

**RUTİN'İN KAPİLER ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ  
İLE FİTONUTRIENT TABLETLERİNDE MİKTAR  
TAYİNİ**

**Döndü Tuğçe Tilki**

Yüksek Lisans Tezi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Analitik Kimya Anabilim Dalı  
Eskişehir, Şubat 2007

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Dilek DOĞRUKOL – AK**

## ÖNSÖZ

Tez çalışmasında, rutin'in fitonutrient tabletlerinde miktar tayini için kapiler elektroforez yöntemi ile çalışıldı. UV-spektrofotometri ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemleriyle de karşılaştırılma yapıldı ve yöntemler arasındaki farkın istatistiksel olarak önemsiz olduğunu buldu. Ayrıca kapiler elektroforezde küçük hacimlerle çalışıldı ve böylece numune sarfiyatı azaldı. Kapiler kolonlar diğer yöntemlerdeki materyallere göre daha dayanıklı ve ucuz olduğundan kolonun tıkanması vb sorunlarla karşılaşma olasılığı diğer yöntemlere göre daha azdır. Çalışma boyunca kolonda tıkanma vb bir sorunla karşılaşmadı. Ayrıca kapilerin uzunluğu ayarlanarak analiz süresinin kısaltılması söz konusu oldu.

Sonuçta kapiler elektroforez yöntemi basit, doğru, kesin, hızlı ve ucuz bir yöntemdir ve tabletlerdeki rutin içeriği tayini için önerilebilir.

Özgür ve laik bir Türkiye' de bilimsel araştırma olanağını bize kazandıran yüce önderimiz Mustafa Kemal ATATÜRK'e,

Her zaman ve her konuda beni destekleyen ve yanımda olduklarını hissettiğim, beni bugünlere getiren aileme,

Bilgi ve tecrübesiyle çalışmalarımı destekleyen Sayın Hocam, Eczacılık Temel Bilimler Bölümü Başkanı Prof.Dr. Muzaffer TUNÇEL'e

Tezim süresince ve her zaman yanımda olan, beni sabırla yönlendiren, hoşgörü ve desteğini esirgemeyen, değerli hocam Prof.Dr. Dilek DOĞRUKOL-AK'a,

Analitik Kimya Anabilim Dalı'ndaki değerli hocalarım Doç.Dr. Göksel ALTIOKKA ve Doç.Dr.Zeki ATKOŞAR'a

Farmakognozi Anabilim Dalı'ndaki değerli hocam Yard.Doç.Dr. Nilgün ÖZTÜRK'e

Çalışmalarım sırasında ilgi ve destekleriyle bana yardımcı olan Analitik Kimya Anabilim Dalı'ndaki Arş.Gör. Arın Gül DAL ve Arş.Gör. Erol ŞENER'e

En içten teşekkürlerimi sunarım.

# RUTİN'İN KAPİLER ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE FİTONUTRİENT TABLETLERİNDE MİKTAR TAYİNİ

## ÖZET

Bu çalışmada, rutin'in fitonutrient tabletlerinde miktar tayini için kapiler elektroforez yöntemi tarif edilmektedir. Çalışma tamponu olarak, 50 mM borat tamponu (pH 9.3) çözeltisi kullanılmıştır. Rutin yanıtları, diyot dizisi detektör kullanılarak 265 nm'de kaydedilmiştir ve enoksazin iç standart olarak kullanılmıştır. Yöntemin kesinliği ve doğrusallığı, doğrusal aralığı, saptama ve tayin sınırı gösterilmiştir. Sinyal/gürültü oranı 3.3 kriterine göre yöntemin saptama sınırı olarak  $4.33 \times 10^{-6}$  M ve sinyal/gürültü oranı 10 kriterine göre tayin sınırı olarak  $1.31 \times 10^{-5}$  M değerleri hesaplanmıştır. Kapiler elektroforez yönteminin rutin içeren ticari preparatlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar, standart yöntemler olan UV-spektrofotometri ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemlerinin sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Yöntemler arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı bulunmuştur. Bu çalışmada önerilen kapiler elektroforez yönteminin kesin, doğru, duyarlı ve ucuz bir yöntem olduğu söylenebilir.

**Anahtar Kelimeler :** rutin, kapiler elektroforez, tablet

## **DETERMINATION OF RUTIN IN PHYTONUTRIENT TABLETS BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS**

### **ABSTRACT**

A capillary electrophoretic method is described for the determination of rutin in the phytonutrient tablets in this study. It was used 50 mM borate buffer (pH 9.3) as run buffer solution. Rutin responses were detected at 265 nm using diode array detector and enoxacin was internal standard. The precision, accuracy, linearity of the method were shown. The detection limit and determination limit of the method (signal / noise 3.3 and 10) were  $4.33 \times 10^{-6}$  M and  $1.31 \times 10^{-5}$  M, respectively. The results obtained with the application of the method to the commercial tablets were compared with those of UV spectrophotometry and high performance liquid chromatography as considered standard methods. It was found that the difference of the standard methods from capillary electrophoresis was not statistically significant. It can be concluded that capillary electrophoretic method proposed with this study is a precise, accurate, sensitive and cheap method.

**Key Words** : rutin, capillary electrophoresis, tablet

## İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA</u>
ÖZGEÇMİŞ	i
ÖNSÖZ	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
GİRİŞ VE AMAÇ	1
KAYNAK BİLGİSİ	2
Rutin'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	2
Rutin'in Farmakolojik Özellikleri	2
Rutin Tayini ile İlgili Çalışmalar	3
GEREÇLER	8
Kullanılan Maddeler	8
Kullanılan Cihazlar	8
<i>Kapiler elektroforez</i>	8
<i>Yüksek performanslı sıvı kromatografisi</i>	8
<i>UV-spektrofotometri</i>	8
<i>Diğer cihazlar</i>	8
Çözeltiler	9
Tablet Numunelerinin Hazırlanması	9
YÖNTEMLER	10
Kapiler Elektroforez Yöntemi	10
BULGULAR VE TARTIŞMA	11
Rutin'in Kapiler Elektroforez Yöntemi ile Tayini	11
Kapiler Elektroforez Yönteminin Kesinliği	11
Kapiler Elektroforez Yönteminin Doğrusal Aralığı	12
Kapiler Elektroforez Yönteminin Doğruluğu ve Kesinliği	12

<b>Kapiler Elektroforez Yöntemi ile Rutin İçeren Tabletlerde Miktar Tayini</b>	13
<b>UV-Spektrofotometri Yöntemi ile Rutin İçeren Tabletlerde Miktar Tayini</b>	14
<b>Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Rutin İçeren Tabletlerde Miktar Tayini</b>	15
<b>Rutin İçeren Tabletlerde Miktar Tayini Sonuçlarının Karşılaştırılması</b>	18
<b>SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	19
<b>KAYNAKLAR</b>	20

## ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL NO ve ADI	SAYFA
Şekil 1 Rutin'in Kimyasal Yapısı	2
Şekil 2 Standart Rutin ( $4.28 \times 10^{-5}$ M) ve Enoksazin (IS, $6.24 \times 10^{-5}$ M)'in Orijinal Elektroferogramı	11
Şekil 3 Rutin Tablet ve Enoksazin ( $6.24 \times 10^{-5}$ M) İçeren Çözeltinin Elektroferogramı	13
Şekil 4 Rutin' in Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Elde Edilen Kromatogramları	
(a) $4.28 \times 10^{-6}$ M Standart Rutin Çözeltisi	17
(b) Fitonutrient Tablet Çözeltisi	17

## ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE NO ve ADI	SAYFA
<b>Çizelge 1</b> Standart Rutin Çözeltisi ( $4.28 \times 10^{-5}$ M ) ve IS ( $6.24 \times 10^{-5}$ M) İçin Elde Edilen Göç Zamanı ve Alan Oranı Tekraredilebilirlik Değerleri	12
<b>Çizelge 2</b> Kapiler Elektroforez Yöntemi ile Doğrusal Aralık İçin Elde Edilen Sonuçlar	12
<b>Çizelge 3</b> Kapiler Elektroforez Yönteminin Doğruluğu ve Kesinliği ile İlgili İstatiksel Değerlendirme Sonuçları	13
<b>Çizelge 4</b> Kapiler Elektroforez Yöntemi ile Tabletlerde Rutin Miktar Tayini Sonuçları	14
<b>Çizelge 5</b> UV-Spektrofotometrik Yöntemle Tabletlerde Rutin Miktar Tayini Sonuçları	15
<b>Çizelge 6</b> Rutin İçin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Elde Edilen Veriler	16
<b>Çizelge 7</b> Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Tabletlerdeki Rutin Miktar Tayini Sonuçları	18
<b>Çizelge 8</b> Tabletlerdeki Rutin İçeriğinin Kapiler Elektroforez, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi ve UV-Spektrofotometri Yöntemleri ile Karşılaştırılması	18



## **GİRİŞ ve AMAÇ**

Flavonol glikozitleri ve bunların aglikonları genel olarak flavonoidler olarak isimlendirilir. Doğada bir çok farklı flavonoide rastlanır. Rutin bu ailenin önemli bir üyesidir ve yüksek bitkilerde yaygın olarak bulunur. Rutin fizyolojik olarak kan damarları üzerinde etkili bir maddedir ve kapiler damarlar üzerinde koruyucu etki gösterdiği bilinmektedir. Ayrıca, serbest oksijen radikallerini süpürerek antioksidan aktivite gösterir. Günümüzde rutin içeren farmasötik preparatlar tedavide kullanılmaktadır.

