

**T.C.**  
**MUĞLA ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**KOMŞU HİDROKSİL GRUBU TAŞIYAN**  
**FLAVONOİDLERİN BORONİK ASİT FONKSİYONLU**  
**MAKROGÖZENEKLİ EŞ BOYUTLU**  
**POLİ(4-KLOROMETİLSTİREN-ko-DİVİNİLBENZEN)**  
**PARTİKÜLLERLE KESİKLİ SİSTEMDE AYRILMASI**  
**VE BİTKİ ÖZÜTLERİNİN ANTIOKSİDAN**  
**AKTİVİTESİNİN ARTIRILMASINA YÖNELİK**  
**KULLANIMI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ONUR ÇETİNKAYA**

**OCAK 2012**

**MUĞLA**

**T.C.**  
**MUĞLA ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**KOMŞU HİDROKSİL GRUBU TAŞIYAN  
FLAVONOİDLERİN BORONİK ASİT FONKSİYONLU  
MAKROGÖZENEKLİ EŞ BOYUTLU  
POLİ(4-KLOROMETİLSTİREN-ko-DİVİNİLBENZEN)  
PARTİKÜLLERLE KESİKLİ SİSTEMDE AYRILMASI  
VE BİTKİ ÖZÜTLERİNİN ANTIOKSİDAN  
AKTİVİTESİNİN ARTIRILMASINA YÖNELİK  
KULLANIMI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ONUR ÇETİNKAYA**

**OCAK 2012**

**MUĞLA**

# MUGLA ÜNİVERSİTESİ

## Fen Bilimleri Enstitüsü

### TEZ ONAYI

ONUR ÇETİNKAYA tarafından hazırlanan KOMŞU HİDROKSİL GRUBU TAŞIYAN FLAVONOİDLERİN BORONİK ASİT FONKSİYONLU MAKROGÖZENEKLİ EŞ BOYUTLU POLİ(4-KLOROMETİLSTİREN-ko-DİVİNİLBENZEN) PARTİKÜLLERLE KESİKLİ SİSTEMDE AYRILMASI VE BİTKİ ÖZÜTLERİNİN ANTİOKSİDAN AKTİVİTESİNİN ARTIRILMASINA YÖNELİK KULLANIMI BAŞLIKLİ tezinin, 13/01/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

#### TEZ SINAV JURİSİ

Prof. Dr. Osman Sermet KABASAKAL (Jüri Başkanı)

Kimya Müh. Anabilim Dalı Eskişehir Osmangazi Üniv., Eskişehir

Prof. Dr. Hüseyin ÇİÇEK (Üye)

Kimya Anabilim Dalı, Muğla Üniversitesi, Muğla

Prof. Dr. Ahmet BALCI (Üye)

Kimya Anabilim Dalı, Muğla Üniversitesi, Muğla



#### BÖLÜM BAŞKANLIĞI VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ ONAYI

Prof. Dr. İlkay KUŞCU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü, Muğla Üniversitesi, Muğla

Prof. Dr. GülAsiye AYÇIK

Kimya Bölüm Başkanı, Muğla Üniversitesi, Muğla

Prof. Dr. Hüseyin ÇİÇEK

Danışman, Kimya Anabilim Dalı, Muğla Üniversitesi, Muğla



Savunma Tarihi: 13/01/2012

Tez çalışmalarım sırasında elde ettiğim ve sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgelerin tarafımdan bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde edildiğini; akademik ve bilimsel etik kurallarına uygun olduğunu beyan ederim. Ayrıca, akademik ve bilimsel etik kuralları gereği bu tez çalışması sırasında elde edilmemiş başkalarına ait tüm orijinal bilgi ve sonuçlara atıf yaptığımı da beyan ederim.

Onur ÇETİNKAYA

Tarih:13/01/2012



## ÖZET

### KOMŞU HİDROKSİL GRUBU TAŞIYAN FLAVONOİDLERİN BORONİK ASİT FONKSİYONLU MAKROGÖZENEKLİ EŞ BOYUTLU POLİ(4-KLOROMETİLSTİREN-ko-DİVİNİL BENZEN) PARTİKÜLLERLE KESİKLİ SİSTEMDE AYRILMASI VE BİTKİ ÖZÜTLERİNİN ANTIOKSİDAN AKTİVİTESİNİN ARTIRILMASINA YÖNELİK KULLANIMI

Onur ÇETİNKAYA

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hüseyin ÇİÇEK

Ocak 2012, 91 sayfa

Flavonoid bileşikleri, biyolojik ve fizyolojik aktivitelerinden dolayı sağlıkla ilgili ürünlerin oluşturulmasında, kozmetikte ve tıpta geniş kullanım alanı bulmaktadır. Bitkilerin bünyesinde yer alan bu bileşikler çeşitli kimyasal maddelerle özütlenerek saflaştırılmaya çalışılmaktadır. Kullanılan kimyasalların maliyeti artırıcı ve çevreye olan olumsuz etkileri düşünüldüğünde alternatif bir yol olarak adsorban yapıların kullanılması ön plana çıkmaktadır. Bu amaçla 2,5 µm çaplı küresel eş boyutlu tohum polistiren (PS) mikropartikülleri dispersiyon polimerizasyonu yöntemi ile üretilmiş, bu partiküller çok basamaklı şişirmeli tohumlu polimerizasyon yöntemi ile klorometil stiren (CMS) monomeri ve divinil benzen (DVB) çapraz bağlayıcısı kullanılarak klor fonksiyonel grupları içerecek şekilde çapları yaklaşık 7 µm'ye kadar çıkarılmıştır. Partiküller yüzeylerindeki klor grupları üzerinden komşu hidroksil grubu taşıyan flavonoidlere ilgi duyacak şekilde boronik asit (APBA) ligandı ile türevlendirilmiştir. Üretilen partiküllerin üzerlerindeki APBA ligandının komşu hidroksil grupları içeren kersetin, rutin ve komşu hidroksil grubu içermeyen fakat kersetine çok benzer bir yapı olan apigenin kullanılarak yapının komşu hidroksil gruplarına karşı olan seçiciliği ortaya konulmuştur.

APBA fonksiyonlu poli(CMS-ko-DVB) partikülleri ile *Hypericum perforatum* bitkisinin etanol ve etil asetat özütü ile adsorpsiyon/desorpsiyon çalışmaları yapılmıştır. Her iki özüt ile elde edilen desorpsiyon ortamlarının antioksidan aktivitesinin yüksek olduğu ve özellikle etil asetat ekstraktı ile yapılan çalışmada belirgin olarak arttığı bulunmuştur. DPPH radikal giderim açısından ise desorpsiyon ortamlarının aktivitesinin başlangıç özütüne göre azaldığı görülmüştür. Etil asetat ekstraktı ile yapılan çalışmada adsorplanmadan ortamda kalan karışımın DPPH giderim aktivitesinin hem başlangıç etil asetat ekstraktına hem de desorpsiyon sonrası elde edilen karışıma göre yüksek olduğu sonucu elde edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Eş boyutlu lateks partiküller, Aktive edilmiş şişme metodu, Kromatografik dolgu materyali, Adsorpsiyon-desorpsiyon, Antioksidan aktivite

## ABSTRACT

### BATCH ISOLATION OF CIS HYDROXY CONTAINING FLAVONOIDS BY USING BORONIC ACID FUNCTIONILIZED MACROPOROUS UNIFORM POLY(4-CHLOROMETHYLSTYRENE-co-DIVINYLBENZENE) PARTICLES AND THEIR APPLICATION TO INCREASE THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PLANT EXTRACTS

Onur ÇETİNKAYA

Master of Science (M.Sc)

Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Hüseyin ÇİÇEK

January 2012, 91 pages

Flavonoids have a wide usage in the areas of medicine and cosmetics due to their biological and physiological activity. These compounds are found in the structures of some plants and they are tried to be isolated and purified by extraction using various chemicals. However, considering the environmental and economical problems resulting from the usage of these polluting and costly chemicals, the usage of adsorbents becomes a preferable alternative way. For this purpose, uniform seed polystyrene (PS) micro-particles with 2.5  $\mu\text{m}$  diameter were produced via dispersion polymerization method and the diameters of these particles were enlarged to about 7  $\mu\text{m}$  via multistage swollen seeded polymerization using chloromethylstyrene (CMS) as monomer and divinylbenzene (DVB) as crosslinking agent in a way to include chlorine functional groups. Particles are derivatized by boronic acid (APBA) ligand via the chlorine atoms on their surfaces to be able to react with the vicinal flavonoids. The selectivity of the APBA ligand on the produced particles to the quercetin and rutin including vicinal hydroxyl groups was investigated by using quercetin, rutin and apigenin, which does not include vicinal hydroxyl groups but does have a similar structure with that of quercetin.

The adsorption/desorption studies were carried out on the APBA functionalized poly(CMS-co-DVB) particles and *Hypericum perforatum* plant using the ethanol and ethyl acetate extracts. Especially with ethyl acetate extract, both of plant extract and desorption medium have high antioxidant activity. It was found that the antioxidant activities of the desorption media were high for both of the extracts and it especially increased with the use of ethyl acetate extract. For the DPPH radical scavenging, it was seen that the activity of the desorption media decreased with respect to that of the initial extract. It was also obtained in the study performed using the ethyl acetate extract that the DPPH radical scavenging activity of the mixture, remained non-adsorbed in the medium, was higher than those of both initial ethyl acetate extract and post-desorption mixture.

**Keywords:** Uniform latex particles, Activated swelling method, Chromatographic packing material; Adsorption-Desorption; Antioxidant activity

## ÖNSÖZ

Bu çalışmayı gerçekleştirmemde büyük emeği bulunan, tez konusunun seçimi, hazırlanması ve araştırmaların yürütülmesinde her türlü bilgi ve önerileriyle bana yön veren değerli hocam Prof. Dr. Hüseyin ÇİÇEK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her anında benden desteklerini esirgemeyen aileme hep yanımda oldukları ve bana güvendikleri için sonsuz teşekkürler.

Bu tez çalışması, TÜBİTAK Hızlı Destek Programı (1002) tarafından 110M382 numaralı proje ve Muğla Üniversitesi tarafından 09/35 numaralı Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) ile desteklenmiştir. Destekleri olmasaydı yapılamayacak olan bu çalışmanın gerçekleşmesinde vermiş oldukları çok büyük destekleri ile yapmış oldukları katkılarından ötürü her iki kuruma en içten duygularıyla saygılarımı sunmak isterim.

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	vi
İÇİNDEKİLER .....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xi
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	xiii
<b>1.GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
1.1. Amaç ve Kapsam .....	2
1.2. Kaynak Özetleri.....	3
<b>2. MALZEME VE YÖNTEM .....</b>	<b>9</b>
2.1. Kullanılan Kimyasallar.....	9
2.2. Deneysel Yöntemler .....	10
2.2.1. Eş boyutlu polistiren (PS) çıkış partiküllerin (çıkış lateksi) üretimi .....	11
2.2.2. Eş boyutlu makrogözenekli poli(klorometilstiren-ko-divinilbenzen) (poli(CMS-ko-DVB)) partiküllerin üretimi .....	11
2.2.2.1. Polistiren çıkış partiküllerinin birinci şişirme basamağı .....	12
2.2.2.2. Polistiren çıkış partiküllerinin ikinci şişirme basamağı .....	12
2.2.2.3. Şişirilmiş çıkış partiküllerinin tekrar polimerleştirilmesi ile poli (CMSko-DVB) partiküllerinin üretimi .....	13
2.2.3. Eş boyutlu ve makrogözenekli poli(CMS-ko-DVB) partiküllerin karakterizasyonu .....	13
2.2.3.1. Partikül boy ve boydağılımı tayini .....	13
2.2.3.2. Partikül gözenekliliğinin ve yüzey alanının hesaplanması .....	14
2.2.4. Poli(CMS-ko-DVB) mikropartiküllere ligand takılması.....	15
2.2.5. APBA bağlı poli(CMS-ko-DVB) mikropartiküllerle flavonoid adsorpsiyon çalışmaları .....	15
2.2.6. Poli(CMS-ko-DVB) mikrokürelerinin bitki özütü antioksidan aktivitesi artırılması amacıyla kullanımı .....	19
2.2.6.1. Kantaron bitkisinin topraküstü kısmından etanol ve etil asetat özütü hazırlanması .....	19
2.2.6.2. Kantaron bitki özütü ile adsorpsiyon çalışmaları.....	20
2.2.6.3. $\beta$ -Karoten renk açılımı yöntemi .....	22
2.2.6.4. DPPH serbest radikal giderim aktivitesi yöntemi .....	22
2.2.6.5. Toplam flavonoid miktar tayini.....	23
2.2.6.6. Desorpsiyon yüzdesinin belirlenmesi.....	23
<b>3. BULGULAR ve İRDELEME .....</b>	<b>25</b>



3.1. Partikül Boy ve Boy Dağılımı .....	25
3.2. Partikül Gözenekliliği ve Yüzey Alanı .....	26
3.3. APBA Bağlı Poli(CMS-ko-DVB) Mikropartiküllerle Flavonoid Adsorpsiyon Çalışmaları .....	28
3.4. APBA bağlı poli(CMS-ko-DVB) Mikropartiküllerle Flavonoid Adsorpsiyonunun Adsorpsiyon Modelleri ile Uyumu .....	32
<b>4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....</b>	<b>44</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>45</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>51</b>
Ek A. Kersetin'in pH'8,5'teki HPLC için Kalibrasyon Doğrusu.....	52
Ek B. Rutin'in pH'8,5'teki HPLC için Kalibrasyon Doğrusu .....	53
Ek C. Apigenin'in pH'8,5'teki HPLC için Kalibrasyon Doğrusu .....	54
Ek D. Apigenin'in pH 6'daki UV-Visible Spektrofotometre için Kalibrasyon Doğrusu .....	55
Ek E. Apigenin'in pH 7'deki UV-Visible Spektrofotometre için Kalibrasyon Doğrusu .....	56
Ek F. Apigenin'in pH 8'deki UV-Visible Spektrofotometre için Kalibrasyon Doğrusu .....	57
Ek G. Apigenin'in pH 8,5'teki UV-Visible Spektrofotometre için Kalibrasyon Doğrusu .....	58
Ek H. Apigenin'in pH 9'daki UV-Visible Spektrofotometre için Kalibrasyon Doğrusu .....	59
Ek I. Kersetin'in pH 6'daki UV-Visible Spektrofotometre için Kalibrasyon Doğrusu .....	60
Ek İ. Kersetin'in pH 7'deki UV-Visible Spektrofotometre için Kalibrasyon Doğrusu .....	61
Ek J. Kersetin'in pH 8'deki UV-Visible Spektrofotometre için Kalibrasyon Doğrusu .....	62
Ek K. Kersetin'in pH 8,5'deki UV-Visible Spektrofotometre için Kalibrasyon Doğrusu .....	63
Ek L. Kersetin'in pH 9'daki UV-Visible Spektrofotometre için Kalibrasyon Doğrusu .....	64
Ek M. Rutin'in pH 6'daki UV-Visible Spektrofotometre için Kalibrasyon Doğrusu .....	65
Ek N. Rutin'in pH 7'deki UV-Visible Spektrofotometre için Kalibrasyon Doğrusu .....	66
Ek O. Rutin'in pH 8'deki UV-Visible Spektrofotometre için Kalibrasyon Doğrusu .....	67
Ek Ö. Rutin'in pH 8,5'teki UV-Visible Spektrofotometre için Kalibrasyon Doğrusu .....	68

