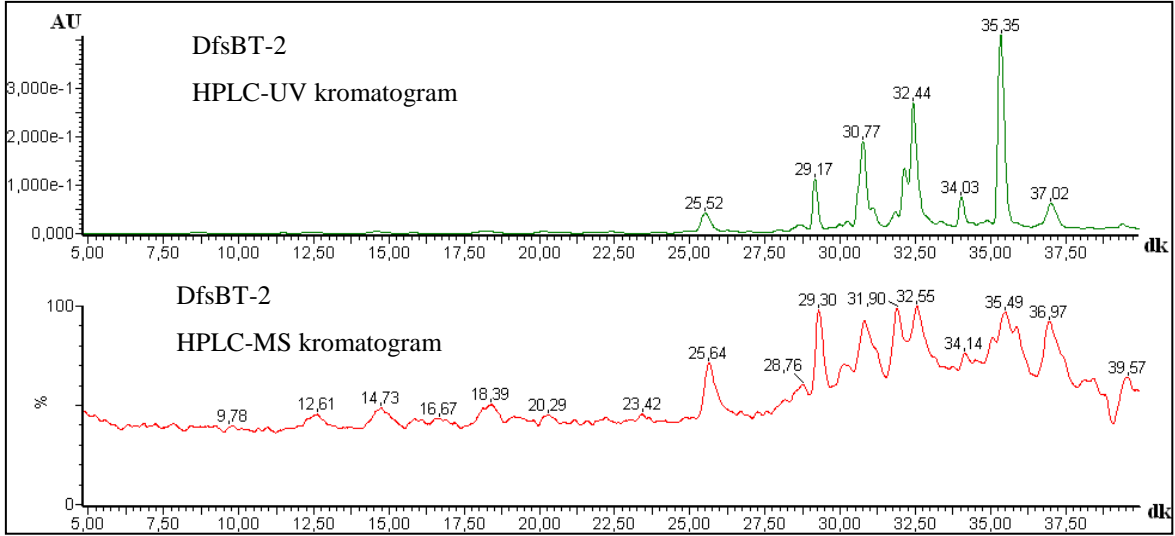
Şekil 24. *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii* bitkisinden üretilen doku kültürlerinin hidrolizsiz ekstraktlarının HPLC-UV analiz sonuçları

3.5. Bitki Ekstraktlarında Fenolik Bileşiklerinin HPLC-UV-MS Analizleri

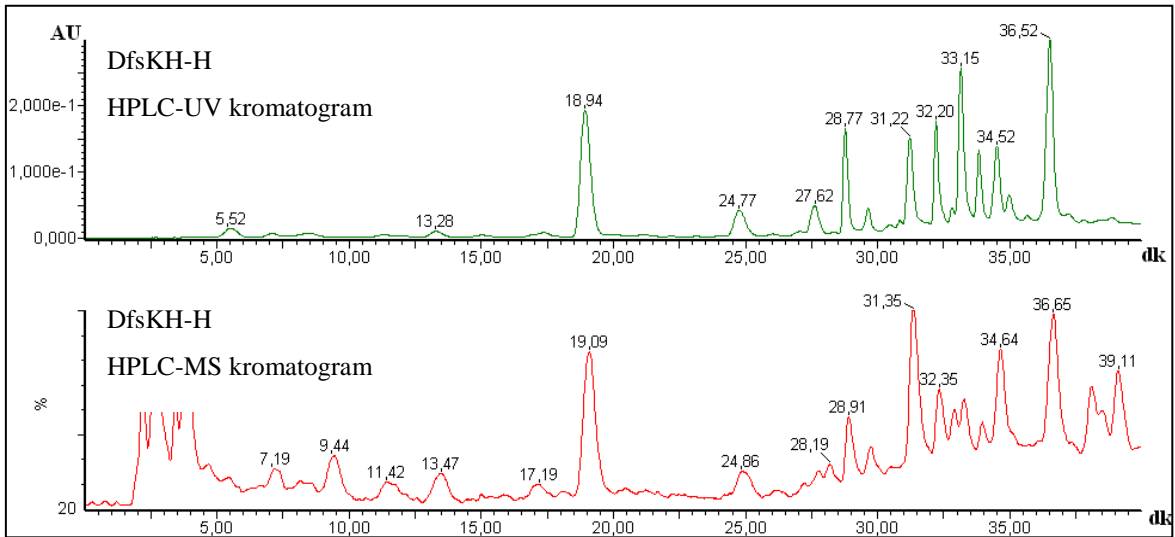
Analizler iki ayrı HPLC-UV-MS sisteminde gerçekleştirilmiştir. HPLC-UV sistemine (Waters) bağlı bir Quattro ESI triple quadrupole mass spektrometer (Micromass) kullanılarak tam taramalı modu ile yapılan analizlere örnek olarak *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii*' nin Rize Verçenik Yaylası Ağustos ayı örneğinin hidrolizli (DfsVA-H), Bolu Abant Gölü örneğinin Temmuz ayı hidrolizsiz (DFsBT-2) ve Rize, Çayeli, Kaptanpaşa Köyü Haziran ayı hidrolizli (DFsKH-H) ekstraktlarına ait HPLC-UV ve HPLC-MS kromatogramları örnek olarak Şekil 25, 26 ve 27' de verilmiştir.



Şekil 25. *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii*' nin Rize Verçenik Yaylası Ağustos ayı örneğinin hidrolizli ekstraktının HPLC-UV (280nm) ve HPLC-MS kromatogramı

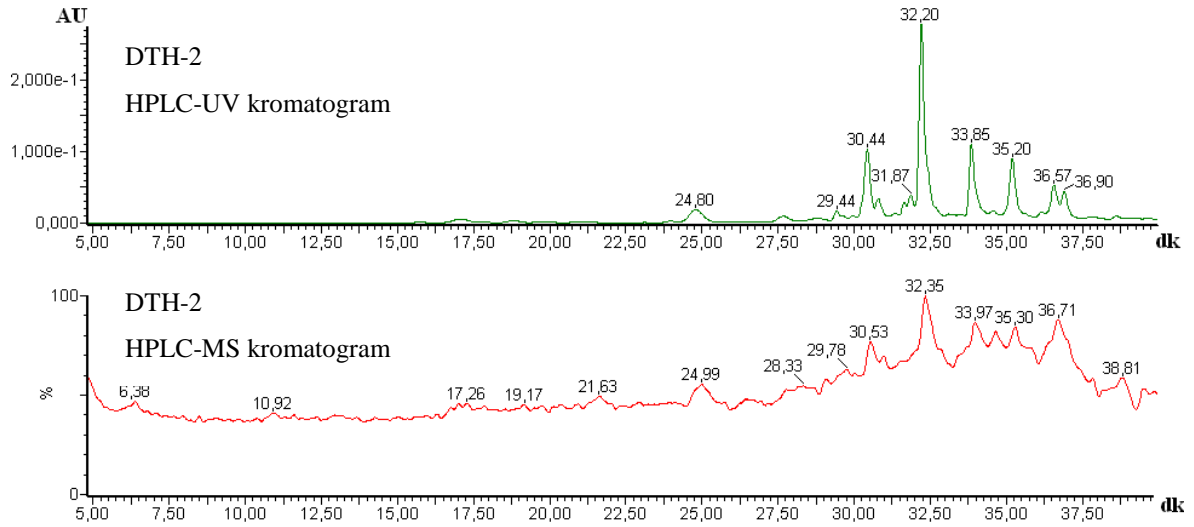


Şekil 26. *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii*' nin Bolu Abant Gölü örneğinin Temmuz ayı hidrolizsiz ekstraktının HPLC-UV (280nm) ve HPLC-MS kromatogramı

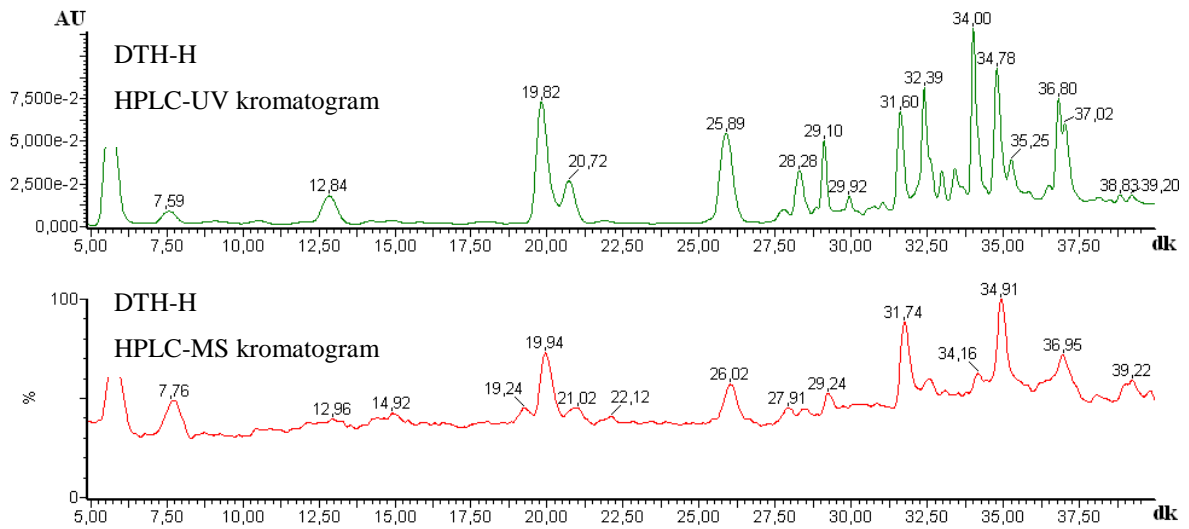


Şekil 27. *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii*' nin Rize, Çayeli, Kaptanpaşa Köyü Haziran ayı hidrolizli ekstraktının HPLC-UV (280nm) ve HPLC-MS kromatogramı

Hidroliz sonucunda pik profillerinin değişiminin gözlenmesi için iyi bir örnek olabileceği düşünülen *Digitalis trojana*' nın Haziran ayı örneğinin hidrolizsiz (Şekil 28) ve hidrolizli (Şekil 29) ekstraktlarının HPLC-UV ve HPLC-MS kromatogramları aşağıda verilmiştir.



Şekil 28. *Digitalis trojana*'nın Haziran ayı örneğinin hidrolizsiz ekstraktının HPLC-UV (280nm) ve HPLC-MS kromatogramı



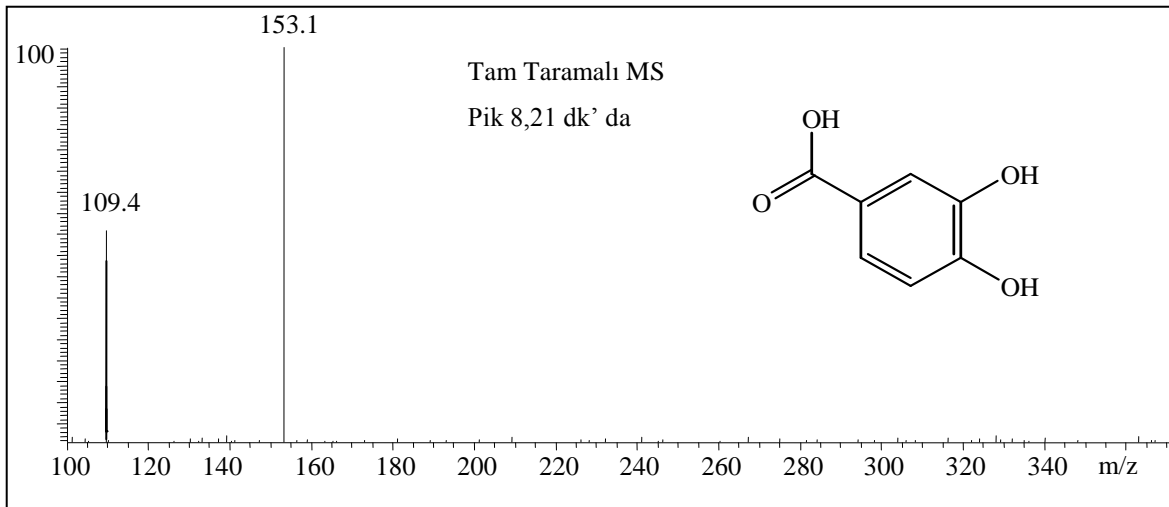
Şekil 29. *Digitalis trojana*'nın Haziran ayı örneğinin hidrolizli ekstraktının HPLC-UV (280nm) ve HPLC-MS kromatogramı

Digitalis trojana'nın Haziran ayı örneğinin hidrolizsiz ekstraktının seyreltilmesi aynı örneğin hidrolizli ekstraktına göre 3 kat daha az yapılmıştır.

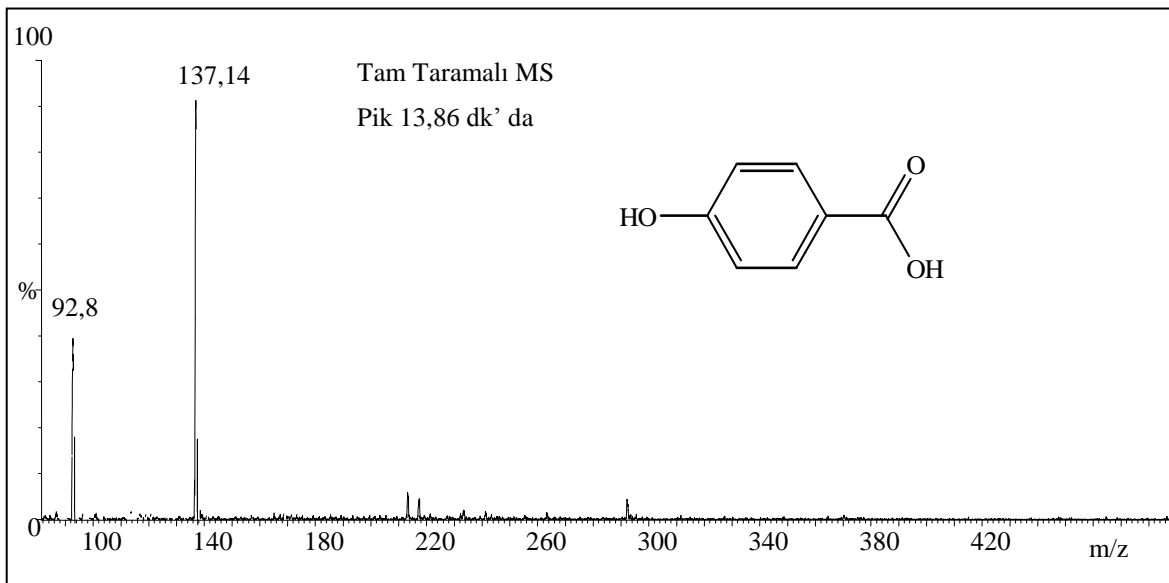
HPLC-UV ve HPLC-MS analizleri ışığında ekstraktlarda gözlemlenen polifenolik bileşikler, fenolik asitler, flavonoid aglikonları ve flavonoid türevleri olarak üç grup halinde toplanmıştır.

3.5.1. Fenolik Asitler

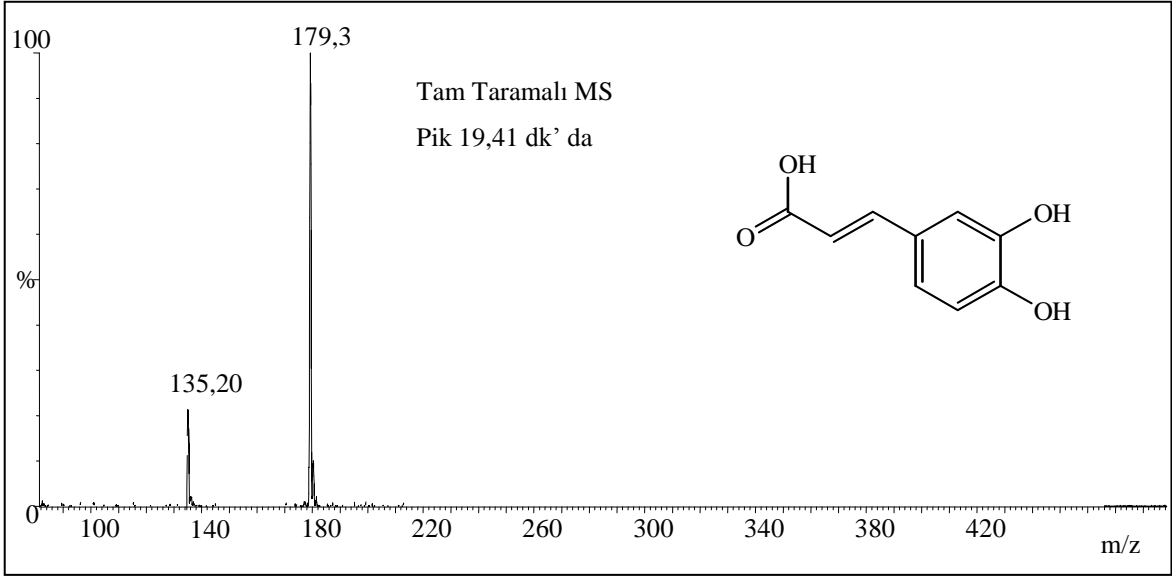
Kromatogramların erken gelen piklerinden HPLC-UV ile tespit edilen protokatekuik, *p*-OH benzoik, kafeik, *p*-kumarik ve ferulik asitin varlıkları kütle spektrumları ile de desteklenmiştir. Şekil 30, 31, 32, 33 ve 34’ de bu fenolik asitlere ait elektrosprey iyonlaşmalı kütle spektrometresi ile alınmış kütle spektrumları verilmiştir ve kimyasal yapıları spektruma eklenmiştir.



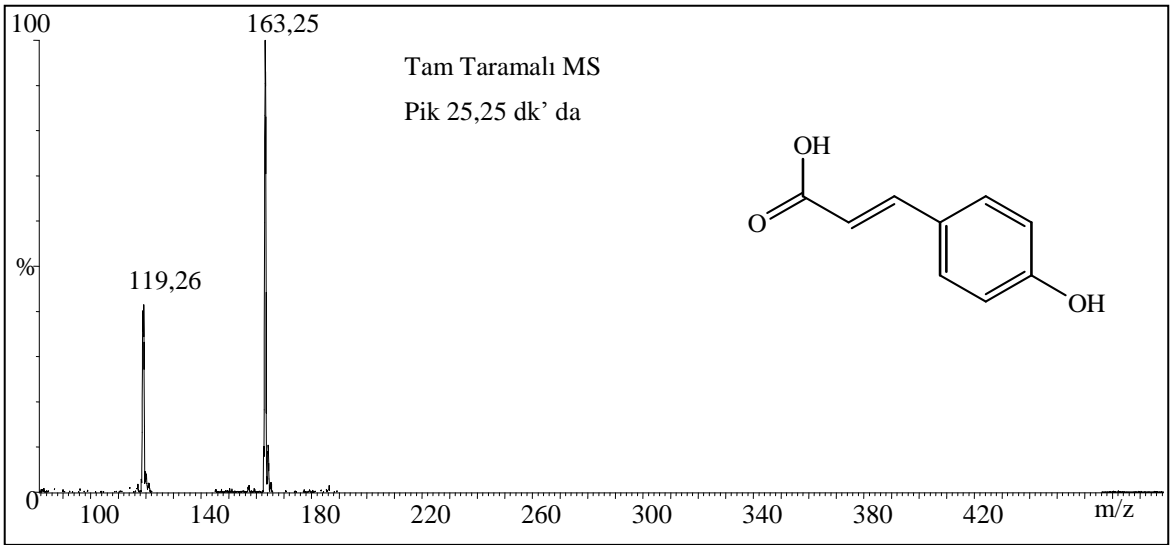
Şekil 30. Protokatekuik asitin kütle spektrumu

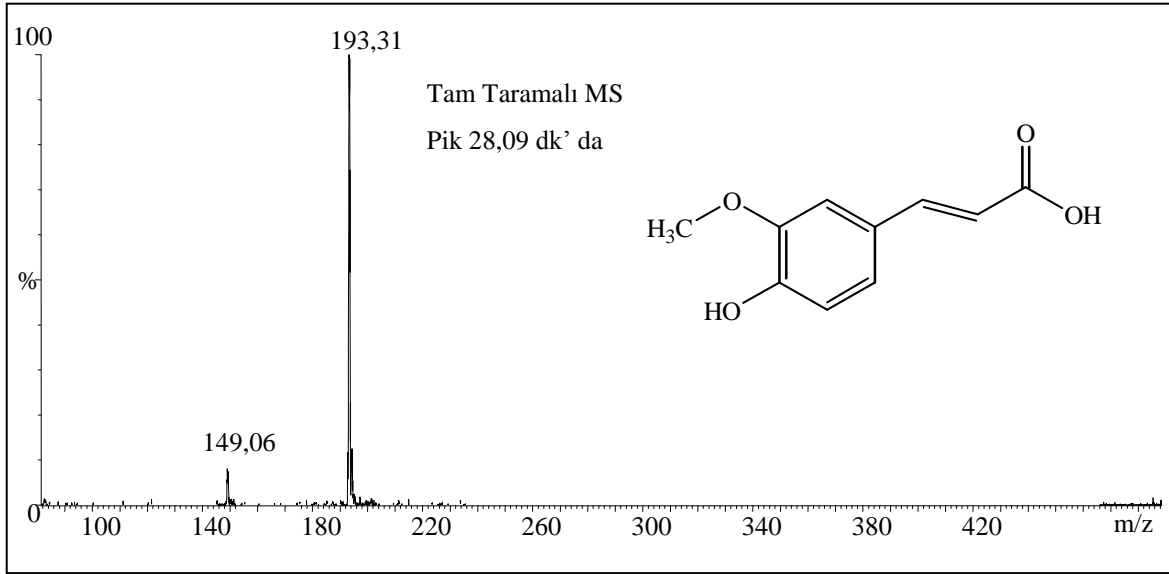


Şekil 31. *p*-OH Benzoik asitin kütle spektrumu



Şekil 32. Kafeik asitin kütle spektrumu

Şekil 33. *p*-Kumarik asitin kütle spektrumu



Şekil 34. Ferulik asitin kütle spektrumu

Micromass HPLC-UV-MS sisteminden elde edilen LC-MS kromatogramlarında bileşenleri kantitatif belirlenmesi malesef tamamlanamamıştır. Ancak çok nicel olmasa da genel bir değerlendirme olması açısından gözlenen ana bileşen trans ferulik asit ve flavonoidlerin tespit edilen pik alanları ($1/10^7$ katı olacak şekilde), numunelerin pik alanları ile karşılaştırılması için kullanılmıştır (Tablo 14).