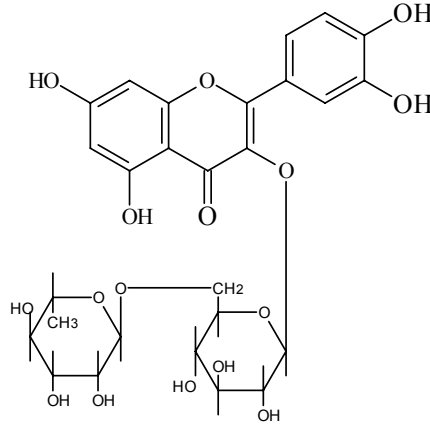
Rutin'in farmasötik preparatlardaki tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografisi tekniği ile yapılmış olan bazı çalışmalar bulunmaktadır (Kuntic ve ark., 2007, Abdallah ve ark., 1993). Bu çalışmaların dışında farmasötik preparatlarda ve bitkilerdeki rutin içeriğinin tayinine yönelik çeşitli analitik yöntemlerin kullanıldığı bir çok araştırma yayınlanmıştır. Kullanılan analitik yöntemler spektroskopik (Hassan ve ark., 1999; Malasev ve ark., 1993; Kuntic ve ark., 1998a ve 1998b) ve kromatografik yöntemlere (Cartoni ve ark., 1991; Pietta ve ark., 1990; Pietta ve ark., 1993; Treutter, 1988; Villeneuve ve ark., 1982; Toker ve ark., 1998; Weber, 1988; Lunte, 1987) dayanmaktadır. Son zamanlarda kapiler elektroforezin çeşitli tarzları ve çeşitli dedektörlerin kullanıldığı farklı çalışmalara rastlamak mümkündür (Bjergegaard ve ark., 1993; Pietta ve ark., 1991; Pietta ve ark., 1993; Pietta ve ark., 1994, Dogrukol-Ak ve ark., 2001; Jiang ve ark., 2004; Xu ve ark., 2006; Wang ve ark., 2003; Li ve ark., 2005.).

Bu çalışmada, kapiler elektroforez yöntemini kullanarak fitonutrient preparatlarda rutin içeriğinin tayini için hızlı ve kolay bir yöntem geliştirilmesi ve geçerliliğinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Kapiler elektroforez yönteminin geçerliliğinin gösterilmesi amacıyla, kesinlik ve doğruluk, doğrusal aralık, tayin ve saptama sınırı gibi geçerlik parametreleri incelenmiştir. Önerilen yöntemin ticari olarak bulunan fitonutrient preparattaki rutin içeriği ile ilgili doğruluğunun gösterilmesi için yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve UV-spektrofotometri yöntemleri ile karşılaştırılmış ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

## KAYNAK BİLGİSİ

### Rutin Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri

Rutin kimyasal olarak [2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4-oxo-chromen-3-yl-rutinoside] ya da [3,3',4',5,7-pentahydroflavon-3-rhamnoglukoside] olarak adlandırılır. Kapalı kimyasal formülü  $C_{27}H_{30}O_{16}$  dır. Açık kimyasal formülü Şekil 1'de verilmiştir.



Şekil 1. Rutin'in Kimyasal Yapısı

Molekül ağırlığı 610.52'dir. Açık sarı renkli iğne şekilli kristal görünümündedir. 214-215 °C de dekompoze olarak erir. 1 g rutin 8 L suda, 200 mL kaynar suda ve 7 mL kaynar metanolde çözünür. Piridin, alkali çözeltiler ve formamit içinde çözünür; alkol, aseton ve etilasetat içinde az çözünür ve kloroform, karbon sülfür, eter ve benzende pratik olarak çözünmez. (Merck, 1989)

Rutin'in metanol içerisinde hazırlanmış çözeltisi 3 hafta dayanıklıdır (Fang ve ark., 2007).

Rutin bir flavonol olan quercetin ve bir disakkarit olan rutinoz (ramnoz ve glukoz) dan meydana gelmiştir ve flavonol tipi bir glikozittir.

### Rutin Farmakolojik Özellikleri

Son on yıl içinde polifenolik bileşikler antitümör, antioksidan ve koroner kalp hastalıklarındaki tıbbi önemlerinden dolayı artan bir ilgi kazanmıştır. Polifenolik bileşikler flavonoidler ve nonflavonoidler olmak üzere ikiye ayrılır. Flavonoidler 4000'den fazla sayıdaki ikincil bitki metabolitlerinin büyük bir ailesini oluşturur ve flavonoller, flavonlar, antosiyaninler, kateşinler ve flavononlar olmak üzere başlıca beş alt sınıfa ayrılabilirler (Fang ve ark., 2007).

Rutin, flavonol grubundan, quercetin-3 rutinoside yapısına sahip olan bir glikozittir. Vücuda alındıktan sonra mikroflorada kersetin yapısına hidroliz edilerek adsorbe olduğu bildirilmektedir. Günümüze kadar, rutin tedavi edici tıpta klinik olarak kullanılmıştır ve rutin ile quercetin dünya çapında yaklaşık 130 kayıtlı preparatı vardır.

Serbest oksijen radikal süpürücü aktivitesi, DNA hasarına karşı koruyucu etkisi, antitümör, antibakteriyel ve antiinflamatuvar özellikleri ve human platelet agregasyonunun inhibisyonu gibi etkileri bilinmektedir (Lin ve ark., 2006).

Antioksidanların etkisi, serbest radikal süpürücü ve zincir kırıcı mekanizmalarla ortaya çıkmaktadır. Oksijen, metabolizasyonu sırasında çok daha reaktif olan superoksit, hidrojen peroksit, tekli (singlet) oksijen ve hidroksil radikallerine çevrilerek aktif oksijen türlerine dönüşür. Antioksidanlar hidrojen atomu vericisi olarak etki göstererek zincir oluşturan radikalleri daha az reaktif türler haline getirirler. Bu şekilde oluşan antioksidan radikali oksijen radikali ile aromatik halka üzerindeki çiftleşmemiş elektronun yer değiştirmesi ile stabilize olur (Başer, 2004).

Flavonoitlerin oksidatif DNA hasarını önlemedeki etkilerinin serbest radikallerin süpürülmesi etkisinin dışındaki mekanizmalarla olabileceği yönündeki çalışmalar bulunmaktadır. Flavonoitlerin glutatyon-S-transferaz aktivitesini artırdığı ve oksidatif stresi azalttığı ve artan GST aktivitesinin mutajenik potansiyeli bulunan ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunu artırdığı bildirilmektedir (Çoşkun, 2005). Ayrıca bu derlemede, flavonoitlerin antitümör, antibakteriyel ve antiinflamatuvar etki mekanizmaları ile ilgili çeşitli yaklaşımlar bulunmaktadır.

Son yıllarda farmakognozi ve gıda biliminde baş döndürücü gelişmeler ve yapılan buluşlar gıda ürünlerine, vücudumuz için yararlı bazı doğal maddelerin, ekstrelerin veya kimyasalların katılmasıyla veya bazı maddelerin bazı dozaj formlarında alınmasıyla bu eksikliklerin giderilmesi ve eksiklikten kaynaklanan rahatsızlıkların önlenmesi fikrini doğurmuştur. Gıda bütünleyiciler (besin destekleri yada dietary supplement) adı altında büyük bir pazarın doğmasıyla vitamin, mineral ve bitkisel drogların pazarlanması gündeme gelmiştir. Gıda bütünleyici terimi 1994 yılında ABD’de yasal olarak tanımlanmıştır ve üretimi için Gıda ve İlaç Dairesi’nden (FDA) izin almak gerekmez. Bu tarihten sonraki gelişmelere bağlı olarak nutrasötik ya da fitonutrient terimi, hastalıkların tedavisinde ya da önlenmesinde sağlığa yararı bilimsel olarak kanıtlanmış toksik olmayan herhangi bir gıda ekstresi desteği olarak tanımlanmıştır. Nutrasötik ürünler için içerik bildirilmesi zorunludur (Başer, 2004).

Rutin tablet 500 mg etken madde içeren bir formulasyon ile gıda bütünleyicilerin fitonutrient grubu içinde pazarlanmakta ve yerel eczanelerde satılmaktadır. Bitkilerle tedavide etkin madde içeriğinin önemi açık olduğu için rutin ilaç ya da bitkilerdeki tayini önem taşır.

### **Rutin Tayini ile İlgili Çalışmalar**

Son yıllarda rutin tayinine yönelik çalışmalar aşağıda yer alan şekilde derlenmiştir.

Kuntic ve arkadaşları (2007), rutin oral dozaj formlarındaki kantitatif tayini için hızlı ve duyarlı bir izokratik ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişler ve geçerliliğini göstermişlerdir. C<sub>18</sub> ters faz analitik kolonda pH 2.8’e ayarlanmış metanol-su 1:1 (h/h) hareketli faz sisteminde 1.0 mL.dk<sup>-1</sup> akış hızında ve 40 °C sıcaklıkta ayırmayı sağlamışlardır. Doğrusal aralık 8.0-120.0 µg.mL<sup>-1</sup>, saptama sınırı 2.6 µg.mL<sup>-1</sup>, tayin sınırı ise 8.0 µg.mL<sup>-1</sup> olarak bildirilmektedir. Günii ve günlerarası kesinlik kabul edilebilir sınırlardadır. Robustness testi, hareketli faz bileşimi ve pH’nın ayırma üzerine başlıca etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Önerilen yöntemin, farmasötik preparatlarda eksipientler varlığında rutin doğrudan tayinine izin vermekle birlikte, rutin ile yapısal ya da kimyasal ilişkili bileşikler içeren preparatlar için uygun olmadığı bildirilmektedir.

Rizzo ve arkadaşları (2006), 23 *Saccharomyces cerevisiae* strain’in (bira mayası) hücre duvarına absorbe edilmiş olan çeşitli fenolik maddelerin tayini için analitik yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Fenolik madde grubundan monomerik antosiyan olarak kateşin, flavanol olarak rutin ve fenolik asit olarak gallik asit ile

çalışılmıştır. Söz konusu fenolik maddelerin mikrobiyal biyokütle saflaştırılması, sıvı sıvı ekstraksiyon yöntemi ile yapılmış ve bu işlemlerin ardından kateşin, rutin ve gallik asidin UV dedektör ile saptandığı bir ters faz kromotografik ayırma uygulanmıştır. Yöntem, gallik asit için 0.12-0.96 µg.mL<sup>-1</sup>, kateşin için 0.25-20.0 µg.mL<sup>-1</sup> ve rutin için 0.02-0.2 µg.mL<sup>-1</sup> derişim aralığında doğrusal bulunmuştur. Geri kazanım gallik asit ve rutin için % 85 den, kateşin için % 94 den büyüktür. Gallik asit, kateşin ve rutin için saptama sınırı 0.015, 0.025 ve 0.029 µg.mg<sup>-1</sup> biyokütle olarak tayin edilmiştir. Bu yöntem, çeşitli fenolik maddelerin tayini ve bira mayasına adsorbsiyon profilini değerlendirmek için önerilmektedir.