Ek P. Rutin'in pH 9'daki UV-Visible Spektrofotometre için Kalibrasyon Doğrusu .....	69
Ek R. Toplam Flavonoid Tayini için Kersetinin 415 nm'deki Kalibrasyon Doğrusu .....	70
Ek S. Poli(CMS-ko-DVB) Partiküllerinin Gözenek Hacim Dağılımı .....	71
Ek T. Poli(CMS-ko-DVB) Partiküllerine Ait BET İzotermi .....	72
Ek U. H. perforatum Bitkisinin Etanol Ekstresinin HPLC Kromatogramı .....	73
Ek Ü. H. perforatum Bitkisinin Etanol Özütünün Adsorpsiyon Sonrası Ortamda Kalan Özütün HPLC Kromatogramı .....	74
Ek V. H. perforatum Bitkisinin Etanol Özütünün Adsorpsiyon Sonrası Ortamdan Ayrılıp Desorbe Edilen Özütün HPLC Kromatogramı .....	75
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	76

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. PS ve poli(CMS-ko-DVB) partiküllerin boy ve boy dağılımı sonuçları .....	25
Çizelge 3.2. H. perforatum bitkisinin etanol özütünün antioksidan aktivitesinin adsorpsiyon öncesi (HPEtOH) ve sonrası (HPA ve HPD) karşılaştırılmalı değerleri .....	35
Çizelge 3.3. H. perforatum bitkisinin etanol özütünün DPPH radikal giderim adsorpsiyon öncesi (HPEtOH) ve sonrası (HPA ve HPD) karşılaştırılmalı değerleri .....	37

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Adsorpsiyon çalışmalarında kullanılan <i>H. perforatum</i> bitkisindeki kersetin, apigenin, rutin ve diğer fenolik yapıli bileşiklerin moleküler yapıları.....	6
Şekil 2.1. Eş boyutlu makrogözenekli poli(CMS-ko-DVB) partiküllerin üretiminin şematik gösterimi .....	12
Şekil 2.2. APBA bağıli poli(CMS-ko-DVB) mikropartiküllerle komşu hidroksil grubuna sahip bileşiklerin adsorpsiyon mekanizması.....	16
Şekil 3.1. Üretilen PS çıkış lateks (a: 8000x, b: 25000x Büyütme), ve Şişirilmiş poli(CMS-ko-DVB) partiküllerinin (c: 3000x , d: 10000x , e:17000x , f: 30000x , g: 150000x Büyütme) SEM fotoğrafları.....	26
Şekil 3.2. Üretilen poli(CMS-ko-DVB) partiküllerin FT-IR spektrumları (a) tohum PS lateks partikülleri (b) poli(CMS-ko-DVB) (c) APBA ligandı bağıli mikropartiküller .....	27
Şekil 3.3. APBA bağıli poli(CMS-ko-DVB) mikropartiküllerin kersetin adsorpsiyon kapasitesinin pH ile değişimi. Metanol/HEPES tamponu (85/25, v/v), sıcaklık 20 °C, başlangıç kersetin konsantrasyonu 0,02 mg/ml .....	28
Şekil 3.4. APBA bağıli poli(CMS-ko-DVB) mikropartiküllerin kersetin adsorpsiyon kapasitesinin farklı kersetin başlangıç konsantrasyonu ile değişimi. ortam sıcaklığı: 20 °C, pH: 8,5 ve adsorpsiyon ortamı: Metanol/HEPES tamponu (85/25, v/v).....	29
Şekil 3.5. APBA bağıli poli(CMS-ko-DVB) mikropartiküllerle kersetin, rutin ve apigenin adsorpsiyon kapasitesinin ortam pH'ı ile değişimi. ortam sıcaklığı: 20 °C, başlangıç flavonoid konsantrasyonları: 0,02 mg/ml.....	30
Şekil 3.6. APBA ligandı taşıyan poli(CMS-ko-DVB) mikroküreler kullanarak apigenin, kersetin ve rutinden oluşan üçlü flavonoid karışımından her bir molekülün adsorpsiyon kapasitesi. flavonoid başlangıç konsantrasyonu: 0.02 mg/ml, pH: 8,5 .....	31
Şekil 3.7. Kersetin flavonoidi için Langmuir izotermi .....	32
Şekil 3.8. Kersetin flavonoidi için Freundlich izotermi.....	33
Şekil 3.9. <i>H. perforatum</i> bitkisinin etanol özütünün antioksidan aktivitesinin adsorpsiyon öncesi (HPEtOH) ve sonrası (HPA ve HPD) karşılaştırılması olarak gösterimi.....	36
Şekil 3.10. <i>H. perforatum</i> bitkisinin etanol özütünün DPPH radikal giderim aktivitesinin adsorpsiyon öncesi (HPEtOH) ve sonrası (HPA ve HPD) karşılaştırılması olarak gösterimi.....	37
Şekil 3.11. <i>H. perforatum</i> bitkisinin etanol özütünün ve bu özüt kullanılarak yapılan adsorpsiyon ve desorpsiyon çalışmaları sonrası oluşan ortamlarının toplam flavonoid miktarlarının karşılaştırılması .....	38
Şekil 3.12. <i>H. perforatum</i> Bitkisinin Etilasetat Ekstraktı ve Bu Ekstrakt Kullanılarak Yapılan Adsorpsiyon ve Desorpsiyon Çalışmaları Sonrası Oluşan Ortamların Toplam Flavonoid Miktarlarının Karşılaştırılması.....	41

Şekil 3.13. <i>H. perforatum</i> Bitkisinin Etil Asetat Özütünün Antioksidan Aktivitesinin Karşılaştırılmalı Olarak Gösterimi .....	42
Şekil 3.14. <i>H. perforatum</i> Bitkisinin Etil Asetat Özütünün DPPH Radikal Giderim Aktivitesinin Karşılaştırılmalı Olarak Gösterimi .....	42

## SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

$\mu\text{L}$	Mikrolitre
$\mu\text{m}$	Mikrometre
$\mu\text{g}$	Mikrogram
PS	Polistiren
CMS	4-vinilbenzil klorür
AIBN	2,2'-Azobis(2-metilpropionitril)
PVP	Polivinilpirolidon
DBP	Dibütilfitalat
NaOH	Sodyum hidroksit
DVB	Divinilbenzen
SDS	Sodyum Lauril Sülfat
PVA	Poli(vinil alkol)
THF	Tetrahidrofur
APBA	3-Aminofenilboronik asit
$\beta$ -(NAD)	$\beta$ -nikotinamid adenin dinukleotid
HPLC	Yüksek performanslı (basınçlı) sıvı kromatografisi
SEC	Büyükölçek ayırma kromatografisi
RNA	Ribonükleik asit
HEPES	4-(2-hidroksietil) piperazin-1-etansülfonik asit
UV	Ultraviyole
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
$D_n$	Partiküllerin sayıca ortalama çapı
$N_i$	$D_i$ ( $\mu\text{m}$ ) çapına sahip partikül sayısı
U	Polidispersite indeksi
$D_w$	Partiküllerin ağırlıkça ortalama çapı
SEM	Scanning Electron Microscope (Taramalı elektron mikroskobu)
HCl	Hidroklorik asit
IR	Infrared
FT-IR	Fourier Transform Infrared (Taşımalı geçirgen kızılötesi)
$C_0$	Başlangıç konsantrasyonu
cpm	Cycle per minute (Dakikadaki çalkalama devir sayısı)
Q	Adsorpsiyon kapasitesi (mg flavonoid / g partikül)
$W_p$	APBA bağlı poli(CMS-ko-DVB) mikropartikül kuru ağırlığı (g)

$A_o$	Adsorpsiyon öncesi adsorpsiyon ortamı absorbands değeri
$A_f$	Adsorpsiyon sonrası adsorpsiyon ortamı absorbands değeri
$C_o$	Adsorpsiyon öncesi adsorpsiyon ortamı flavonoid konsantrasyonu (mg/ml)
$V$	Adsorpsiyon ortamı toplam hacmi (ml)
$P_o$	Adsorpsiyon öncesi ilgili flavonoidin geldiği yerdeki pikin alanı
$P_f$	Adsorpsiyon sonrası ilgili flavonoidin geldiği yerdeki pikin alanı
$NH_3$	Amonyak
$R$	$\beta$ -karoten renk açılım oranı
$a$	Başlangıç absorbandsı
$b$	360 dakika inkübasyondan sonraki absorbandsı
$AA$	Antioksidan Aktivite
$A_o$	Kontrolün absorbandsı
$A_I$	Örneğin absorbandsı
$W_{stok}$	Etanol özütü stok çözeltisinin adsorpsiyon öncesi içerdiği toplam katı miktarı (mg)
$W_{desorp}$	Adsorpsiyon sonrası desorbe edilmiş toplam katı miktarı (mg)
$W_{çözelti}$	Adsorpsiyon sonrası çözeltide kalan katı miktarı
$nm$	Nanometre
$IUPAC$	International Union of Pure and Applied Chemistry
$y$	Adsorbentın gramı başına adsorblanmış adsorbatın gram miktarı (mg/g)
$C$	Çözeltinin konsantrasyonunu (g/L)
$n$	0,1 ile 0,5 aralığında değişen bir sabiti
$k$	Ampirik bir sabiti
$HPeEtOH$	H. perforatum etanol özütü
$HPA$	Poli(CMS-ko-DVB) adsorbanına tutunmadan kalan özütteki bileşenler
$HPD$	Poli(CMS-ko-DVB) adsorbanına tutunan bileşenler
$EC_{50}$	Etkili konsantrasyon
$AAPH$	2,2'-Azobis(2-metilpropionamidin) dihidroklorid
$EtOAc$	Etil asetat fraksiyonu
$EtOAcA$	Etil asetat fraksiyonunun adsorpsiyon ortamı
$EtOAcD$	Etil asetat fraksiyonunun desorpsiyon ortamı

# 1.GİRİŞ

Kanser vakaları başta olmak üzere bir çok hastalığın iyileştirilmesine yönelik alternatif ilaçların geliştirilmesi üzerine yoğun bilimsel çalışmalar yapılmaktadır. Bazı bitki özütlerinde bulunan çeşitli faydalı bileşiklerin de bu amaca yönelik olarak etkileri araştırılmaktadır.

Flavonoidler modern eczacılık uygulamalarında anti-inflamatör, anti-tümör, anti-oksidan ve serbest radikal yok edicisi olarak kullanılabilir. Bu nedenle de klinik uygulamalar için olduğu kadar doğal ilaç geliştirilmesi sürecinde üzerlerinde fazlaca araştırma yapılan doğal bileşikler grubunda yer almaktadırlar (Havsteen, 2002, Walle, 2004).

Doğal flavonoid bileşiklerinin özütlenmesi ve saflaştırılması teknikleri içerisinde çözücü ekstraksiyonu bilinen en eski ve gelişimini tamamlamış yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır (Takeda ve Fatope, 1988; He vd., 2002). Fakat son yıllarda artan çevre kirliliği bilinci ve çözücü ekstraksiyon süreçleri neticesinde oluşan atık çözücülerin çevreyi tehdit etmesi, çevre dostu, yüksek seçiciliğe sahip, verimi yüksek ve toksisitesi düşük tekniklerin geliştirilmesini zorunlu kılmıştır. Ekstraksiyon yöntemleri istenilen bir bileşiği ya da bileşik grubunu umulan etkinlikte ayırmak pek mümkün olamamakta, ayrıca kullanılan çözücü miktarının fazla olması çevre sorunlarına da neden olabilmektedir. Bu amaçla makrogözenekli reçineler aktif bileşiklerin kazanılması için yeni tekniklerin geliştirilmesinde kullanılmaya başlanmıştır (Pi vd., 2008). Farklı yapılarda adsorbanlar kullanılarak tüm bu dezavantajların önüne geçebilmek için çok sayıda çalışma yapılmıştır. Çalışmaların birçoğunda olumlu sonuçlar yakalanmıştır.

Yapılan bu çalışmada ise daha önce denenmemiş aminofenil boronik asit fonksiyonlu eş boyutlu ve makrogözenekli poli(klorometilstiren-ko-divinilbenzen) partiküller kullanılmıştır. Geliştirilen partiküller antioksidan aktivitesi olduğu bilinen ve üzerinde komşu hidroksil grupları bulunan fenolik bileşiklere ilgi duyabilecek ve onları yüksek seçicilikte yakalayabilecek özelliكتedir. Çalışmada, geliştirilen partiküller halk arasında kantaron otu olarak bilinen bitkinin özütleri ile etkileştirilerek daha yüksek antioksidan aktiviteli karışımların elde edilebileceği gösterilmiştir. Geliştirilen adsorbanın başka bitki özütlerine uygulanabilme ve ilginç



sonuçların elde edilebilme ihtimali de bulunmaktadır. Ayrıca eş boyutlu olmaları nedeniyle ileride kolon kromatografisinde kullanılabilme potansiyelleri bulunmaktadır.