Tablo 14. Trans-ferulik asidin ekstraktların HPLC-MS kromatogramlarında tespit edilen pik alanı

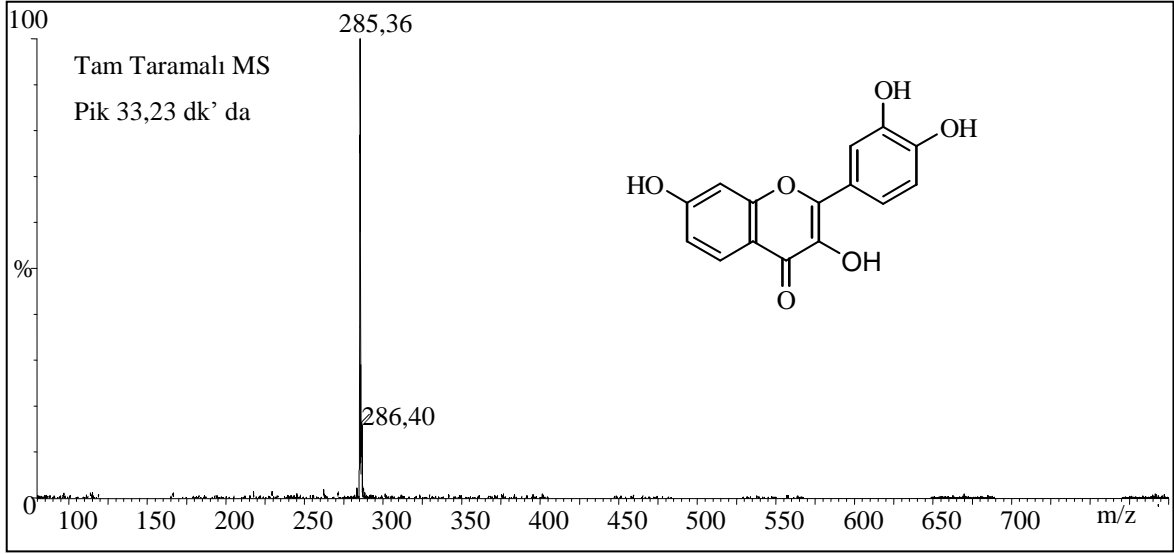
No	Numune	Trans-ferulik asit
1	DfsVA-H	3,82
2	DfsKH-H	9,75
3	DfsAE-2	1,52
4	DfsYEk-2	0,82
5	DfsSH-2	0,31
6	DfsSoT-2	0,46
7	DfsSiT-2	0,59
8	DFsBT-2	2,01
9	DFfH-2	1,58
10	DFfT-2	1,31
11	DTH-2	0,09
12	DTH-H	17,74
13	DTT-2	0,032

Tablo 14' ün devamı

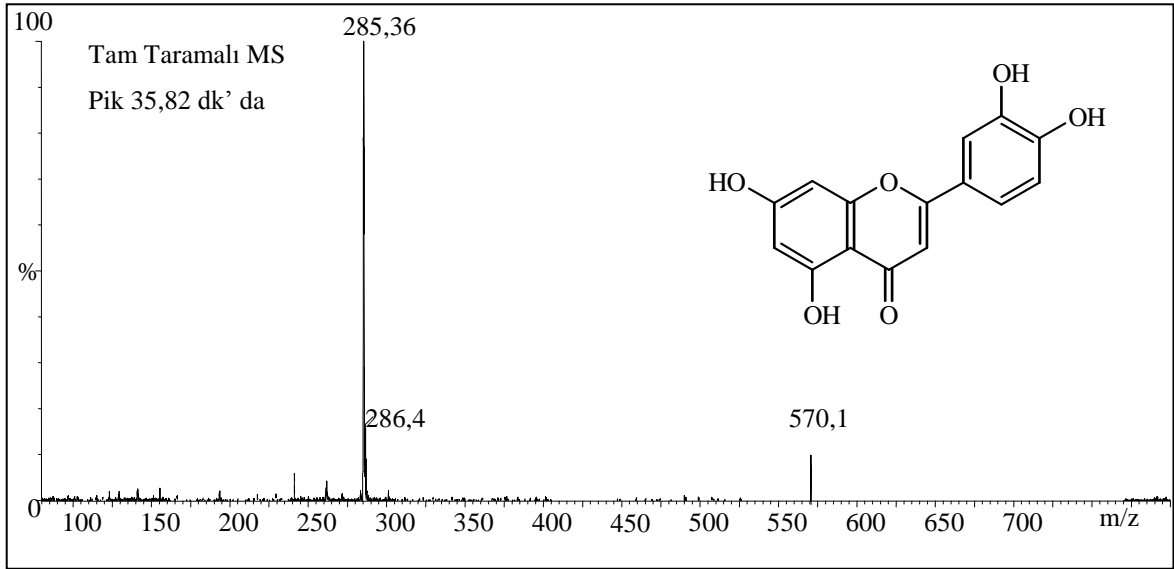
No	Numune	Trans-ferulik asit
14	DTT-H	10,59
15	DTA-2	0,22
16	DTA-H	22,67
17	DDH-H	24,29
18	DDT-H	34,31
19	DDE-H	14,03
20	DLA-H	74,49
21	DLE-H	10,51
22	DCH-H	4,68
23	DCT-H	13,39
24	DCE-H	9,94
25	KS	0,29
26	KFY	0,12
27	KYe	0,47
28	KK	0,06
29	KFS	0,05

3.5.2. Flavonoid Aglikonları

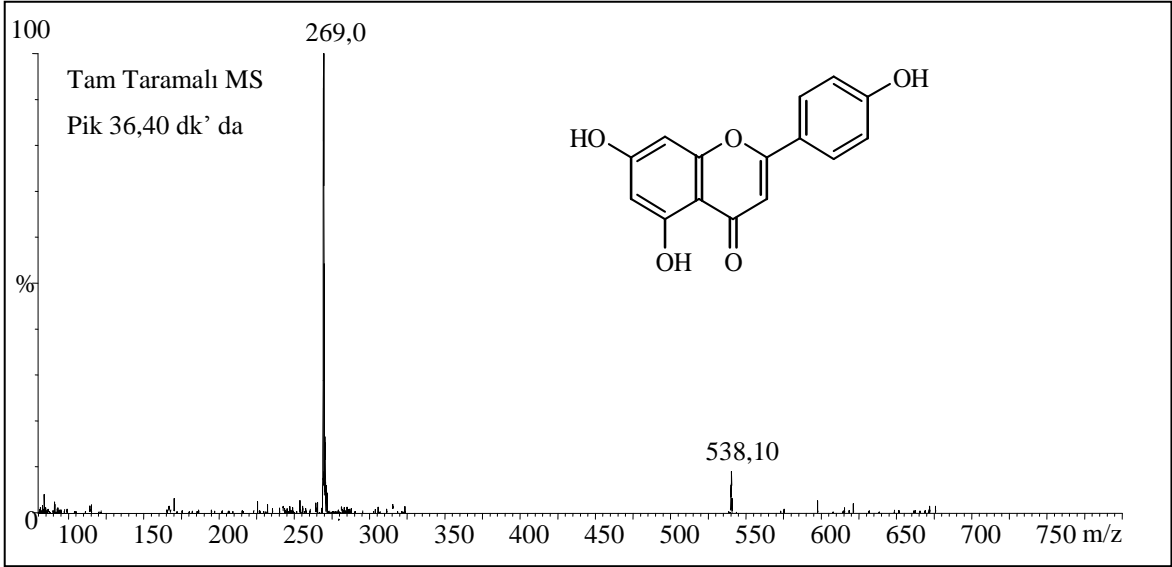
Flavonoid aglikonları olarak fisetin, luteolin, apigenin, kamferid ve ramnazin *Digitalis* türlerinde karakterize edilmiştir. Şekil 35, 36, 37, 38 ve 39' da tam taramalı MS modunda Micromass HPLC-UV-ESI-MS sistemi ile elde edilen kütle spektrumları verilmiştir. Pik karakterizasyonları standardı mevcut olan luteolin ve apigenin flavonoidleri için hem standardın alıkonma zamanı ve kütle spektrumları karşılaştırılarak hemde elusyon karakterleri literatür ile karşılaştırılarak gerçekleştirilmiştir. Standardı mevcut olmayan flavonoidler için kütle spektrumları ve elüsyon karakterleri literatür ile karşılaştırılarak pik karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. İlgili flavonoid aglikonlarının yapısal formülleri spektrumda gösterilmiştir.



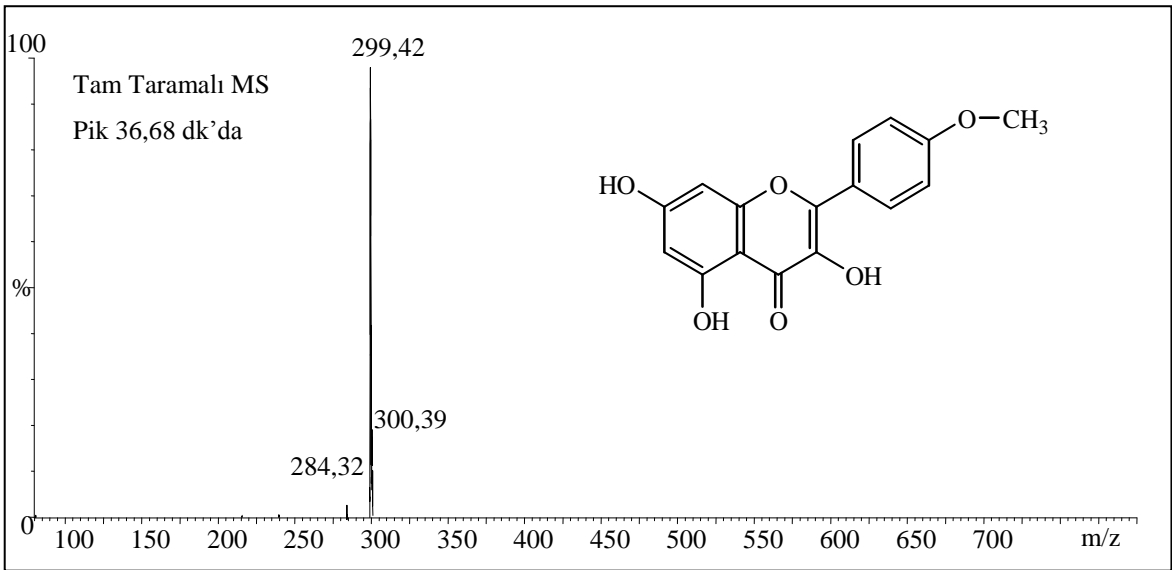
Şekil 35. Fisetinin kütle spektrumu



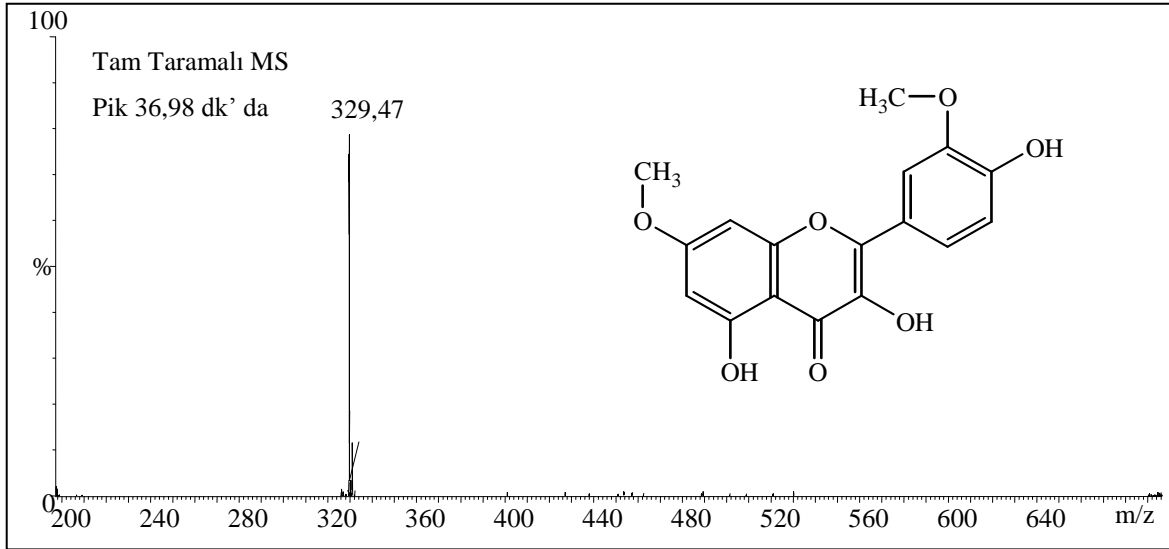
Şekil 36. Luteolin kütle spektrumu



Şekil 37. Apigeninin kütle spektrumu



Şekil 38. Kamferidin kütle spektrumu



Şekil 39. Ramnazinin kütle spektrumu

Flavonoid aglikonlarının ilgili kromatogramlardan elde edilen pik alanları $1/10^7$ katı olacak şekilde Tablo 15' de verilmiştir.

Tablo 15. Flavonoid aglikonlarının ekstraktların HPLC-MS kromatogramlarında tespit edilen pik alanları

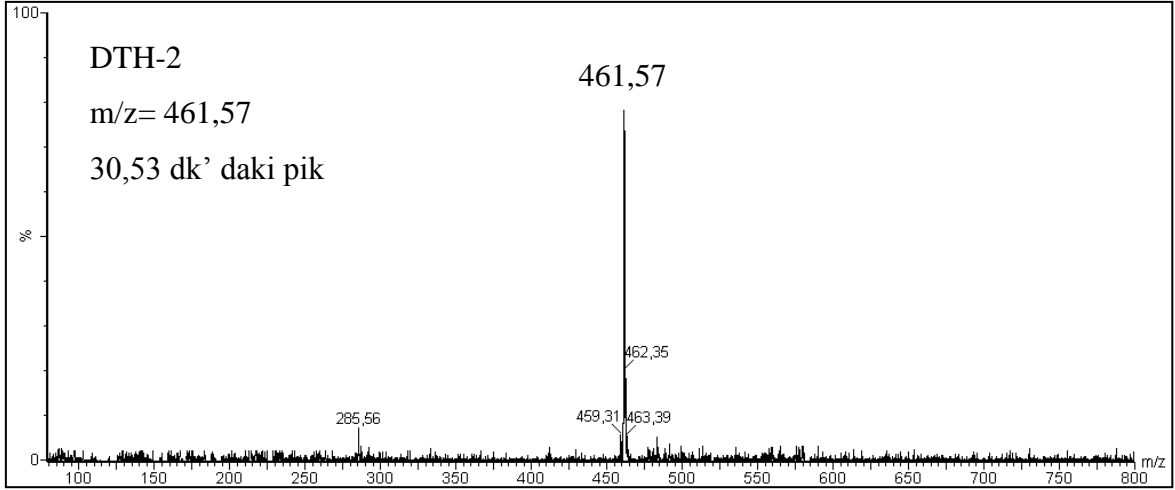
No	Numune	Fisetin	Luteolin	Apigenin	Kamferid	Ramnazin
1	DfsVA-H	G	14,66	8,08	6,56	G
2	DfsKH-H	147,86	6,43	7,30	10,86	0,16
3	DfsSH-2	89,79	14,39	3,73	9,53	1,45
4	DfsSiT-2	101,76	4,63	3,68	2,06	0,83
5	DFsBT-2	9,30	1,50	0,71	1,76	0,96
6	DfsSoT-2	16,05	5,16	1,82	5,31	0,85
7	DfsAE-2	G	6,01	4,71	2,43	0,44
8	DfsYEk-2	G	15,37	3,82	10,43	0,43
9	DFH-2	1,48	0,58	0,05	0,77	0,21
10	DFT-2	1,93	0,33	0,24	0,46	0,09
11	DTH-2	G	1,10	2,26	7,70	1,03
12	DTH-H	34,82	1,11	2,09	14,78	2,31
13	DTT-2	140,92	6,76	10,33	8,77	1,08
14	DTT-H	158,68	2,47	4,74	10,02	G

Tablo 15' in devamı

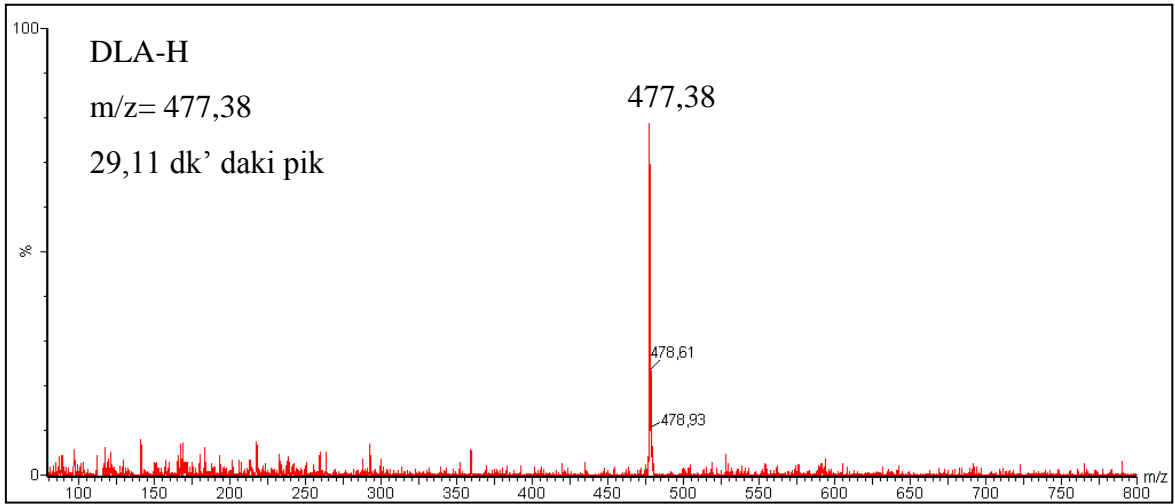
No	Numune	Fisetin	Luteolin	Apigenin	Kamferid	Ramnazin
15	DTA-2	1,80	0,28	G	4,02	0,31
16	DTA-H	5,96	2,02	G	10,52	0,59
17	DDH-H	17,24	4,65	4,30	16,77	0,84
18	DDT-H	17,16	2,09	0,90	4,86	1,58
19	DDE-H	9,40	0,70	0,20	2,16	0,50
20	DLA-H	65,13	6,36	7,62	22,58	3,81
21	DLE-H	9,31	4,02	3,49	9,74	4,01
22	DCH-H	52,93	1,61	2,81	15,04	1,63
23	DCT-H	14,98	0,57	2,38	9,01	0,65
24	DCE-H	21,74	3,23	0,69	8,75	5,94
25	KS	3,60	2,32	0,48	0,58	0,26
26	KFY	3,73	2,70	0,68	1,62	0,29
27	KYe	0,53	0,80	0,06	0,20	0,04
28	KK	G	0,46	0,25	0,42	1,72
29	KFS	G	6,90	0,98	1,29	0,78

3.5.3. Flavonoid Türevleri

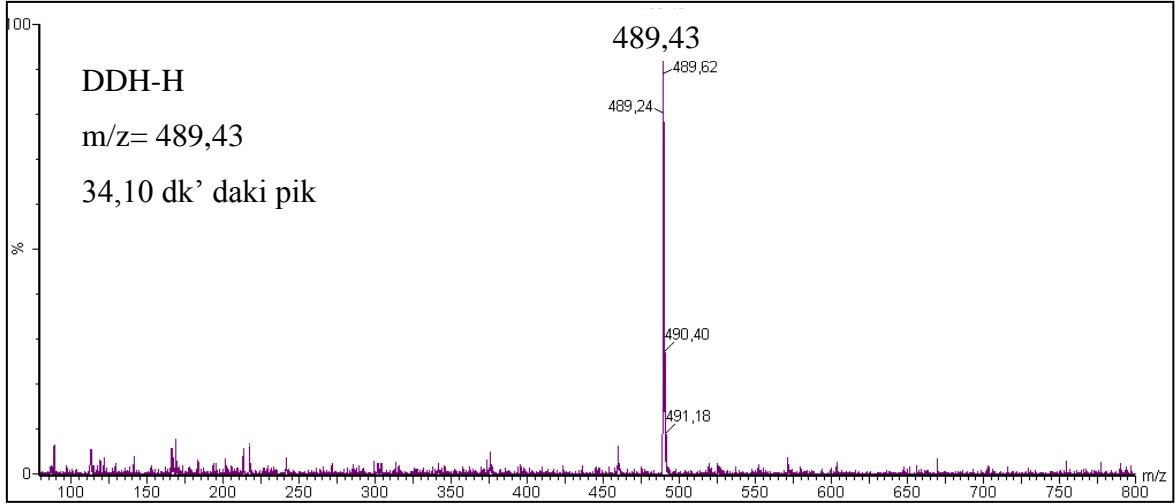
HPLC-UV sistemine (Waters) bağlı bir Quattro ESI triple quadrupole mass spektrometer (Micromass) kütle spektrometresi kullanılarak tam taramalı MS modu ile yapılan analizler sonucunda gözlenen moleküler iyonlara örnek olarak Şekil 40, 41 ve 42' de sırasıyla DTH-2 ekstraktına ait $[M-H]^- = 461,57$, DLA-H ekstraktına ait $[M-H]^- = 477,38$ ve DDH-H ekstraktına ait $[M-H]^- = 489,43$ moleküler iyonlarına ait kütle spektrumları verilmiştir.