Hassan ve arkadaşları (1999) rutin, kersetin ve askorbik asit içeren tablet ya da yumuşak kapsüller gibi farmasötik materyallerde UV spektrofotometrik yöntemin kullanıldığı bir analiz önermektedirler. Yöntem, Kalman Filter kalibrasyonuna dayanmaktadır ve 2.0-10.0 µg.mL<sup>-1</sup> derişim aralığında, 2 ya da 3 bileşenli sentetik karışımlarda veya oral dozajlarda tayinin mümkün olduğunu bildirmektedir.

Dubber ve Kanfer (2006), flavonol glikozitleri, rutin ve kersitirin flavonol aglikonlanları, izoramnetin, kamferol ve kersetin, terpen trilaktonları, A, B, C, J ginkolitleri ve seskiterpen bilobalide'in aynı andaki kalitatif tayini için bir ters akış (revers-flow) miselsi elektrokinetik kromotografik yöntem geliştirmişlerdir. *Ginkgo biloba*'nın katı oral dozaj formlarında, sayılan bileşenlerin kalitatif tayini için bu yöntem kullanılmıştır. Söz edilen bileşenlerin kantitatif tayini için yöntemin geçerliliği gösterilmiş, bazı ticari ürünlerdeki rutin ve kersetin tayin edilmiştir. Ayrıca sodyum dodesilsülfat ve β-siklodekstrin gibi çalışma tamponu bileşenlerinin etkisi araştırılmıştır. Ayırma için 45.0 cm etkin uzunluk ve 60.0 cm toplam uzunluktaki ergitilmiş silika kapiler kolon kullanılmıştır. Çalışma tamponu 20 mM fosforik asit, 40 mM sodyum dodesilsülfat ve 12 mM β-siklodekstrin (pH 2.2) içermektedir ve -17.5 kV değerinde ters polarite kullanılmıştır. Kalitatif analizler için, elektrokinetik injeksiyon tarzı ile -5 kV değerindeki potansiyel 3 s süre ile; kantitatif tayinler için hidrodinamik injeksiyon tarzı ile 20 mbar basınç 0.6 s süre ile uygulanarak numuneler kapilere verilmiştir. Toplam analiz süresi 22 dk dır ve saptama sınırı rutin için 3.13 µg.mL<sup>-1</sup>, kersetin için 1.88 µg.mL<sup>-1</sup>'dir. Önerilen yöntem ticari olarak bulunan *Ginkgo biloba* ürünlerinin kalitesini değerlendirmek için kullanışlıdır.

Jiang ve arkadaşları (2004) sigara numunelerinde kloronejik asit ve rutin tayini için indirekt kemiluminesans kapiler elektroforez sisteminin kullandığı bir yöntem geliştirmişlerdir. Kapiler elektroforezle ayırma işlemlerinden sonra analit zonları luminol potasyum heksasiyanoferrat'ın dolaylı kelimünisansı ile tayin edilmiştir. Önerilen kapiler elektroforez kemiluminesans sistemi ile kemiluminesans reaktifinin elektrolizinin engellendiği, kemiluminesans zemin değerlerinin stabilitesinin sağlandığı, çalışma ve elektrot tampon çözeltilerinin çalışma süresinin uzatıldığı bildirilmektedir. Sigara numunesi çözeltilerinin matriksi, indirekt dedeksiyonda kemiluminesans şiddetini engelleyici etkiye sahiptir. Bu çalışmada, matriks inhibisyonun düzeltilmesi sağlanarak standart ilavesi yöntemi ile dört sigara numunesinde klorojenik asit ve rutin içeriği kapiler elektroforez kemilyuminans sistemi ile tayin edilmiştir.

Xu ve arkadaşları (2006) *Houttuynia cordata* ve *Saururus chinensis* içerisinde rutin, hiperozit, quercitrin ve kersetin tayini için elektrokimyasal dedeksiyonlu bir kapiler elektroforez yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışma elektrodu 500 µm çaplı karbon disk elektrottur ve saptama potansiyeli olarak 0.95 V (Ag/AgCl referans elektroduna karşı) kullanılmıştır. Söz konusu dört flovanoit maddenin ayrılmasında optimum koşulların sağlanması için çalışma tamponunun tipi, pH ve konsantrasyonu, ayırma voltajı, enjeksiyon süresi gibi bazı önemli faktörlerin etkisi araştırılmıştır. 60 mM borat - 120 mM fosfat (pH 8.8) tamponu içeren bir çalışma tamponunda, 60 cm uzunluktaki bir kapilere 15 kV ayırma voltajı uygulanarak

flavonoitlerin ayrılması 21 dk da sağlanmıştır. Pik akımları ve analit konsantrasyonları arasındaki ilişki magnitudün iki katı düzeyinde doğrusaldır ve saptama sınırları bütün analitler için 0.02 ile 0.05  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  aralığındadır. Bu yöntemin *H. cordata* ve *S. chinensis* türlerinde yapılan basit ekstraksiyon işlemlerinden sonra dört flavonoitin tayini için uygulandığı bildirilmektedir.

Wang ve arkadaşları (2003) amperometrik saptamalı kapiler elektroforez yöntemiyle Çin'deki bitkisel ilaçlarda ve insan idrarında hidrokloriyazit ve rutin tayini için bir yöntem geliştirmişlerdir. İki bileşen aynı anda ve 12 dk içinde ve karbon elektrot kullanılarak analiz edilmiştir. Hidrokloriyazid için doğrusal aralık  $2.0 \times 10^{-6} - 1.0 \times 10^{-4}$  M ve rutin için  $1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-4}$  M, saptama sınırları ise  $5.0 \times 10^{-7}$  ve  $2.0 \times 10^{-7}$  M'dır. Elde edilen sonuçlar yöntemin yüksek duyarlılıkta tekraredilebilir ve yüksek seçicilikte olduğunu göstermiş, ilaçların metabolik kinetik çalışmaları için önerilmiştir.

Li ve arkadaşları (2005) susuz ortam kapiler elektroforez yöntemini kullanarak rutin, puerarin, daidzein, esculin ve esculetin gibi biyoaktif bileşenlerin aynı anda tayini için bir yöntem geliştirmişlerdir. Çalışma tamponu, % 15 (h/h) asetonitril, % 2.5 (h/h) asetik asit ve metanol içerisinde hazırlanmış 90 mM sodyum kolat'dan oluşmaktadır. Bu maddeler için saptama sınırları 0.05 ile 1.22  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  aralığındadır. Analitlerin göç zamanı ve pik alanlarının bağıl standart sapması günüçi % 1.3-2.9 ve günlerarası % 1.7-3.6 aralığındadır. Çalışılan konsantrasyon aralığında pik alanları ile derişimler arasında doğrusal ilişki elde edilmiş ve önerilen yöntem tıbbi preparatlarda bileşenlerin aynı anda tayini için uygun geri kazanımla uygulanmıştır.

Guo ve arkadaşları (2006) *Forsythia suspensa* rutinin de içinde bulunduğu on iki bileşenin aynı anda tayini için diyot dizisi dedektörlü yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi tayini Zorbax XDBc 18 kolonda metanol ve % 0.3 asetik asidin gradient elüsyonunda 55 dk içinde gerçekleştirilmiştir. Yöntemin geçerliliği, % 3 den az günüçi ve günlerarası değişkenlikle tekraredilebilirlik ve % 91.2-104.9 aralığındaki geri kazanım ile gösterilmiştir. *F. Suspensa*'nın kalite kontrolünde geliştirilen yöntemin uygun olabileceği önerilmektedir.

Zu ve arkadaşları (2006) *Hippophae rhamnoides* yapraklarının ekstresinde kateşin, rutin, kersetin, kamferol ve izoramnetin'in aynı anda tayini için diyot dizisi dedektörlü ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Numune ön işlemleri 80 kHz frekansta % 85 etanolle 45 °C de 30 dk ultrasonik ekstraksiyonu içerir. Sıvı/materyal oranı  $15 \text{ mL.g}^{-1}$  dir. Ekstraksiyonun ardından ekstre ters faz kolona verilerek %1 asetik asit içeren metanol-asetonitril-su (40:15:45) hareketli faz sisteminde ayrılmıştır. Saptama dalga boyu olarak 270 nm kateşin için, 250 nm rutin için, 368 nm ise kamferol, kersetin ve izoramnetin için kullanılmıştır. *Hippophae rhamnoides* yapraklarındaki flavonoitlerin uygun geri kazanım ve tekraredilebilirlikle 12 dk içinde tayini gösterilmiştir.

Lu ve arkadaşları (2006) *Platycladus orientalis* bitkisinde bulunan dört biyoaktif flavonoitin (rutin, quercitrin, kersetin ve amentoflavon) kalitesinin değerlendirilmesi için diyot dizisi dedektörlü ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Rutin için doğrusal aralık  $0.8-80.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$  olarak bildirilmektedir. Çin'in 12 farklı bölgesinde yetişen *P. orientalis* türlerinde bulunan söz konusu dört flavonoit içeriği yöntemin verimliliğini değerlendirmek için karşılaştırılmıştır.

Krizman ve arkadaşları (2007) *Foeniculum vulgare*'deki fenolik bileşiklerin analizi için bir ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişler. Optimize kromatografik koşullarla küçük boyuttaki monolitik kolonların kullanımı ile günlük 100 den fazla numunenin analizinin yapıldığı bildirilmektedir. Kolon sıcaklığı ve enjeksiyon hacmi

gibi kromatografik parametrelerin uygun seçicilik ve rezölasyonun elde edilmesinde çok önemli olduğu bulunmuştur. Önerilen yöntemin fenolik maddeler için geçerliliği gösterilmiştir.