### **1.1. Amaç ve Kapsam**

Literatürde yapılan adsorpsiyonla flavonoid bileşiklerinin izolasyonu çalışmalarında ağırlıklı olarak iyonik olmayan ve hidrojen bağı yapabilecek adsorbanlar kullanılmaktadır. Bu tür adsorbanlar hidroksil grubunun bağlı olduğu fenolik yapıların tümünü yakalayabilmektedir. Bu durumda seçicilik düşmektedir. Antioksidan özelliği yüksek flavonoid yapıların birçoğunda komşu hidroksil grubu yer almaktadır. Bu gruplara sahip flavonoidlerin ortamdan çekilerek daha belirgin yapıların seçici olarak ayrılması sonucu antioksidan aktivitenin artırılacağı düşünülmüştür. Bu nedenle komşu hidroksil grubuna ilgisi olan adsorbanların üretimi bu çalışmada öncelikli hedef olmuştur. Geliştirilecek adsorbanların HPLC uygulamalarında kullanılabilirliklerini mümkün kılabilmek amacıyla eş boyutlu olarak üretilmeleri ve çaplarının yaklaşık olarak 6-10 µm aralığında ve eş boyutlu olması hedeflenmiştir. Bu amaçla literatürde de yapıldığı gibi (Çiçek, 2005) fakat farklı bir adsorban ve yöntem kullanılarak bu kez poli(4-klorometilstiren-ko-divinilbenzen) (poli(CMS-ko-DVB)) partiküllerinin üzerlerindeki klor grupları vasıtasıyla amino fenil boronik asit (ABPA) ligandı ile türevlendirilip komşu hidroksil gruplarına sahip flavonoidlere ilgi duyabilecek duruma getirileceklerdir. Bu adsorbanların literatürde yapıldığı gibi komşu hidroksil grubu içeren oligonükleotidlerin izolasyonu amacıyla kullanımı da mümkün olabilecektir.

Geliştirilmiş yapıların afinite kromatografisinde kolon dolgu materyali olarak kullanımı da planlanmaktadır. Uygun sonuçlar elde edilirse ekonomik yönden ciddi kazanımların olması da umulmaktadır.

Halk sağlığı ve ileride bazı hastalıkların tedavisine yönelik olarak kullanılacak antioksidan aktivitesi yüksek karışımlar üretilmesi beklentilerimiz içerisinde. Ayrılan karışımlardan beklenen şekilde yüksek antioksidan aktiviteli ürünler elde edilebilirse sağlık sektöründe önemli ticari bir adım atılmış olacaktır.

## 1.2. Kaynak Özetleri

*Hypericum perforatum* L üzerine yapılmış birçok araştırmada bitki özütlerinin antidepresan, antianksiyeti, antiviral, ve antimikrobiyal aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Sakar ve Tamer, 1990; Butterweck vd., 1997, 2000, 2002; Barnes vd., 2001; Flausino vd., 2002). Örneğin *Hypericum perforatum* özütünden hazırlanan (LI 160) 12 yaş grubu çocuklarda görülen psikovejetatif ve depresif rahatsızlıklarda potansiyel etkileri ispatlanmıştır (Hubner ve Kirste, 2001).

*Hypericum* türlerinde flavonoidler (Ishiguro vd., 1991, 1993; Chung vd., 1997; Dias vd., 1998), ksanthonlar (Gunatılaka vd., 1979; Rath vd., 1996; Wu vd., 1998), kromenil ketonlar (Ishiguro vd., 1990; Wu vd., 1998), hyperforin türevli bileşikler (Decosterd vd., 1989; Maisenbacher ve Kovar, 1992; Trifunovic vd., 1998), filoroglusinoller (Decosterd vd., 1991; Ishiguro vd., 1994; Ishiguro vd., 1998), n-alkanlar (Bronz vd., 1983) naftodiantronlar (Kitanov, 2001) uçucu yağlar (Cakır vd., 1997), biflavonoidler (Cakır vd., 2003) bulunmaktadır. *Hypericum* türü bitkiler fenolik yapılı ve özellikle flavonoidler bakımından oldukça zengindir. Hatta onlarda tespit edilen bazı biflavonoidlerin varlığının *Hypericum* türlerinin tıbbi aktivitelerini daha da arttırdığı ileri sürülmektedir (Cakır vd., 2003). Flavonoidlerin gelecekte muhtemel kullanım alanları ayrıca belirtilmiştir (Forkmann ve Martens 2001; Rijke vd., 2006).

*Hypericum perforatum* bitkisinin kök üstü bölgelerinin sulu alkol ekstraktları (%60 etanol veya %80 metanol) doğal altı ana grubu içermektedir (Saddiqe, 2010). Bu altı ana gruptan naftodiantronlar grubunda hiperisin ve pseudohipersin; filoroglusinoller grubunda hiperforin ve adhiperforin; flavonoid grubunda kaempferol, luteolin, mirisetin and kersetin, hiperozit (hiperin), rutin, kersitrin ve izokersitrin; biflavonlar grubunda biapigenin, amentoflavon, diquercetin; fenilpropan grubundan p-kumarik asit and kafeik asit. klorojenik asit; uçucu yağ gruplarından alifatik bileşikleri (2-metil oktan, n-nonan, n-dekan, n-undekan, n-tetradekanol, 2-metil-dekan ve 2-metil-dodekan) ve terpenoid bileşikleri ( $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinene, geraniol,  $\beta$ -karyofiylen,  $\beta$ -farnesen, humulen ve germakren D) bulunmaktadır. Ayrıca az miktarda tanin, zenton, esansiyel yağ ve amino asitler içermektedir.

*Hypericum perforatum* bitkisinin etanolik ekstraktı ve fraksiyonlarının antioksidan potansiyelleri değerlendirilmiş ve fenolik bileşikleri ile ilişkilendirilmiştir (Silva vd.,

2005). Yapılan bu çalışmada *Hypericum perforatum* bitkisinin etanol ekstraktının farklı polaritelere sahip çözücülerden elde edilen fraksiyonları incelenmiş ve bitkinin özütünde hiperofin, hiperisin, quercetin, biapigenin, kafeoilkuinik asit ve flavonoid glikozitleri gibi yapıların varlığı aydınlatılmıştır. Bu flavonoid yapılı bileşiklerin anti-radikal aktivitesi ve yağ peroksidasyonları araştırılarak hangi fraksiyonların daha çok aktivite gösterdiği saptanmıştır.

*Hypericum perforatum* bitkisinin flavonoid türü bileşiklerinin miktarları ve bileşimleri ülkeden ülkeye hatta aynı ülke içerisinde bölgeden bölgeye değiştiği görülmektedir (Çırak vd., 2007; Hosni vd., 2010). Örneğin Çırak ve ekibinin yapmış olduğu çalışmada Türkiye'nin kuzeyindeki *Hypericum perforatum* bitkisinin etanol ekstraktındaki klorojenik asit, rutin, hiperozit, apigenin-7-O-glukosit, kersitrin, kersetin ve hiperisin bileşimleri incelenmiş ve birbirine yakın bölgelerdeki bitkinin bu flavonoid tarzı moleküllerde bileşimlerinin değiştiği ortaya konulmuştur.

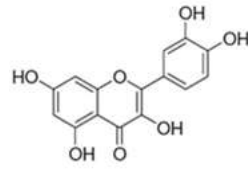
Flavonoidlerin zenginleştirilmesi için ticari polimerik adsorbanların kullanıldığı bazı çalışmalar mevcuttur (Xu vd., 2000; Maria vd., 2002; Scordino vd., 2003; Fu vd., 2005; Zhang vd., 2007). Bu reçinelerin çoğunluğu hidrofobik polistiren ve poliakrilik ester formunda yapılarıdır. Elde edilen bulgulara göre polimerik adsorban yapısının hidrofobisitesindeki artış Van Der Waals etkileşimlerini artırarak üzerlerinde komşu hidroksil gruplar içeren aromatik flavonoid yapıların daha az adsorblanmasına neden olmaktadır (Crittenden vd., 1999). Kısaca artan hidrofobisite flavonoid seçiciliğini azaltmaktadır. Polimerik adsorban yapısında hidrojen bağı kurabilecek ester, amin ve amid fonksiyonel gruplarının varlığı ise hidrojen bağı ile flavonoid yakalanmasını sağlayarak adsorbanın flavonoid seçiciliğini ve verimini artırmaktadır. Ancak yapılan çalışmalar adsorbanın yapısına göre en ideal verimin belli bir "hidrofobisite artırıcı kısım/hidrojen bağı artırıcı kısım" oranında olabildiğini göstermiştir. Polimerik moleküller içerisindeki hidrofobisite yaratan kısmın miktarı belli bir değere ulaşmadıkça ortamda bulunan flavonoid molekülleri su molekülleri ile etkileşime girmeyi tercih etmekte ve polimerik adsorbanın seçiciliğini düşürmektedir (Renner vd., 2006; Ren vd., 2008). Bu bulgular dikkate alınarak yapılan bir çalışmada ester, amin ve amid grupları taşıyan etilen glikol dimetakrilat (EGDMA)-metilakrilat (MA) kopolimerik partikülleri (çap: 0.2-0.3 mm ve yüzey alanı: 45-94 m<sup>2</sup>/g) sentezlenmiş ve hidrofobisitenin (dimetakrilat oranı) artırılması ile flavonoid adsorpsiyonu seçiciliğindeki değişim incelenmiştir.

Amid fonksiyonel grupları içeren yapılarla %15 EGDMA oranında ayrılan karışımdaki flavonoid oranı %3 ler den %50'nin üzerine çıkarılmıştır (Geng vd., 2009). Sonuçlar ticari olan yine ester, amin, amid grupları içeren poli(stiren-divinil benzen) yapısında adsorbanların (çap: 0.3-0.8 mm ve yüzey alanı: 80-120 m<sup>2</sup>/g) sonuçları ile karşılaştırıldığında daha yüksek seçiciliğe ulaşıldığı görülmüştür. Üzerinde hiç bir fonksiyonel grup içermeyen benzer ticari yapılar (çap: 0,3-0,8 mm ve yüzey alanı: 480-800 m<sup>2</sup>/g) kullanılması durumunda diğer ticari adsorbanlara göre daha düşük adsorpsiyon değerleri elde edilmiştir. Amin fonksiyonel gruplu adsorban partiküllerin amin grupları ile fenolik gruplar arasındaki etkileşiminin kuvvetli olması nedeniyle desorpsiyon yüzdelерinin düşük olduğu bulunmuştur. Bu nedenle amin gruplu yapılar flavonoid yapılarının ayrıştırılması için uygun bulunmamıştır.

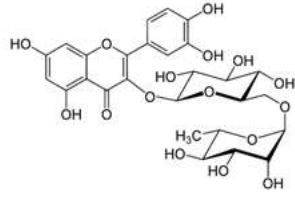
Yukarıdaki bilgiler ışığında flavonoidlerin saflaştırılması amacıyla yaklaşık 3-10 µm aralığında çapa sahip uniform, farklı gözeneklilikte ve yapısında komşu hidroksil grupları içeren flavonoid moleküllerine ilgisi olan aminofenil boronik asit (APBA) ligandı taşıyan polimerik adsorban mikropartiküllerin geliştirilmesinin şimdiye kadar bilinen adsorbanlara göre seçicilik ve zenginleştirme verimi açısından avantajlı sonuçlar yaratacağı düşünülmüştür. Önemli bazı flavonoidlerin molekül yapıları Şekil 1.1'de verilmektedir.

Şekil 1.1'deki moleküller bazı bitkilerin aseton ve alkol fraksiyonunda major bileşik olarak bulunmakta ve ayrılarak biyoaktivitesi daha yüksek fraksiyonların elde edilmesi bu aşamada önem arz etmektedir. Bu gibi durumlarda komşu hidroksil grubu taşıyan bu ve benzeri molekülleri ayırabilmesi açısından boronik asit fonksiyonlu taşıyıcıların uygun olacağı düşünülmektedir.

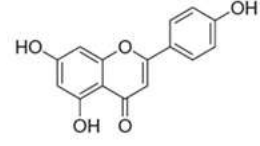
Partiküllerin özellikle “eş boyutlu”, makrogözenekli olması ileriki çalışmalarda flavonoid moleküllerin “afinite HPLC (Yüksek performanslı (basınçlı) sıvı kromatografisi)” uygulamalarında tayini açısından önemlidir (Unsal vd., 2005; Unsal vd., 2006). HPLC kolonlarında uygun kullanım partikül çapı aralığı olan yaklaşık 3-20 µm aralığında eş boyutlu partiküllerin doğrudan elde edilmesi bilinen polimerizasyon yöntemleri ile yapılamamaktadır. HPLC dolgu malzemesi uniform



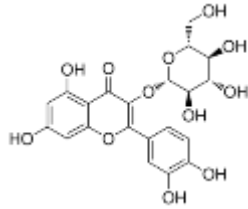
Kersetin



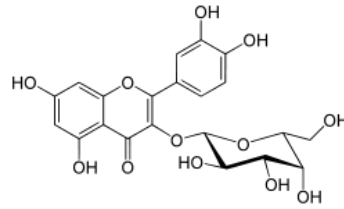
Rutin



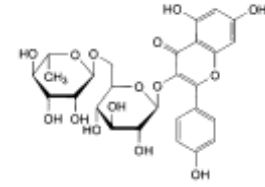
Apigenin



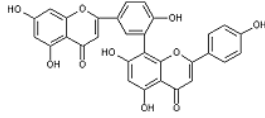
İzokersitrin



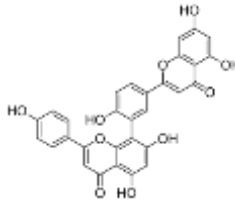
Hiperozit



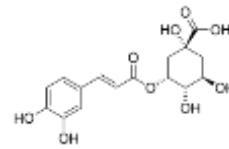
Kaempferol-3-O-Rutinozit



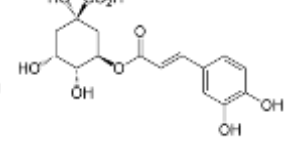
Amentoflavon



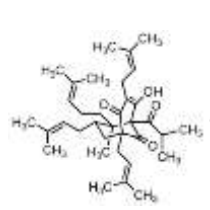
Biapigenin



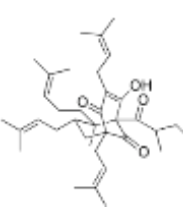
Neoklorojenik asit



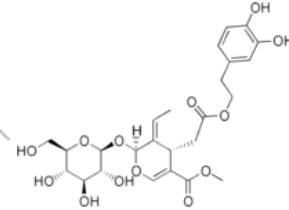
Klorojenik asit



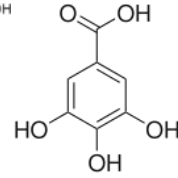
Hiperforin



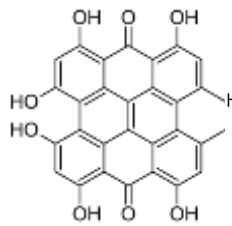
Adhyperforin



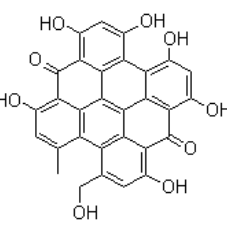
Oleuropin



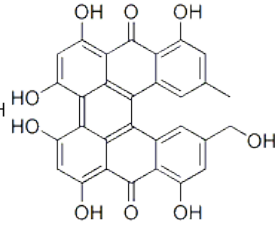
Gallik asit



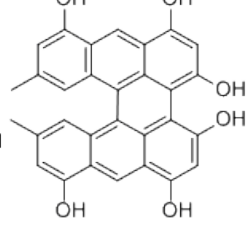
Hiperisin



Pseudohiperisin



Protopsedohiperisin



Protohiperisin

Şekil 1.1. Adsorpsiyon çalışmalarında kullanılan *H. perforatum* bitkisindeki kersetin, apigenin, rutin ve diğer fenolik yapıli bileşiklerin moleküler yapıları

partiküllerin 1-20 µm aralığında sentezi için “aktive edilmiş şişme metodu” ismiyle önerilen ilk yöntem Ugelstad’a aittir (Ugelstad, 1978; Ugelstad vd., 1979; Ugelstad vd., 1992). Emülsiyon polimerizasyonu ile elde edilen eş boyutlu polistiren partiküllerin kullanılıp stiren ve divinil benzen monomerleri ile şişirilmesi ve daha sonra polimerleştirilmesi aşamalarını içeren “tohumlu emülsiyon polimerizasyonu” yöntemiyle 10 µm boyutunda eş boyutlu partiküller elde edebilmiştir (Cheng vd., 1992; Unsal vd., 2004). Bu partiküllerin gözenek boyutu ortalama 500 Å civarında olup makrogözeneklidir. Gözenek boyutu, çıkış lateksini oluşturan polistiren zincirlerinin ortalama molekül ağırlığı düştükçe dağılım göstermekte ve mezogözenekliliğe doğru kaymaktadır.