Şekil 40. *Digitalis trajana*' nın Haziran ayı hidrolizsiz ekstraktına ait tam taramalı MS modu ile elde edilen kütle spektrumu

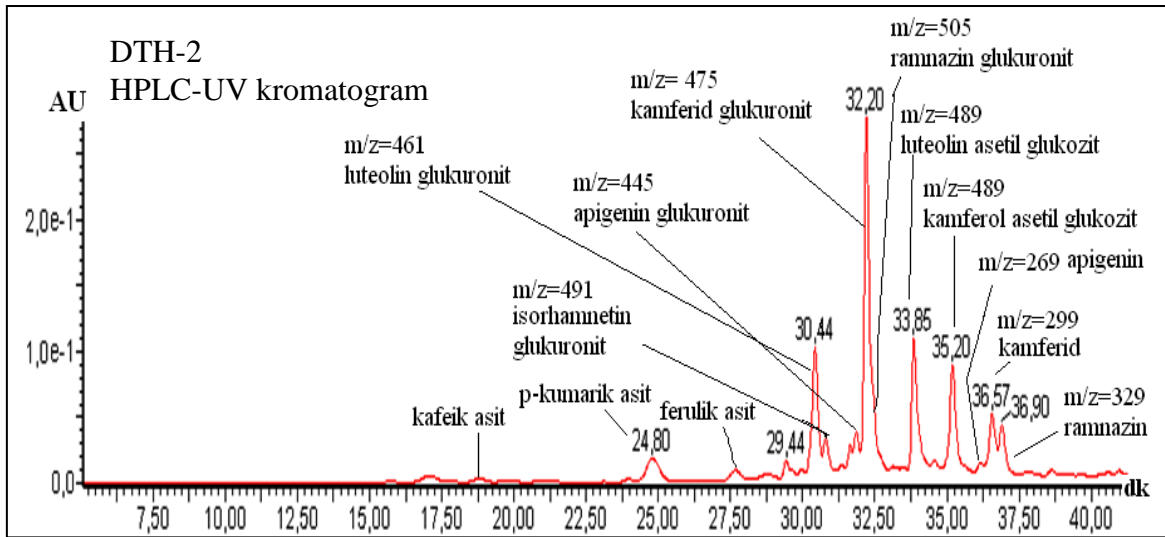


Şekil 41. *Digitalis lamarckii*' nin Ağustos ayı hidrolizli ekstraktına ait tam taramalı MS modu ile elde edilen kütle spektrumu

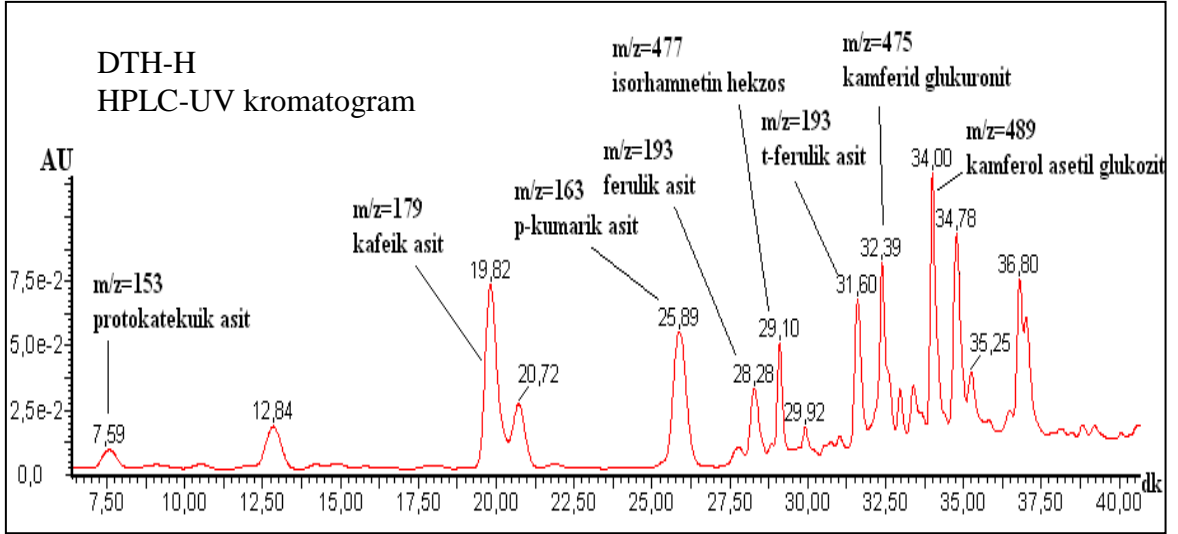


Şekil 42. *Digitalis davisiana*'nın Haziran ayı hidrolizli ekstraktına ait tam taramalı MS modu ile elde edilen kütle spektrumu

Micromass HPLC-UV-ESI-MS-MS sistemi ile piklerin karakterize edildiği örnekler için temsilen *Digitalis trojana*'nın Haziran ayı örneğinin (DTH) hidrolizsiz ve hidrolizli ekstraktlarının HPLC-UV kromatogramları sırasıyla Şekil 43 ve Şekil 44' de verilmiştir.

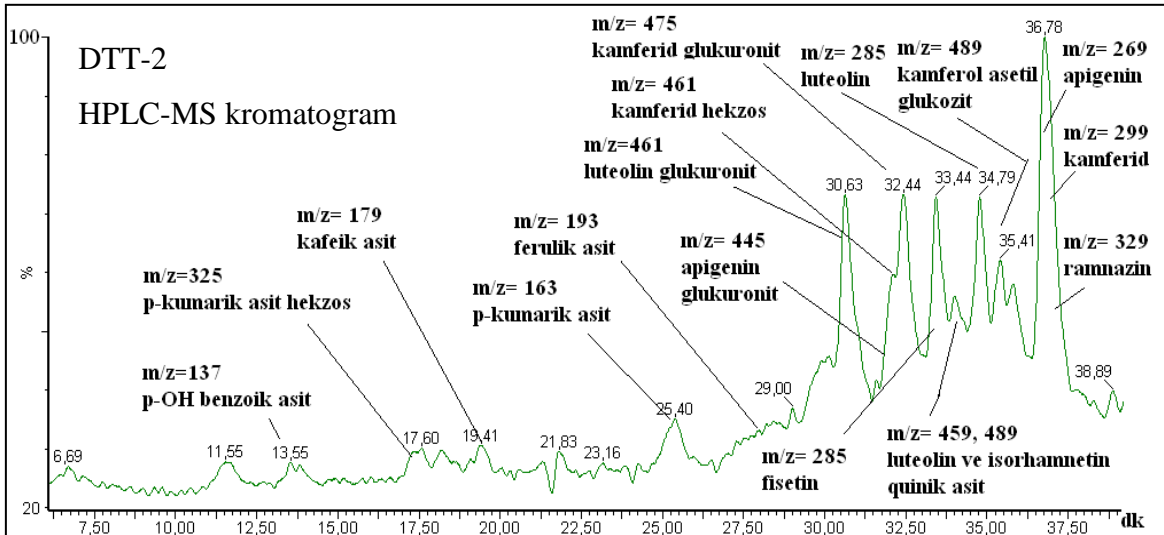


Şekil 43. *Digitalis trojana*'nın Haziran ayı hidrolizsiz ekstraktının (Micromass) HPLC-UV-ESI-MS-MS sistemi ile elde edilen kromatogramı

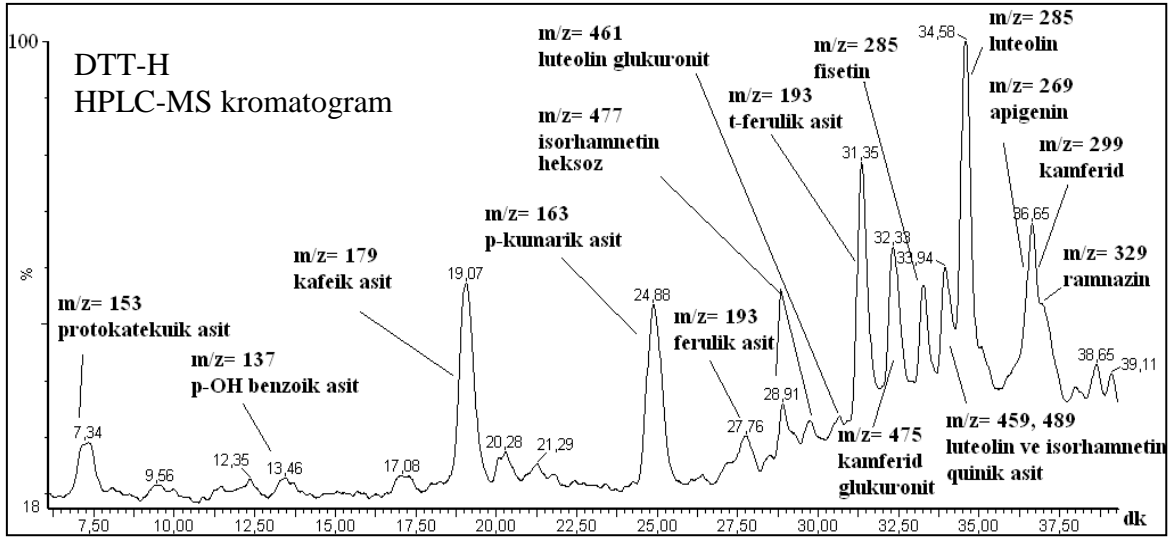


Şekil 44. *Digitalis trojana*'nın Haziran ayı hidrolizli ekstraktının (Micromass) HPLC-UV-ESI-MS/MS sistemi ile elde edilen HPLC-UV kromatogramı

Digitalis trojana'nın Temmuz ayına ait örneğinin (DTT) hidrolizsiz ve hidrolizli ekstraktlarının HPLC-MS kromatogramları sırasıyla Şekil 45 ve Şekil 46' da verilmiştir.

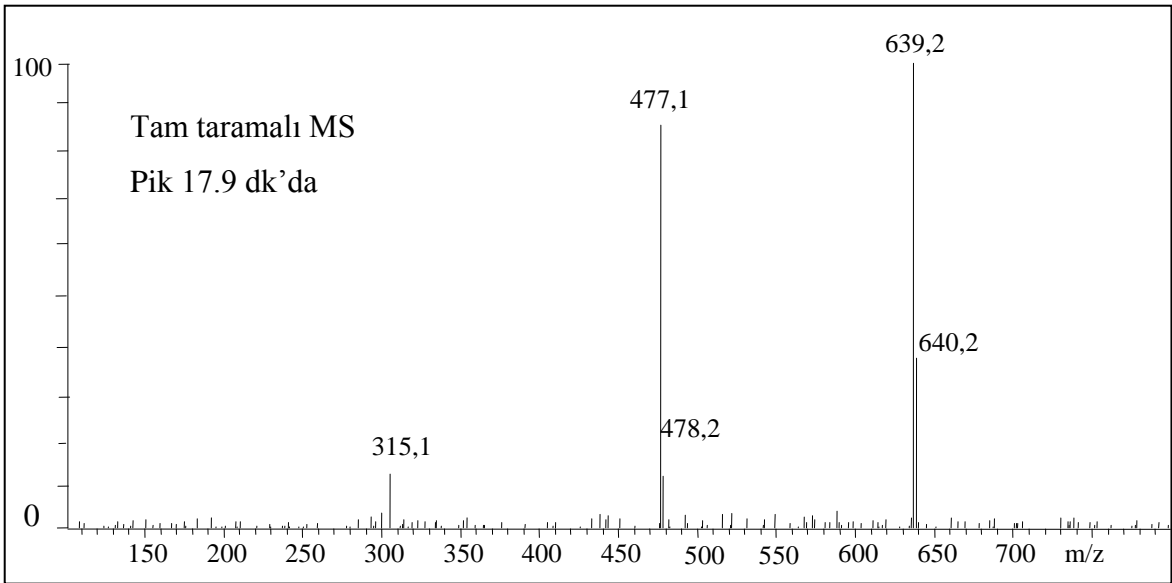


Şekil 45. *Digitalis trojana*'nın Temmuz ayı hidrolizsiz ekstraktının üzerinde piklerin karakterize edildiği (Micromass) HPLC-MS kromatogramı

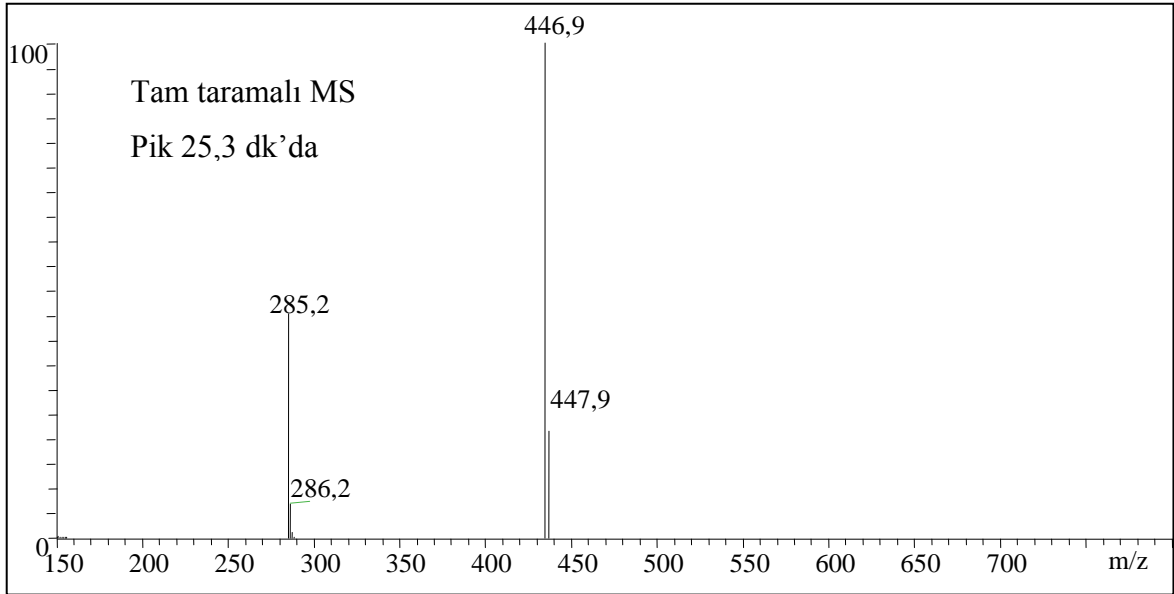


Şekil 46. *Digitalis trojana*'nın Temmuz ayı hidrolizli ekstraktının üzerinde piklerin karakterize edildiği (Micromass) HPLC-MS kromatogramı

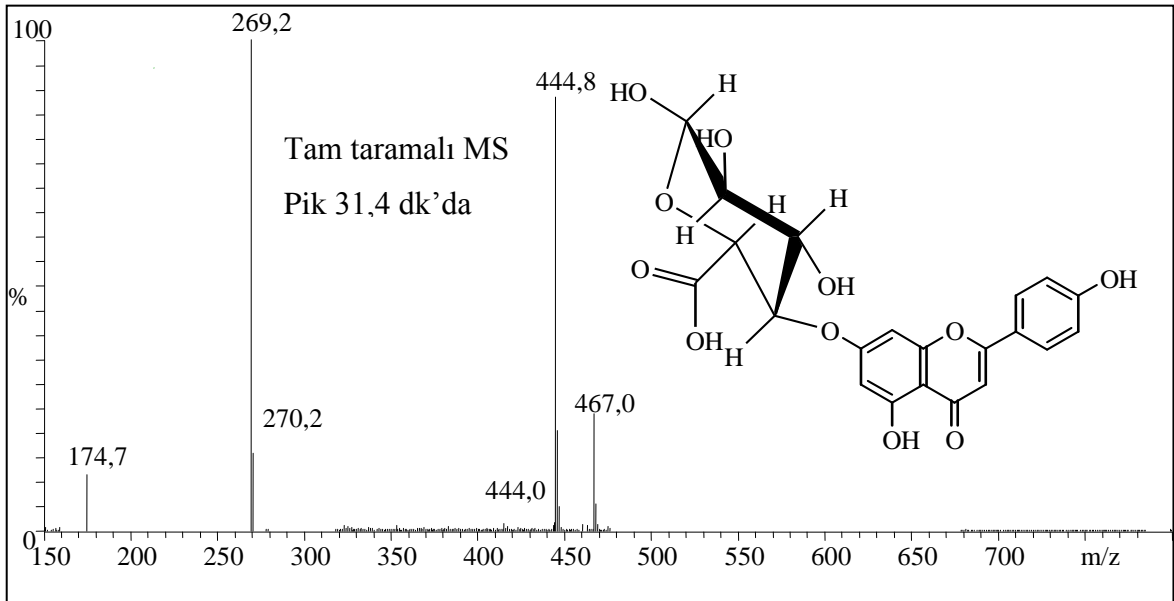
Flavonoid türevlerine ait bazı kütle spektrumları Şekil 47-53' de örnek olarak verilmiştir.



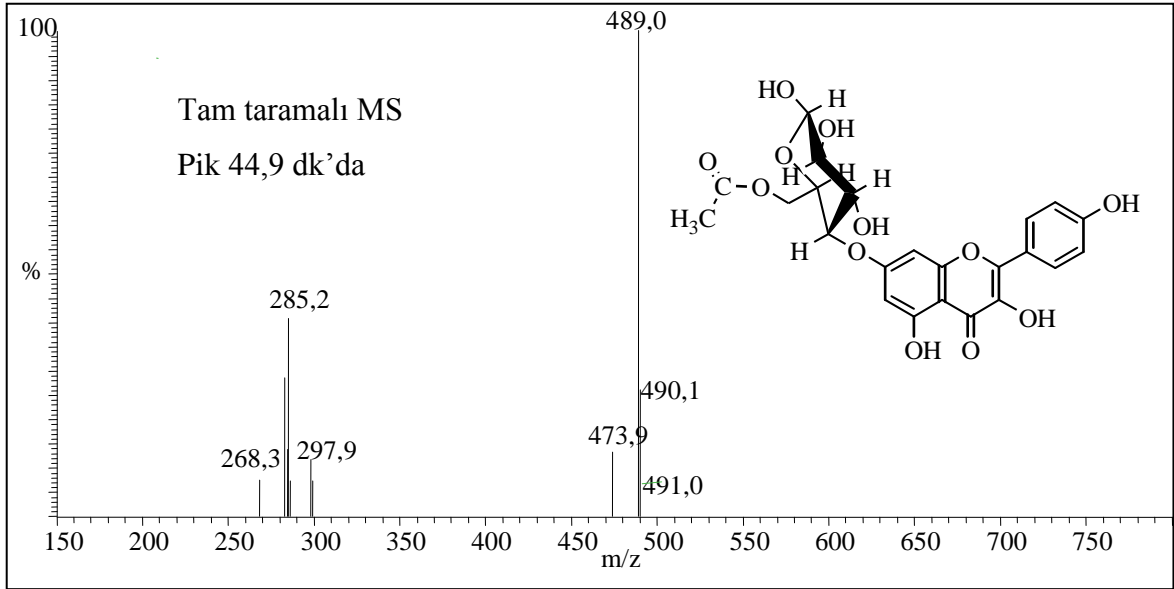
Şekil 47. İsorhamnetin-diheksos'un kütle spektrumu (%35 CID)



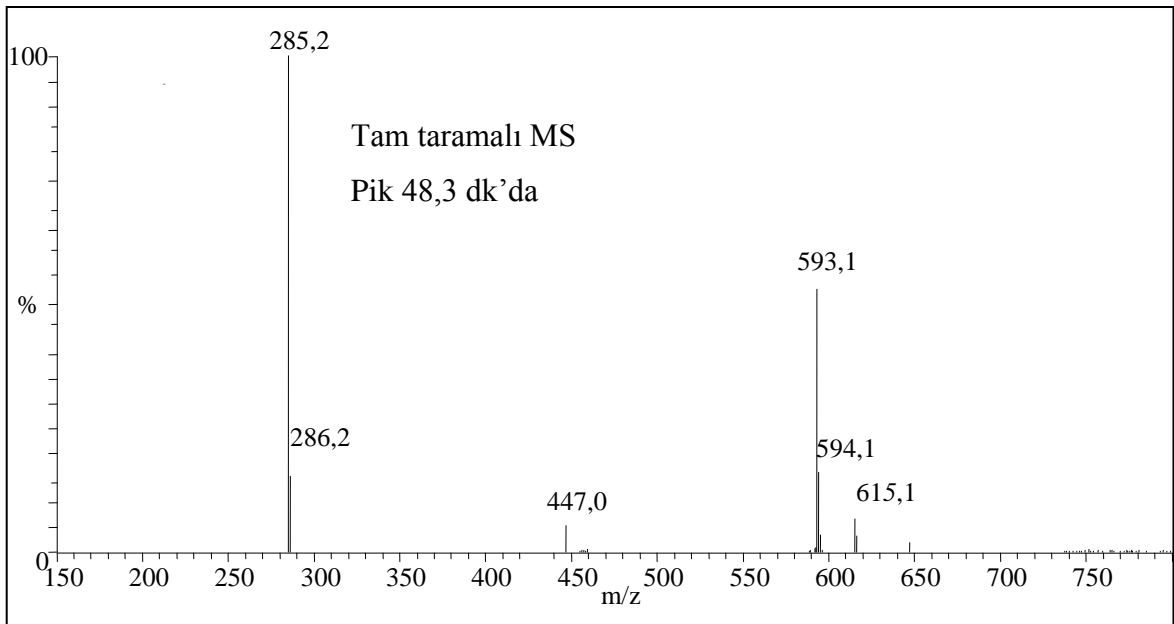
Şekil 48. Luteolin-heksoz'un kütle spektrumu (%35 CID)