Bilboa ve arkadaşlarının önerdiği bir çalışmada (2007), *Citrus* türlerinin ekstrelerindeki flavonoidlerin analizi için diyet dizisi dedektörlü yüksek performanslı sıvı kromatografisi tekniği geliştirilmiş ve miktarları tayin edilmiştir. Flavonoidlerin teşhisi için sıvı kromatografi kütle spektrometri tekniği kullanılmıştır. Yöntemin geçerliliği gösterilmiş ve çok hızlı bir numune hazırlama tekniği önerilmiştir.

Lin ve arkadaşları (2006), bir karışımdaki rutin ve kersetinin aynı anda tayini için diferansiyel puls voltametri tekniğini kullanmışlardır. Karbon nanotüp pasta elektrot bu amaçla kullanılmıştır. Doygun kalomel elektrotta karşı 0.155 ve 0.360 V'da iki oksidasyon basamağı ile kersetin, 0.316 V'da tek oksidasyon basamağı ile rutin pikleri elde edilmiştir. Elektrot yüzeyinde kuvvetli adsorbsiyon ve istenen birikmesi gözlenmiş ve büyüyen sinyallerle birbirinden ayrılmış voltametrik pikler elde edilmiştir. Elektrokimyasal sistem, uygun tampon seçimi ve adsorbsiyon potansiyeli ve gerekli süre gibi ön biriktirme parametreleri için optimize edilmiştir. Yöntemin gerçek numunelere uygulanması gösterilmiş ve değerlendirilmiştir.

Zeng ve arkadaşları (2006) rutin tek duvarlı karbon nanotüp modifiye altın elektrotta voltametrik davranışını incelemişler ve tayinini gerçekleştirmişlerdir. Modifiye elektrotta pH 11 den küçük olduğu zaman rutine ait bir çift pik gözlenmiştir. pH 5 ve 0.1 M fosfat tamponu çözeltisinde pik potansiyeli 0.35 V'tur. Elektrokimyasal reaksiyon iki elektron transferi ile ilgilidir ve elektro kimyasal işlem adsorbsiyon ile kontrol edilir. Rutinin adsorbsiyon tarzı ve difüzyon katsayısı tayin edilmiştir. Çözelti pH'ı, biriktirme zamanı ve biriktirme potansiyeli optimize edilmiş ve pik akımlarının  $2.0 \times 10^{-8}$  ile  $5.0 \times 10^{-6}$  M derişim aralığında doğrusal olduğu belirlenmiştir. Rutinin ilaç tabletlerindeki ve *flos sophorae*' da tayini için yöntem uygulanmıştır. Hemoglobinin varlığında rutin pik akımı doğrusal olarak azalmakta ve bu hemoglobinin dolaylı tayini için önerilmektedir.

## **GEREÇLER**

### **Kullanılan Maddeler**

Rutin hidrat (Sigma, R-5143, Steinheim, Almanya), enoksazin (Eczacıbaşı İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş., İstanbul, Türkiye), borat (Sigma B-9876, Steinheim, Almanya) sodyum hidroksit (Merck, Darmstadt, Almanya), metanol (Riedel de Haen, Seelze, Almanya), perklorik asit (Merck, Darmstadt, Almanya) deneyler süresince kullanılan kimyasallardır ve analitik saflıktadır.

### **Kullanılan Cihazlar**

#### ***Kapiler elektroforez***

Kapiler elektroforez deneyleri, PrinCE CEC 750 marka kapiler elektroforez cihazını oluşturan yüksek voltaj güç kaynağı, otomatik injeksiyon modülü ve diyot dizisi dedektör (Emmen, Hollanda) kullanılarak yapılmıştır. Bu cihaza kombine edilmiş olan PC bilgisayar Windows programı altında çalışan DAX 3D (version 7.3) donanımına sahiptir ve veriler bu kısımda toplanarak değerlendirilmiştir. Analizler 75 µm iç çapa sahip toplam uzunluğu 47 cm, etkin uzunluğu 39.8 cm olan ergitilmiş silika kapiler (Phenomenex, CA, ABD) ile gerçekleştirilmiştir.

Günlük çalışmalara başlamadan önce kapiler, 0.1 M sodyum hidroksit, ultra saf su ve çalışma tamponunun her biri ile, verilen sırada, 10 dk süre ile yıkanmış ve kapiler iç yüzeyinin koşullandırılması sağlanmıştır. Deneyler arasında, kapiler içi 0.1 M sodyum hidroksit, ultra saf su ve çalışma tamponu ile 7, 1, 3 dk süreyle, verilen sırada, yıkanmıştır. Ergitilmiş silika kapiler 50 mM borat (pH 9.3) çalışma tamponu ile doldurulduktan sonra, hidrodinamik injeksiyon tarzı kullanılarak numune, 50 mBar basınçla ve 0.08 dk süreyle kapiler kolona alınmıştır. Analiz sırasında +20 kV potansiyel uygulayarak ayırmalar sağlanmıştır. Tüm deneyler süresince 25°C sıcaklıkta çalışılmıştır. Ayrılmış olan pikler rutin'in monokromatik ışığı maksimum düzeyde absorbe ettiği dalga boyu olan 265 nm de saptanmıştır. Analiz sırasında, karşılık gelen akım 200 µA olarak gözlenmiştir.

#### ***Yüksek performanslı sıvı kromatografisi***

Yüksek performanslı sıvı kromatografi deneyleri, hepsi Shimadzu olan LC 10AT Liquid Chromatograph, LCV-10AL VP gradient donanımlı pompa, SPD-M10A diode array dedektör, CBM-10A communication bus module, 5 µL hacimli loop cihazları ile yapılmış, Pentium 75 işletim sistemli Accura marka bilgisayar bağlantılı Class LC10A programı altında çalışan veri işletim sisteminde değerlendirilmiştir. 260 nm dalga boyunda çalışılmıştır. Ayırma ve miktar tayini işlemlerinde Luna 3 µ tanecik çapında, C<sub>18</sub>, 100 x 4.60 mm Phenomenex marka kolon kullanılmıştır. Akış hızı 0.6 mL.dk<sup>-1</sup> dir.

#### ***UV-Spektrofotometri***

UV-Spektrofotometrik deneyler sırasında Shimadzu marka UV-2401 PC spektrofotometre kullanılmıştır.

#### ***Diğer cihazlar***

Çözeltilerin pH sı cam elektrotlu P 114 model pH metre (Consort, Belçika) kullanılarak ölçülmüştür. Çözeltilerin her biri santrifüj edildikten sonra B-220 model ultrasonik banyo (Branson, ABD) kullanılarak çözeltide çözünmüş olan gazlar uzaklaştırılmıştır.

#### ***Çözeltiler***

Rutin standart çözeltisi 1.0x10<sup>-3</sup> M derişimde metanol içinde hazırlanmış ve gerekli bütün seyreltme işlemlerinde kullanılmıştır. Kapiler elektroforez deneylerinde kullanılan iç standart

(IS) çözeltisi olan enoksazin (1.0 mg/mL) metanol içerisinde hazırlanmıştır. Çalışma tamponu olarak 50 mM pH 9.3 borat tamponu kullanılmıştır. IS çözeltisi daima  $6.24 \times 10^{-5}$  M son derişimi sağlayacak şekilde kullanılmıştır. Kapiler elektroforeze enjekte edilen standart ve numune çözeltileri % 10 metanol ve 10 mM borat pH 9.3 içerisinde hazırlanarak cihaza verilmiştir. Rutin standart çözeltisi ile çalışma aralığının belirlenmesinde,  $2.14 \times 10^{-5}$  M –  $1.07 \times 10^{-4}$  M derişim aralığındaki beş farklı derişimde standart rutin çözeltileri kullanılmıştır. Bu çözeltiler için kalibrasyon eşitlikleri belirlendikten sonra, yöntemin geçerliliği (validasyonu) ile ilgili çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi yönteminde hareketli faz olarak metanol-su (50:50, h/h) kullanılmıştır. Rutin standart ve numune çözeltileri hareketli faz bileşiminde seyreltilerek kromatografik sisteme enjekte edilmiştir. Çalışma aralığının belirlenmesi için,  $2.14 \times 10^{-6}$  M –  $1.07 \times 10^{-5}$  M derişim aralığındaki beş farklı derişimde standart rutin çözeltileri kullanılmıştır.

UV-spektrofotometrik yöntemde, % 10 metanol (h/h) içerisinde rutin standart çözeltileri ve tablet numuneleri hazırlanmıştır. Bu yöntemde kullanılan kör çözeltisi % 10 metanol (h/h) içeren sulu çözeltidir. Rutin standart çözeltisi ile çalışma aralığının belirlenmesinde,  $7.49 \times 10^{-6}$  M –  $3.21 \times 10^{-5}$  M derişim aralığındaki beş farklı derişimde standart rutin çözeltileri kullanılmıştır.

#### **Tablet Numunelerinin Hazırlanması**

Rutin'in tayini için kullanılan fitonutrient preparatı, Solgar Vitamin Ltd. (İstanbul, Türkiye) firmasının üretimi olan RUTİN 500 mg<sup>®</sup> adlı tablettir. *Dimorphandra mollis* bitkisinden elde edilip üretildiği ve 500 mg rutin içerdiği bildirilmektedir. Etken madde dışında 85 mg kalsiyum, mikrokristal seluloz, bitkisel seluloz, bitkisel stearik asit, bitkisel magnezyum stearat, bitkisel gliserin içermekte ve tamamen doğal kaynaklardan üretildiği bildirilmektedir.

RUTİN 500 mg<sup>®</sup> tablet lokal eczaneden temin edilerek kullanılmıştır.

Tablet numunelerinin hazırlanması için, 500 mg rutin içeren 10 tablet ağırlığı tam olarak tartıldıktan sonra tabletler havanda toz edilmiş ve ağız sıkı kapanan ve ışık geçirmeyen bir kaba konulmuştur. Bir tabletin ortalama ağırlığı hesaplanarak, bu ağırlığa karşılık gelen miktar tam tartıldıktan sonra 35 mL metanol ile çözülmüş ve ağız kapalı bir kaptaki 30 dk sonike edildikten sonra 50 mL ye metanol ile tamamlanmıştır. Tablet çözeltisi analize hazırlanmak üzere seyreltilmeden önce 5000 rpm de santrifüj edilmiştir. Kapiler elektroforez, yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve UV-spektrofotometri yöntemleri ile yapılacak tayinlerde söz edilen tablet stok çözeltisi kullanılarak ilgili kısımda belirtilen şekilde seyreltilerek miktar tayini yapılmıştır.