Yine çıkış partikülü olarak poli(stiren)’in kullanıldığı benzer yöntemle yapılan bir başka çalışmada poli(glisidil metakrilat-ko-etilen dimetakrilat) kopolimerinin hidroliz formu olan eş boyutlu polar partiküller “basamaklı şekil kalıp polimerizasyonu” adı verilen yöntemle elde edilmiştir (Wang vd., 1992). Yaklaşık 7 µm çapında ve 200 Å gözenek boyutunda olan bu eş boyutlu partiküller normal faz büyüklükçe ayırma kromatografisinde (SEC) yapılan çalışmalarda iyi sonuçlar vermiştir. Gözenek boyutu polimerik gözenek oluşturucuların bileşimi tarafından belirlenmektedir. Şişirme işleminden sonra çıkış partiküller içerisindeki çözünen polimer kesrinin artması gözenek boyutunun artmasına neden olmaktadır. SEC sonuçlarının iyi olması gözenek boyutunun düzenliliğine bağlanmaktadır. Düşük kolon geri basıncı (=column back-pressure), kolon boyunca düzenli akış rejimi ve yüksek çözünürlükte sıvı kromatogramlarının elde edilebilmesinin kromatografik kolon dolgu maddelerin eş boyutlu olması ile ilgili olduğu yapılan çalışmalarda vurgulanmıştır (Tuncel ve Cicek, 1997; Tuncel vd., 2003).

Eş boyutlu poli(stiren-divinilbenzen) kopolimer partikülleri yukarıda bahsedilen emülsiyon polimerizasyonu yerine dispersiyon polimerizasyonundan elde edilen eş boyutlu polistiren çıkış partiküllerinin tek basamaklı şişirilmesi ve arka sıra polimerizasyonu ile de üretilmiştir (Ogino vd., 1995). Bu çalışma ile partikül boyutu 4.1–7.5 µm aralığında ayarlanabilen poli(stiren-divinilbenzen) kopolimerik eş boyutlu partiküller elde edilmiştir. Partiküllerin gözenek boyutu ortalama 30–550 Å aralığında ayarlanabilmektedir. Aynı yaklaşımla oligo(etilen glikol) dimetakrilat partiküller boyutları 5,5-9,7 Å m aralığında ayarlanabilecek şekilde eş boyutlu olarak elde edilmiştir (Ogino vd., 1995). Bu partiküller SEC ile proteinlerin ayrılması

işleminde başarıyla kullanılmıştır. Aynı şekilde eş boyutlu makrogözenekli glisidil metakrilat-etilen dimetakrilat kopolimer partikülleri sentezlenmiştir. Zayıf katyon iyon değişimi için kullanımı düşünülen bu partiküller üzerine yapının hidrofilik özelliğini artırıcı karboksil grupları takılmıştır. Partiküllerin kullanıldığı iyon değişim kromatografisi ile protein karışımları başarıyla ayrılabilmiştir.

Boronik asit fonksiyonlu destek maddelerini içeren kromatografik çalışmalar “boronat affinite kromatografisi” adı altında toplanmıştır. Bu çalışmalar destek materyali üzerindeki boronat grupları ile hedef moleküller arasındaki kompleks oluşumu ile gerçekleştirilmektedir (Senel vd., 2002 ). Nükleotid, RNA, glisated proteinler ve glikoenzimlerin seçici olarak elde edilmesi için bir kolon içerisinde boronik asit taşıyan partiküller kullanılmaktadır. Bu amaçla boronik asit fonksiyonlu poliakrilamid, agaroz ve poliakrilat bazlı jeller destek materyali olarak tercih edilmektedir.

Yüksek performanslı afinite sıvı kromatografisi birbirine seri olarak bağlı kolonlardan oluşmaktadır. Önce boronat fonksiyonlu kolondan geçirilerek glisated molekülleri alınmakta daha sonra anyon değişim kromatografisine gönderilen glisated olmayan bileşikler analiz edilmektedir (Yasukawa vd., 1992).

## 2. MALZEME VE YÖNTEM

### 2.1. Kullanılan Kimyasallar

Stiren (Sigma Aldrich, %99) 25 °C’da vakum altında distile edilerek kullanılmıştır. Mutlak etanol (Aldrich Chem. Co.) ve 2-metoksietanol (Merck, Almanya) polistiren (PS) çıkış lateksinin dispersiyon polimerizasyonu ile üretimi aşamasında sürekli faz olarak kullanılmıştır. Dispersiyon polimerizasyonunda metanol ile kristalize edilmiş 2,2’-Azobis(2-metilpropionitril) (AIBN), (Acros Organics, New Jersey, USA) başlatıcı, polivinilpirolidon (PVP K-30, Mr:40.000, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) ise stabilizör olarak kullanılmıştır. Dibütilfitalat (DBP, Aldrich Chem. Co.), toluen ve dodekanol makrogözenekli partiküllerin oluşturulmasında çıkış lateksi içerine difüzenip seyreltici fonksiyonu yapabilecek ve yıkama sonrası gözenek oluşumunu sağlayacak bileşenler olarak seçilmiştir. 4-vinilbenzil klorür (4-klorometilstiren, CMS, %90 saflıkta, Aldrich Chem. Co., USA.) ve %5 (w/w) NaOH çözeltisi ile ekstrakte edilerek kullanılan divinilbenzen (DVB, %55 para-ve meta-divinylbenzene izomeri içeren, Aldrich Chem. Co.) kimyasalları çıkış partiküllerinin birinci şişirme basamağı sonrasında tekrar polimerizasyon aşamasında sırasıyla monomer ve çapraz bağlayıcı olarak kullanılmıştır. Sodyum Lauril Sülfat (SDS, Sigma Chem. Co.), polistiren çıkış lateksinin sulu fazda şişirilebilmesi için sulu emülsiyon ortamının oluşturulması amacıyla kullanılmıştır. AIBN, çıkış partiküllerin şişirilmesi sonrası tekrar polimerleştirilmesi basamağında başlatıcı olarak seçilmiştir. Poli(vinil alkol) (PVA, MW 85,000–146,000, %87–89 hidrolize formu) monomerle şişirilmiş çıkış lateksinin tekrar polimerizasyonu sırasında stabilizör olarak kullanılmıştır. Seyreltici ajanların tekrar polimerizasyon sonrası partikül yapısından ekstraksiyonu tetrahidrofuran (THF) (HPLC saflıkta Aldrich Chem. Co.) ile yapılmıştır. Tüm polimerizasyon basamaklarında distile su kullanılmıştır.

Üretilen küresel, eş boyutlu, makrogözenekli poli(CMS-ko-DVB) partiküllerinin yüzeyi 3-Aminofenilboronik asit (APBA, Aldrich,USA) ile komşu hidroksil grubuna sahip flavonoidlere karşı ilgisi olacak şekilde türevlendirilmiştir.

Adsorpsiyon çalışmalarında model flavonoid olarak kersetin hidrat (> %95, Aldrich), rutin hidrat (>%94, Sigma) ve apigenin (%95, Sigma) kullanılmıştır. Adsorpsiyon ve



desorpsiyon ortamlarının hazırlanması için metanol (GC grade, Merck), saf etanol (Sigma-Aldrich) ve su kullanılmış, ortam pH'ı ise 4-(2-hidroksietil) piperazin-1-etansulfonik asit (HEPES, %99,5 Sigma) ile 0,1 N NaOH kullanılarak ayarlanmıştır. UV ölçümleri UV-visible spectrophotometer SHIMADZU W-1601 ile yapılmıştır.

Kolon çalışmaları SHIMADZU HPLC Sıvı kromatografisinde (LC-20AT, Kolon Fırını CTO-10A, Communications Bus Module CBM-20A, Detektör SPDM20A, Fraction Collector FRC-10A, Degasser DGV-20A3) gerçekleştirilmiştir. Taşıyıcı faz için metanol ile birlikte, asetonitril (%99,9, Carlo Erba), asetik asit (%100, Riedel-de Haen, Sigma Aldrich) ve ultra distile su kullanılarak çözeltiler hazırlanmıştır.

Adsorpsiyon ve desorpsiyon ortamlarındaki çözücünün uzaklaştırılması işlemi soğutucu banyo bağlantılı Rotary Evaporatör (Heidolph) ile gerçekleştirilmiştir.

Adsorpsiyon çalışmalarında kullanılacak olan APBA bağlı poli(CMS-ko-DVB) mikropartiküllerin üretimi dört aşamada gerçekleşmektedir. Bu aşamalar tohum mikropartikül sentezi, birinci ve ikinci şişirme basamakları ve ligand bağlama basamaklarından oluşmaktadır. Üçüncü aşama olan poli(CMS-ko-DVB) partiküllerin sentezi sonrası yüzeylerindeki klor gruplarından başlanarak yapılan türevlendirme işlemleri aşağıda şematik olarak Şekil 2.2'de verilmiştir.

Bitki özütlerinin antioksidan aktivitesi ve toplam flavonoid miktarı belirleme çalışmalarında ise  $\beta$ -Karoten (Fluka, %97), linoleik asit (Aldrich, %99), 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) (Fluka, %85), Tween-40 (Merck), Potasyum asetat (Merck, %99,0-100,5), Alüminyum nitrat (Merck, %98,5) kullanılmıştır. Kullanılan kimyasallar ve tüm çözücüler analitik saflıktadır.

Ekstraksiyon çalışmalarında etanolün yanı sıra etil asetat (%99.5, Sigma Aldrich) da kullanılmıştır.

## **2.2. Deneysel Yöntemler**

Eş boyutlu makrogözenekli poli(CMS-ko-DVB) partiküllerin üretimi Şekil 2.1'de şematize edilen çok basamaklı mikrosüspansiyon yöntemi ile yapılmıştır (Unsal vd., 2003). Bu yöntem gereği önce tek basamaklı dispersiyon polimerizasyonu yöntemi ile eş boyutlu çıkış lateksinin (Şekil 2.1.a) üretilmesi gerekmektedir. Çıkış lateksi

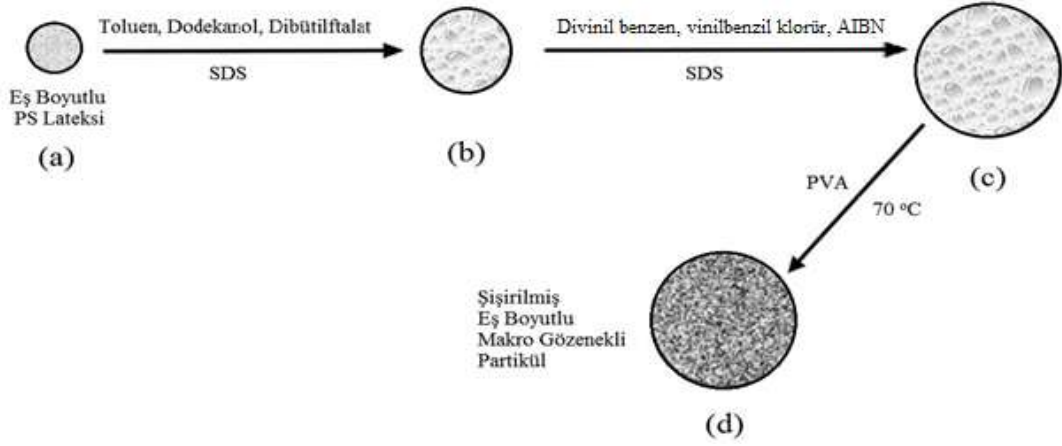
daha sonra seyreltici olarak görev yapacak bir ya da birkaç organik bileşikle şişirilmekte (Şekil 2.1.b), ardı sıra seyreltici moleküllerin yarattığı ortamlara monomer, çapraz başlatıcı ve başlatıcı transferi (Şekil 2.1.c) ve en son olarak monomerce şişmiş partiküllerin tekrar polimerizasyonla (Şekil 2.1.d) kararlı hale getirildiği basamaklardan oluşmaktadır. Bu basamakların ayrıntılı açıklaması aşağıda verilmiştir.