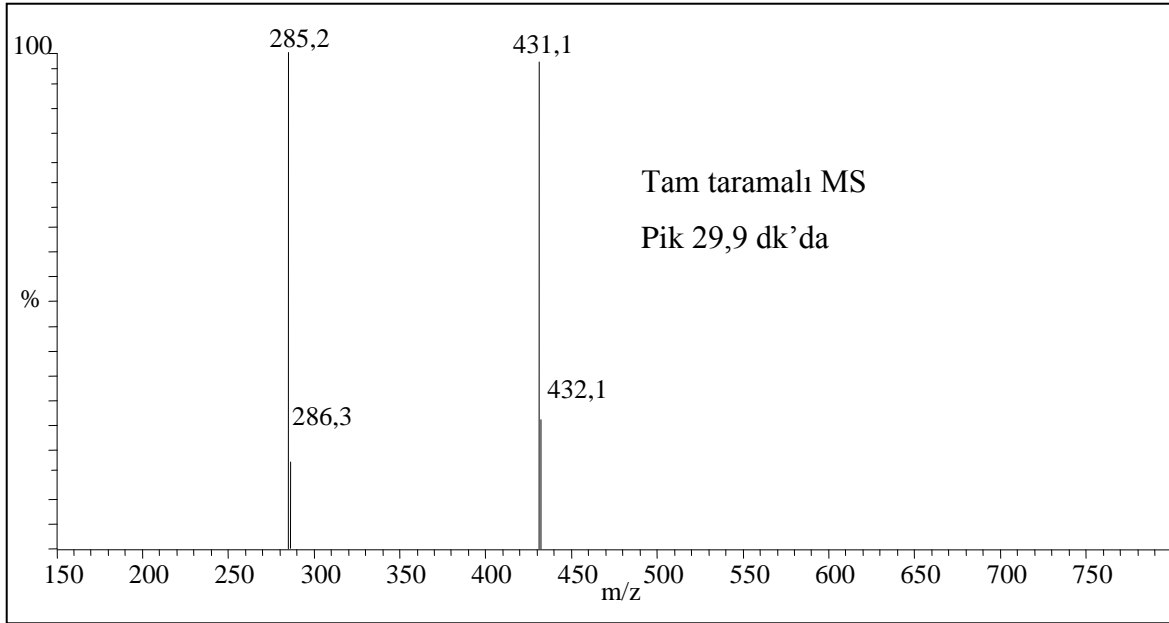
Şekil 49. Apigenin-glukuronide ait kütle spektrumu (%35 CID)



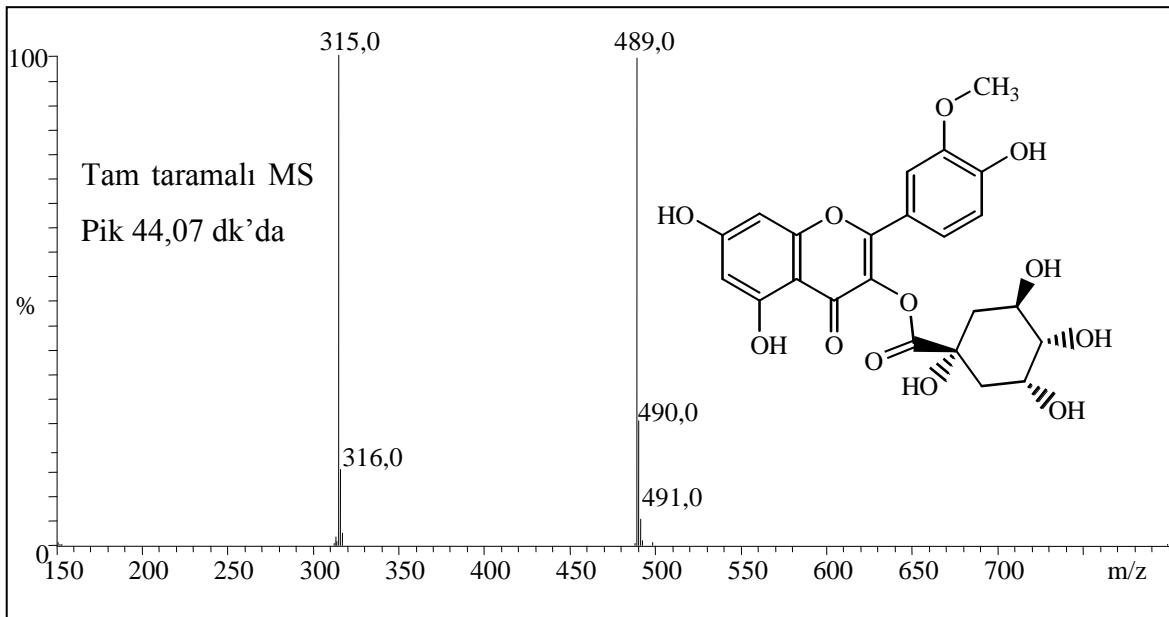
Şekil 50. Kamferol-asetilglukozit-1' in kütle spektrumu (%35 CID)



Şekil 51. Kamferol-heksoz-deoksiheksoz'un kütle spektrumu (%35 CID)



Şekil 52. Luteolin-deoksiheksoz'a ait kütle spektrumu (%35 CID)



Şekil 53. İsorhamnetin-kuinik asit' in kütle spektrumu (%35 CID)

İlgili kromatogramlarda integrasyon yolu ile hesaplanan pik alanları çalışılan türler için Tablo 16-23' de verilmiştir. Örnek içinde belirlenemeyen flavonoid türevleri için daha önce tanımlandığı şekliyle dedeksiyon sınırında küçüktür (<LOD) kullanılmamıştır. Bu çalışmada standart kullanılarak LOD değerleri hesaplanmadığından gözlenmediğini belirtmek üzere G gösterimi tercih edilmiştir.

Tablo 16. *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii*' nin Verçenik ve Kaptanpaşa örneklerinin hidrolizli örneklerindeki şeker bağlı flavonoidlerin HPLC-MS kromatogramlarında tespit edilen alanları

RT	[M-H] ⁻	Fragment	Bileşikler	Hidroliz	
				DFsVA	DFsKH
17,9	639	477; 315	I-diheksöz-1	0,85	1,73
19,8	639	477	I-diheksöz-2	2,23	2,75
21,6	463	301	Ku- heksoz	1,28	G
22,8	477	315	I-heksöz-1	34,51	43,09
24,9	477	315	I-heksöz-2	8,92	10,81
25,3	447	285	L-heksöz	8,49	G
26,9	461	285	L-glukuronit	2,16	G
27,6	491	315; 300	I-glukuronit-1	9,19	G
28,7	491	315; 300	I-glukuronit-2	G	7,96
34,2	475	299; 284	Kr-glukuronit-2	36,38	37,23
35,5	475	299	Kr-glukuronit-3	77,08	8,65
36,78	505	329; 315	Ramnazin-glukuronit	18,38	18,57
43,15	459	285; 268	K-kuinik asit	93,60	41,74
44,07	489	315; 285	I-kuinik asit	133,80	58,56
46,03	489	299; 284	K-asetilglukozit-2	G	11,77
			Toplam	426,87	242,86

I: İsorhamnetin, Ku: Kuersetin, L: Luteolin, Kr: Kamferid, K: Kamferol, G: Gözlenmedi

Tablo 17. *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii*' nin Bolu, Rize (Abelat, Yeşiltepe, Soğukçeşme ve Salarha) ve Trabzon (Sis dağı) örneklerinin hidrolizsiz şeker bağlı flavonoidlerin HPLC-MS kromatogramlarında tespit edilen alanları

RT	[M-H] ⁻	Frag- ment	Bileşikler	pH=2					
				DFsSH	DFsSiT	DFsBT	DFsSoT	DFsAE	DFsYEk
17,9	639	477; 315	I-diheksöz-1	10,24	16,14	8,96	15,16	9,10	5,14
19,8	639	477	I-diheksöz-2	2,80	3,65	2,18	G	2,43	G
21,6	463	301	Ku-heksöz	3,74	1,185	2,08	4,25	6,84	3,83
22,1	477	301	Ku-glukuronit-1	3,38	0,97	G	5,43	1,94	15,25
22,8	477	315	I-heksöz-1	15,88	21,16	17,31	G	36,63	G
25,3	447	285	L-heksöz	8,07	4,52	4,75	5,95	42,73	29,39
26,9	461	285	L-glukuronit	32,83	37,65	22,32	25,55	64,88	32,32
26,9	477	315	I-heksöz-3	21,89	G	G	10,03	19,55	18,17
27,6	491	315; 300	I-glukuronit-1	20,75	6,22	6,67	6,27	8,97	24,48

Tablo 17' nin devamı

RT	[M-H] ⁻	Frag- ment	Bileşikler	pH=2					
				DFsSH	DFsSiT	DFsBT	DFsSoT	DFsAE	DFsYEk
28,7	491	315; 300	I-glukuronit-2	G	1,15	G	1,84	2,26	2,14
29,9	431	285	L-deoksiheksöz	G	1,75	G	G	G	3,60
31,5	445	269	Apigenin- glukuronit	12,53	16,02	6,04	9,85	29,30	15,37
32,2	461	299	Kr-heksöz	11,29	G	8,32	11,85	G	8,98
33,2	475	299	Kr-glukuronit-1	46,64	12,31	33,89	12,47	28,12	43,96
34,2	475	299; 284	Kr-glukuronit-2	13,71	36,26	17,14	37,40	31,57	16,45
35,5	475	299	Kr-glukuronit-3	G	18,52	20,39	16,04	G	G
36,6	475	299	Kr-glukuronit-4	11,46	7,25	6,21	8,86	85,95	64,00
36,8	505	329; 315	Ramnazin- glukuronit	43,96	6,6	4,88	8,68	12,20	43,96
41,4	475	299	Kr-glukuronit-5	6,61	18,585	4,96	0,81	G	G
43,2	459	285; 268	K-kuinik asit	G	42,68	12,38	11,72	46,33	46,19
44,1	489	315; 285	I-kuinik asit	75,39	25,02	36,97	11,72	36,16	136,76
44,9	489	299	K-asetilglukozit-1	2,65	G	7,42	G	G	15,23
46,0	489	299; 284	K-asetilglukozit-2	G	7,91	G	14,90	G	G
47,6	519	329;315	I-asetilglukozit-2	G	G	G	8,39	G	G
48,3	593	447; 285	K-heksöz- deoksiheksöz	G	G	G	G	3,01	G
			Toplam	343,82	285,54	222,87	227,17	467,97	550,24

I: İsorhamnetin, Ku: Kuersetin, L: Luteolin, Kr: Kamferid, K: Kamferol, G: Gözlenmedi

Tablo 18. *Digitalis ferruginea ssp. ferruginea*' nin ekstraktlarında mevcut şeker bağlı flavonoidlerin HPLC-MS kromatogramlarında tespit edilen pik alanları

RT	[M-H] ⁻	Fragment	Bileşikler	DFH-2	DFT-2
12,6	325	265; 163	<i>p</i> -Kumarik asit-heksöz	0,87	3,46
17,7	639	477; 315	I-diheksöz-1	23,39	16,85
20,1	639	477	I-diheksöz-2	3,94	3,19
21,5	463	301	Ku- heksöz	10,92	3,32
22,3	477	301	Ku-glukuronit-1	48,12	3,67
22,7	477	315	I-heksöz-1	5,83	13,69
25,2	447	285	L-heksöz	7,74	10,22

Tablo 18' in devamı

RT	[M-H] ⁻	Fragment	Bileşikler	DFH-2	DFT-2
26,1	461	285	L-glukuronit	10,04	14,35
26,7	477	315	I-heksoz-3	6,11	10,52
27,6	491	315; 300	I-glukuronit-1	11,77	24,14
28,4	491	315; 300	I-glukuronit-2	8,36	6,89
31,4	461	299	Kr-heksoz	3,71	8,53
33,3	475	299	Kr -glukuronit-1	26,24	38,76
34,5	475	299; 284	Kr -glukuronit-2	42,60	25,71
35,7	475	299	Kr -glukuronit-4	32,07	43,57
36,6	505	329; 315	Ramnazin-glukuronit	60,48	68,41
44,4	489	315; 285	I-kuinik asit	115,03	100,05
46,0	489	299; 285	K-asetilglikozit-2	12,96	5,71
46,9	519	329;315	I-asetilglikozit-2	32,76	7,80
48,3	593	447; 285	K-heksoz-deoksiheksoz	2,67	7,06
			Toplam	465,61	415,9

I: İsorhamnetin, Ku: Kuersetin, L: Luteolin, Kr: Kamferid, K: Kamferol, G: Gözlenmedi

Tablo 19. *Digitalis trojana*' nın ekstraktlarında mevcut şeker bağlı flavonoidlerin HPLC-MS kromatogramlarında tespit edilen pik alanları

RT	[M-H] ⁻	Fragment	Bileşikler	pH=2			Hidroliz		
				DTH	DTT	DTA	DTH	DTT	DTA
13,8	325	163	<i>p</i> -kumarik asit-heksoz	G	G	2,68	G	G	G
17,7	639	477;315	I-diheksoz-1		G	4,67	3,29	7,57	2,40
19,8	477	161	Tanımlanamadı	G	G	G	2,06	G	5,00
20,1	639	477	I-diheksoz-2	G	30,54	G	G	G	G
21,5	463	301	Ku- heksoz	G	G	5,49	G	G	1,57
21,7	639	477	I-diheksoz-3	G	36,06	G	3,15	18,82	G
22,6	477	315	I-heksoz-1	G	18,57	1,72	27,94	90,83	34,16
24,9	477	315	I-heksoz-2	G	G	G	5,05	24,72	5,42
25,3	447	285	L-heksoz	2,70	27,45	9,48	G	G	5,40
26,3	461	285	L-glukuronit	5,19	95,43	4,03	G	44,44	G
26,8	477	315	I-heksoz-3	G	G	7,64	G	G	G
27,6	491	315; 300	I-glukuronit-1	G	17,46	20,10	G	G	G
28,7	491	315; 300	I-glukuronit-2	3,09	G	2,15	11,89	68,45	29,87
32,6	461	299	Kr-heksoz	7,32	G	15,03	G	G	6,90

Tablo 19' un devamı

RT	[M-H] ⁻	Fragment	Bileşikler	pH=2			Hidroliz		
				DTH	DTT	DTA	DTH	DTT	DTA
33,3	475	299	Kr-glukuronit-1	15,39	141,71	59,70	G	G	G
34,9	475	299; 284	Kr-glukuronit-2	42,10	239,32	16,75	36,72	386,18	13,93
35,9	475	299	Kr-glukuronit-4	18,83	88,28	14,95	8,28	146,29	16,88
36,7	505	329; 315	Ramnazin-glukuronit	18,51	G	54,89	28,21	112,82	84,80
43,8	459	285; 268	K-kuinik asit	24,74	162,80	G	18,44	216,51	23,09
44,5	489	315; 285	I-kuinik asit	170,09	364,28	163,36	145,08	355,64	260,51
44,9	489	299	K-asetilglukozit-1	34,86	115,91	G	18,53	112,27	G
45,6	519	329; 315	I-asetilglukozit-1	44,20	G	G	32,21	G	G
46,7	489	299	K-asetilglukozit-1	G	G	G	G	103,95	28,31
47,5	519	329; 315	I-asetilglukozit-2	8,04	G	2,10	G	G	G
48,5	593	447; 285	K-heksoz-deoksiheksoz	G	G	1,20	G	G	G
			Toplam	395,06	1441,13	385,93	340,85	1688,5	518,24

I: İsorhamnetin, Ku: Kuersetin, L: Luteolin, Kr: Kamferid, K: Kamferol, G: Gözlenmedi

Tablo 20. *Digitalis davisiana*' nın ekstraktlarında mevcut şeker bağlı flavonoidlerin HPLC-MS kromatogramlarında tespit edilen pik alanları

RT	[M-H] ⁻	Fragment	Bileşikler	DDH-H	DDT-H	DDE-H
17,9	639	477; 315	I-diheksos-1	2,40	12,37	G
19,8	477	161	Tanımlanamadı	6,50	19,00	G
22,8	477	315	I-heksoz-1	52,05	249,67	G
24,9	477	315	I-heksoz-2	16,93	62,59	G
26,9	461	285	L-glukuronit	G	23,76	G
28,7	491	315; 300	I-glukuronit-2	G	22,24	G
33,2	475	299	Kr-glukuronit-1	14,36	G	G
34,2	475	299; 284	Kr-glukuronit-2	5,27	G	G
35,5	475	299	Kr-glukuronit-3	17,68	14,67	G
36,78	505	329; 315	Ramnazin-glukuronit	12,08	39,49	G
43,15	459	285; 268	K-kuinik asit	45,04	19,74	11,87
44,07	489	315; 285	I-kuinik asit	220,96	6,39	G
44,85	489	299;285	K-asetilglukozit-1	G	65,90	25,46
45,38	519	329; 315	I-asetilglukozit-1	G	19,61	G
			Toplam	393,27	555,43	37,32

I: İsorhamnetin, Ku: Kuersetin, L: Luteolin, Kr: Kamferid, K: Kamferol, G: Gözlenmedi

Tablo 21. *Digitalis lamarckii*' nin ekstraktlarında mevcut şeker bağlı flavonoidlerin HPLC-MS kromatogramlarında tespit edilen pik alanları

RT	[M-H] ⁻	Fragment	Bileşikler	DLA-H	DLE-H
17,9	639	477; 315	I-diheksöz-1	3,71	G
19,8	477	161	Tanımlanamadı	7,90	G
21,88	639	477	I-diheksöz-2	2,92	G
22,8	477	315	I-heksöz-1	71,70	G
24,9	477	315	I-heksöz-2	15,99	G
25,3	447	285	L-heksöz	G	7,29
26,9	461	285	L-glukuronit	9,86	G
28,7	491	315; 300	I-glukuronit-2	28,89	17,50
29,86	431	285	L-deoksiheksöz	4,38	G
34,2	475	299; 284	Kr-glukuronit-2	49,52	23,61
35,5	475	299	Kr-glukuronit-3	132,59	125,78
36,78	505	329; 315	ramnazin-glukuronit	56,88	89,87
43,15	459	285; 268	K-kuinik asit	158,61	55,35
44,07	489	315; 285	I-kuinik asit	139,88	132,98
44,85	489	299;285	K-asetilglükozit-1	125,78	164,63
45,38	519	329; 315	I-asetilglükozit-1	94,06	191,79
			Toplam	902,67	808,80

I: İsorhamnetin, Ku: Kuersetin, L: Luteolin, Kr: Kamferid, K: Kamferol, G: Gözlenmedi

Tablo 22. *Digitalis cariensis*'in ekstraktlarında mevcut şeker bağlı flavonoidlerin HPLC-MS kromatogramlarında tespit edilen pik alanları

RT	[M-H] ⁻	Fragment	Bileşikler	DCH-H	DCT-H	DCE-H
17,9	639	477; 315	I-diheksöz-1	G	0,92	G
22,8	477	315	I-heksöz-1	G	4,32	G
25,3	447	285	L-heksöz	G	3,43	G
28,7	491	315; 300	I-glukuronit-2	4,78	G	G
28,1	193		trans ferulik asit	G	13,39	G
29,9	431	285	L-deoksiheksöz	G	4,25	G
32,2	461	299	Kr-heksöz	G	8,07	G
34,2	475	299; 284	Kr-glukuronit-2	40,30	38,21	13,43
35,5	475	299,1	Kr-glukuronit-4	33,10	30,05	73,40
36,8	505	329; 315	ramnazin-glukuronit	30,87	17,95	112,55
37,4	285		fisetin	37,86	G	G
43,2	459	285; 268	K-kuinik asit	111,50	211,25	30,55

Tablo 22' nin devamı

RT	[M-H] ⁻	Fragment	Bileşikler	DCH-H	DCT-H	DCE-H
44,1	489	315; 285	I-kuinik asit	151,82	317,41	63,66
44,9	489	299;285	K-asetilglikozit-1	55,65	G	105,53
45,4	519	329; 315	I-asetilglikozit-1	34,94	51,03	129,20
			Toplam	500,82	700,28	528,32

I: İsorhamnetin, Ku: Kuersetin, L: Luteolin, Kr: Kamferid, K: Kamferol, G: Gözlenmedi

Tablo 23. *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii*' nin doku kültürü örneklerinin pH=2' de elde edilen ekstraktlarının şeker bağlı flavonoidlerinin HPLC-MS kromatogramlarında tespit edilen pik alanları

RT	[M-H] ⁻	Fragment	Bileşikler	KS	KFY	KYe	KK	KFS
18,7	639	477; 315	I-diheksoz-1	4,48	1,21	9,10	G	G
20,9	639	477	I-diheksoz-2	1,36	0,50	2,37	G	G
22,5	463	301	Ku- heksoz	1,94	G	3,61	G	0,47
22,9	477	301	Ku-glukuronit-1	1,18	G	1,22	1,04	G
23,6	477	315	I-heksoz-1	22,43	1,36	33,61	G	G
25,5	477	315	I-heksoz-2	2,61	G	5,29	G	G
25,9	447	285	L-heksoz	15,30	2,88	17,28	G	4,18
26,8	461	285	L-glukuronit	13,79	4,66	12,88	1,28	4,67
27,6	477	315	I-heksoz-3	2,88	G	1,19	G	0,68
28,6	491	315; 300	I-glukuronit-1	4,56	1,55	2,10	G	0,62
29,3	491	315; 300	I-glukuronit-2	2,08	G	3,79	G	G
30,3	431	285	L-deoksiheksoz	0,57	G	1,31	G	0,28
31,9	445	269	apigenin-glukuronit	G	1,00	1,04	G	0,08
32	461	299	Kr-heksoz	2,39	1,11	1,44	G	0,08
33,5	475	299	Kr-glukuronit-1	5,40	5,67	G	1,20	G
35,5	475	299; 284	Kr-glukuronit-2	G	2,04	4,29	G	G
36,6	475	299	Kr-glukuronit-4	47,89	4,82	56,35	G	5,17
37,5	505	329; 315	Ramnazin-glukuronit	18,66	1,46	15,99	G	0,42
44,4	459	285; 268	K-kuinik asit	2,21	6,35	1,78	G	G
45,2	489	315,;285	I-kuinik asit	2,43	11,10	1,56	G	G
46,3	489	299	K-asetilglikozit	4,52	G	3,88	G	G
47,0	519	329; 313	I-asetilglikozit	0,84	G	3,17	G	G
			Toplam	157,55	45,72	183,25	3,52	16,65

I: İsorhamnetin, Ku: Kuersetin, L: Luteolin, Kr: Kamferid, K: Kamferol, G: Gözlenmedi

3.6. *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii* Bitkisindeki Kardiyak Glikozitlerinin HPLC-DAD Analizleri

Digoksinin, gitoksinin, Lanatosit C, digoksin ve digitoksin olarak beş kardenolit standardının HPLC-DAD sisteminde analiz edilebilmeleri için tekrarlanabilirlik ve değişen konsantrasyona karşı doğrusal cevapların elde edildiği bir metot optimize edilmiştir. Tablo 24’ de standart kardiyak glikozitleri kullanılarak HPLC-DAD analizinde optimizasyon verileri görülmektedir. Metot bitki ekstraktlarında kardenolitlerin analizi için uygun bulunmuş ve *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii* bitkisinin yaprak, çiçek ve petiyol kısımlarından elde edilen ekstraktlar bu koşullarda analiz edilmiştir. Tablo 25’ de sonuçlar ekstraktaki standardın mg/L cinsinden miktarı ve 1 kg kuru bitki materyaline karşılık gelen mg kardenolit miktarı olarak verilmiştir.