## YÖNTEMLER

### Kapiler Elektroforez Yöntemi

Kapiler elektroforez, küçük hacimlerdeki numunelerde bulunan yüklü parçacıkların hızlı ve verimli ayırmalarına ve analizine olanak sağlayan modern bir analitik tekniktir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi, gaz kromatografisi ve jel elektroforez gibi yaygın kullanılan ayırma tekniklerinin tamamlayıcısıdır. Gelecekte, yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve jel elektroforez gibi çok kullanılan analiz yöntemlerinin yerini olasılıkla kapiler elektroforez alacaktır, çünkü yüksek verimlilikte ve hızlı ayırmalar, diğer yöntemlerdeki materyallere göre ucuz ve dayanıklı kapiler kolonlar, küçük hacimli numune ile çalışabilme ve reaktif sarfiyatının az olması gibi bazı üstünlükler taşımaktadır (Li, 1993, Baker, 1995).

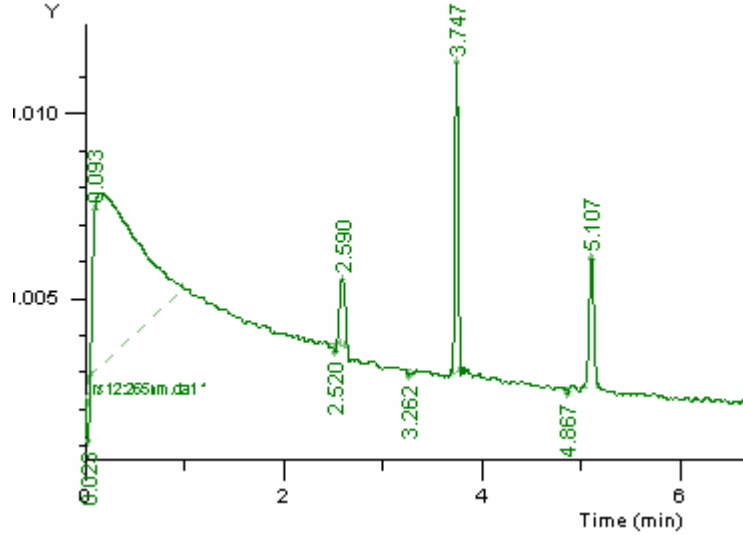
Aynı kapiler ile, polar, nonpolar ve kiral yapılardaki bileşiklerin, proteinler gibi büyük moleküllerin, oda sıcaklığında ve bir sıvı pompasına gerek duyulmaksızın düşük basınçta ayırma ve analizleri yapılabilmektedir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi kolonları ile karşılaştırıldığında kapiler kolonlar daha ucuz, kullanımı kolay ve daha uzun ömürlüdür (Li, 1993, Baker, 1995).

Kapiler elektroforezin bilinen dezavantajı, kısa ışık yolu nedeniyle saptama limitinin yüksek performanslı sıvı kromatografisi yönteminde olduğu kadar düşük olmamasıdır. Katı ve sıvı faz ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak fiziksel olarak bu olumsuzluğun ortadan kaldırılması yoluna gidilebildiği gibi, literatürlerde rastlanan biriktirme tekniği (stacking) ve kapiler elektroforezin diğer çalışma tarzları olan izotakoforez ve izoelektrik odaklama tekniklerinin uygulanması ile  $10^{-6}$  M altındaki saptama sınırlarına ulaşılabilir (Shihabi, 2000).

## BULGULAR ve TARTIŞMA

### Rutin'in Kapiler Elektroferez Yöntemi ile Tayini

Rutin ve iç standart olarak kullanılan enoksazin çözeltisi 50 mM pH 9.3 çalışma tamponu kullanılarak kapiler elektroferez cihazında +20 kV potansiyel uygulanarak 3.7 dk 'da IS ve 5.1 dk rutin için birbirinden ayrılmış keskin pikler elde edilmiştir.



Şekil 2. Standart Rutin ( $4.28 \times 10^{-5}$  M) ve Enoksazin (IS,  $6.24 \times 10^{-5}$  M) Orijinal Elektroferogramı, Rutin 5.1 dk ve IS 3.7 dk

50 mM pH 9.3 borat çalışma tamponu ile elektroozmotik hareketlilik  $2.99 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , IS için elektroforetik hareketlilik  $-1.21 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  ve rutin için ise  $-3.24 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır. Yöntemin seçiciliği 2.25, resolusyon (ayırma gücü) ise 3.75 olarak hesaplanmıştır.

### Kapiler Elektroferez Yönteminin Kesinliği

Ayrılmanın sağlanmasının ardından, yöntemin kesinliğini belirlemek için göç zamanı ve pik alanı tekraredilebilirlikleri incelenmiştir. Bu amaçla, standart HP ve IS çözeltileri, üç gün boyunca 6 defa kapiler elektroferez cihazına verilerek elde edilen göç zamanları ve pik alanları değerlendirilmiştir. Pik alanlarının değerlendirilmesinde, alan oranı  $[\text{Alan}_{\text{rutin}} / \text{Alan}_{\text{IS}}]$  değerleri kullanılarak yapılan istatistiksel değerlendirme sonuçları Çizelge 1'de verilmektedir (Caporal-Gautier, ve ark., 1992).

Çizelge 1'e göre, göç zamanı günüçi tekraredilebilirlik değerleri % 2' nin altındaki bağıl standart sapma değeri ile tekraredilebilirlik kriterlerine uygun görülmektedir. Günlerarası tekraredilebilirlik değerlendirildiğinde, söz konusu derişim değeri için % 15 bağıl standart sapmanın altında elde edilen sonuçlar yöntemin tekraredilebilirliğini göstermektedir (Shah ve ark., 1992). Alan oranı kullanılarak yapılan değerlendirmelerde oldukça iyi tekraredilebilirlik elde edildiği için, sonraki verilerin değerlendirilmesinde alan oranı değerlendirme şeklinin kullanılmasına karar verilmiştir.

**Çizelge 1. Standart Rutin Çözeltileri ( $4.28 \times 10^{-5}$  M) ve IS ( $6.24 \times 10^{-5}$  M) için Elde Edilen Göç Zamanı ve Alan Oranı Tekraredilebilirlik Değerleri<sup>1,2</sup>**

	Ortalama Göç Zamanı (dk)	Günlük Tekraredilebilirlik	Günlerarası Tekraredilebilirlik
Elektroozmoz	2.5	0.6547	1.6011
IS ( $6.24 \times 10^{-5}$ M)	3.7	0.4331	1.0908
Rutin ( $4.28 \times 10^{-5}$ M)	5.2	1.0843	2.0074
Alan oranı	0.7334	1.5261	5.7081

<sup>1</sup> n = 6 (deney sayısı); k = 3 (gün);

<sup>2</sup> Tekraredilebilirlik % Bağıl Standart Sapma ile ifade edilmiştir.

### **Kapiler Elektroferez Yönteminin Doğrusal Aralığı**

Doğrusal aralığının incelenmesi için,  $2.14 \times 10^{-5}$  M ile  $1.07 \times 10^{-4}$  M derişim aralığında beş farklı derişimdeki rutin çözeltileri kapiler elektroferez cihazına verilerek üç ayrı günde elektroferogramları kaydedilmiş ve elde edilen sonuçlar en küçük kareler yöntemine göre değerlendirilmiştir. Yöntemin  $2.14 \times 10^{-5}$  M ile  $8.56 \times 10^{-5}$  M derişim aralığında elde edilen yüksek korelasyonlu doğrusallığını gösteren sonuçlar Çizelge 2’de verilmektedir.

**Çizelge 2. Kapiler Elektroferez Yöntemi ile Doğrusal Aralık için Elde Edilen Sonuçlar**

	Günlük			Günlerarası (n = 15)
	1. Gün (n = 5)	2. Gün (n = 5)	3. Gün (n = 5)	
Eğim ± SE	14320±168.8	15250±36.42	13840±83.25	14470±328.1
Kesim ± SE	-0.0598±0.0096	-0.0686±0.0021	-0.0322±0.0047	-0.0535±0.0185
Korelasyon Katsayısı	0.9999	0.9999	0.9999	0.9982

SE: Standart Hata

Yöntemin saptama sınırı, alan oranları kullanılarak elde edilen kalibrasyon eğrisinin kesim değerinin standart sapmasının 3.3 ile çarpımının, kalibrasyon eğrisinin eğimine bölünmesiyle,  $4.33 \times 10^{-6}$  M olarak hesaplanmıştır. Tayin sınırı ise, kesimin standart sapmasının 10 ile çarpımının eğime bölünmesi ile  $1.31 \times 10^{-5}$  M olarak hesaplanmıştır.

### **Kapiler Elektroferez Yönteminin Doğruluğu ve Kesinliği**

Yöntemin doğruluğu ve kesinliğini test etmek için üç farklı derişimdeki standart rutin çözeltileri hazırlanarak 6 defa kapiler elektroferez cihazına verilmiş ve kalite kontrol standartları için bir değerlendirme yapılmıştır.