### **2.2.1. Eş boyutlu polistiren (PS) çıkış partiküllerin (çıkış lateksi) üretimi**

Polistiren çıkış partiküllerin (tohum partikülleri) üretimi stiren monomeri kullanılarak dispersiyon polimerizasyonu yöntemi ile yapılmıştır (Unsal vd., 2003, Unsal vd., 2004). Üretim için öncelikle 0,44 g azobisisobütironitril (AIBN) başlatıcısı, 2,1 g 40 000 ortalama mol kütesine sahip PVP, 84 ml ethanol, 36 ml 2-metoksietanol ve 20 ml stiren bir pyrex cam şişe reaktörün içine alındı. Karışım şeffaf bir ortam elde edilene kadar karıştırıldı. Cam reaktörün kapağı, içerisinden azot gazı 10 dakika süresince geçirildikten sonra sızdırmaz şekilde kapatıldı. Daha sonra bir çalkalamalı su banyosu içerisine konularak ortamın sıcaklığı oda sıcaklığından 0,4 °C/dakika ısıtma hızı ile 70 °C sıcaklığına getirildi ve bu sıcaklıkta 24 saat 100 cpm çalkalama hızı ile çalkalandı. Oluşan partiküller santrifüjde çöktürülerek etanol ve su ile ardışık yıkamalara tabi tutuldu ve en son hacmi toplam 100 ml olacak şekilde sulu lateks çözeltisi haline getirildi. Ortam homojenize edildikten sonra az bir örnek alındı ve etüvde vakum altında 40 °C sıcaklıkta kurutulduktan sonra gravimetrik analize tabi tutuldu. Ortalama partikül konsantrasyonu 0,13 g partikül/ml olarak bulundu. Bu ortam daha sonraki uygulamalarda çıkış lateksi olarak kullanılmak üzere bekletildi.

### **2.2.2. Eş boyutlu makrogözenekli poli(klorometilstiren-ko-divinilbenzen) (poli(CMS-ko-DVB)) partiküllerin üretimi**

Polistiren çıkış lateksi kullanılarak poli(CMS-ko-DVB) partiküllerin üretimi için yapılan çalışmalar aşağıda sırasıyla verilmiştir.



**Şekil 2.1. Eş boyutlu makrogözenekli poli(CMS-ko-DVB) partiküllerinin üretiminin şematik gösterimi**

### 2.2.2.1. Polistiren çıkış partiküllerinin birinci şişirme basamağı

İçerisinde 40 ml su olan bir erlende içerisinde derişimi %0.25 (g/g) olacak şekilde sodyum dodesil sülfat (SDS) sonikasyon yardımıyla çözüldü. Düşük molekül ağırlıklı şişirmeye yardımcı ve gözenek oluşturucu organik bileşen olarak 2 ml toluen, 1 ml DBP ve 0,25 ml dodekanol karışımı bir cam deney tüpünde sonikatör (Bandelin Sonorex RK103H) içerisinde iyice çözüldü ve daha önce hazırlanmış olan erlendeki 40 ml sulu SDS çözeltisine aktarıldı. Erlen içeriği bu şekliyle 30 dk. sonikatör içerisinde sonikasyona tabi tutuldu. Daha sonra bu ortama 0,35 g (2,6 ml lateks çıkış lateksi) çıkış partikülü eklendi ve ortam 15 dk. ilave olarak sonikasyona tabi tutuldu. Manyetik karıştırıcıda ağzı kapalı olarak 400 rpm karıştırma hızında 24 saat boyunca karışmaya bırakıldı (Unsal vd., 2003; Unsal vd., 2004).

Ayrıca bir sonraki gün kullanılmak üzere 0,8 g PVA, 10 ml su içinde 45°C da manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çözülmeye bırakıldı.

### 2.2.2.2. Polistiren çıkış partiküllerinin ikinci şişirme basamağı

Başka bir erlende 40 ml su içerisinde derişimi %0.25 (g/g) olacak şekilde katı SDS sonikasyon yardımıyla çözüldü. Bir cam deney tüpü içerisine sırasıyla 0,08 g AIBN, 1,2 ml CMS ve 1,8 ml DVB eklendi. Deney tüpü içerisindeki AIBN çözünene kadar sonikasyona tabi tutuldu. Daha sonra cam tüp muhteviyatı 40 ml su içinde çözülen SDS'li ortama eklendi ve 45 dk. sonikasyona tabi tutulduktan sonra birinci şişirme

basamağındaki karışımın içine hepsi birden boşaltıldı. Son karışım tekrardan 24 saat süre ile manyetik karıştırıcıya bırakıldı (Unsal vd., 2003; Unsal vd., 2004).

### *2.2.2.3. Şişirilmiş çıkış partiküllerinin tekrar polimerleştirilmesi ile poli(CMS-ko-DVB) partiküllerinin üretimi*

İkinci şişirme basamağından çıkan partiküller pyrex cam şişe reaktör içerisine alındı. Bu ortama 1 gün önce çözünmeye bıraktığımız ikinci şişirme basamağındaki PVA karışımı eklendi ve içerisinden 10 dk. azot gazı geçirildi. Reaktör manyetik karıştırıcıdan alınıp 70 °C'de 120 cpm çalkalama hızında çalışan çalkalamalı su banyosuna konuldu. Reaksiyon ortamı 24 saat sonunda alındı ve yıkamalara tabi tutuldu. Yıkama işlemi önce iki kez etanolle oda sıcaklığında 12 saatlik periyodlarla manyetik karıştırmayla, daha sonra ağzı kapalı bir şişede 150 ml THF ile üç kez 12 saat boyunca bu sefer çalkalayıcıda 60 °C'da gerçekleştirildi (Unsal vd., 2003). En son olarak iki kez etanol ve 3 kez su ile yıkanan partiküller APBA ligandı takılması ve karakterizasyon işlemlerinde kullanılmak üzere toplam sıvı hacmi 100 ml olacak şekilde etanol/distile su (50/50, v/v) ile bir şişe içerisine alındı. Ortam homojenize edildikten sonra az bir örnek alındı ve etüvde vakum altında 50 °C sıcaklıkta kurutulduktan sonra gravimetrik analize tabi tutuldu. Ortalama partikül konsantrasyonu 0,018 g partikül/ml olarak bulundu. Bu ortam daha sonraki uygulamalarda çıkış lateksi olarak kullanılmak üzere oda koşullarında beklemeye alındı (Unsal vd., 2003; Unsal vd. 2004).

### **2.2.3. Eş boyutlu ve makrogözenekli poli(CMS-ko-DVB) partiküllerin karakterizasyonu**

#### *2.2.3.1. Partikül boy ve boydağılımı tayini*

Üretilen PS çıkış partikülleri ve poli(CMS-ko-DVB) partiküllerin boy ve boy dağılımını görebilmek amacıyla optik mikroskop fotoğrafları (Leica, Almanya, inverter ışık mikroskopu ile) çekilmiştir. Mikropartiküllerin ortalama boy ve boy dağılımının belirlenebilmesi için yoğun bir bölgeden alınan fotoğraf üzerinde en az 100 partikülün çapı ölçülmüştür. Daha sonra sayıca ortalama çap ( $D_n$ ) ve her bir

boyutun hacimsel kesri hesaplanmıştır. Sayıca ortalama çap Eşitlik 2.1'deki formüle göre belirlenmektedir.

$$D_n = \sum N_i D_i / \sum N_i \quad (2.1)$$

Burada  $N_i$ ,  $D_i$  ( $\mu\text{m}$ ) çapına sahip partiküllerin sayısını göstermektedir. Partikül boy dağılım indeksi ( $U$ , polidispersite indeksi) ise Eşitlik 2.2'deki formül ile ifade edilmektedir.

$$U = D_w / D_n \quad (2.2)$$

Burada  $D_w$  partiküllerin ağırlıkça ortalama çapı olup Eşitlik 2.3'deki formül üzerinden hesaplanmaktadır.

$$D_w = \left\{ \frac{\sum N_i D_i^6}{\sum N_i D_i^3} \right\}^{1/3} \quad (2.3)$$

Ayrıca partiküllerin yüzey özellikleri ve boyutları SEM (Scanning Electron Microscope, JSM-7600 F FEG) ile de görüntülenerek incelenmiştir.

#### 2.2.3.2. Partikül gözenekliliğinin ve yüzey alanının hesaplanması

Spesifik yüzey alanları (BET), mikro-mezo gözenek boyut dağılımları, gözenek hacmi dağılımları ve ortalama gözenek çapı boyutları azot gazı adsorpsiyonu ile standart volumetrik metot ile Quantochrome Autosorp 1 MP cihazı ile sıvı azot sıcaklığında,  $P/P_0 = 0,0001$  ile  $0,99$  aralığında adsorpsiyon ve desorpsiyon izotermelerinden yararlanarak belirlenmiştir. Analizden önce örnekler 48 saat boyunca  $70^\circ\text{C}$ 'de etüvde bekletilip daha sonra  $80^\circ\text{C}$ 'de 6 saat boyunca safsızlıkları gidermek ve yüzeye adsorbe olmuş suyu uzaklaştırmak amacıyla vakum altında degaz işlemi uygulanmıştır. Bu özellikler belirlenmesinde BET yüzey alanı, BJH model gözenek boyut dağılımı, t-plot mikro gözenek yüzey alanı belirlenmelerinde ve silindirik gözenek şekli göz önüne alınarak ortalama gözenek çapı cihazın programı yardımıyla hesaplanmıştır.

#### **2.2.4. Poli(CMS-ko-DVB) mikropartiküllere ligand takılması**

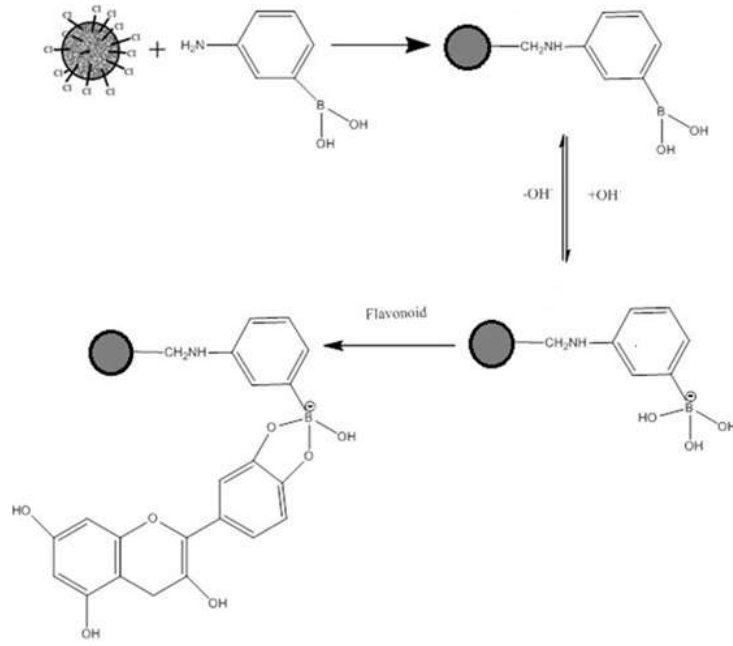
Poli(CMS-ko-DVB) mikropartiküllere ligand olarak flavonoid molekülleri üzerindeki komşu hidroksil gruplarına ilgisi olduğu düşünülen APBA bağlanması hedeflenmiştir. Bu amaçla etanol/su ortamındaki poli(CMS-ko-DVB) mikropartiküllerinden kuru ağırlığı 1 g olacak şekilde alınıp partiküller santrifüjlenerek çöktürülüp üst kısmı atıldı. 10 ml distile suda 0,4 g APBA çözülmüş ve partiküller bu ortama eklenmiştir. Son ortamın pH'ı 3 N NaOH ile 12'ye ayarlanmıştır ve son olarak 60 °C sıcaklıkta 100 rpm çalkalama hızında 24 saat boyunca çalkalanmaya bırakılmıştır. Daha sonra partiküller 100 ml etanol/distile su (50/50, v/v) ortamına alınıp homojen hale getirildikten sonra ortamdan 1 ml çekilerek 60 °C sıcaklıkta vakum altında kurutulmaya bırakılmıştır. Gravimetrik analiz sonucunda partikül konsantrasyonu  $8,4 \cdot 10^{-3}$  g partikül/ml olarak bulunmuştur. Bu süspansiyon çözeltisi daha sonraki adsorpsiyon işlemlerinde stok olarak kullanılmıştır. Kimyasal yapı analiz çalışmaları için stok ortamından 3 ml örnek alınıp santrifüjle çöktürüldü ve üst kısım atılmıştır. Çökmüş partiküller çalkalama varlığında 10 ml 0,1 N HCl ile etkileştirilmiştir. Çöktürme sonrası elde edilen partiküller bu kez saf su ile yıkanmış ve çöktürülerek 40 °C sıcaklıkta vakum altında kurutulmuştur. Kuruyan örneklerin IR (Infrared) spektrumu Perkin-Elmer FT-IR (Fourier Transform Infrared) spektrofotometresi ile alınmıştır.

#### **2.2.5. APBA bağlı poli(CMS-ko-DVB) mikropartiküllerle flavonoid adsorpsiyon çalışmaları**

Bu kısımdaki çalışmalar kapsamında Şekil 2.2'de şematize edildiği gibi APBA fonksiyonel grubuna sahip poli(CMS-ko-DVB) mikropartiküllerle komşu hidroksil grubuna sahip flavonoidlerin seçici olarak adsorpsiyonunun gösterilmesi amaçlanmış ve üç aşamalı olarak planlanmıştır.

İlk aşamada Şekil 1.1'de moleküler yapısı gösterilen komşu hidroksil grubuna sahip kersetin flavonoid molekülü ile adsorpsiyon çalışmaları yapılmış ve ortam pH'ının adsorpsiyon kapasitesine etkisi incelenmiştir. Daha sonra en yüksek adsorpsiyon kapasitenin olduğu ortam pH'ında adsorpsiyon izotermi çıkarılmıştır.

İkinci aşamada yine Şekil 1.1’de moleküler yapıları verilen kersetin’de olduğu gibi komşu hidroksil grubuna sahip rutin ve bu yapılarla benzer fakat komşu hidroksil grubuna sahip olmayan apigenin ile başlangıç konsantrasyonları aynı tutularak aynı pH’nın adsorpsiyon kapasitesine etkisi incelenmiştir. Böylelikle etkinliği pH’a ve flavonoid molekülünün tipine bağlı olması beklenen poli(CMS-ko-DVB) mikropartiküllerle flavonoid yapısının farklı olmasıyla, diğer bir deyişle komşu hidroksil grubuna sahip flavonoid ile sahip olmayanın adsorpsiyon kapasitesinin pH ile değişimi ortaya konulmaya çalışılmıştır.