Tablo 24. Kullanılan standart maddelere ait alıkonma zamanları (RT) ve pik alanlarına ait değerler. Ölçümler 5 mg/L’ lik karışımlar hazırlanarak 10 tekrarlı yapılmıştır (\pm SS, standart sapma).

Kardenolitler	RT \pm SS	Alan \pm SS	LOD (mg/L)
Digoksinin	5,41 \pm 0,04	163,99 \pm 10,03	0,20
Gitoksinin	13,49 \pm 0,07	151,39 \pm 14,88	0,30
Lanatosit C	18,48 \pm 0,11	58,98 \pm 7,26	0,40
Digoksin	19,09 \pm 0,11	86,95 \pm 10,54	0,38
Digitoksin	31,45 \pm 0,06	92,82 \pm 14,33	0,50

Tablo 25. Ağustos 2008’de toplanan *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii* türüne ait çeşitli bitki kısımlarına ait ticari ve tıbbi öneme sahip kardenolitlerin analizleri (her bir uygulama üç tekrarlı olarak analiz edilmiştir)

Bitki kısımları	Lanatosit C		Digoksin		Digitoksin	
	mg/L	mg/kg KA* (\pm SS)	mg/L	mg/kg KA* (\pm SS)	mg/L	mg/kg KA* (\pm SS)
Yaprak (lamina)	86,14	861,4 \pm 74,7	20,8	208,0 \pm 30,1	15,43	154,3 \pm 23,3
çiçek	21,31	213,1 \pm 26,9	9,88	98,8 \pm 20,6	7,4	74,0 \pm 15,2
Petiyol	14,82	148,2 \pm 20,8	3,63	36,3 \pm 10,7	1,58	15,8 \pm 3,3
Toplam	122,27	1222,7	34,31	343,1	24,41	244,1

\pm SS: standart sapma

*: mg/kg KA: 1 kg kuru bitki materyaline karşılık gelen mg kardenolit miktarı

3.7. Bitki Ekstraktlarında Spektrofotometrik Toplam Fenolik Madde Tayini

Digitalis türlerinin doğrudan metanol ekstraktlarının spektrofotometrik toplam fenolik madde tayini sonuçları gallik asit ve kateşin ekivalent olarak Tablo 26' da verilmiştir. Burada birim, mg toplam fenolik /g numune olarak kullanılmıştır.

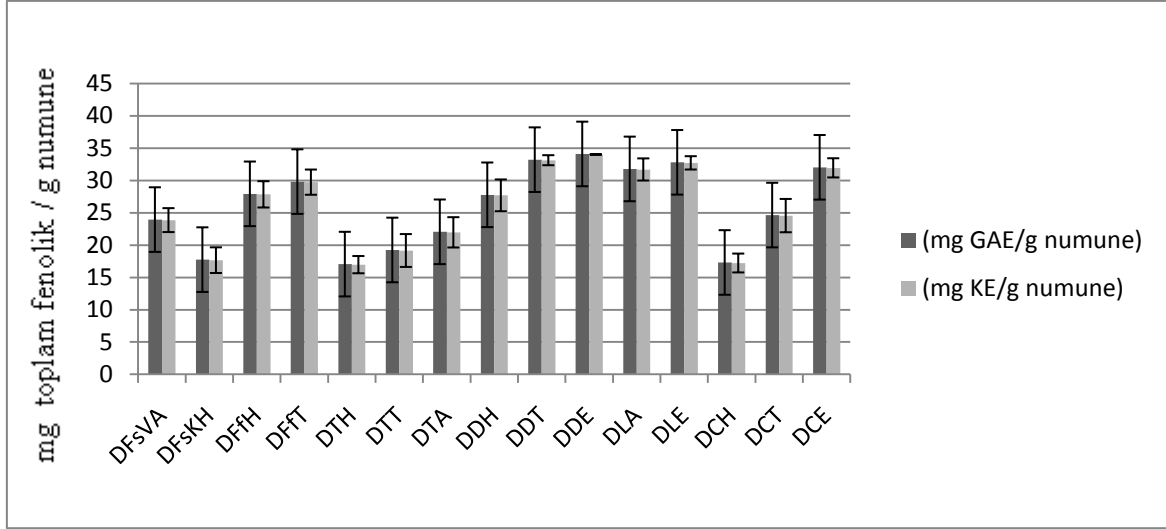
Tablo 26. Doğrudan metanol ekstraktlarında spektrofotometrik toplam fenolik madde tayininin gallik asit ve kateşin eşdeğeri cinsinden sonuçları

No	Numuneler	(mg GAE/g numune)	(mg KE/g numune)
1	DFsVA	23,944 (±1,853)	23,862 (±1,853)
2	DFsKH	17,745 (±1,986)	17,663 (±1,986)
3	DFfH	27,932 (±2,035)	27,850 (±2,035)
4	DFfT	29,823 (±1,952)	29,741 (±1,952)
5	DTH	17,051 (±1,335)	16,968 (±1,335)
6	DTT	19,240 (±2,543)	19,158 (±2,543)
7	DTA	22,053 (±2,346)	21,971 (±2,346)
8	DDH	27,781 (±2,461)	27,698 (±2,461)
9	DDT	33,219 (±0,775)	33,137 (±0,775)
10	DDE	34,105 (±0,047)	34,022 (±0,047)
11	DLA	31,786 (±1,713)	31,704 (±1,713)
12	DLE	32,809 (±1,031)	32,727 (±1,031)
13	DCH	17,304 (±1,458)	17,222 (±1,458)
14	DCT	24,643 (±2,578)	24,561 (±2,578)
15	DCE	32,035 (±1,484)	31,953 (±1,484)

mg GAE/g numune: mg Gallik asit eşdeğeri/ g numune

mg KE/g numune: mg Kateşin eşdeğeri/ g numune

Verilerin daha anlaşılır olması için her bir tür için toplam fenolik madde miktarlarının dağılımları Şekil 54' de grafik halinde gösterilmiştir.



Şekil 54. Türlerin direk metanol ekstraktlarının spektrofotometrik toplam fenolik madde tayininin gallik asit ve kateşin eşdeğeri cinsinden sonuçları

HPLC-UV ve HPLC-MS analiz sonuçları ile toplam fenolik madde tayininin sonuçları arasında bir karşılaştırma yapabilmek açısından pH=2' de ve hidrolizden sonra sıvı-sıvı seçimli ekstraksiyonunun uygulandığı numunelerde de toplam fenolik madde tayini yapılmıştır. pH=2' deki ekstraktların toplam fenolik madde tayini sonuçları Tablo 27' de ve grafik halinde Şekil 54,'de verilmiştir.

Tablo 27. Spektrofotometrik toplam fenolik madde tayininin pH=2' de ektstrakte edilen örneklerde gallik asit ve kateşin eşdeğeri cinsinden sonuçları

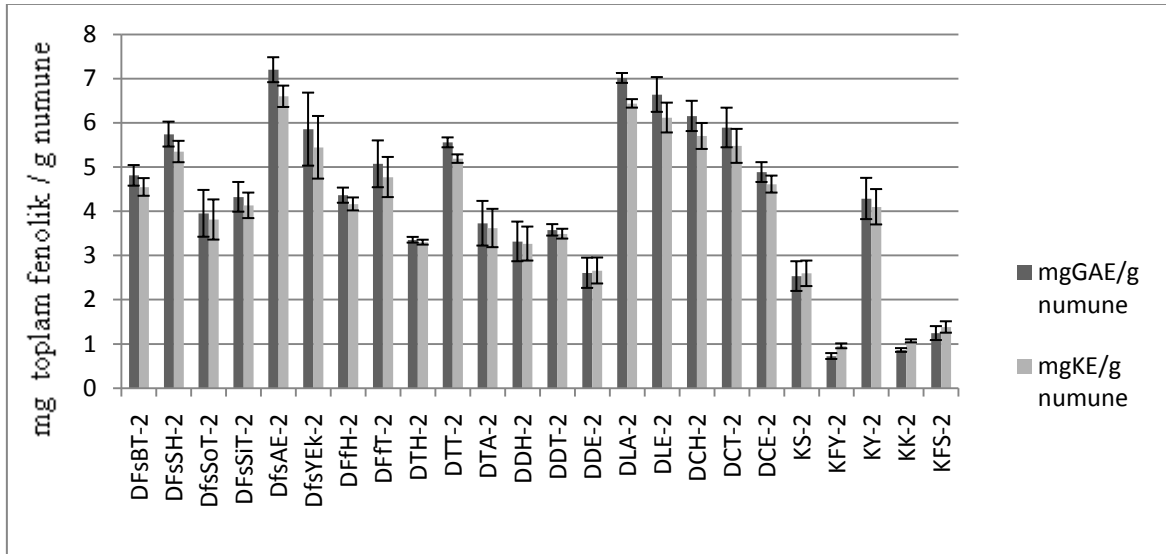
No	Numuneler (pH=2)	mgGAE/g numune	mgKE/g numune
1	DFsBT-2	4,808 (±0,233)	4,547 (±0,200)
2	DFsSH-2	5,742 (±0,282)	5,347 (±0,242)
3	DfsSoT-2	3,950 (±0,529)	3,810 (±0,454)
4	DFsSiT-2	4,323 (±0,336)	4,131 (±0,288)
5	DfsAE-2	7,198 (±0,282)	6,596 (±0,242)
6	DfsYEK-2	5,854 (±0,826)	5,443 (±0,708)
7	DFfH-2	4,360 (±0,171)	4,163 (±0,147)
8	DFfT-2	5,070 (±0,529)	4,771 (±0,454)
9	DTH-2	3,352 (±0,065)	3,298 (±0,055)
10	DTT-2	5,555 (±0,112)	5,187 (±0,096)
11	DTA-2	3,726 (±0,505)	3,618 (±0,433)
12	DDH-2	3,315 (±0,448)	3,266 (±0,384)
13	DDT-2	3,576 (±0,129)	3,490 (±0,111)

Tablo 27' nin devamı

No	Numuneler (pH=2)	mgGAE/g numune	mgKE/g numune
14	DDE-2	2,606 (\pm 0,342)	2,658 (\pm 0,293)
15	DLA-2	7,011 (\pm 0,112)	6,436 (\pm 0,096)
16	DLE-2	6,638 (\pm 0,393)	6,116 (\pm 0,337)
17	DCH-2	6,152 (\pm 0,342)	5,699 (\pm 0,293)
18	DCT-2	5,891 (\pm 0,448)	5,475 (\pm 0,384)
19	DCE-2	4,883 (\pm 0,224)	4,611 (\pm 0,192)
20	KS-2	2,531 (\pm 0,336)	2,594 (\pm 0,288)
21	KFY-2	0,724 (\pm 0,067)	0,954 (\pm 0,055)
22	KYe-2	4,286 (\pm 0,466)	4,098 (\pm 0,400)
23	KK-2	0,860 (\pm 0,042)	1,066 (\pm 0,035)
24	KFS-2	1,243 (\pm 0,157)	1,380 (\pm 0,129)

mg GAE/g numune: mg Gallik asit eşdeğeri/ g numune

mg KE/g numune: mg Kateşin eşdeğeri/ g numune



Şekil 55. Spektrofotometrik toplam fenolik madde tayininin pH=2' de ekstrakte edilen örneklerde gallik asit ve kateşin eşdeğeri cinsinden sonuçları

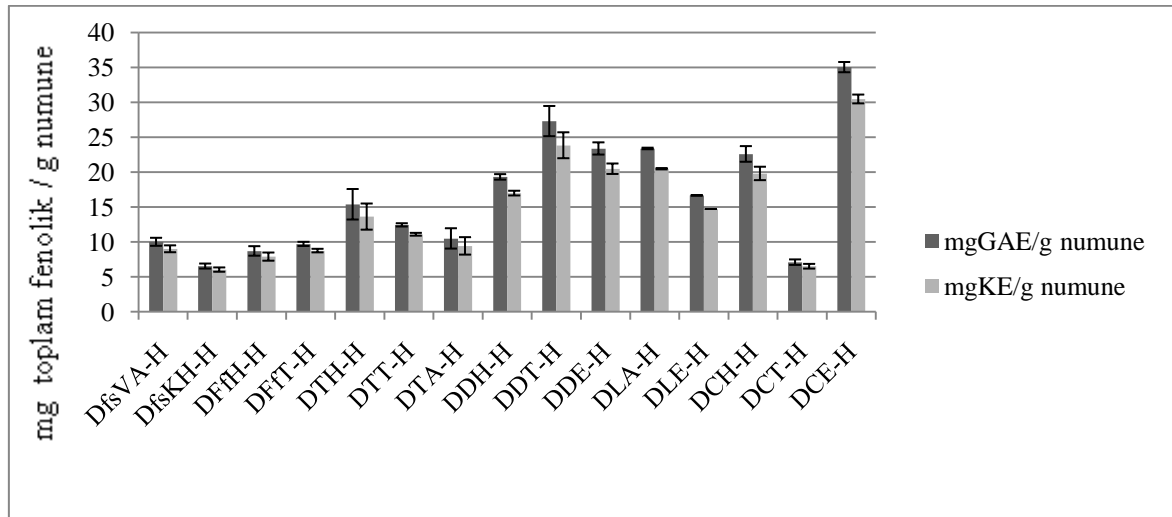
Hidrolizli ekstraktların toplam fenolik madde tayini sonuçları Tablo 28' de ve grafik halinde Şekil 56' da verilmiştir.

Tablo 28. Hidroliz edilen örneklerdeki spektrofotometrik toplam fenolik madde tayininin gallik asit ve kateşin eşdeğeri cinsinden sonuçları

No	Numuneler (hidroliz)	mgGAE/g numune	mgKE/g numune
1	DfsVA-H	9,998 ($\pm 0,575$)	8,997 ($\pm 0,493$)
2	DfsKH-H	6,526 ($\pm 0,360$)	6,020 ($\pm 0,309$)
3	DFfH-H	8,691 ($\pm 0,681$)	7,877 ($\pm 0,584$)
4	DFfT-H	9,699 ($\pm 0,296$)	8,741 ($\pm 0,254$)
5	DTH-H	15,373 ($\pm 2,184$)	13,608 ($\pm 1,873$)
6	DTT-H	12,424 ($\pm 0,233$)	11,079 ($\pm 0,200$)
7	DTA-H	10,483 ($\pm 1,456$)	9,414 ($\pm 1,249$)
8	DDH-H	19,293 ($\pm 0,393$)	16,970 ($\pm 0,337$)
9	DDT-H	27,282 ($\pm 2,163$)	23,822 ($\pm 1,855$)
10	DDE-H	23,363 ($\pm 0,875$)	20,460 ($\pm 0,750$)
11	DLA-H	23,363 ($\pm 0,112$)	20,460 ($\pm 0,096$)
12	DLE-H	16,643 ($\pm 0,000$)	14,697 ($\pm 0,000$)
13	DCH-H	22,579 ($\pm 1,120$)	19,788 ($\pm 0,961$)
14	DCT-H	7,086 ($\pm 0,393$)	6,500 ($\pm 0,337$)
15	DCE-H	35,010 ($\pm 0,734$)	30,450 ($\pm 0,630$)

mg GAE/g numune: mg Gallik asit eşdeğeri/ g numune

mg KE/g numune: mg Kateşin eşdeğeri/ g numune



Şekil 56. Hidroliz edilen örneklerdeki spektrofotometrik toplam fenolik madde tayininin gallik asit ve kateşin eşdeğeri cinsinden sonuçları

4. TARTIŞMA

4.1. Fenolik Bileşiklerin Analizi İçin HPLC-UV Metot Optimizasyonu

Optimize edilen RP-HPLC-UV metodu kullanılarak 17 standart fenolik bileşiğin analizine bir örnek Şekil 11’ de görülmektedir. Metot, 40 dakika içinde tüm analitlerin uygun bir şekilde ayrılmasını sağladı. Düşük konsantrasyonlarda alıkonma zamanlarının ve pik alanının tekrarlanabilirliği kabul edilebilir değerlerde bulundu (Tablo 5). Ayrıca tüm 17 standardın kalibrasyonlarından doğrusal cevaplar ($R^2=0.999$) elde edildi. Tüm standartlar için LOD değerleri 0,11 mg/L’ nin altında ve LOQ değeri ise 0,31 mg/L’ nin altında bulunmuştur ki bu değerler bitki materyallerinde fenolik bileşiklerin belirlenmesi için yeterlidir.

4.2. HPLC-UV-MS Metot Optimizasyonu

HPLC-UV-MS analizlerinde gallik asit, protokatekuik asit, *p*-OH benzoik asit, kateşin, vanilik asit, klorojenik asit, kafeik asit, siringik asit, epikateşin, *p*-kumarik asit, ferulik asit, rutin, kuersetin, luteolin, apigenin, kamferol ve ramnetin olarak kullanılan 17 fenolik madde standardı için elde edilen pik çözünürlükleri kalitatif analiz için uygun bulunmuştur (Şekil 12). Uygulanan kromatografik koşullar optimize edilerek ilgili standartların tam olarak ayrımını sağlayan kromatogram elde edilmesine karşın bu standartların kantitatif değerlendirmesi yapılamamıştır.

4.3. Bitki Örneklerinden Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonunun Optimizasyonu

Farklı ekstraksiyon koşulları için belirlenen geri kazanım verilerini içeren Tablo 6 ve Şekil 13’ e bakıldığında ortam pH’ sının her standart üzerinde farklı etki yaptığı görülmektedir. Özellikle seçimli ekstraksiyon ve pH değişiminin uygulandığı veriler dikkate alındığında benzoik asit türevleri olan gallik asit, protokatekuik asit, *p*-OH benzoik asit, vanilik asit ve siringik asit için asitliğin hidroliz koşulları dışında ekstraksiyona önemli bir etkisinin olmadığı gözlenmektedir. Öte yandan hidrolizde gallik asit, vanilik asit ve siringik asitin geri kazanımlarının düştüğü gözlenmektedir. Sinamik asit türevi olan

klorojenik asit, kafeik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit ve *o*-kumarik asidin ise birbirlerinden oldukça farklı cevapları gözlenmiştir. Kafeik asit, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit ve ferulik asit hidroliz ile belirgin şekilde artarken, klorojenik asitte, pH düşüşü ile artan ancak hidroliz ile azalan geri kazanım verileri elde edilmiştir. Kateşin ve epikateşin gibi flavanollerin ekstraksiyon geri kazanımları ise pH' nın düşmesi ile doğru orantılı olarak düşüş göstermiştir. Flavonol türevleri olan rutin ve kuersetinin pH düşüşü ve seçimli ekstraksiyon ile geri kazanımlarının düşmekte olduğu gözlenmiştir.

Sonuçlara göre mevcut standartlar düşünüldüğünde metanolik ekstraktların doğrudan analizini temsil eden ilk sütündeki verilere göre pH değişimi ve seçimli ekstraksiyona gerek kalmaksızın numunelerin analiz edilip edilemeyeceği düşünüldüğünde, metanolik ekstraktların pek çok diğer ikincil metabolit gruplarını da içermeleri yüzünden kromatogramlarının çok kalabalık olması analizleri güçleştirdiği ve sonuçların güvenilirliğini düşürdüğü için seçimli ekstraksiyona gereksinim duyulacağı açıktır (Endale, vd. 2005; Kim vd., 2006; Kader vd., 1996). Ayrıca bitkilerin daha önce analiz edilen örneklerinden kafeik asit, ferulik asit, *p*-kumarik asit ve bunların hidroliz ile kırılabilen türevlerinin numunelerde esas bileşen olarak gözlenmesi ve elimizde rutin dışında şeker grubu içeren fenolik bileşiklerin standartları bulunmadığından asit hidrolizi ve sonucunda da numunelerin seçimli olarak ekstraksiyona tabi tutulmalarına karar verilmiştir. Hidroliz işleminin gerekliliği ile ilgili çalışmalar literatürde mevcuttur (Nuutila A.M. vd., 2002; Häkkinen S., 2000).

Digitalis trojana' nın Temmuz ayı örneğine ait doğrudan metanolik ekstraktının HPLC-UV (280nm) ve HPLC-MS kromatogramlarında da görüldüğü gibi kalabalık bir pik profilinin yanı sıra kromatogram baseline çizgisinde meydana gelen yükselme piklerin doğru karakterizasyonunu ve kantitatif analizi güçleştirmekte ve hatta sonuçların güvenilirliğini düşürmektedir (Şekil 14). Öte yandan *Digitalis trojana*' nın Temmuz ayı örneğine ait asit hidrolizli ve pH=2' deki ekstraktların HPLC-UV kromatogramlarına (Şekil 15) bakıldığında dietil eter ve etil asetat ile ardışık olarak uygulanan seçimli ekstraksiyonun kromatogramda baseline çizgisinin düzleşmesi ve piklerin çözünürlüklerinin artmasına olanak sağladıkları gözlenmektedir. Kromatogramlardan yine hidroliz sonucu elde edilen örneğin pH=2' ye göre daha yüksek miktarda fenolik bileşim içerdiği de gözlenmektedir.

Digitalis trojana' nın Haziran ayı örneğine ait asit hidrolizli ve pH=2' de elde edilen ekstraktlarının HPLC-UV ve HPLC-MS kromatogramları (Şekil 16) ve Ağustos ayı

örneklerine ait asit hidrolizli ve pH=2' deki ekstraktlarının HPLC-UV kromatogramları (Şekil 17), hidroliz sonucu numunelerde mevcut olabilecek fenolik bileşik türevlerinin parçalanmaları sebebi ile daha fazla miktarda fenolik bileşimin tespit edildiğini göstermiştir.