**Çizelge 3. Kapiler Elektrozefrez Yöntemin Doğruluğu ve Kesinliğı ile İlgili İstatistiksel Değerlendirme Sonuçları\***

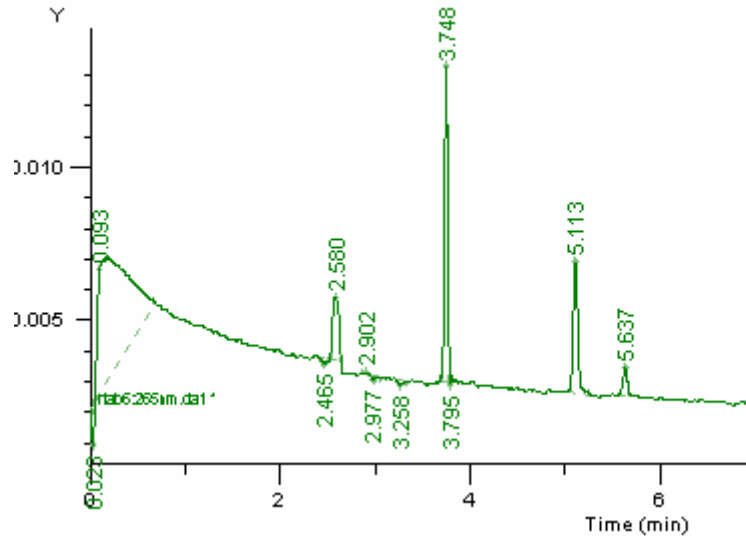
Eklenen Rutin (M)	Bulunan Rutin (M) (ort.±SS)	Gerikazanım (%)	Doğruluk (%)	BSS (%)
$2.14 \times 10^{-5}$	$2.30 \times 10^{-5} \pm 2.95 \times 10^{-6}$	107.47	8.88	12.82
$4.28 \times 10^{-5}$	$4.22 \times 10^{-5} \pm 1.95 \times 10^{-6}$	98.60	-1.40	4.41
$8.56 \times 10^{-5}$	$8.58 \times 10^{-5} \pm 2.70 \times 10^{-6}$	100.23	0.23	3.14

\* n = 6

Doğruluk için, kabul edilebilirlik kriteri, % 15’den fazla sapmanın olmamasıdır (Shah ve ark., 1992). Çizelge 3’de görüldüğü gibi, standart rutin çözeltilerinin tayininde elde edilen sonuçlar, tayin sınırına yakın olan derişim dışında bu kriterin oldukça altında bulunmuştur.

### **Kapiler Elektrozefrez Yöntemi ile Rutin İçeren Tabletlerde Miktar Tayini**

Kapiler elektrozefrez yönteminin uygulaması, 500 mg rutin içerdüğü bilinen fitonutrient tabletlerde miktar tayini yapılarak gösterilmiştir (Şekil 3). Deneysel kısımda tarif edildiğı şekilde hazırlanan tablet numuneleri söz edilen optimum koşullarda analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, doğrusallık bölümünde verilen günlerarası eşitlikte çözümlenerek rutin içeren tabletlerdeki miktarlar ve karşılık gelen yüzdeleri hesaplanmıştır. Tablet bileşenlerinden kaynaklanan ve ölçümleri etkileyecek düzeyde girişim gözlenmemiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmeler, Çizelge 4’de sunulmaktadır.



**Şekil 3. Rutin 500 mg Tablet ve Enoksazin ( $6.24 \times 10^{-5}$  M) İçeren Çözeltinin Elektrozefrogramı**

USP XXIV farmakopesinde, birim etken madde içeriği için sağlanması gerekli bulunan koşullar bildirilmektedir (United States Pharmacopeia, 2000). Farmakopeye göre, 10 adet tablet ölçümü yapılmasının ardından etkin madde içeriğinin % 85-115 aralığında bulunması ve ölçümün % bağıl standart sapma değerinin ise % 6 dan az veya eşit olması gereklidir. Geliştirilen yöntemle yapılan ölçümlerde, RUTİN 500 mg<sup>®</sup> tablet içeriği farmakopenin gerektirdiği aralıkta bulunmuştur. Ölçümlerin % bağıl standart sapma değeri % 6 dan oldukça azdır.

**Çizelge 4. Kapiler Elektroferez Yöntemi ile Tabletlerde Rutin Miktar Tayini Sonuçları.**

Deney Sayısı	Bulunan Rutin (mg)	% Rutin
1	490.80	98.16
2	485.55	97.11
3	505.80	101.16
4	516.00	103.20
5	524.15	104.83
6	506.00	101.20
Ortalama	504.70	100.90
Standart sapma	14.62	2.92
% Bağıl standart sapma	2.90	2.90
Güven aralığı (p<0.05)	±72.23	±2.76

Rutin'in piyasadaki preparatı etken madde dışında dikalsiyum fosfat, mikrokristal seluloz, bitkisel seluloz, bitkisel stearik asit, bitkisel magnezyum stearat, bitkisel gliserin içermekte ve tamamen doğal kaynaklardan üretildiği bildirilmektedir. Bitkisel matriks ortamının hazırlanmasındaki güçlük nedeniyle matriks ortamındaki kesinlik ve doğruluk değerlendirilmesi yapılamamıştır. Ancak kapiler elektroferez yöntemi ile yapılan tablet içerisindeki rutin miktar tayini sonuçları, iki farklı tayin yöntemi, UV-spektrofotometrik yöntem ile yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi kullanılarak kapiler elektroferez yönteminin doğruluğunu test etmek amacıyla karşılaştırılmıştır.

#### **UV Spektrofotometri Yöntemi ile Rutin İçeren Tabletlerde Miktar Tayini**

UV-spektrofotometri, ilaç içerisindeki etken madde tayininde yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir (Tunçel, ve ark., 1991; Tunçel ve Doğrukol, 1992; Doğrukol-Ak ve Tunçel, 1994; Doğrukol-Ak ve Tunçel, 1995; Doğrukol-Ak ve ark., 1998). Kapiler elektroferez yöntemi ile yapılan bitkisel kökenli tablet içerisindeki rutin miktar tayini sonuçlarının doğruluğunu ve kesinliğini karşılaştırmak için UV-spektrofotometrik yöntemin kullanılabileceği koşullar araştırılmıştır.

UV-spektrofotometrik yöntemin uygulanması için rutin'in % 10 metanol (h/h) içeren sulu çözeltisi kullanılmıştır. Maddenin spektrumu 200-800 nm dalga boyu aralığında kuartz kuvvetler kullanılarak kaydedilmiştir. Kör olarak % 10 metanol (h/h) içeren sulu çözelti kullanılmıştır. % 10 metanol (h/h) içeren sulu çözelti ortamında hazırlanan rutin'in 255 nm ve 351 nm olmak üzere iki ayrı dalga boyunda maksimum absorbans verdiği bulunmuştur. 255 nm dalga boyunda daha yüksek absorbans değerleri elde edildiği için çalışma dalga boyu olarak seçilmiştir.

Kalibrasyon eğrisinin hazırlanması ve kalibrasyon eşitliğinin belirlenmesi için  $7.49 \times 10^{-6}$  -  $3.21 \times 10^{-5}$  M aralığındaki beş farklı derişimdeki standart rutin çözeltileri hazırlanarak 255 nm’deki absorbens değerleri okunmuştur. Belirtilen derişim aralığına karşılık gelen absorbens değerleri grafiğe geçirildiğinde

$$A = 26500 \cdot C (M) + (-0.011) , r = 0.9998$$

eşitliği elde edilmiştir. Korelasyon katsayısı yüksek doğrusal kalibrasyon eğrisi ile rutin içeren tabletlerde miktar tayininin yapılabileceğine karar verilmiştir.

Tablet numunesinin analizi sırasında, Gereçler kısmında tarif edildiği şekilde, kalibrasyon doğrusunun orta noktasına karşı gelecek derişimde hazırlanarak 255 nm dalga boyunda karşı gelen absorbens değerleri okunmuştur. Hazırlanan numunelerdeki rutin içeriği ile ilgili olarak ölçülen absorbens değerleri kalibrasyon eşitliğinde çözüldükten sonra tablet içeriğindeki rutin miktarı hesaplanmıştır. UV-spektrofotometrik yöntemle elde edilen sonuçlar Çizelge 5’de sunulmaktadır.

**Çizelge 5. UV-Spektrofotometrik Yöntemle Tabletlerde Rutin Miktar Tayini Sonuçları.**

Deney Sayısı	Bulunan Rutin (mg)	% Rutin
1	513.75	102.75
2	492.30	98.46
3	503.40	100.68
4	495.75	99.15
5	512.45	102.49
6	496.35	99.27
Ortalama	502.3	100.46
Standart sapma	9.10	1.82
% Bağlı standart sapma	1.81	1.81
Güven aralığı (p<0.05)	±10.02	±0.88

### **Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Rutin İçeren Tabletlerde Miktar Tayini**

Abdallah ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntem (1993) temel alınarak deneysel kısımda tarif edildiği şekilde uygulanan yüksek performanslı sıvı kromatografisi yönteminde  $5.86 \times 10^{-6}$  M rutin çözeltileri için elde edilen kromatogramları Şekil 4a ve Şekil 4b’de verilmektedir. Bu yöntem, rutin içeren tablet şeklindeki farmasötik preparatta kapiler elektroforez yöntemi ile bulunan sonuçları karşılaştırmak amacıyla uygulanmıştır. Kullanılan metanol-su (50:50, h/h) hareketli faz sistemi ile rutin için 5.0 dk dolayında keskin pik elde edilmiştir. Validasyonu ayrıntılı bir şekilde Abdallah ve arkadaşları tarafından gösterilmiş olan bu yöntemin kesinliğini kontrol etmek amacıyla yapılan çalışmada elde edilen veriler Çizelge 6’da sunulmaktadır.