**Şekil 2.2. APBA bağlı poli(CMS-ko-DVB) mikropartiküllerle komşu hidroksil grubuna sahip bileşiklerin adsorpsiyon mekanizması**

Çalışmalarda adsorpsiyon ortamı olarak metanol/HEPES (85/25, ml/ml) kullanılmıştır. Adsorpsiyon ortamının pH değeri kullanılan HEPES tamponunun pH’ı değiştirilerek ayarlanmıştır. Başlangıç konsantrasyonu ( $C_0$ ) değerinin belirlenmesi amacıyla çalışılan her bir pH değerinde hazırlanmış kalibrasyon eğrileri kullanılmıştır (Bknz Ek D-3.15). Öncelikli olarak çalışılan flavonoidin metanol/HEPES ortamında istenilen pH değerinde çözeltileri hazırlanmıştır. Kersetinin pH 8,5 değerinde maksimum adsorsiyon kapasitesini belirlemek amacıyla kersetin konsantrasyonu 0-0.15 mg/ml aralığında değiştirilmiştir. Adsorpsiyon ortamı pH değerinin adsorpsiyon kapasitesi üzerine etkisinin incelendiği her üç flavonoidle yapılan deneylerde 0.02 mg/ml başlangıç konsantrasyon değeri kullanılmıştır.

Adsorpsiyon işlemleri için önce 10 ml lik metanol/HEPES ortamında belli başlangıç flavonoid konsantrasyonunda adsorpsiyon ortamı hazırlanmıştır. Hazırlanmış olan poli(CMS-ko-DVB) mikropartikül stoğundan içerisinde 0.05 g kuru partikül olacak şekilde sıvı çekilmiş ve santrifüjlenerek üzeri atılmıştır. Daha sonra çökmüş poli(CMS-ko-DVB) partiküller üzerine flavonoid içermeyen metanol/HEPES ortamından 5 ml eklenmiş ve çalkalanarak tekrar santrifüjlenmiştir. Üzeri atılan çökmüş partiküller daha önce hazırlanmış 10 ml'lik flavonoid ortamı ile birleştirilip ortam homojenize olacak şekilde çalkalandıktan sonra ağzı kapalı olarak çalkalayıcıya (200 cpm) konulmuştur. Adsorpsiyon işlemi bu şekilde iki saat sürdürülmüştür. Bu süre sonunda adsorpsiyon ortamını içeren tüpler santrifüjlenmiş ve üst kısmın adsorpsiyon değeri UV spektrofotometrede belirlenmiştir. Her bir flavonoid için adsorpsiyon değeri ölçümü maksimum adsorpsiyonun gözlemlendiği dalga boyunda yapılmıştır (Bknz Ek D-3.15). Tüm çalışmalar oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

Birinci ve ikinci aşamalarda adsorpsiyon miktarını belirlemek amacıyla UV spektrofotometresi ile çalışılmış ve adsorbans (A) değerleri kullanılarak adsorpsiyon kapasitesi Eşitlik 2.4'teki formüle göre hesaplanmıştır.

$$Q = \left(1/W_p\right) \left[\left(A_o - A_f\right) / A_o\right] \times C_o \times V \quad (2.4)$$

Burada;

Q: Adsorpsiyon kapasitesi (mg flavonoid / g partikül)

$W_p$ : APBA bağlı poli(CMS-ko-DVB) mikropartikül kuru ağırlığı (g)

$A_o$ : Adsorpsiyon öncesi adsorpsiyon ortamı absorban değeri

$A_f$ : Adsorpsiyon sonrası adsorpsiyon ortamı absorban değeri

$C_o$ : Adsorpsiyon öncesi adsorpsiyon ortamı flavonoid konsantrasyonu (mg/ml)

V: Adsorpsiyon ortamı toplam hacmi (ml)

olduğunu göstermektedir.



Üçüncü aşamada her bir flavonoid yapısı için en iyi adsorpsiyon kapasitesinin görüldüğü pH 8,5 değerinde üç flavonoid yapısının bir arada (karışım halinde) bulunması durumunda yine aynı pH değerinde her bir molekülün adsorpsiyon kapasitesini belirlemek ve adsorbanın komşu hidroksil gruplarına olan ilgisini (seçiciliğini) göstermek amacıyla HPLC kullanılmıştır. Bu çalışmalarda öncelikle üç tip flavonoid molekülünün tek tek kolonda yürütülmesi ve çıkış zamanının belirlenmesi çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalarda üç flavonoid molekülünün pH'ı 8.5 olan metanol/HEPES ortamında konsantrasyonları 50-200 mg/ml aralığında değişen çözeltileri hazırlanmıştır. Taşıyıcı faz olarak %1 asetik asit içeren metanol–asetonitril–su (40:15:45, v/v/v) ortamı kullanılmıştır (Yuangang vd., 2006). Taşıyıcı fazın hazırlanması sırasında kullanılan su ultra saf su kalitesindedir. Hazırlanan çözeltiler HPLC kolonuna verilmeden önce mutlaka 0.4 µm lik filtreden geçirilmiştir. Her bir flavonoid molekülü çözeltilisinden 20 µL alınarak taşıyıcı faza enjekte edilmiştir. Enjeksiyon sonrası her bir flavonoid molekülünün kolondan çıkış zamanı tespit edilmiştir. Geliş zamanları ve pik şiddetleri değerlendirilerek çalışılabilecek ortak minimum flavonoid konsantrasyonu belirlenmiş ve kalibrasyon eğrileri hazırlanmıştır (Bknz. Ek A, Ek B, Ek C). Daha sonra üçlü flavonoid karışımı her bir flavonoid molekülünün karışımdaki konsantrasyonu ortak minimum konsantrasyon olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu karışımın 20 µL si kolona verilerek başlangıç pikleri belirlenmiştir. Bu karışımın 10 ml si ile yine kuru ağırlığı 0.05 g olacak şekilde kuru poli(CMS-ko-DVB) mikropartikül kullanılarak adsorpsiyon çalışmaları yukarıda anlatıldığı gibi tekrarlanmıştır. Adsorpsiyon sonrası ortam santrifüj edilmiş ve üste kalan kısımdan alınan 20 µL lik örnek taşıyıcı faza enjekte edilerek kolondan geçirilmiştir. Flavonoid moleküllerinin karışım içerisinden adsorpsiyon kapasitesi Eşitlik 2.5'e göre hesaplanmıştır.

$$Q = (1/W_p) \left[ \frac{(P_o - P_f)}{P_o} \right] \times C_o \times V \quad (2.5)$$

Burada;

Q: Adsorpsiyon kapasitesi (mg flavonoid / g partikül)

W<sub>p</sub>: APBA bağlı poli(CMS-ko-DVB) mikropartikül kuru ağırlığı (g)

P<sub>0</sub>: Adsorpsiyon öncesi ilgili flavonoidin geldiği yerdeki pikin alanı

$P_f$ : Adsorpsiyon sonrası ilgili flavonoidin geldiği yerdeki pikin alanı

$C_o$ : Adsorpsiyon öncesi adsorpsiyon ortamı flavonoid konsantrasyonu (mg/ml)

$V$ : Adsorpsiyon ortamı toplam hacmi (ml)

olduğunu göstermektedir.

Formüldeki  $C_o$  değeri kalibrasyon eğrileri kullanılarak belirlenmiştir (Bknz Ek A, Ek B, Ek C).

### **2.2.6. Poli(CMS-ko-DVB) mikrokürelerinin bitki özütü antioksidan aktivitesi artırılması amacıyla kullanımı**

Geliştirilen organik temelli adsorbanın seçici olarak bazı bileşikleri ayıracağı, daha sonra bu bileşiklerin oluşturduğu karışımın daha yüksek aktivite vereceği beklentisini açığa kavuşturmak için Muğla yöresine ait bir bitki seçilmiş ve bu bitkinin etanol özütü ile adsorpsiyon, desorpsiyon, toplam flavonoid tayini ve antioksidan aktivite belirleme çalışmaları yapılmıştır. Etanol özütünden etil asetat özütüde hazırlanarak benzer çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Aşağıda bu çalışmalar ayrıntılı olarak verilmiştir.

#### *2.2.6.1. Kantaron bitkisinin topraküstü kısmından etanol ve etil asetat özütü hazırlanması*

Antioksidan aktivitesinin adsorban kullanılarak artırılmasına yönelik çalışmalar için *Hypericum perforatum* (kantaron) bitkisi kullanılmıştır. Halk pazarından taze (henüz kurutulmamış) olarak demetler halinde alınan kantaron otu bir şilte üzerine yayılarak güneş ışığı ile doğrudan temas ettirilmeden, gölgede, açık havada ve havalandırılmalı bir ortamda iki hafta süre ile kurutulmuştur. Kurumuş kantaron otundan yaklaşık 300 g örnek alınmış ve orta büyüklükte parçalara ayrıldıktan sonra büyük bir cam kavanoza içerisine yerleştirilmiştir. Bitki özütünden yağimsı molekülleri ekstrakte edebilmek için cam kavanoz içerisine bitki parçaları seviyesinin hemen üzerine gelecek şekilde hekzan eklenmiştir. Kavanoz bir çalkalayıcıya yerleştirilerek ağzı kapalı olarak çalkalamaya bırakılmıştır. Arada bir kavanozun kapağı açılarak bir cam

baget vasıtasıyla bitki yığını karıştırılmış ve yine ağzı kapalı olarak çalkalama işlemine devam edilmiştir. Her 24 saatte bir ortamdaki hekzan çözeltisi süzülerek alınmış ve yeni hekzan eklenerek çalkalama işlemine devam edilmiştir. Alınan hekzan özütü rotary buharlaştırıcıda 45 °C'da çektirilmiştir. Bu işlem üç kez tekrarlanarak bitki içerisindeki yağimsı moleküllerin alınması sağlanmıştır. Bir sonraki aşamada yağimsı molekülleri alınmış bitki örnekleri üzerine bu kez etanol eklenmiş ve yukarıdaki çalkalama ve çektirme işlemleri üç kez tekrarlanarak bitki içerisindeki flavonoid tarzı moleküllerin etanol fazına geçirilmesi ve konsantre halde ayrılması sağlanmıştır. Konsantre haldeki etanol özütü ağzı açık olarak çeker ocakta bir hafta süre ile havalandırılarak içerisindeki tüm çözücülerin uçması sağlanmıştır. Bu süre zarfında özüt bir baget ile sık sık karıştırılmıştır.

Yukarıda hazırlanan etanol ekstraktı etil asetat ile ekstrakte edilerek etil asetat ekstraktı oluşturulmuştur. Kullanılan yöntem yukarıdaki ile aynıdır.

#### *2.2.6.2. Kantaron bitki özütü ile adsorpsiyon çalışmaları*

Bu kısımda adsorban partiküllerle bitki özütünden bazı molekülleri seçici olarak alıp antioksidan aktivitenin nasıl değişeceği belirlenmek istenmiştir. Bu nedenle kantaron bitkisinin etanol özütünden bir stok çözelti hazırlanmış ve bu çözeltden adsorpsiyon yapılmıştır. Adsorplanmış moleküller desorpsiyon sonrası ayrılmış ve adsorplanmadan önceki karışımla karşılaştırılması yapılmak üzere toplam flavonoid ve antioksidan aktivite testlerine tabi tutulmuştur.

Adsorpsiyon ve desorpsiyon çalışmalarında ortamda bulunacak HEPES'in daha sonraki analiz sonuçlarını etkilememesi için HEPES tamponu kullanılmamıştır. Adsorpsiyon çalışmalarında kullanılmak üzere öncelikle elde edilen bitki özütünden metanol/su (85/25, v/v) ile pH'ı 8,5 olan (pH ayarlaması NH<sub>3</sub>'ün %25'lik sulu çözeltisinden hazırlanan 0,1 N'lik çözelti ile yapılmıştır) 200 µg/ml konsantrasyonunda adsorpsiyon ortamı stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltden 100 ml alınmış ve yaklaşık ağırlığı 1 g olan APBA bağlı poli(CMS-ko-DVB) mikropartiküllerle ağzı sıkı kapalı 50 ml'lik iki santrifüj tüpü içerisinde etkileştirilmiştir. Santrifüj tüpü çalkalayıcıya konulmuş ve iki saat süre ile 200 cpm'de çalkalama işlemine devam edilmiştir. Bu süre sonunda ortam santrifüj edilmiş ve üste kalan kısım ayrı bir şişeye alınmıştır. Adsorpsiyon sonrası

adsorplanan moleküllerin desorpsiyonu için çöktürülmüş olan partiküller 100 ml'lik pH'ı 5,5-6,5 (pH ayarlaması CH<sub>3</sub>COOH'ın 0,1 N'lik sulu çözelti ile yapılmıştır) aralığında olan etanol/su (70/30, v/v) ortamı ile aynı tüp içerisinde homojen olarak dağıtılıp, ağzı kapalı olarak yine çalkalayıcıda 1 saatlik çalkalama ile desorpsiyona tabi tutulmuştur. Desorpsiyon ortamı santrifüj sonrası ayrı bir şişeye alınmıştır. Çöktürülmüş partiküllerle desorpsiyon işlemi iki kez daha aynı hacimdeki aynı ortamla tekrarlanmış ve desorpsiyon ortamı aynı şişede biriktirilmiştir. Çökmüş olan poli(CMS-ko-DVB) mikropartiküller pH'ı 8,5 olan metanol/su (85/25, v/v) çözeltisi ile yıkanmış ve çöktürülerek yeni adsorpsiyon işlemine hazır hale getirilmiştir. Bu partiküller kullanılarak adsorpsiyon ve desorpsiyon işlemleri yeterli miktarda flavonoid desorpsiyon ürünü elde edilene kadar tekrarlanmıştır. Ayrı şişelerde biriktirilmiş olan adsorpsiyon ve desorpsiyon ortamları rotary buharlaştırıcıda çektirilerek yoğun fazda hem desorpsiyon hem de adsorpsiyon sonrası adsorpsiyon ortamları elde edilmiştir. Bu ortamlar çözücülerinden daha iyi arındırılabilmesi için yine ağzı açık olarak oda sıcaklığında bir çeker ocak içerisinde üç gün süre ile havalandırmaya bırakılmıştır. Bu süre sonrasında örnekler soğutmalı dondurucuda (freeze drying) içerisindeki sudan tamamen arındırılarak katı örnekler haline getirilmiştir.

Bu çalışmalar neticesinde etanol bitki özütü katı stoğu, adsorpsiyon sonrası adsorpsiyon ortamından elde edilen katı örnek ve desorpsiyon sonrası desorpsiyon ortamından elde edilen katı örnek olmak üzere üç farklı ortam elde edilmiştir. Bu ortamların her biri için DPPH ve β-karoten olmak üzere iki farklı yöntemle antioksidan aktivite ölçümleri yapılmış ve toplam flavonoid miktarları belirlenmiştir. Yöntemlerin uygulanması aşağıda detaylı olarak verilmektedir.