Tüm bu sonuçlar ışığında hem sıvı-sıvı seçimli ekstraksiyonun hem de hidrolizin *Digitalis* türlerindeki fenolik bileşimin belirlenmesi açısından uygun olduğu görülmüştür. Böylece asidik hidrolizin ardından seçimli ekstraksiyon uygulanması ile aynı şekilde ekstrakte edilen örneklerin fenolik bileşimlerinin türden türe ve mevsimsel olarak değişimleri HPLC-UV yöntemi ile hem kalitatif hem kantitatif olarak ve HPLC-MS yöntemi ile kalitatif olarak karşılaştırılmıştır. Bunun yanısıra kütle spektrometresi ile fenolik bileşiklerin türevlerinin hidroliz ile bozulmaksızın bitkideki orjinal yapıları ile karakterize edilebilecekleri düşünülerek hem doğrudan ekstraksiyon örneklerinde hem de pH=2 ortamında ekstraksiyonu gerçekleştirilen örneklerin içeriğinin hidroliz ile değişiminin gözlenmesi için kütle spektrometresinin (MS) sağladığı yapısal aydınlatma avantajlarından faydalanılmıştır. Ayrılan bileşenlerin kütle spektrumları kalitatif analiz için çok büyük bir üstünlük ve kolaylık sağlamaktadır. Ayrıca elektrosprey iyonlaşma (ESI) ile bu türlerin yapısal aydınlatılması da ilk kez bu çalışmada gerçekleştirilmiştir.

4.4. Bitki Ekstraktlarında Fenolik Bileşiklerinin HPLC-UV Analizleri

Türlerden *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii*' nin çeşitli yerlerden farklı zamanlarda toplanan örnekleri ve diğer türlerin kendi içlerinde aynı yerden fakat farklı zamanlarda toplanan örneklerinin ekstraktları ayrı ayrı incelenmiştir. Böylece *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii*' nin toplanma yeri ve zamanına göre ve diğer türlerin ise toplanma zamanlarına göre fenolik bileşik içeriklerindeki değişim takip edilmiştir. Aslında bu tür bir karşılaştırmanın daha sağlıklı olarak yapılması için çalışılan türün aynı koşullarda ve aynı iklimde yetiştirilerek eş zamanlı olarak toplanıp çalışılması gerekir. Zira bitkinin ürettiği birincil veya ikincil kimyasallar, toprak yapısı, iklim, yağış rejimi gibi faktörlere doğrudan bağlıdır. Bu çalışmada sadece farklı zamanlarda örnekleme yapılması hedeflenmiş olup mevsimsel değişim çok detaylı olarak incelenmemiştir. Zaten örneklerin toplanma zamanlarındaki farklılıklarda bunu yansıtmaktadır.

4.4.1. *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii* Bitkisinin HPLC-UV Analizleri

Ekstraktlardaki fenolik bileşimin yer ve zamana göre değişimini incelemek için Rize, Trabzon ve Bolu' dan çeşitli aylarda toplanan örneklerin analiz sonuçları Tablo 7 ve Şekil 18' de verilmiştir. Rize'nin Verçenik Yayla' sı ve Kaptanpaşa Köyü' ne ait hidrolizli ekstraktlarda HPLC-UV analiz sonuçlarına göre kafeik asitin belirgin şekilde en bol bulunan fenolik bileşik olduğu gözlenmektedir (Tablo 7 ve Şekil 18). *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii*' nin hidrolizsiz ekstraktlarında en bol fenolik asidin *p*-OH benzoik asit olduğu gözlenmektedir. Tüm *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii* örneklerinin pH=2' deki ekstraktlarını karşılaştırdığımızda Abelat yaylası örneğinin *p*-kumarik asit ve ferulik asit açısından en bol örnek olduğu, diğerlerinin ise toplanma yerleri arasında mevcut fenolik asitler açısından önemli farkların olmadığı, oldukça benzer miktarlarda oldukları gözlenmektedir. Bitkilerin toplandıkları yerlerin deniz seviyesinden yüksekliklerinin *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii* bitkisinin fenolik bileşimi açısından etkili bir faktör olmadığı gözlenmiştir.

Digitalis ferruginea ssp. *schischkinii* bitkisinin arazi örnekleri ile doku kültürü örneklerinin pH=2 ortamında elde edilen ekstraktlarının HPLC-UV analizlerini karşılaştırdığımızda ferulik asitin doku kültürü örneklerinde ve özellikle farklılaşmamış siyah ve yeşil (KS, KYe) örneklerde çok daha bol bulunduğu tespit edilmiştir. Kafeik asit ve *p*-kumarik asit ise doku kültürü örneklerinde arazi örneklerine nisbeten daha az miktarda gözlenmiştir.

4.4.2. *Digitalis ferruginea* ssp. *ferruginea* Bitkisinin HPLC-UV Analizleri

Digitalis ferruginea ssp. *ferruginea* bitkisinin Haziran ve Temmuz aylarına ait örneklerinin hidrolizli ekstraksiyonlarına bakıldığında yaklaşık aynı miktarda kafeik asit içerirlerken *p*-kumarik asitin Temmuz ayı ferulik asitin de Haziran ayı örneklerinde daha fazla bulunduğu gözlenmektedir (Tablo 8 ve Şekil 19). Öte yandan pH=2' deki ekstraktlar fenolik içeriğine bakıldığında Haziran ayı örneklerinde üç fenolik asitin de Temmuz ayı örneklerinden daha fazla olduğu gözlenmektedir.

4.4.3. *Digitalis trojana* Bitkisinin HPLC-UV Analizleri

Digitalis trojana bitki örneklerinin Haziran, Temmuz ve ağustos aylarına ait hidrolizli ekstraktlarının HPLC-UV analiz sonuçlarına bakıldığında ağustos ayı örneklerinin fenolik bileşiminin daha zengin olduğu görülmektedir (Tablo 9 ve Şekil 20). Bitkinin pH=2' deki ekstraktlarına bakıldığında Haziran ayında kafeik asit, Temmuz ayında ferulik asit ve ağustos ayında *p*-kumarik asitin en bol bulunan fenolik asit olduğu gözlenmektedir ve Temmuz ve Ağustos ayı örneklerinin çok daha zengin olduğu gözlenmektedir.

4.4.4. *Digitalis davisiana* Bitkisinin HPLC-UV Analizleri

Digitalis davisiana bitkisinin Haziran, Temmuz ve Eylül aylarına ait hidrolizli ve hidrolizsiz ekstraktlarının HPLC-UV analiz sonuçlarına bakıldığında Haziran ayı örneklerinin her iki tip ekstraksiyonda da en bol fenolik bileşime sahip olan örnekleri olduğu gözlenmektedir (Tablo 10 ve Şekil 21). Hidrolizli ekstraktlarda kafeik asit en bol bileşen iken hidrolizsiz ekstraktlarda diğer iki fenolik aside nispeten daha az miktarda bulunmaktadır.

4.4.5. *Digitalis lamarckii* Bitkisinin HPLC-UV Analizleri

Ağustos ve Eylül aylarında toplanan *Digitalis lamarckii* bitkisinin HPLC-UV analiz sonuçlarına bakıldığında Ağustos ayı hidrolizli ekstraktında çok yüksek miktarda kafeik asit ve yine yüksek miktarlarda *p*-kumarik ve ferulik asitin bulunduğu görülmektedir. Ağustos ayı ekstraktlarında Eylül ayına nispeten oldukça fazla miktarda fenolik asit bulunduğu gözlenmektedir (Tablo 11 ve Şekil 22).

4.4.6. *Digitalis cariensis* Bitkisinin HPLC-UV Analizleri

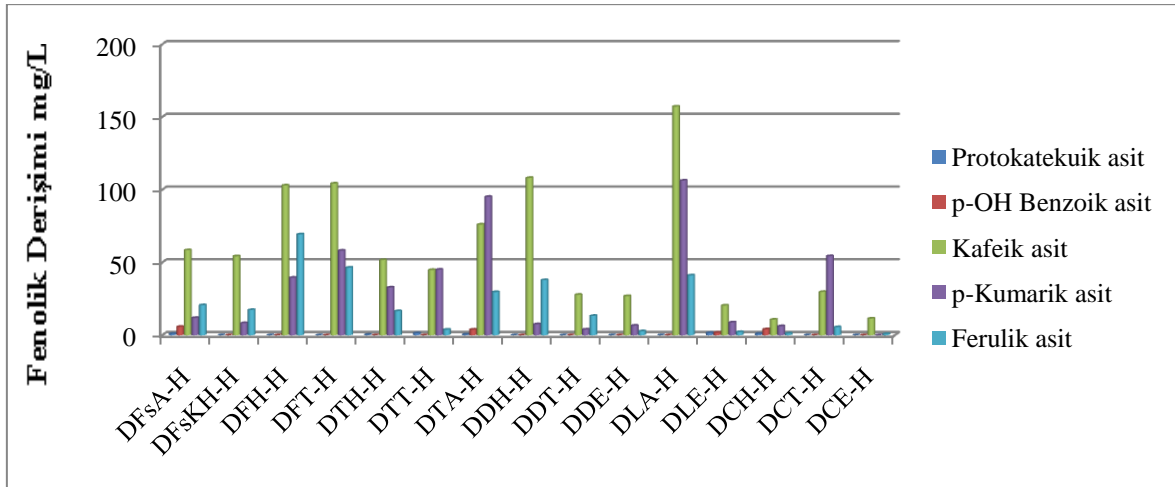
Digitalis cariensis bitkisinin Haziran, Temmuz ve Eylül ayı hidrolizli ve hidrolizsiz ekstraktlarına ait HPLC-UV analiz sonuçları incelendiğinde Temmuz ayı hidrolizli örneğin en bol fenolik asit içeriğine sahip ekstrakt olduğu görülmektedir. Kafeik asitin hidrolizli ekstraktlarda genel olarak bol bulunduğu ancak Temmuz ayı ekstraktında en bol bulunan bileşenin *p*-kumarik asit olduğu görülmektedir (Tablo 12 ve Şekil 23).

4.4.7. *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii* Bitkisinin Doku kültürü Örneklerinin HPLC-UV Analizleri

Digitalis ferruginea ssp. *schischkinii* bitkisinden üretilen doku kültürlerinin pH=2’ de elde edilen ekstraktlarındaki fenolik bileşiklerin HPLC-UV analizleri sonucunda ferulik asitin en bol gözlenen fenolik asit olduğu gözlenmektedir. Kültür örnekleri aralarında en bol fenolik bileşen içeriğine sahip olan farklılaşmamış yeşil (KYe) ve bunu takiben de farklılaşmamış siyah (KS) doku kültürleri olduğu gözlenmektedir (Tablo 13 ve Şekil 24).

4.4.8. *Digitalis* Türlerinde Fenolik Bileşiklerin HPLC-UV Analizlerinin Karşılaştırılması

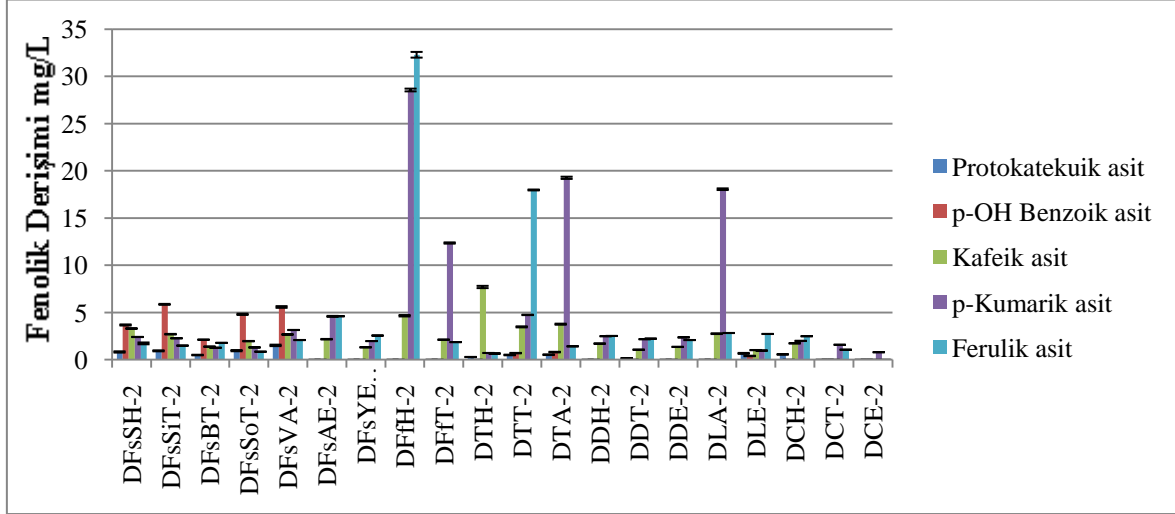
Önceki başlıklarda ayrı ayrı incelenen *Digitalis* türlerinin tür, ay ve yüksekliğe göre fenolik bileşimin değişiminin karşılaştırılması için türlerin hidrolizli örneklerindeki fenolik bileşiklerin HPLC-UV analiz sonuçları Şekil 57’ de verilmiştir.



Şekil 57. *Digitalis* türlerinin hidrolizli örneklerindeki fenolik bileşiklerin HPLC-UV analiz sonuçları

Çalışılan tüm *Digitalis* türlerinde kafeik asitin en yüksek miktarda bulunduğu ve *Digitalis lamarckii*’ nin Ağustos ayı örneğinde de diğer türlere göre en bol miktarda olduğu HPLC-UV sonuçlarına göre tespit edilmiştir. Genel olarak fenolik bileşimin belli bir ayda arttığını veya diğer aylara göre genel olarak daha yüksek olduğunu söylemek mevcut sonuçlara göre zor olsa da Eylül ayı örneklerinde diğer aylara nispeten düşük miktarda fenolik bileşim bulunduğu söylenebilir (Şekil 57).

Tür, ay ve yüksekliğe göre fenolik bileşimlerin karşılaştırılması pH=2' de ekstraktlanan örneklerin verileri için de yapılmış olup Şekil 58' de gösterilmiştir.



Şekil 58. *Digitalis* türlerinin pH=2' deki ekstraktlarındaki fenolik bileşiklerin HPLC-UV analiz sonuçları

Digitalis türlerinin hidrolizsiz ekstraktlarına bakıldığında türler arasında DFfH-2 (*Digitalis ferruginea* ssp *ferruginea*' nın Haziran ayı örneği) en zengin fenolik asit içeriğine sahip olan tür olup en bol miktarda ferulik asit içerdiği görülmektedir. Genel olarak bakıldığında *p*-kumarik asit ve ferulik asit hidrolizsiz ekstraktlarda ana fenolik asitler olarak görülmektedir (Şekil 58).

4.5. Bitki Ekstraktlarında Fenolik Bileşiklerinin HPLC-UV-MS Analizleri

HPLC-UV sistemine (Waters) bağlı bir Quattro ESI triple quadrupole mass spektrometer (Micromass) kullanılarak tam tarama modu ile yapılan analizler sayesinde:

1. *Digitalis* türlerinin fenolik bileşiminin belirlenmesi için daha önce yapılan HPLC-UV analizleri kütle dedektörü ile desteklenmiştir. HPLC sistemi ile ayrılan bileşenlerin MS dedeksiyonu aşağıda belirtilen çok önemli bazı analiz iyileştirmeleri sağlamıştır.
2. HPLC-UV ile tanımlanamayan pikler karakterize edilmiştir.
3. *Digitalis* türlerinin HPLC-MS kromatogramları HPLC-UV kromatogramlarındaki piklerin tümünü içermekle birlikte UV' de gözlenme sınırının altında olan bazı pikler de

MS sayesinde gözlenebilmiştir. Böylece UV' de gözlenmeyen veya gözlenme sınırının altına düşen bileşiklerin de analizleri MS sayesinde gerçekleştirilebilmiştir.

4. *Digitalis* türlerinde mevcut olan fenolik bileşiklerin türevleri hidroliz öncesi ve sonrasında gerçekleştirilen analizler ile karakterize edilmeye çalışılmıştır.

5. *Digitalis* türlerinin fenolik bileşimi toplanma yeri, zamanı ve türlerine göre karşılaştırılmıştır.

Örnek olarak DfsVA-H, DFsBT-2 ve DFsKH-H ekstraktlarına ait HPLC-UV ve HPLC-MS kromatogramlarının genel profillerini inceleyecek olursak hidroliz sonucunda hem erken hem de geç gelen piklerin sayıları gibi konsantrasyonlarında da belirgin artış olduğu görülmektedir (Şekil 25, 26 ve 27).

Hidrolizden sonra erken gelen piklerin esas olarak fenolik asitlerden oluştuğunun belirlenmesi asit hidrolizi ile çeşitli fenolik asit türevlerinin parçalanarak bu fenolik asit çekirdeklerinin ortaya çıktıklarını göstermektedir. Şeker grupları yüksek polarlıkları nedeniyle bağlandıkları fenolik bileşiğin daha erken elue edilmesine neden olmaktadır. Bu yüzden hidroliz sonucunda kromatogramın geç gelen kısmında pik yoğunluğunun artması, glikozidik flavonoidlerin şeker gruplarının kırılıp aglikonlarının ya da daha az sayıda şeker grubu içeren bileşiklerinin açığa çıkması ile açıklanabilir (Şekil 28 ve 29). Ancak bazı glikozidik bağların hidroliz ile tamamen kırılmadıkları da gözlenen sonuçlardandır. Her ne kadar mevcut yöntemler ile şeker grupların türleri ve bağlanma yerleri tespit edilemese de glukuronitler gibi bazı şeker gruplarının asit hidrolizine karşı dirençli oldukları bilinmektedir (Robards K. ve Antolovich M., 1997). Bu da hidrolizden önce ve sonra flavonoid-glukuronitlerin gözlenmelerinin açıklamaktadır.

Tüm bu HPLC-UV ve HPLC-MS analizleri ışığında ekstraktlarda gözlemlenen polifenolik bileşikler, fenolik asitler, flavonoid aglikonları ve flavonoid türevleri olarak üç grup halinde toplanabilir.

4.5.1. Fenolik Asitler

Erken gelen piklerin fenolik asitlerden kafeik asit, *p*-kumarik asit ve ferulik asit olduğu daha önce HPLC-UV sisteminde tespit edildiği gibi HPLC-MS sistemi ile elde edilen kütle spektrumları ile de onaylanmıştır ve Şekil 30, 31, 32, 33 ve 34' de verilmiştir. Kütle spektrumlarının değerlendirilmesinde mevcut yapıların muhtemel fragmentasyonları ve literatür verileri (Bravo vd., 2006) kullanılmıştır.

1. Protokatekuik asit: 8,21 dk. alıkonma zamanına ve 153 akb'li bir negatif iyon $[M-H]^-$ 'e sahiptir (Şekil 30). Spektrumdaki 153 m/z ve 109 m/z arasındaki 44 akb kaybı protokatekuik asidin dekarboksilasyonu sonucu $[(M-H)-CO_2]^-$ fragment iyonuna karşılık gelir.

2. *p*-OH Benzoik asit: 13,86 dk. alıkonma zamanına ve 137 akb'li bir negatif iyon $[M-H]^-$ 'e sahiptir (Şekil 31). Spektrumdaki 137 m/z ve 93 m/z arasındaki 44 akb kaybı *p*-OH benzoik asidin dekarboksilasyonu sonucu $[(M-H)-CO_2]^-$ fragment iyonuna karşılık gelir.

3. Kafeik asit: 19,41 dk. alıkonma zamanına ve 179 akb'li bir negatif iyon $[M-H]^-$ 'e sahiptir (Şekil 32). Spektrumdaki 179 m/z ve 135 m/z arasındaki 44 akb kaybı kafeik asidin dekarboksilasyonuna karşılık gelir.

4. *p*-Kumarik asit: 25,25 dk. alıkonma zamanına ve 163 akb'li bir negatif iyon $[M-H]^-$ 'e sahiptir (Şekil 33). Spektrumdaki 163 m/z ve 119 m/z arasındaki 44 akb kaybı *p*-kumarik asidin dekarboksilasyonuna karşılık gelir.

5. Ferulik asit: 28,09 dk. alıkonma zamanına ve 193 akb'li bir negatif iyon $[M-H]^-$ 'e sahiptir (Şekil 34). Spektrumdaki 193 m/z ve 149 m/z arasındaki 44 akb kaybı ferulik asidin dekarboksilasyonuna karşılık gelir.

6. Trans-ferulik asit: Fenolik asitlerde standartlar ile örtüşen yukarıdaki beş fenolik aside ilaveten standardı olmayan ancak kütle spektrumu ile tanımlanan bir fenolik asit; trans-ferulik asit olarak tanımlanmıştır. Bu tür 31,26 dk. alıkonma zamanına ve ferulik asit gibi 193 akb'li bir negatif iyon $[M-H]^-$ 'e sahiptir.

Micromass HPLC-UV-MS sistemi ile elde edilen kromatogramlardaki pik alanları türlerin fenolik bileşimlerinin karşılaştırılması için kullanılmıştır. Tablo 14' den de anlaşılacağı gibi hidrolizli örneklerde trans-ferulik asit miktarı büyük artış göstermiştir. HPLC-UV analizlerinde gözleendiği gibi HPLC-MS analizlerinde de yine kafeik asit, *p*-kumarik asit ve ferulik asidin hidroliz sonucunda artışları gözlenmiştir. Pik alanları kullanılarak ayrıca hidrolizli ve hidrolizsiz ekstraktlar arasında istatistiksel karşılaştırma yapılmış ve kafeik, *p*-kumarik ve trans-ferulik asit için T testine göre anlamlı fark bulunmuş ve sırasıyla $p=0,001$; $0,029$ ve $0,004$ değerleri bu fenolik asitlerin hidroliz ile belirgin şekilde arttıklarını göstermiştir. Ferulik asit için de Mann Whitney U testi ile anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,004$).