**Çizelge 6. Rutin İçin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Elde Edilen Veriler.**

Deney No	Alıkonma Zamanı	Pik Alanı	Normalize Pik Alanı
1	5.062	113404	22.403
2	5.028	116261	23.123
3	5.020	113335	22.577
4	5.028	112517	22.378
5	5.039	113007	22.426
6	5.053	111323	22.031
Ortalama	5.038	113308	22.490
Standart sapma	0.0163	1626	0.3585
% Bağlı Standart Sapma	0.32	1.44	1.59

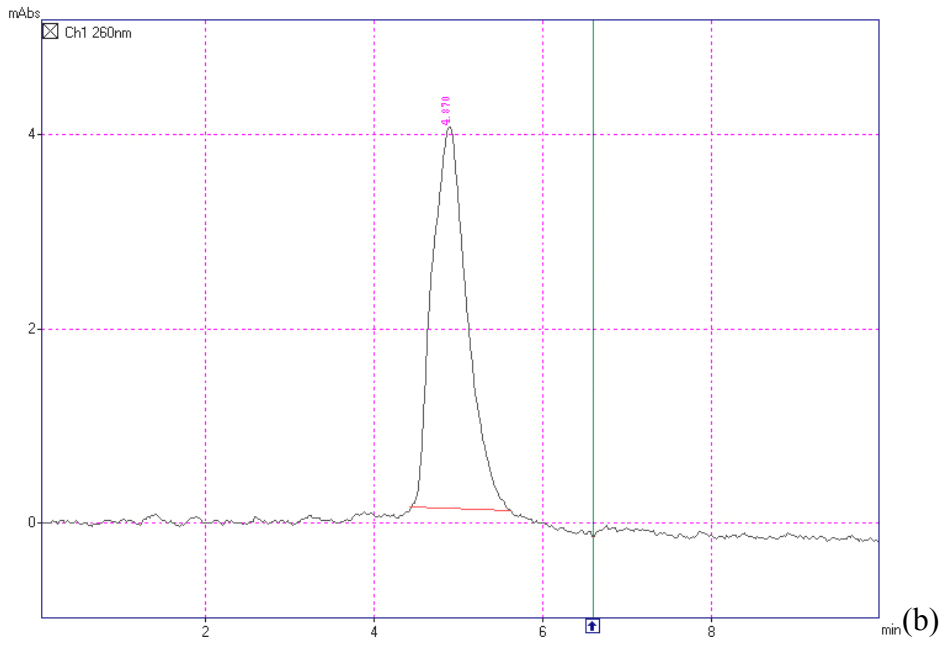
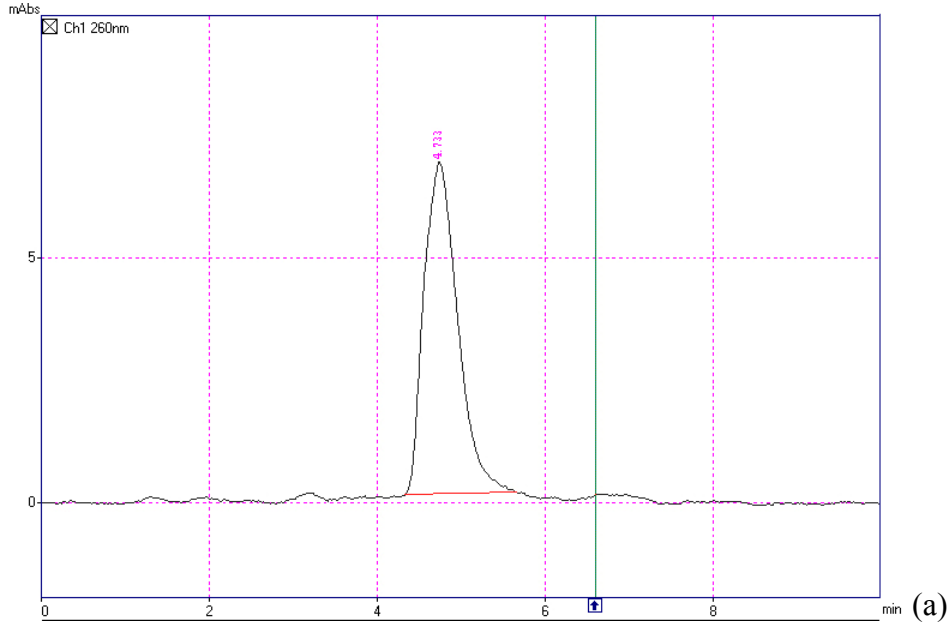
Çizelge 6’ da görüldüğü gibi standart rutin çözeltisinin 6 defa analizi sonucunda pik alanı ve normalize pik alanı ( $Alan_{rutin} / Alıkonma\ zamanı_{rutin}$ ) şeklinde yapılan değerlendirmede % bağıl standart sapma değerleri bu yöntemin kullanılmasına izin verecek şekilde tekraredilebilir bulunmuş ve daha sonraki hesaplamalarda derişime karşı pik alanı değerlerinin kullanılmasına karar verilmiştir.

$2.14 \times 10^{-6} - 1.07 \times 10^{-5}$  M derişim aralığında farklı derişimlerdeki standart rutin çözeltileri ile yapılan çalışmada derişim ile pik alanı arasındaki doğrusallık ilişkisi araştırılmıştır. Belirtilen derişim aralığında, derişim ile pik alanı arasında

$$Pik\ Alanı = -15505 + 2.872 \times 10^{10} Derişim\ (M); r = 0.9999$$

eşitliği elde edilmiştir.

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi ile derişim ile karşılık gelen alan değerleri arasındaki doğrusal ilişki yüksek korelasyon katsayılı eşitlikler ile gösterildikten sonra tablet şeklindeki rutin içeren farmasötik preparattaki miktar tayini işlemine geçilmiştir. Bunun için, 500 mg rutin içerdiği bildirilen tablet numunesi Gereçler kısmında tarif edildiği şekilde çalışılarak tablet numunesine için metanol içerisinde stok çözelti hazırlanmıştır. Bu stok çözeltilerden % 50 (h/h) metanol içeriği verecek şekilde yapılan seyreltme işlemlerinden sonra kromatografik analiz gerçekleştirilmiştir. Numune çözeltisi için elde edilen kromatogram Şekil 4b’ de ve miktar tayini sonuçları Çizelge 7’de görülmektedir.



**Şekil 4. Rutin'in Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Elde Edilen Kromatogramları**  
**(a)  $4.28 \times 10^{-6}$  M Standart Rutin Çözeltisi, (b) Fitonutrient Tablet Çözeltisi**



**Çizelge 7. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Tabletlerdeki Rutin Miktar Tayini Sonuçları.**

Deney Sayısı	Bulunan Rutin (mg)	% Rutin
1	509.00	101.80
2	512.25	102.45
3	528.20	105.64
4	509.70	101.94
5	513.35	102.67
6	505.75	101.15
Ortalama	513.0	102.61
Standart Sapma	7.89	1.58
% Bağıl Standart Sapma	1.54	1.54
Güven aralığı (p<0.05)	±107.62	±4.32

Çizelge 7’de görüldüğü gibi yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi ile rutin içeren tabletlerde yapılan analiz sonucunda tablet numunesinin ortalama % 102 rutin içerdiği bulunmuştur. Bu koşullarda elde edilen bağıl standart sapma değerleri % 2’ den azdır.

#### Rutin İçeren Tabletlerde Miktar Tayini Sonuçlarının Karşılaştırılması

Kapiler elektroforez yöntemi ve standart yöntemler olarak uygulanan UV-spektrofotometri ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemleri uygulanarak elde edilen rutin içeren tabletlerde yapılan analiz sonuçları GraphPad Prism version 3.0 veri işletim programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Kapiler elektroforez ile elde edilen tabletteki rutin içerikleri standart yöntemlerle karşılaştırıldığında bulunan istatistiksel veriler Çizelge 8’de verilmektedir.

**Çizelge 8. Tabletlerdeki Rutin İçeriğinin Kapiler Elektroforez, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi ve UV-Spektrofotometri Yöntemleri ile Karşılaştırılması.**

	Kapiler Elektroforez	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi	UV-Spektrofotometri
Ortalama	504.70	513.0	502.3
Standart sapma	14.62	7.89	9.10
% Bağıl standart sapma	2.90	1.54	1.81
t-testi (p<0.05)	1.39; 0.40	Tablo $t_{0.05} = 2.57$	Tablo $t_{0.05} = 2.57$
F testi (p<0.05)	3.43; 2.58	Tablo $F_{0.05} = 5.05$	Tablo $F_{0.05} = 5.05$

Çizelge 8’ de görüldüğü gibi t-testi uygulanarak kapiler elektroforez ile bulunan ortalama rutin miktarı, yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemin verdiği ortalama ile karşılaştırıldığında elde edilen 1.39 değeri, serbestlik derecesi (n-1) 5 ve % 95 güven düzeyi için bilinen Tablo t değeri olan 2.57 den küçük olduğu için sonuç olarak yöntemlerin verdiği ortalama değerleri arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı söylenebilir. Aynı şekilde kapiler elektroforez yöntemi ile elde edilen ortalama rutin miktarı, UV-spektrofotometrik yöntemle bulunan ortalama miktar arasında bulunan t değeri 0.40 olup

Tablo t değerinden küçüktür ve ortalamalar için bulunan farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmektedir.

Kapiler elektroforez yöntemi ile standart yöntemlerin kesinlikleri arasındaki fark F- testi uygulanarak % 95 önem düzeyinde incelenmiştir. Yöntemlerin kesinlikleri için yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile karşılaştırıldığında bulunan F değeri 3.43, ve UV-spektrofotometri ile karşılaştırıldığında bulunan F değeri 2.58 olarak hesaplanmıştır ve her ikisi de Tablo F değeri olan 5.05 değerinden küçüktür. Verilere göre yöntemlerin kesinlikleri arasındaki farkın, istatistiksel olarak önemli olmadığı söylenebilir.

İkiden fazla seri ya da yöntemin varyanslarının karşılaştırılması amacıyla kullanılan varyans analizi (ANOVA) testi, elde edilen verilerin değerlendirilmesi için uygulanmıştır. ANOVA testinde de kapiler elektroforez ile standart yöntemler arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı bulunmuştur ( $F_{2,15} = 1.59, p < 0.05$ ).

### **SONUÇ ve ÖNERİLER**

Kapiler elektroforez, son yıllarda basitliği, hızlı oluşu, az miktarda numune gerektirmesi ve ucuz olması gibi nedenlerle analitik kimyada önem kazanmış bir yöntemdir. Diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında kolay otomasyonu, duyarlılığı, yüksek tekrar edilebilirliği ve kısa analiz süresi sağlaması nedenleriyle daha çok tercih edilen bir yöntem olmuştur.