Yukarıdaki işlemler etanol özütünden elde edilen etil asetat özütü ile tekrarlanmıştır. Burada olduğu gibi tüm çalışmalarda ve denemelerde aynı partiküller kullanılmıştır. Ancak yeni bir çalışmaya geçmeden önce kullanılmış partiküller önce desorpsiyon ortamı ile sonrada saf etanol ile iki gün boyunca yıkanmıştır.

Antioksidan aktivite β-Karoten renk açılımı ve serbest radikal giderim aktivitesi olmak üzere iki farklı yöntemle belirlenmiştir. Yöntemlerin uygulanması aşağıda verilmektedir.

### 2.2.6.3. $\beta$ -Karoten renk açılımı yöntemi

Toplam antioksidan aktivite, linoleik asit oksidasyonundan ileri gelen konjuge dien hidroperoksitlerin ve uçucu organik bileşiklerinin inhibisyonunun ölçülmesine dayanan  $\beta$ -karoten-linoleik asit sistemiyle belirlenmiştir.  $\beta$ -karoten çözeltisi, 0,2 mg  $\beta$ -karotenin 1 ml kloroformda çözülmesiyle hazırlanmıştır.

Bu çözeltiliye 20  $\mu$ g linoleik asit ve 200 mg Tween 40 ilave edilmiştir. Kloroform rotary evaporatörde buharlaştırıldıktan sonra 50 ml saf oksijen geçirilmiş distile su ile karıştırılmıştır. 2000 ppm konsantrasyonundaki özütlerin değişen konsantrasyondaki, 500  $\mu$ l çözeltilerinin bulunduğu test tüplerine bu emülsiyonunun 4 ml ilave edilmiştir. Emülsiyon, test tüplerine ilave edilir edilmez spektrofotometre (LANGE, DR2800) kullanılarak başlangıç absorbansları 490 nm'de ölçülmüştür. Tüpler 50°C sıcaklıkta ve karanlıkta inkübasyona bırakılmış ve  $\beta$ -karotenin rengi kayboluncaya kadar inkübasyona devam edilmiştir.  $\beta$ -karoten renk açılım oranı (R), Eşitlik 2.6'ya göre hesaplanmıştır:

$$R = \ln (a/b)/t \quad (2.6)$$

Burada; ln=doğal logaritma, a=başlangıç absorbansı ve b=360 dakika inkübasyondan sonraki absorbansı göstermektedir.

Antioksidan Aktivite (AA) ise Eşitlik 2.7 'ye göre hesaplanmıştır.

$$AA = \left[ \left( R_{\text{kontrol}} - R_{\text{örnek}} \right) / R_{\text{kontrol}} \right] \times 100 \quad (2.7)$$

### 2.2.6.4. DPPH serbest radikal giderim aktivitesi yöntemi

Kantaron özütlerinin serbest radikal giderim aktiviteleri DPPH kullanılarak belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda analiz örnekleri hazırlamak için 3.2 ml metanol içerisine özütlerin 0.4 ml (0.2- 3.2 mg aralığında değişen farklı miktarlar içeren)'si ilave edildikten sonra 1 ml 1mM DPPH çözeltisi ile karıştırılmış ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyondan sonra 517 nm'de absorbansları Elisa test cihazında (Molecular Devices, Spectrum Max 340PC384) ölçülmüştür. Örneklerin

absorbans değerleri boş kontrole karşı (0,8 ml çözücü) değerlendirilmiştir. Serbest radikal giderim aktivitesi Eşitlik 2.8 kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{İnhibisyon (\%)} = 100 - \left[ \left( A_1 / A_0 \right) \times 100 \right] \quad (2.8)$$

Burada;  $A_0$  kontrolün absorbansı,  $A_1$  örneğin absorbansıdır. Elde edilen bu absorbans değerlerinden % inhibisyon değerleri hesaplanmıştır.

#### 2.2.6.5. Toplam flavonoid miktar tayini

Kantaron özütleri ve hazırlanan adsorban ile kolon kromatografisinde fraksiyonlandırılmış özütlerin her bir fraksiyonun toplam flavonoid miktarları mikrogram kersetin ekivalent olarak alüminyum nitrat metodu ile belirlenmiştir (Öztürk vd., 2007). Bu yöntemle göre, içerisinde 1 mg örnek içerecek şekilde çözeltilerden 500 µl alınmış ve üzerine 3,3 mL metanol ilave edilmiştir. Bu karışıma 0,1 M 100 µL potasyum asetat eklendikten hemen sonra 100 µl %10'luk alüminyum nitrat çözeltisinden ilave edilmiştir. Karışımlar 45 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 415 nm'de absorbansları okunmuştur. Özütlerin toplam flavonoid miktarları standart kersetin grafiğinden (Bknz Ek R) elde edilen Eşitlik 2.9'u kullanılarak belirlenmiştir.

$$A = 0.0064 [\text{kersetin (mg)}] + 0.0637 \left( R^2 : 0.999 \right) \quad (2.9)$$

#### 2.2.6.6. Desorpsiyon yüzdesinin belirlenmesi

Yukarıda kantaron bitki özütü ile adsorpsiyon çalışmaları neticesinde elde edilen katı örnek ağırlıkları kullanılarak Eşitlik 2.10'a göre % desorpsiyon değeri elde edilmiştir.

$$\% \text{ Desorpsiyon değeri} = \left[ 1 - \left( \left( W_{\text{stok}} - \left( W_{\text{desorp}} + W_{\text{çözelti}} \right) \right) / W_{\text{desorp}} \right) \right] \times 100 \quad (2.10)$$

Burada;

$W_{\text{stok}}$  : Etanol özütü stok çözeltisinin adsorpsiyon öncesi içerdiği toplam katı miktarı (mg)

$W_{\text{desorp}}$  : Adsorpsiyon sonrası desorbe edilmiş toplam katı miktarı (mg)

$W_{\text{çözültü}}$ : Adsorpsiyon sonrası çözeltide kalan katı miktarı

olarak ifade edilmektedir..

### 3. BULGULAR ve İRDELEME

#### 3.1. Partikül Boy ve Boy Dağılımı

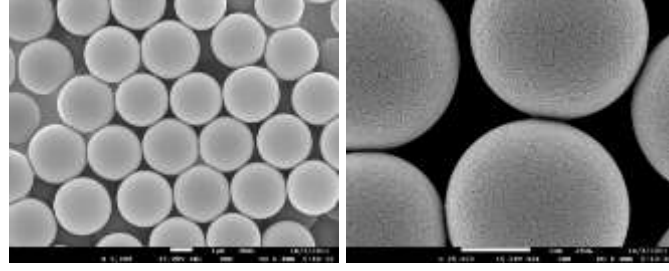
Üretilen PS çıkış partikülleri ve poli(CMS-ko-DVB) partiküllerin çekilen SEM fotoğrafları Şekil 3.1’de gösterilmektedir. SEM fotoğrafları kullanılarak en az 100 partikül çapı dikkate alınarak elde edilen  $D_n$  ve  $D_w$  ortalama çap değerleri ve bu değerler kullanılarak Eşitlik 2.1, Eşitlik 2.2 ve Eşitlik 2.3’teki formüllerle hesaplanan U değerleri Çizelge 3.1’de verilmektedir. Çıkış partiküllerinin ortalama 2,5  $\mu\text{m}$  olan çapı çok basamaklı şişirme yöntemiyle artırılarak çapı yaklaşık 6,6  $\mu\text{m}$ ’ye boy dağılımı az olacak şekilde çıkarılabilmektedir. PS çıkış lateks partikülleri için bulunan polidispersite değeri 1.005 olup eş boyutluluğu çok iyi olan partiküllerde (1.001-1.0001 aralığında olan) olması gereken aralıktadır. Şişirme sonucu elde edilen poli(CMS-ko-DVB) partiküllerin polidispersite indeksi ise 1.017 olarak oldukça düşük polidispersitede üretilebilmiştir.

PS çıkış partiküllerinin şişirilmesi sonucu elde edilen poli(CMS-ko-DVB) partiküllerin gözenek boyutları incelendiğinde (Şekil 3.1.g) makrogözenekliliğin (>50 nm) tüm yüzeyde homojen bir şekilde ve fazlaca bulunduğu görülmektedir. Şişirilmiş partiküllerin makrogözenekli yapısı, çıkış partikülleri ile kıyaslandığında (Şekil 3.1.b ve Şekil 3.1.d) şişirilmiş partiküllerdeki gözeneklerin boyutunun yaklaşık 10 nm’den 100 nm civarlarına çıktığı görülmektedir. Bu sonuçlar tez konusunun hedeflerinden biri olan eş boyutlu ve makrogözenekli partiküllerin elde edilebildiğini ortaya koymaktadır.

**Çizelge 3.1. PS ve poli(CMS-ko-DVB) partiküllerin boy ve boy dağılımı sonuçları**

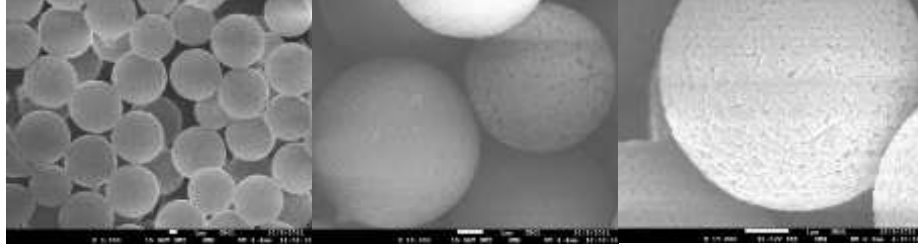
Partikül Tipi	$D_w$ ( $\mu\text{m}$ )	$D_n$ ( $\mu\text{m}$ )	U
Çıkış lateksi (PS)	2.487	2,474	1.005
Şişirilmiş partikül (Poli(CMS-ko-DVB ))	6.666	6.552	1.017





(a)

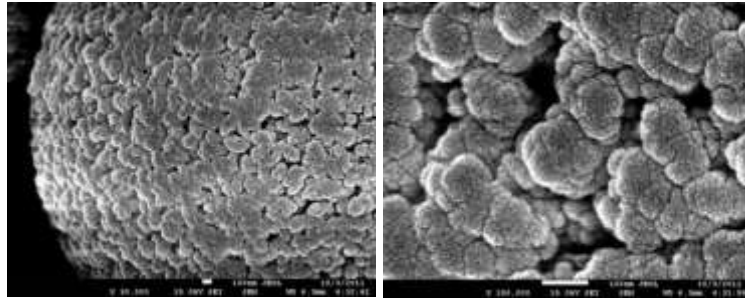
(b)



(c)

(d)

(e)



(f)

(g)

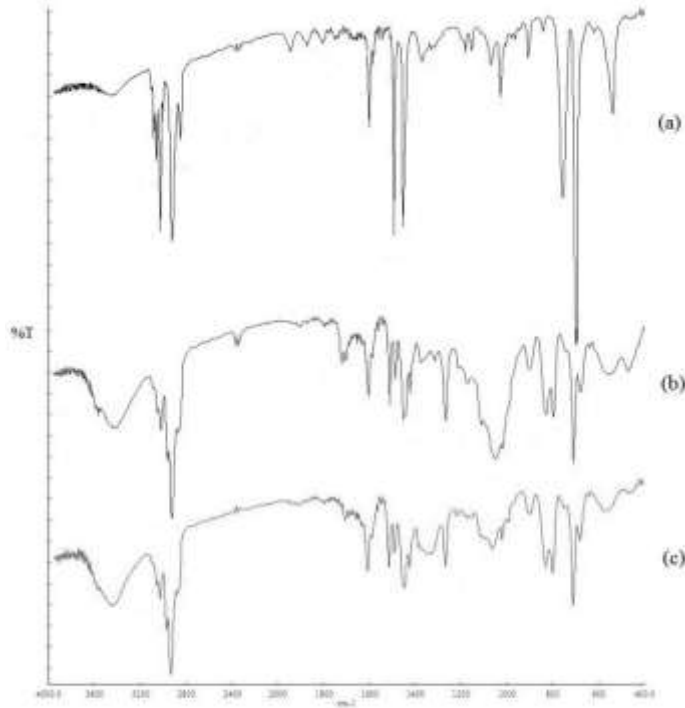
**Şekil 3.1. Üretilen PS çıkış lateks (a: 8000x , b: 25000x büyütme), ve şişirilmiş poli(CMS-ko-DVB) partiküllerinin (c: 3000x , d: 10000x , e:17000x , f: 30000x , g: 150000x büyütme) SEM fotoğrafları**

### 3.2. Partikül Gözenekliliği ve Yüzey Alanı

Poli(CMS-ko-DVB) partiküllerin sorptometrik verilerine göre BET yüzey alanı, gözenek hacmi ve ortalama gözenek çapı sırasıyla  $84,35 \text{ m}^2/\text{g}$ ,  $0,5603 \text{ cm}^3/\text{g}$  ve  $265,7 \text{ Å}$  olarak hesaplanmıştır. Gözeneklerin çap dağılımı Ek S’de görüldüğü gibi bir heterojenlik göstermektedir. Bu sonuçlara ilaveten Ek T’deki poli(CMS-ko-DVB) partiküllerine ait BET izotermi incelendiğinde IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) sınıflandırmasına göre fiziksel adsorpsiyonlardan tip II izotermine daha çok uyması partiküllerin makrogözenekli olduğu göstermektedir (Sing vd., 1985).

### 3.3. Partiküllerin türevlendirmesi ve FT-IR analizi

Üretilmiş olan APBA bağlı poli(CMS-ko-DVB) mikropartikülleri yıkandıktan sonra vakum altında kurutularak FT-IR analizi yapılmıştır. Aynı şekilde ligand bağlı olmayan tohum PS lateks ve poli(CMS-ko-DVB) partiküllerinin de IR spektrumları elde edilmiştir (Şekil 3.2). Bu grafiğe göre üretilen polistiren lateks partiküllerinden (Şekil 3.2.a) şişirmeli tohumlu emülsiyon polimerizasyonu ile üretilen poli(CMS-ko-DVB) partiküllerine (Şekil 3.2.b) geçerken yapıya klor gruplarının bağlandığı 678  $\text{cm}^{-1}$ 'deki pikin artışı ile söylenebilir. 1340  $\text{cm}^{-1}$ 'deki pikin artışı ise poli(CMS-ko-DVB) partiküllerindeki klor grubunun çıkması ve APBA ligandının azot ucundan bağlanması ile C-N (karbon-azot) bağlarının oluştuğunu gösterir (Şekil 3.2.c).