HPLC-MS ile hidrolizden önce ve sonraki analizler sonucunda gözlenen bu anlamlı farklar çalışılan *Digitalis* türlerinin kafeik asit, *p*-kumarik asit ve ferulik asidin yanısıra

trans-ferulik asidin de çeşitli türevlerini ihtiva ettiklerini ve asidik hidroliz sayesinde bu türevlerin parçalanarak trans-ferulik asidin oluştuğunu göstermektedir.

4.5.2. Flavonoid Aglikonları

Flavonoid aglikonları olarak fisetin, luteolin, apigenin, kamferid ve ramnazin kütle spektrumu ile karakterize edilmişlerdir. Bu aglikonların standardı olan luteolin ve apigeninin karakterizasyonları hem alıkonma zamanları hemde kütle spektrumları ile karşılaştırılarak yapılmıştır. Fisetin, kamferid ve ramnazin ise kütle spektrumları ve alıkonma davranışları literatür ile karşılaştırılarak karakterize edilmişlerdir (Marzouka vd., 1999; Fabre vd., 2001; Lai vd., 2007; Benavides vd., 2007; Petrovicu vd., 2010).

1. Fisetin: Bir flavonol olan fisetin 33,23 dk. alıkonma zamanına ve 285 akb'li bir negatif iyon $[M-H]^-$ 'e sahiptir (Şekil 35). Ters faz sıvı kromatografisinde luteolinden önce elüe edilmektedir.

2. Luteolin: Yaygın bir flavon olan luteolin 35,82 dk. alıkonma zamanı standardı ile örtüşmektedir (Şekil 36). Ekstraktlarda 285 akb'li bir negatif iyon $[M-H]^-$ ile belirlenmiştir ve 570 akb luteolinin dimerine ait fragment iyonuna karşılık gelir.

3. Apigenin: Bir flavon olan apigeninin 36,40 dk. alıkonma zamanı standardı ile örtüşmektedir (Şekil 37). Ekstraktlarda 269 akb'li bir negatif iyon $[M-H]^-$ ile belirlenmiştir ve 538 akb, apigeninin dimerine ait fragment iyonudur.

4. Kamferid: 4'-Metilkamferol olarak adlandırılan kamferid bir *O*-metil flavonoldür. Kromatogramda alıkonma davranışı ve spektrumu literatür ile karşılaştırılarak karakterize edilmiştir. Kromatogramda 36,68 dk. alıkonma zamanına ve 299 akb'li bir negatif iyon $[M-H]^-$ 'e sahiptir (Şekil 38). Fragment iyon piki olan 284 akb $[(M-H)-CH_3]^-$ iyonuna karşılık gelirken 15 akb kayıp metil grubundan kaynaklanmaktadır.

5. Ramnazin: İki metoksi grubu içeren bir *O*-metil flavonoldür. Metil gruplarının polariteyi düşürmelerinden dolayı kromatogramın en geç gelen molekülüdür. Alıkonma süresi 36,98 dk. ve 329 akb'li bir negatif iyon $[M-H]^-$ 'e sahiptir (Şekil 39). Kromatogramda alıkonma davranışı ve spektrumu literatür ile karşılaştırılarak karakterize edilmiştir.

Micromass HPLC-UV-MS sistemi ile elde edilen kromatogramlardaki pik alanları Tablo 15' de türlerin flavonoid aglikonlarının karşılaştırılması için verilmiştir. Pik alanları kullanılarak hidrolizli ve hidrolizsiz ekstraktlar arasında istatistiksel karşılaştırma

yapılmıştır. Kamferid için T testine göre, anlamlı fark bulunmuş ($p=0,000$) ve hidrolizli ekstraktlarda fazla çıkmıştır. Fisetin için Mann Whitney U testine göre fark görülmüş ($p=0,016$) ve hidrolizi tercih ettiği belirlenmiştir. Böylece bu flavonoidlerin *Digitalis* türlerinde asidik hidroliz ile kırılabilen türevleri formunda buldukları belirlenmiştir.

Digitalis ferruginea ssp *schischkinii*' nin arazi örnekleri ve doku kültürü örneklerinde mevcut flavonoid aglikonları karşılaştırıldığında doku kültürü örneklerinde çok daha küçük pik alanları gözlenmiştir. Ancak küçük pik alanlarına rağmen kalitatif olarak arazi örneklerinde belirlenen flavonoid aglikonları hemen hemen tüm kültür örneklerinde gözlenmiştir. Bu da kültürlerinin ilgili arazi örnekleri ile benzer flavonoid içeriğine sahip olduklarının bir göstergesidir. Doku kültürü örnekleri kendi içlerinde flavonoidler cinsinden karşılaştırıldığında ise farklılaşmamış yeşil (KYe) ve kökleşmiş (KK) örneklerinin en küçük pik alanlarına sahip oldukları görülmektedir.

4.5.3. Flavonoid Türevleri

HPLC-UV-ESI-MS ile full tarama modunda yalnızca moleküler iyon piki gözlenmektedir. Şekil 49, 41 ve 42' de sırasıyla DTH-2 ekstraktına ait $[M-H]^- = 461,57$, DLA-H ekstraktına ait $[M-H]^- = 477,38$ ve DDH-H ekstraktına ait $[M-H]^- = 489,43$ moleküler iyonlarını gösteren kütle spektrumları glikozidik flavonoidlere aittir. Ancak aynı kütleyle sahip olabilecek birden fazla glikozidik flavonoidin kütle spektrumları fragmentlerinin eksikliğinden dolayı aynı olacağından karakterize edilmeleri oldukça güçtür. Örneğin $[M-H]^- = 461,57$, kamferid heksoz, isorhamnetin deoksiheksoz veya ramnazin pentoz olabilir. Bunun gibi diğer moleküler iyonlarında alıkonma profillerinden hangi flavonoidin şeker bağlı türevi olduğu tahmin edilebilecek olsa da bu güçlü bir karakterizasyon sağlanamaz. Bundan dolayı Quattro ESI triple quadrupole mass spektrometer (Micromass) bağlı HPLC-UV sistemi ile HPLC-UV-ESI-MS-MS modunda moleküler iyonlara ait fragment analizi yapılmıştır. Tespit edilen fragmentler aracılığı ile pikler karakterize edilmeye çalışılmıştır. (Micromass) HPLC-UV-ESI-MS-MS modunda yapılan analizler ayrıca HPLC-UV sistemine bağlı LCQ iyon tuzaklı ESI-MS sisteminin full tarama modunda ve ayrıca % 35 çarpışma enerjisi ile elde edilen fragmentler sayesinde glikozidik flavonoidlerin karakterizasyonu güçlendirilmiştir. Karakterize edilen piklerin işaretlendiği kromatogramlar örnek olarak Şekil 43, 44, 45 ve 46'da verilmiştir. Burada flavonoid türevleri, çeşitli glikozidik türevleri olan diheksozlar, heksozlar, glukuronitler,

asetil glikozitler, heksoz-deoksiheksozlar ve deoksiheksozlar ve flavonoidlerin kuinik asit türevleri olarak sınıflandırılmıştır.

1. Diheksozlar: Üç İsorhamnetin-diheksoz'dan isorhamnetin-diheksoz-1' e ait kütle spektrumu Şekil 47'de gösterilmiştir. Alıkonma zamanı 19,7 dk olup 639 akb içeren $[M-H]^-$ iyonuna sahiptir. Uygulanan %35 CID sonucunda önce heksoza karşılık gelen 162 akb kaybı görülür ve bu lineer diheksoz modeline uygun olarak aynı kütlede diğer bir heksozun kaybı takip eder (Häkkinen ve Auriola, 1998).

2. Heksozlar: Kuersetin, luteolin, isorhamnetin ve kamferid'e ait heksozlar karakterize edilmiştir. Temsilen luteolin-heksoz'a ait kütle spektrumu Şekil 48'de verilmiştir. Alıkonma zamanı 25,3 dk olup 461 akb olan $[M-H]^-$ iyonuna sahiptir. Uygulanan %35 CID sonucunda heksoza karşılık gelen 162 akb kaybı gözlenmiştir (Lai vd., 2007).

3. Glukuronitler: Apigenin, isorhamnetin, kamferid ve ramnazin flavonoidlerine ait glukuronitler karakterize edilmiştir. Apigenin glukuronide ait kütle spektrumu örnek olarak Şekil 49'da verilmiştir. Alıkonma zamanı 31,4 dk olup 445 akb olan $[M-H]^-$ iyonuna sahiptir. Uygulanan %35 CID sonucunda glukuronide karşılık gelen 176 akb kaybı gözlenmiştir (Lai vd., 2007).

4. Asetil glikozitler: İsorhamnetin ve kamferole ait asetil glikozitler tespit edilmiştir. Örnek olarak kamferol asetil glikozit-1'in %35 CID ile elde edilen kütle spektrumu Şekil 50' de verilmiştir. Alıkonma zamanı 44,9 dk olup 489 akb olan $[M-H]^-$ iyonuna sahiptir. Uygulanan %35 CID sonucunda asetil-glikozit'e karşılık gelen 204 akb kaybı ile 285akb olan kamferolün $[M-H]^-$ iyonu gözlenmiştir (Lai vd., 2007).

5. Heksoz-deoksiheksozlar: Yalnızca kamferol-heksoz-deoksiheksoz tespit edilmiştir. Alıkonma zamanı 48,3 dk olup 593 akb olan $[M-H]^-$ iyonuna sahiptir (Şekil 51). Uygulanan % 35CID sonucunda deoksiheksoz'a karşılık gelen 146 akb kaybı ile 447 akb heksoz'a karşılık gelen 162 akb kaybı ile 285 akb olan kamferolün $[M-H]^-$ iyonu gözlenmiştir (Lai vd., 2007).

6. Deoksiheksozlar: Alıkonma zamanı 30,3 dk olan luteolin-deoksiheksoz tesbit edilen tek deoksiheksoz türevidir. 431 akb olan $[M-H]^-$ iyonuna sahiptir (Şekil 52). Uygulanan %35 CID sonucunda deoksiheksoz'a karşılık gelen 146 akb kaybı ile 285 akb olan luteolin $[M-H]^-$ iyonu gözlenmiştir (Lai vd., 2007).

7. Kuinik asit: Kamferol ve isorhamnetine ait olmak üzere iki flavonoid kuinik asit gözlenmiştir. Örnek olarak isorhamnetin-kuinik asit 44,6 dk alıkonma zamanına ve 489

akb olan $[M-H]^-$ moleküler iyonuna sahiptir (Şekil 53). Uygulanan %35 CID sonucunda kuinik asite karşılık gelen 174 akb kaybı ile 315 akb $[M-H]^-$ gözlenmiştir (Lai vd., 2007).

Literatürde *Digitalis* türlerinin fenolik bileşimleri üzerine yapılan çalışmalar sonucu genellikle izole edilen kafeik asit ve ferulik asidin çeşitli feniletanoid ve fenilpropanoid glikozitleri NMR, UV ve MS ile analiz edilmişlerdir (Matsumoto vd., 1987; Baudouin vd., 1988; Zhou vd., 1998; Çalış vd., 1999; Taskova vd., 2005; Lee vd., 2006).

Bu çalışmada HPLC-UV ile fenolik bileşik standartları kullanılarak bitki örneklerindeki fenolik bileşim belirlenmeye çalışıldığı için özellikle hidroliz sonucunda açığa çıkan kafeik asit, *p*-kumarik asit ve ferulik asitin hangi glikozitlerinin kırılıp çekirdek fenolik aside dönüştüğünün belirlenmesi hedeflenmemiştir. Ancak HPLC-UV ile bitki örneklerinin başlıca hangi fenolik bileşik ve türevlerini içerdikleri belirlenirken HPLC-MS sayesinde de başlıca hangi flavonoid ve bunların glikozidik türevlerini içerdikleri karakterize edilmiştir. Flavonoid türevlerindeki şeker gruplarının karakterizasyonu için yeterli veri elde edilememiş, standart şeker bağlı flavonoidler de mevcut olmadığında şekerler karbon sayılarına göre karakterize edilmişlerdir. Çalışmada analiz edilen türlerin şeker grupları açısından oldukça zengin oldukları gözlenmiştir. Çalışılan toplam 6 türde oldukça benzer şeker grupları gözlenmesi burada çalışılmayan diğer *Digitalis* türleri ile de benzer olabileceklerini göstermektedir. Bu durumda *Digitalis*' e ait herhangi bir türün şeker grupları üzerine yapılan çalışmalar diğer türlerin şeker gruplarının belirlenmesi açısından da önemli veriler sağlamaktadır. Hensel ve arkadaşlarının (1998) *Digitalis purpurea* yaprakları ve *Digitalis lanata* kültür hücrelerinde yaptıkları polisakkarit analizleri sonucunda çeşitli arabinogalaktan, glukomannan, ramnogalakturonan, arabinoksiloglukan, kisilan ve di-deoksi şeker grupları tanımlanmıştır ve şekerlerce oldukça zengin oldukları gözlenmiştir.

Sonuçlar ayrıca istatistiksel olarak da değerlendirilmiştir. Genel olarak asidik hidroliz ve hidrolizsiz ekstraksiyon koşullarının fenolik bileşik ürünleri karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmuştur. Genel olarak fenolik asit ve flavonoid çekirdek yapılarının asidik hidroliz koşullarında miktarlarının anlamlı şekilde fazla oluşu beklenen bir sonuç olup çeşitli türevlerin hidroliz sonucu parçalanarak ürün olarak fenolik bileşiklerin açığa çıktığının bir göstergesidir. İstatistiksel değerlendirmeler sonucunda karakterize edilen glikozidik flavonoidlerden isorhamnetin-diheksoz-1, isorhamnetin-diheksoz-2 luteolin-glukuronit, apigenin-glukuronit ve kamferid-heksoz içinde anlamlı farklar elde edilmiş ve pH=2 kuşullarında elde edilen ekstraktlarda daha fazla miktarda bulunmuşlardır. Bu da

yine pH=2' de parçalanmadan muhafaza edilebilirlerken hidrolizle parçalanmaları sonucu glikozidik flavonoidlerin miktarlarında düşüş olduğunu göstermektedir. Glikozidik yapılar çekirdek yapılara göre daha polar olduklarından kromatogramın önde gelen kısımlarında gözlenmektedirler. Öte yandan kamferol-kuinik asidin hidroliz sonucunda daha fazla gözlenmesi ve pH=2'de erken elue edilen glikozidik türevinin gözlenmemesi glikozidik bir türevinin parçalanmış olma ihtimalini zayıflatmakta ki olası türevininin glikozidik olmadığını göstermektedir.

Digitalis ferruginea ssp. *schischkinii* bitkisinin arazi ve doku kültürü örnekleri flavonoid türevleri cinsinden karşılaştırıldığında; arazi örneklerinde gözlenen flavonoid türevlerinin hemen hemen tamamı kültür örneklerinde de gözlenmiştir. Pik alanları olarak bakıldığında kültür örnekleri genel olarak daha küçük pik alanları sergilerken özellikle farklılaşmamış siyah (KS) ve farklılaşmamış yeşil (KYe) örneklerinin pik alanlarının arazi örneklerine oldukça yakın oldukları hatta bazı flavonoid türevleri açısından arazi örneklerinde daha büyük pik alanlarına sahip oldukları tespit edilmiştir.

4.6. *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii* Bitkisindeki Kardenolitlerin HPLC-DAD Analizleri

HPLC-DAD sisteminde kardenolit standartlarının analizleri için tekrarlanabilirlik ve değişen konsantrasyona karşı doğrusal cevap olarak optimize edilen metot bitki ekstraktlarında kardenolitlerin analizi için uygun bulunmuş ve *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii* bitkisinin yaprak, çiçek ve petiyol kısımlarından elde edilen ekstraktlar bu koşullarda analiz edilmiştir (Tablo 24). Tablo 25' de ekstraktlarda gözlenen standartların miktarları hem mg/L, hem de 1 kg kuru bitki materyaline karşılık gelen mg kardenolit miktarı olarak verilmiştir. Sonuçlar bitkinin kısımları arasında yaprak kısmının kardenolitler açısından en zengin kısım olduğunu göstermektedir. Bitkinin genel olarak en çok lanatosit C içerdiği ve en bol olan yaprak kısmında 861,40 mg/kg kuru ağırlık olarak tesbit edilmiştir.

Digitalis' in çeşitli türlerinde yapıla gelmiş kardiyak glikozit izolasyonu ve analizleri sonucunda tanımlanan yeni kardiyak glikozitleri ilk izole edildikleri türün adını almışlardır. Örneğin Lanatozit C, *Digitalis lanata*' da izole edilerek adlandırılmıştır. Yine digoksin, digitoksin ve gitoksin gibi kardiyak glikozitleri *Digitalis* türlerinde yaygın gözlenmektedir (Braga vd., 1997).

4.7. Bitki ekstraktlarında Spektrofotometrik Toplam Fenolik Madde Tayini

Digitalis türlerinin metanolik ekstraktlarının direkt olarak spektrofotometrik toplam fenolik madde tayininin yanısıra hem pH=2'de hem de hidrolizli seçimli ekstraksiyona maruz bırakılan örneklerinde toplam fenolik madde tayinleri yapılmış ve sonuçları gallik asit ve kateşin ekivalent olarak verilmiştir. Burada birim olarak mg toplam fenolik/g numune madde kullanılmıştır. Kullanılan standartlar gallik asit ve kateşin arasında toplam fenolik madde cinsinden korelasyon 1 bulunmuştur.

Türlerin doğrudan metanol ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarlarına bakıldığında türler arasında *Digitalis davisiana* türünde ve özellikle Eylül ayında en yüksek olduğu (34,11 mg GAE/ g numune) görülmektedir. Aylara göre türlere genel olarak bakıldığında ise Haziran ve Temmuz ayları arasında Temmuz ayının daha yüksek olduğu çıkarılabilirken Temmuz, Ağustos ve Eylül ayları arasında belirgin bir farklılık yapılamamıştır.

Hidrolizli ekstraktların toplam fenolik madde miktarlarına baktığımızda *Digitalis cariensis*' in Eylül ayı örneğinde en yüksek olduğu (35,01 mg GAE/ g numune) ve bunu takiben *Digitalis davisiana* ve *Digitalis lamarckii* örneklerinde genel olarak yüksek olduğu görülmektedir. pH=2 koşullarındaki ekstraktlarda ise *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkini*' nin Abelat yaylası eylül ayı örneğinde en yüksek toplam fenolik madde miktarı (7,19 mg GAE/ g numune) tespit edilmiştir. Spektrofotometrik toplam fenolik madde tayini sonuçları, fenolik asitlerin HPLC-UV analiz sonuçları ile karşılaştırıldığında benzer profiller gözlenmemektedir. HPLC-UV sonuçlarında mevcut fenolik asitler açısından en zengin türün *Digitalis lamarckii* olduğu, *davisiana* ve *cariensis*' in en düşük oldukları gözlenmektedir. Öyleyse toplam fenolik madde miktarını bu denli değiştiren türlerin flavonoidler yada çalışmada hem MS hemde UV dedektörü ile gözlenemeyen fenolik bileşikler olduğu çıkarılabilir. Flavonoidler için elde edilen pik alanları toplamalarına bakıldığında hem hidrolizli hemde hidrolizsiz ekstraktlarda en yüksek değerde olan *Digitalis trojana* Temmuz ayı ekstraktıdır. Aynı türün toplam fenolik madde miktarı cinsinden değerlerine bakıldığında hidrolizsiz ekstraktında ortalama bir değerde iken hidrolizli ekstraktının diğer türler arasında düşük olduğu görülmektedir. Ayrıca HPLC-UV ile analiz edilen fenolik asit miktarları da diğer ekstraktlara göre ortalama hatta daha düşük değerde bulunmuştur.

Buradan da iki önemli yorum yapılabilir. İlki kromatografik analizlerde henüz belirlenemeyen bazı bileşenlerin de olduğu, ikincisi ise Folin reaktifi ile yapılan toplam fenolik madde miktarı belirlenmesinde gerçek fenolik madde içeriklerinden daha yüksek değerler elde edildiğidir. Bu konu tez çalışmasının devamında derişimi tam olarak bilinen standart karışımlar kullanılarak test edilebilir. Ancak doğrudan bitkiden yapılan ekstraksiyonda sadece fenolik bileşiklerin değil bitkini yapısından gelen diğer bileşenlerin matriks veya sinerjik etkilerinin de göz ardı edilmemesi gerekir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Digitalis türlerinin kromatografik analizleri bu türlerde mevcut olan fenolik bileşiklerin ve kardiyak glikozitlerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Fenolik bileşimin belirlenmesinden önce ekstraksiyon koşulları optimize edilmiş ve metanol ile elde edilen ekstraktlara asidik hidroliz ve ardından SIV1-SIV1 seçimli ekstraksiyonunun uygulanması uygun görülmüştür. Ekstraksiyonlar türlerin fenolik içeriğinin tespiti için yeterli ipuçları elde etmek amacıyla hidrolizsiz olarak da gerçekleştirilmiştir. Fenolik bileşiklerin HPLC-UV analizleri neticesinde bu türlerin başlıca üç hidroksi sinamik asit; *p*-kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit ve bunların asidik hidroliz ile çekirdek fenolik asitlere parçalanmış türevlerini içerdikleri belirlenmiştir. Standartları mevcut olmayan flavonoidlerin çeşitli glikozidik veya glikozidik olmayan türevleri HPLC-MS metoduna göre kalitatif olarak belirlenmiştir. Türlerin ekstraktları hem hidrolizli hemde hidrolizsiz olarak hazırlanıp fenolik bileşik türevlerinin değişimi ile hidrolize verilen cevap HPLC-MS kromatogramlarında gözlenmeye çalışılıp bileşiklerin karakterize edilmelerinde önemli veriler sağlanmıştır. HPLC-MS sonuçlarına göre *Digitalis* türlerinin çeşitli ekstraktlarında başlıca fisetin, luteolin, apigenin, kamferid ve ramnazin aglikonları ve bunların diheksöz, heksoz, glukuronit, asetil glikozit ve deoksiheksoz kuinik asit bağlı türevleri karakterize edilmiştir.

Tez çalışması kapsamında glikozitlerin detaylı tanımlanması mümkün olamamıştır. Flavonoid türevlerinin karakterize edildiği bu çalışma ışığında hidroliz koşullarının değiştirilip her bir değişim sonucunda HPLC-MS sonuçlarının incelenmesi ile glikozit türevlerinde glikozitlerin türü ve hatta flavonoid çekirdeklerine bağlanma yerlerinin tespiti mümkündür.