Bu çalışmada, önerilen kapiler elektroforez yöntemi, geçerli yöntemler olan UV-spektrofotometri ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemleriyle karşılaştırılmıştır. Yöntemler arasındaki farkın istatistiksel olarak önemsiz olduğu % 95 güvenle söylenebilir. Her üç yöntem ile elde edilen % rutin içeriği USP XXIV' te (The United States Pharmacopeia, 2000) belirtilen içerik koşullarını sağlamaktadır.

Burada önerilen yöntem basit, doğru, kesin, hızlı ve ucuz bir yöntemdir. Bu nedenle tabletlerdeki rutin içeriği tayini için önerilebilir.

## KAYNAKLAR

- Abdallah, R., El Walily, A.M., Zamel, S., Liquid chromatographic determination of rutin and ascorbic acid-binary mixture in pharmaceutical preparations, *J. Liq. Chromatogr.*, 16(18), 4107-4116, (1993).
- Baker, D.R. Capillary Electrophoresis. John Wiley & Sons, Inc., USA, 1995.
- Başer, K.H.C. Fonksiyonel gıdalar ve nutrasötikler. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, Eds: KHC Başer, N. Kırimer, 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, 29-31 Mayıs, Eskişehir, 31-44, (2002).
- Bilbao, M.L.M., Andres-Lacueva, C., Jauregui, O., Raventos-Lamuela, R.M, Determination of flavoids in a Citrus fruit extract by LC-DAD and LC-MS, *Food Chem.*, 101, 1742-1747 (2007).
- Bjergegaard, C., Michaelsen, S., Mortensen, K., Sorensen, H., Determination of flavonoids by micellar electrokinetic capillary chromatography, *J. Chromatogr. A*, 652, 477-485 (1993).
- Caporal-Gautier, J., Nivet, J.M., Algranti, P., Guilloteau, M., Histe, M., Lallier, M., N'Guyen-Huu, J.J. and Russotto, R., Guide de validation analytique, Rapport d'une commission SFSTP I. Methodologie, *S.T.P. Pharm Pratiques* 2(4), 205-226 (1992).
- Cartoni, G.P., Coccioli, F., Pontelli, L., E. Quattrucci, E.J. Separation and identification of free phenolic acids in wines by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 537, 93-99 (1991).
- Coşkun, T., Fonksiyonel besinlerin sağlığımız üzerine etkileri. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 48, 69-84 (2005).
- Doğrukol-Ak, D., Tunçel, M., Determination of cytarabine in ampoules by certain polarographic techniques. *Pharmazie*, 49(12), 928-929, (1994).
- Doğrukol-Ak, D., Tunçel, M., Determination of omeprazole in capsules by certain polarographic techniques. *Pharmazie*, 50(10), 701-702, (1995).
- Doğrukol-Ak, D., Tunalier, Z., Tunçel, M., TLC densitometric determination of omeprazole in pharmaceutical preparations. *Pharmazie*, 53(4), 272-273, (1998).
- Doğrukol-Ak, D., Kırimer, N., Tunçel, M., Y.Aboul-Enein, H., Determination of rutin in hypericum perforatum extract by capillary electrophoresis., 34(2), 185-191 (2001).
- Dubber, M.-J., Kanfer, I., Application of reverse-flow micellar electrokinetic chromatography for the simultaneous determination of flavonols and terpene trilactones in *Ginkgo biloba* dosage forms, *J. Chromatogr. A*, 1122, 266-274 (2006).
- Fang, F., Li, J.M., Pan, Q.H., Huang, W.D., Determination of red wine flavonoids by HPLC and effect of aging, *Food Chem.*, 101, 428-433 (2007).
- Guo, H., Liu, A.-H, Li, L., Guo, D.-A., Simultaneous determination of 12 major constituents in *Forsythia suspensa* by high performance liquid chromatography-DAD method, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, (2006), basımda.
- Hassan, H.N.A., Barsoum, B.N., Habib, I.H.I., Simultaneous spectrophotometric determination of rutin, quercetin and ascorbic acid in drugs using a kalman filter approach, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 20, 315-320 (1999).

- Jiang, H.-L., He, Y.-Z., Zhao, H.-Z., Hu, Y.-Y., Determination of chlorogenic acid and rutin in cigarettes by an improved capillary electrophoresis indirect chemiluminescence system, *Anal. Chim. Acta*, 512, 111-119 (2004).
- Krizman, M., Baricevic, D., Prosek, M., Determination of phenolic compounds in fennel by HPLC and HPLC-MS using a monolithic reversed-phase column, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43 (2), 481-485 (2007).
- Kuntic, V.S., Malesev, D.L., Radovic, Z.V., Kosanic, M.M., Mioc, U.B., Vukojevic, V.B. Spectrophotometric investigation of uranyl(II)-rutin complex in 70% ethanol, *J. Agric. Food Chem.*, 46(12), 5139-5142 (1998a).
- Kuntic, V., Kosanic, M., Malesev, D., Radovic, Z., Spectrophotometric investigation of Pd(II)-rutin complexes and its application to rutin determination in tablets, *Pharmazie*, 53(10), 724-726 (1998b).
- Kuntic, V., Pejic, N., Ivkovic, B., Vujic, Z., Ilic, K., Micic, S., Vukojevic, V., Isocratic RP-HPLC method for rutin determination in solid oral dosage form, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 43, 718-721 (2007).
- Li, C., Chen, A., Chen, X., Hu, Z., Separation and simultaneous determination of rutin, puerarin, daidzein, esculetin in medicinal preparations by non-aqueous capillary, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 39, 125-131 (2005).
- Li, S.F.Y. *Capillary Electrophoresis, principles, practice and application*. Elsevier. The Netherlands, 1993.
- Lin, X.-Q., He, J.-B., Zha, Z.-G., Simultaneous determination of quercetin and rutin at a multi-wall carbon-nanotube paste electrodes by reversing differential pulse voltammetry, *Sensors and Actuators B*, 119, 608-614 (2006).
- Lu, Y.-H., Liu, Z.-Y., Wang, Z., Wei, D.-Z., Quality evaluation of platycladus orientalis(L.) Franco through simultaneous determination of four bioactive flavonoids by high-performance liquid chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 41, 1186-1190 (2006).
- Lunte, S.M., Structural classification of flavonoids in beverages by liquid chromatography with ultraviolet—visible and electrochemical detection, *J. Chromatogr.*, 384, 371-382 (1987).
- Malasev, D., Radovic Z., Zelekic-Stankov, M., Investigation of europium(III) –rutin complex in water-ethanolic solution, *Spectr. Lett.*, 26(10), 1985-1995 (1993).
- The Merck Index, *An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals*, Eleventh edition, Published by Merck & Co., Inc., N.J., ABD, 1989, s: 979.
- Pietta, P.G., Mauri, P.L., Manera, E., Ceva, P.L. Determination of isoflavones from *Ononis spinosa* L. extracts by high-performance liquid chromatography with ultraviolet diode-array detection, *J. Chromatogr. A*, 513, 397-400 (1990).
- Pietta, P.G., Mauri, P.L., Bruno, A., Zini, L., High-performance liquid chromatography and micellar electrokinetic chromatography of flavonol glycosides from *Tilia*, *J. Chromatogr. A*, 638(2), 357-361 (1993).
- Pietta, P.G., Mauri, P.L., Zini, L., Gardana, C., Identification and determination and determination of phenolic constituents in natural beverages and plant extracts by means of a coulometric electrode array system., *J. Chromatogr. A*, 680, 175-179 (1994).
- Pietta, P.G., Mauri, P.L., Application of micellar electrokinetic capillary chromatography to the determination of flavonoid drugs, *J. Chromatogr.*, 546, 367-373 (1991).

- Rizzo, M., Ventrice, D., Varone, M.A., Sidari, R., Caridi, A., HPLC determination of phenolics adsorbed on yeasts, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 42, 46-55 (2006).
- Shah, V.P., Midha, K.K., Dighe, S., Analytical method validation: Bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. *Pharm. Res*, 9, 588-592 (1992).
- Shihabi, Z.K. Stacking in capillary zone electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 902 (1), 107-117, (2000).
- Treutter, D., Separation of naturally occurring mixtures of phenolic compounds from various *Prunus* tissues by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 436, 490-496 (1988).
- Toker, G., Turkoz, S., Erdemoğlu, N. High performance liquid chromatographic analysis of rutin in plants, *I. Pharmazie*, 53(7), 494-495 (1998).
- Tunçel, M., Yazan, Y., Doğrukol, D., Atkoşar, Z., A polarographic study on dipyrindamole and its determination in commercial tablets. *Analytical Letters*, 24(10), 1837-1846, (1991).
- Tunçel, M., Doğrukol, D., A study on the polarographic behaviour and determination of tizanidine. *Analytical Letters*, 25(6), 1087-1094, 1992.
- The United States Pharmacopeia XXIV, Marck Printing Co., Easton, 2000, s: 2001-2002.
- Villeneuve, F., Abravanel, G., Moutonet, M., Aliber, G. General scheme of analysis of phenolic compound in plant extracts by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, 234(1), 131-140 (1982).
- Wang, Q., Ding, F., Li, H., He, P., Fang, Y., Determination of hydrochlorothiazide and rutin in Chinese herb medicines and human urine by capillary zone electrophoresis with amperometric detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 30, 1507-1514 (2003).
- Weber, G. HPLC with electrochemical detection of metal-flavonoid-complexes isolated from food, *Chromatographia*, 26, 133-138 (1988).
- Xu, X., Ye, H., Wang, W., Yu, L., Chen, G., Determination of flavonoids in *Houttuynia cordata* Thunb. and *Saururus chinensis* (Lour.) Bail. by capillary electrophoresis with electrochemical detection, *Talanta*, 68, 759-764 (2006).
- Zeng, B., Wei, S., Xia, F., Zhao, F., Voltammetric behavior and determination of rutin at a single-walled carbon nanotubes modified gold electrode, *Sensors and Actuators B*, 115, 240-246 (2006).
- Zu, Y., Li, C., Fu, Y., Zhao, C., Simultaneous determination of catechin, rutin, quercetin, kaempferol and isorhamnetin in extract of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves by RP-HPLC with DAD, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 41, 714-719 (2006).