Mevcut çalışmada *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii* türünün hem arazi örnekleri hem doku kültür örneklerinde fenolik bileşikler analiz edilmişlerdir. Doku kültür örneklerinde de arazi örneklerine benzer fenolik bileşik profilleri gözlenmiştir. Kafeik asit ve *p*-kumarik asit doku kültürü örneklerinde arazi örneklerine nisbeten daha az miktarda bulunurken ferulik asitin doku kültürü örneklerinde ve özellikle farklılaşmamış siyah ve yeşil (KS, KYe) örneklerde çok daha bol bulunduğu tespit edilmiştir. Ayrıca doku kültürleri flavonoidler ve flavonoid türevleri açısından arazi örnekleri kadar olmasa da oldukça zengin bulunmuştur. Tez çalışması süresince doku kültür ortamı değiştirilerek

ikincil metabolitlerden fenoliklerin üretim verimi değerlendirilememiştir, ancak oldukça zengin bir içeriğin elde edildiği bu çalışma daha ileri taşınarak fenoliklerin üretim verimleri artırılabilir. Özellikle doğadaki popülasyonları gittikçe daha azalan endemik türlerin tarımsal uygulamalara alternatif yollarla üretilmesi ve bu şekilde özellikle önemli sekonder metabolitlerin üretilmesi bakımından, doku kültürü çalışmalarının verimliliği büyük önem arz etmektedir.

Digitalis ferruginea ssp. *schischkinii* türünün arazi örneklerinin kardiyak glikozitleri HPLC-DAD sistemi ile belirlenmiştir. Bitkinin yaprak, çiçek ve petiyollerinde Lanatosit C, digoksin ve digitoksinin tespit edilmiş ve bitki kardiyak glikozitleri açısından en zengin olan yaprak kısmında sırasıyla 86,14; 20,8; ve 15,43 mg/L olarak bulunmuşlardır. Tez kapsamında fenolik bileşikleri çalışılan Türkiye' ye endemik dört *Digitalis* türünün (*trojana*, *davisiana*, *cariensis* ve *lamarckii*) kardiyak glikozitlerinin in-vitro üretimleri 1060470 nolu Tübitak projesi kapsamında çalışılmıştır.

Digitalis türlerinin ekstraktlarında spektrofotometrik toplam fenolik madde tayini yapılmıştır. Sonuçlar pH=2 ortamında daha geniş örnek yelpazesinde değerlendirildiğinde *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii*' nin Abelat yaylasından toplanan örneğinde en yüksek fenolik bileşim belirlenmiş olup bu türü *Digitalis lamarckii* ve *Digitalis cariensis* takip etmektedir. Toplam fenolik madde miktarları *Digitalis davisiana* türünde diğer türlere nispeten daha az bulunmuştur. *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii*' nin doku kültürü örneklerinden farklılaşmamış yeşil (KYe) örneğinde arazi örneklerine benzer miktarda fenolik madde tespit edilirken genel olarak arazi örneklerinden daha düşük miktarda fenolik madde içeriği bulunmuştur. Sonuçlar doku kültürü çalışmaları açısından oldukça ümit vericidir.

6. KAYNAKLAR

- Abarquez R.F.J., 2001. The Old but Reliable *Digitalis*: Persistent Concerns and Expanded Indications. Int. J. Clin. Pract., 55, 108-114.
- Ainsworth E. A. ve Gillespie K. M., 2007. Estimation of Total Phenolic Content and Other Oxidation Substrates in Plant Tissues Using Folin–Ciocalteu Reagent, Nature Protocols, 2, 875 - 877.
- Baudouin G., Skaltsounis A.L., Tillequin F. ve Koch M., 1988. Lugrandoside: A New Phenylpropanoid Glycoside from Various *Digitalis* Species, Planta Med., 54, 4, 321-325.
- Baytop T., 2002. Türkiye’ de Bitkilerle Tedavi, Nobel Yayınevi, 352, İstanbul.
- Becchi M. ve Fraisse D., 1989. Fast Atom Bombardment and Fast Atom Bombardment Collision-Activated Dissociation/Mass Analyzed Ion Kinetic Energy Analysis of C-Glycosidic Flavonoids, Biomed. Environ. Mass Spectrom., 18, 122-130.
- Benavides A., Bassarello C., Montoro P., Vilegas W., Piacente S. ve Pizza C., 2007. Flavonoids and Isoflavonoids from *Gynerium Sagittatum*, Phytochemistry, 68, 1277–1284.
- Bilaloğlu G. V. ve Harmandar M., 1999. Flavonoidler, Aktif Yayınevi, 382, İstanbul.
- Borbalán Á.M.A., Zorro L., Guillén D.A. ve Barroso C.G., 2003. Study of Polyphenol Content of Red and White Grape Varieties by Liquid Chromatography- Mass Spectrometry and Its Relationship To Antioxidant Power, J. Chromatogr. A, 1012, 31-38.
- Bovanová L. ve Brandšteterová E., 2000. Direct Analysis of Food Samples by High-Performance Liquid Chromatography, J. Chromatogr. A, 880, 149-168.
- Braga F. C., Kreis W., Récio R. A. ve De Oliveira A. B., 1997. Variation of Cardenolides with Growth in A *Digitalis Lanata* Brazilian Cultivar, Phytochemistry, 45, 3, 473-476.
- Bräuchler C., Meinberg H. ve Heubl G., 2004. Molecular Phylogeny of The Genera *Digitalis* L. and *Isoplexis* (Lindley) Loudon (Veronicaceae) Based on ITS- and Trnl-F Sequences, Plant Systematics and Evolution, 248, 111-128.
- Bravo L., 1998. Polyphenol Chemistry, Dietary Sources, Metabolism and Nutritional Significance, Nutr. Rev., 56, 317-333.
- Bucay J. W., 1999. Digitalis, Plant with Relevance to Medicine, Revista Medica del Instituto Mexicano del Seguro Social, 37, 147-153.

- Chang L.C., Kinghorn A.D. ve Tringali C., 2001. Bioactive Compounds from Natural Sources, Taylor & Francis, 159, London.
- Chilla C., Guillén D.A., Barroso C.G. ve Pérez-Bustamante J.A., 1996. Automated On-Line Solid-Phase Extraction-High-Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detection of Phenolic Compounds in Sherry Wine, J. Chromatogr. A, 750, 209-214.
- Cordell G. A., Lemos T. L. G., Monte F. J. Q. ve De Mattos M. C., 2007. Vegetables as Chemical Reagents, J. Nat. Prod., 70, 478-492.
- Cousins D. J., 1994. Medicinal Plants-Metabolite Production in Vitro 1973-1993, Department of Horticulture and Plantation Crops, Cab International, Wallingford, UK.
- Covey T. R. ve Devanand P., 2002. Nanospray Electrospray Ionization Development: LC/MS, CE/MS Application, Practical Spectroscopy Series, 32, New York.
- Cuyckens F. ve Claeys M., 2004. Mass Spectrometry in the Structural Analysis of Flavonoids, J. Mass Spectrom., 39, 1-15.
- Çalış İ., Taşdemir D., Sticher O. ve Nishibe S., 1999. Phenylethanoid Glycosides from *Digitalis ferruginea* ssp. *ferruginea* (=D. aurea LINDLEY) (Scrophulariaceae), Chem. Pharm. Bull., 47, 9, 1305-1307.
- Davis P.H., 1978. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Edinburg University Press, Edinburg, 6, 680-687.
- De Villiers A., Lynen F., Crouch A. ve Sandra P., 2004. Development of a Solid-Phase Extraction Procedure for the Simultaneous Determination of Polyphenols, Organic Acids and Sugars in Wine, Chromatographia, 59, 403-409.
- Dinan L., Harmatha J. ve Lafont R., 2001. Chromatographic Procedures for the Isolation of Plant Steroids, Journal of Chromatography A, 935, 105-123.
- Erkoç Ş., Erkoç F. ve Keskin N., 2003. Theoretical Investigation of Quercetin and Its Radical Isomers, J. Mol. Struct. (Theochem), 631, 141-146.
- Endale A., Kammerer B., Gebre-Mariam T. ve Schmidt P. C., 2005. Quantitative Determination of the Group of Flavonoids and Saponins from the Extracts of the Seeds of *Glinus Lotoides* and Tablet Formulation There of by High-Performance Liquid Chromatography, Journal of Chromatography A, 1083, 32-41.
- Fabre N., Rustan I., Hoffmann D.E. ve Quetin-Leclercq J., 2001. Determination of Flavone, Flavonol, and Flavanone Aglycones by Negative Ion Liquid Chromatography Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry, J. Am. Soc. Mass Spectrom., 12, 707-715.

- Fang Z., Zhang M. ve Wang L., 2007. HPLC-DAD-ESI-MS Analysis of Phenolic Compounds in Bayberries (*Myrica rubra* Sieb.et Zucc.), Food Chem., 100, 845-852.
- Fernández de Simón B., Pérez-Ilzarbe J., Hernández T., Gómez-Cordovés C. ve Esterella I., 1990. HPLC Study of the Efficiency of Extraction of Phenolic Compounds, Chromatographia, 30, 35–37.
- Goldberg D.M., Tsang E., Karumanchiri A., Diamandis E.P., Soleas G. ve Ng E., 1996. Method to Assay the Concentrations of Phenolic Constituents of Biological Interest in Wines, Anal. Chem., 68, 1688-1694.
- Gürel E., Yücesan B., Aglic E., Gürel S., Verma K. S., Sökmen M. ve Sökmen A., 2010. Regeneration and Cardiotoxic Glycoside Production in *Digitalis davisiana* Heywood (Alanya Foxglove), Plant Cell Tiss Organ Cult., 104, 2, 217-225.
- Hagimori M., Matsumoto T. ve Obi Y., 1982. Studies on the Production of *Digitalis* Cardenolides by Plant Tissue Culture. II. Effect of Light and Plant Growth Substances on Digitoxin Formation by Undifferentiated Cells and Shoot-Forming Cultures of *Digitalis Purpurea* L. Grown in Liquid Media, Plant Physiol., 69, 653-656.
- Häkkinen S., 2000. Flavonols and Phenolic Acids in Berries and Berry Products, Kuopio University Publications D. Medical Sciences, 221, 90.
- Häkkinen S. ve Auriola S., 1998. High-Performance Liquid Chromatography with Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Diode Array Ultraviolet Detection in the Identification of Flavonol Aglycones and Glycosides in Berries, Journal of Chromatography A, 829, 91–100.
- Harvey D., 2000. Modern Analytical Chemistry, Mc Graw Hill International Edition, USA.
- Hensel A., Schmidgall J. ve Kreis W., 1998. The Plant Cell Wall—A Potential Source for Pharmacologically Active Polysaccharides, Pharmaceutica Acta Helvetiae, 73, 37-43.
- Herrera M.C. ve Luque de Castro M.D., 2005. Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Strawberries Prior to Liquid Chromatographic Separation and Photodiode Array Ultraviolet Detection, Journal of Chromatography A, 1100, 1-7.
- Hertog M. G. L., Hollman P. C. H. ve Katan M. B., 1992. Content of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids of 28 Vegetables and 9 Fruits 286 Commonly Consumed in the Netherlands, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40, 2379-2383.
- Ikeda Y. ve Fujii Y., 2003. Quantitative Determination of Lanatosides in the Hybrid *Digitalis ambigua* x *Digitalis lanata* Leaves by HPLC, J of Liq Chr & Rel Tech., 26, 2013-2021.

- Javanmardia J., Stushnoff C., Locke E. ve Vivanco J.M., 2003. Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Iranian Ocimum Accessions, Food Chemistry, 83, 547-550.
- Kader F., Rove B., Girardin M. ve Metche M., 1996. Fractionation and Identification of the Phenolic Compounds of Highbush Blueberries (*Vaccinium corymbosum*, L.), Food Chemistry, 55, 1, 35-40.
- Kim K.-H., Tsao R, Yang R. ve Cui S. W., 2006. Phenolic Acid Profiles and Antioxidant Activities of Wheat Bran Extracts and the Effect of Hydrolysis Conditions, Food Chemistry, 95, 466-473.
- Kinne-Saffran E. ve Kinne R.K., 2002. Herbal Diuretic Revisited: From Wise Women to William Withering, Am. J. Nephrol., 22, 112-118.
- Korkina L.G., 2007. Phenylpropanoids As Naturally Occurring Antioxidants: From Plant Defense to Human Health, Cellular And Molecular Biology, 53, 1, 15-25.
- Kuninori T. ve Nishiyama J., 1986. Separation and Quantitation of Ferulic Acid and Tyrosine in Wheat Seeds (*Triticum Aestivum*) by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography, J Chromatogr., 362, 255-262.
- Lai J-P., Lima Y. H., Sua J., Shen H-M. ve Ong C. N., 2007. Identification and Characterization of Major Flavonoids and Caffeoylquinic Acids in three Compositae plants by LC/DAD-APCI/MS, Journal of Chromatography B, 848, 215-225.
- Lee J. Y., Woo E. ve Kang K. W., 2006. Screening of New Chemopreventive Compounds from *Digitalis purpurea*, Pharmazie, 61, 356-358.
- Lindsay S., 1987. High Performance Liquid Chromatography (Analytical Chemistry by Open Learning), Wiley, New York.
- Lopez-Lazaro M., Palma De La Pena N., Pastor N., Martin-Cordero C., Navarro E., Cortes F., Ayuso M.J. ve Toro M.V., 2003. Anti-Tumour Activity of *Digitalis purpurea* L. subsp. *Heywoodii*, Planta Med, 69, 701-704.
- Ma Y.-Q., Chen J.-C., Liu D.-H. ve Ye X.-Q., 2009. Simultaneous Extraction of Phenolic Compounds of Citrus Peel Extracts: Effect of Ultrasound, Ultrasonics Sonochemistry, 16, 57-62.
- Macheix J-J., Fleuriet A. ve Billot J., 1990. Fruit Phenolics, USA: CRC Press, Boca Raton.
- Malovaná S., García Montelongo F.J., Pérez J.P. ve Rodríguez-Delgado M.A., 2001. Optimisation of Sample Preparation for the Determination of Trans-Resveratrol and Other Polyphenolic Compounds in Wines by High Performance Liquid Chromatography, Anal. Chem. Acta, 428, 245-253.
- Marzouka M. S., El-Toumya S.A.A., Merfortb I. ve Nawwar M. A.M., 1999. Polyphenolic Metabolites of *Rhamnus Disperma*, Phytochemistry, 52, 943-946.

- Matsumoto M., Koga S., Shoyama Y. ve Nishioka I., 1987. Phenolic Glycoside Composition of Leaves and Callus Cultures of *Digitalis purpurea*, Phytochemistry, 26, 3225-3227.
- Nacz M. ve Shahidi F., 2004. Extraction and Analysis of Phenolics in Food, Journal of Chromatography A, 1054, 95-111.
- Nuutila A.M., Kammiovirta K. ve Oksman-Caldentey K.-M., 2002. Comparison of Methods for the Hydrolysis of Flavonoids and Phenolic Acids from Onion and Spinach for HPLC Analysis, Food Chemistry, 76, 519-525.
- Olmstead R.G., De Pamphilis C.W., Wolfe A.D., Young N.D., Elisons W.J. ve Reeves P.A., 2001. Disintegration of the Scrophulariaceae, American Journal of Botany, 88, 348-361.
- Paranhos A., Fernandez-Tarrago J. ve Corchete P., 1999. Relationship between Active Oxygen Species and Cardenolide Production in Cell Cultures of *Digitalis thapsi*: Effect of Calcium Restriction, New Phytol., 141, 51-60.
- Pérez-Serradilla J. A., Priego-Capote F. ve Luque de Castro M. D., 2007, Simultaneous Ultrasound-Assisted Emulsification-Extraction of Polar and Nonpolar Compounds from Solid Plant Samples, Anal. Chem., 79, 17, 6767-6774.
- Petroviciu I., Albu F. ve Medvedovici A., 2010. LC/MS and LC/MS/MS Based Protocol for Identification of Dyes in Historic Textiles, Microchemical Journal, 95, 247-254.
- Pietta P.G., 2000. Flavonoids as Antioxidants, J. Nat. Prod., 63, 1035-1042.
- Prasain J.K., Wang C-C. ve Barnes S., 2004. Mass Spectrometric Methods for the Determination of Flavonoids in Biological Samples, Free Rad. Bio. Med., 37, 1324-1350.
- Rise-Evans C. ve Packer L., 1998. Flavonoids in Health and Disease, Marcel-Dekker, New York.
- Robards K. ve Antolovich M., 1997. Analytical Chemistry of Fruit Bioflavonoids, Analyst, 122, 11R-34R.
- Roca-Perez L., Boluda R., Gavidia I. ve Perez-Bermudez P., 2004. Seasonal Cardenolide Production and Dop5 β r Gene Expression in Natural Populations of *Digitalis obscura*, Phytochemistry, 65, 1869-1878.
- Sandra P., 2004. Advanced Separation Science, Ghent University, Belgium.
- Schuster B. ve Herrmann K., 1985. Hydroxybenzoic and Hydroxycinnamic Acid Derivatives in Soft Fruits, Phytochem., 24, 2761-2764.
- Skoog D.A., James Holler F. ve Nieman T.A., 1998. Principles of Instrumental Analysis, Fifth Edition, Kılıç E., Köseoğlu F. ve Yılmaz H., Saunders College Publishing, USA, Bilim Yayıncılık, Ankara.

- Skoog D.A., James Holler F. ve Nieman T.A., 1999. Fundamentals of Analytical Chemistry, Seventh Edition, Kılıç E. ve Köseoğlu F., Saunders College Publishing, USA, Bilim Yayıncılık, Ankara.
- Skoog D.A., Holler F.H. ve Crouch S.R., 2007. Principles of Instrumental Analysis, Thompson Brooks, 17-21, California, USA.
- Slinkard K. ve Singleton V. L., 1977. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manuel Methods, Am. J. Enol. Viticult., 28, 49-55.
- Spacil Z., Novakov L. ve Solich P., 2008. Analysis of Phenolic Compounds by High Performance Liquid Chromatography and Ultra Performance Liquid Chromatography, Talanta, 76 189-199.
- Stuhlemmer U., Kreis W., Eisenbeiss M. ve Reinhard E., 1993. Cardiac Glycosides in Partly Submerged Shoots of *Digitalis lanata*, Planta Medica, 59, 539-545.
- Suschetet M., Siess M.-H., Le Bon A.-M. ve Canivenc Lavier M.-C., 1998. INRA Edition, Polyphenols 96, Les Colloques, Paris, 166-204.
- Taskova R. M., Gotfredsen C. H. ve Jensen S. R., 2005. Chemotaxonomic Markers in Digitalideae (Plantaginaceae) Phytochemistry, 66 1440-1447.
- Tavman Ş., Kumcuoğlu S. ve Akkaya Z., 2009. Bitkisel Ürünlerin Atıklarından Antioksidan Maddelerin Ultrason Destekli Ekstraksiyonu, Gıda, 34, 3, 175-182.
- Tekelioğlu S., Gürbüz E., Coşkun B. ve İnal F., 2010. Evaluation of Vitamin and Mineral Content of Commercial Premixes, Eurasian J Vet Sci., 26, 2, 81-85.
- Theurer C., Kreis W. ve Reinhard E., 1998. Effects of Digitoxigenin, Digoxigenin, and Various Cardiac Glycosides on Cardenolide Accumulation in Shoot Cultures of *Digitalis lanata*, Planta Medica, 64, 705-710.
- US EPA, 1984. Definition and Procedure for the Method Detection Limit-Revision 1.11, 40 CFR Part 136, Appendix B, EPA.
- Vermerris W. ve Nicholson R., 2006. Phenolic Compound Biochemistry, Springer, The Netherlands.
- Werner K., 1964. Die Verbreitung der *Digitalis*-Arten. Wiss. Z. Univ. Halle-Wittenberg, Math.-Naturwiss, Reihe, 13, 453-486.
- Wollgast J. ve Anklam E., 2000. Review on Polyphenols in Theobroma Cacao: Changes in Composition During the Manufacture of Chocolate and Methodology for Identification and Quantification, Food Res. Int., 33, 423-347.
- Wu Q., Wang M. ve Simon J.E., 2004. Analytical Methods to Determine Phytoestrogenic Compounds, J. Chromatogr. B, 812, 325-355.
- Yavuz O. ve Aksoy A., 2006. Örnek Hazırlamada Katı Faz Ekstraksiyonu Metodu, F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi, 20, 3, 259-269.

Yıldız A. ve Genç Ö., 1993. Enstrümenal Analiz, Hacettepe Üniversitesi Yayınları A-64, ISBN: 975-491-028-6, 421-438.

Zhou B-N., Bahler B. D., Hofmann G. A., Mattern M. R., Johnson R. K. ve Kingston D. G. I., 1998. Phenylethanoid Glycosides from *Digitalis purpurea* and *Penstemon linarioides* with PKCr-Inhibitory Activity, J. Nat. Prod., 61, 1410-1412.

ÖZGEÇMİŞ

1978 Yılında Rize' de doğdu. 1995 Yılında Rize Lisesi' nden mezun oldu. 1996 yılında yerleştiği KTÜ Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü' nden 2001 yılında Kimyager ünvanıyla mezun oldu. 2001 yılında Rize Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Analitik Kimya Ana Bilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı ve halen de bu göreve devam etmektedir. 2003 yılında KTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans Programı'na başladı. 2005-2006 Öğrenim yılında Socrates-Erasmus öğrenci değişim programı ile Belçika'nın Ghent Üniversitesi, Pfizer Analitik Kimya Araştırma Merkezi' nde yüksek lisans tezini yürüttü. 2007 yılında yüksek lisansdan mezun oldu. Aynı yıl KTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda Doktora Programı' na başladı. 2009-2010 öğrenim yılı bahar yarı döneminde YÖK doktora araştırma bursu ile Ghent Üniversitesi, Pfizer Analitik Kimya Araştırma Merkezi' nde doktora tezi üzerine çalıştı. Çok iyi derecede İngilizce bilmektedir.