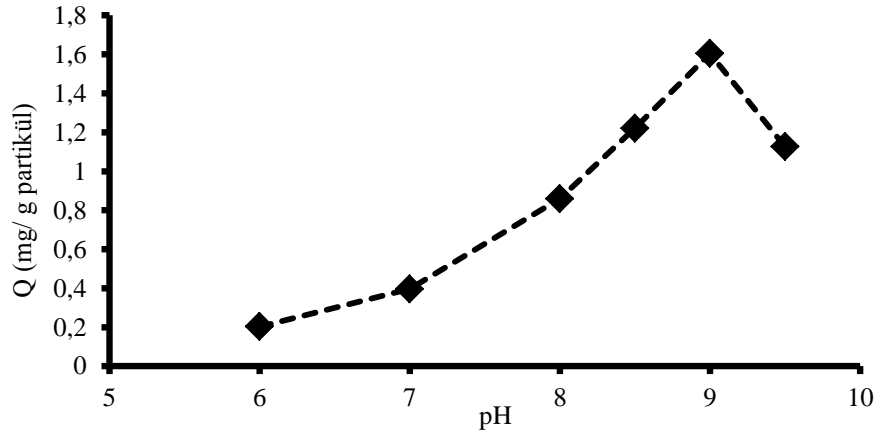


Şekil 3.2. Üretilen poli(CMS-ko-DVB) partiküllerin FT-IR spektrumları (a) tohum PS lateks partikülleri (b) poli(CMS-ko-DVB) (c) APBA ligandı bağlı mikropartiküller

### 3.3. APBA Bağlı Poli(CMS-ko-DVB) Mikropartiküllerle Flavonoid Adsorpsiyon Çalışmaları

Adsorpsiyon çalışmalarında her ikisi de komşu hidroksil grubuna sahip kersetin ve rutin kullanılarak bu gruplar haricindeki yapı farklılığının adsorpsiyona, dolayısıyla adsorbanın seçiciliğine etkisi araştırılmak istenmiştir. Komşu hidroksil gruplarının adsorpsiyon üzerine etkisi ise kersetine yapı olarak çok benzeyen fakat komşu hidroksil grubu olmayan apigenin kullanılarak ortaya konulmaya çalışılmıştır.

Adsorpsiyon çalışmalarında öncelikle kersetinin adsorpsiyon kapasitesi belirlenmiştir. Yapılan ilk çalışmalarda metanol/0.05 M HEPES (25/75, v/v) tampon karışımı kullanılmıştır. Bu ortamda maksimum kersetin adsorpsiyonu yaklaşık 1,5 mg/g partikül olarak saptanmıştır. Ancak bu ortamda apigeninin 0,02 mg/ml'lik çözeltisi düşük çözünürlüğünden dolayı hazırlanamamıştır. Bu nedenle adsorpsiyon çalışmalarına apigenin için 0,02 mg/ml çözünürlüğüne ulaşıldığı metanol/0.05 M HEPES (85/25, v/v) ortamı kullanılarak devam edilmiştir. Kersetin yapısı ile farklı pH değerlerinde yapılan adsorpsiyon çalışmaları sonucu elde edilen sonuçlar Şekil 3.3'te verilmektedir.

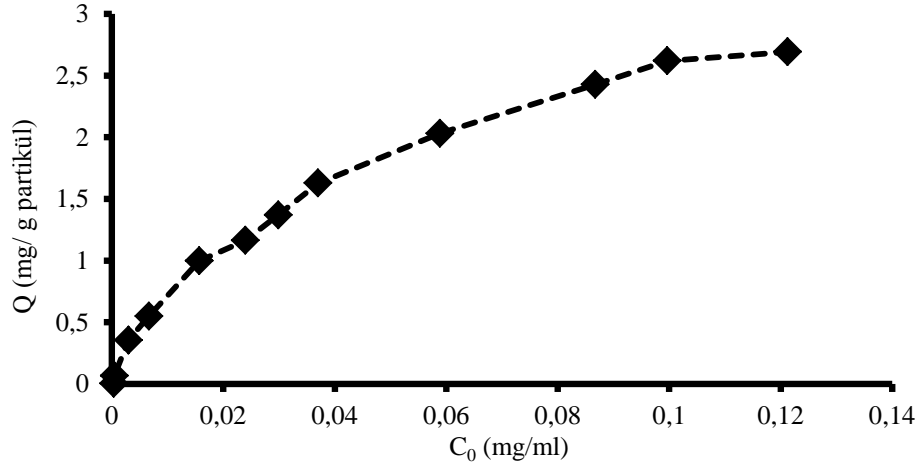


Şekil 3.3. APBA bağlı poli(CMS-ko-DVB) mikropartiküllerin kersetin adsorpsiyon kapasitesinin pH ile değişimi. Metanol/HEPES tamponu (85/25, v/v), sıcaklık 20 °C, başlangıç kersetin konsantrasyonu 0,02 mg/ml

Şekil 3.3'ten pH 9'da adsorpsiyon kapasitesinin en yüksek değere ulaştığı görülmektedir. APBA ligandının pKa değeri 8.9 olduğundan pH'ın bu değere yakın olduğu durumlarda Şekil 2.2'de verilen mekanizmaya göre bazik pH değerlerinde APBA ligandının tetragonal formu oluşmaktadır. Dolayısıyla komşu hidroksil grubuna sahip maksimum flavonoid adsorpsiyonu beklenildiği gibi bu formdaki

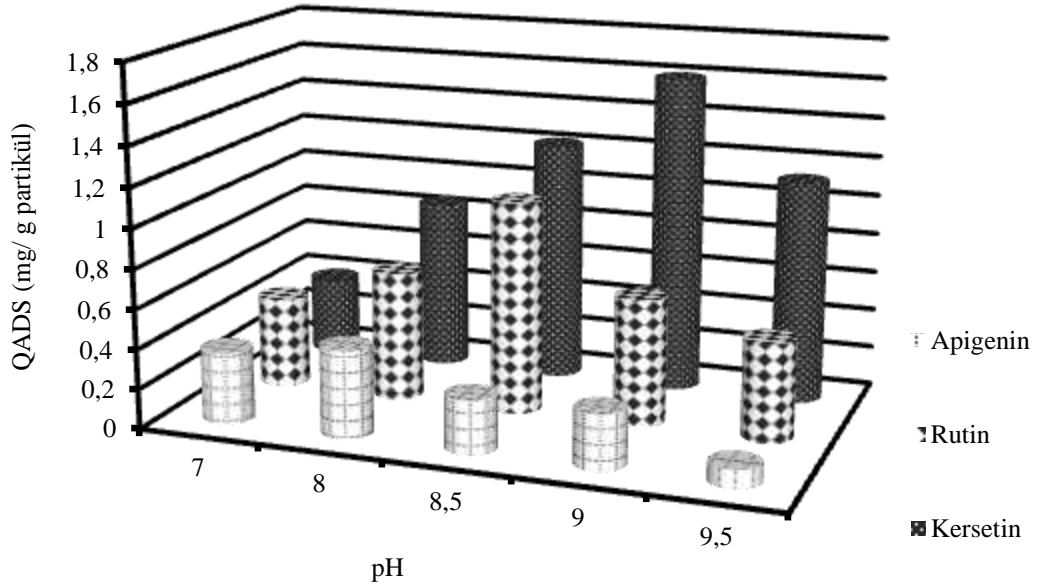
yapının en yüksek değerine ulaştığı pH 9'da gerçekleşmiştir. Maksimum adsorpsiyon pH 9'da gerçekleşmiş olsa da flavonoid tarzı moleküllerin yüksek ve düşük pH değerlerinde yapılarının bozulma riski olduğundan kersetinin adsorpsiyon izotermi pH 8,5'ta gerçekleştirilmiştir.

Kersetin'in adsorpsiyon kapasitesine kersetin başlangıç konsantrasyonunun etkisi Şekil 3.4'te verilmektedir. Buradan artan kersetin konsantrasyonu ile adsorpsiyon kapasitesinin arttığı ve yaklaşık 0.12 mg/ml kersetin başlangıç konsantrasyonundan sonra adsorpsiyon kapasitesinin değişmediği görülmektedir (Şekil 3.4). Buradan görüleceği üzere kersetin için yaklaşık maksimum adsorpsiyon kapasitesi 2,6 mg/g partikül'dür. 0.02 mg/ml başlangıç konsantrasyonunda ve pH 8.5'ta rutin'in adsorpsiyon kapasitesinin 1.6 mg/g partikül olduğu bulunmuştur. Rutin için literatürde organik yapıda ve farklı hidrofobik karakterde polimerik (ester, amino ve amido fonksiyonel gruplu) partiküllerle yapılan çalışmalarda rutin adsorpsiyon kapasitesinin hidrofobisiteye göre 1-3 mg/g partikül aralığında değiştiği ve artan hidrofobisite ile azaldığı görülmektedir. *Hypericum perforatum* bitki özütünde %3.7 oranında bulunan rutin oranı desorpsiyon sonrası %53 değerine çıkartılmıştır (Geng vd., 2009). Bu sonuç ile kıyaslandığında göre yapmış olduğumuz çalışmada üretilmiş olan adsorbanın adsorpsiyon kapasitesinin literatürle örtüştüğü görülmektedir.



**Şekil 3.4. APBA bağlı poli(CMS-ko-DVB) mikropartiküllerin kersetin adsorpsiyon kapasitesinin farklı kersetin başlangıç konsantrasyonuyla değişimi. ortam sıcaklığı: 20 °C, pH: 8,5 ve adsorpsiyon ortamı: Metanol/HEPES tamponu (85/25, v/v)**

Komşu hidroksil grubuna APBA bağlı poli(CMS-ko-DVB) mikropartiküllerin seçiciliğini göstermek için kersetin, rutin ve apigenin için elde edilen maksimum adsorpsiyon değerinin ortam pH'ı ile değişimi Şekil 3.5'te verilmektedir.

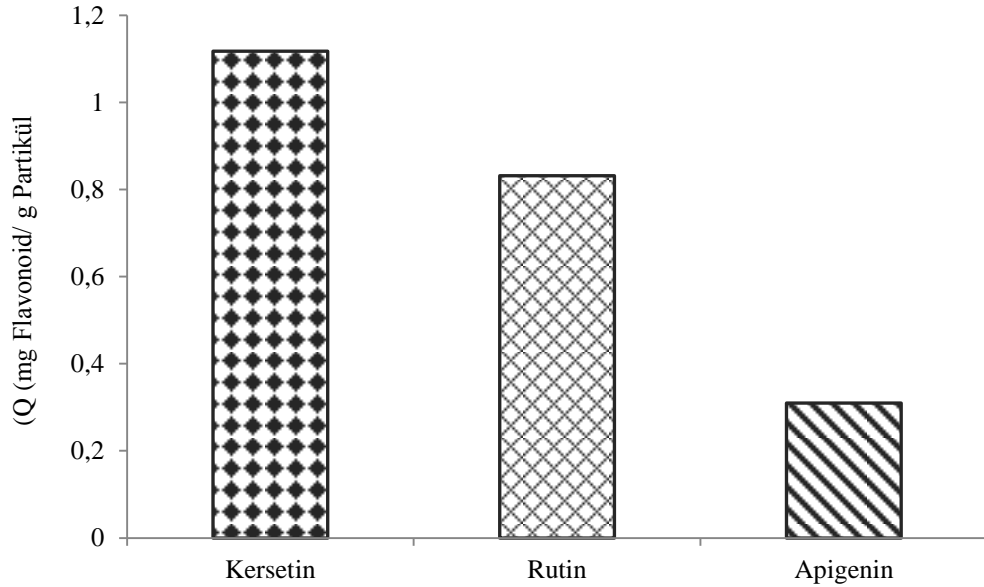


**Şekil 3.5. APBA bağlı poli(CMS-ko-DVB) mikropartiküllerle kersetin, rutin ve apigenin adsorpsiyon kapasitesinin ortam pH'ı ile değişimi. ortam sıcaklığı: 20 °C, Başlangıç Flavonoid Konsantrasyonları: 0,02 mg/ml**

Şekil 3.5'ten pH 8,5 değerinde komşu hidroksil grubu içeren rutin ve kersetinin adsorpsiyon kapasitesinin komşu hidroksil grubu içermeyen apigenine göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Rutin'in molekül ağırlığının kersetine göre yüksek olmasından doğan sterik engellemeden dolayı partikül yüzeyine yanaşması ve dolayısıyla adsorplanabilmesi ihtimali düşük olduğundan kersetinin adsorpsiyon kapasitesinin rutine göre daha yüksek olmasına neden olduğu düşünülmektedir. Apigeninin rutine ve özellikle de molekül ağırlığı kendisine çok yakın olan kersetine göre adsorpsiyon kapasitesinin düşük olması pH 8,5 civarında adsorban üzerindeki APBA gruplarının Şekil 2.2'deki mekanizmaya göre tetragonal forma ulaşması ve komşu hidroksil grubu içeren rutin ve kersetin'i daha seçici yakalayabilmesi ile açıklanabilmektedir. pH 7-8 civarında apigeninin adsorpsiyon kapasitesinin yüksek pH'lara göre daha çok olması bu pH değerinde hidrofobik karakteri artan partikül yüzeyi ile apigeninin hidrojen bağı gibi yapabileceği fiziksel etkileşimlere bağlanabilir. Bu nedenlerle APBA bağlı poli(CMS-ko-DVB) mikropartiküllerle komşu hidroksil grupları içermeyen ancak hidrojen bağı yapabilecek grupları olan apigenin, komşu hidroksil grupları içeren kersetin ve rutin'e göre daha düşük adsorpsiyon kapasitesi göstermiştir.

Yukarda yapılmış olan yorumlara göre bu üç bileşik karışımdaki oranları aynı olacak şekilde bir karışım olarak adsorbanla etkileştirildiğinde de benzer sonuçların elde edilmesi beklenmektedir. Bu nedenle her üç bileşik her birinin karışımdaki konsantrasyonları 25 µg/ml ve aynı olacak şekilde pH 8,5 metanol/HEPES (85/25, v/v) ortamında hazırlanmıştır. Karışımdan UV ölçümleri ile miktar tayini mümkün olmadığından HPLC sistemi kullanılarak adsorpsiyon süreci takip edilmiştir. Bu ortamın APBA fonksiyonlu poli(CMS-ko-DVB) partiküllerle etkileştirilmesi öncesi ve sonrası HPLC kolonu çıkışından alınan adsorbans değerleri kullanılarak her bir bileşik için adsorpsiyon kapasitesi belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar Şekil 3.6'da verilmektedir. Şekil 3.5'ten görüleceği gibi UV spektrofotometresi sonuçları kullanılarak, her bileşik için Şekil 3.5'te elde edilen sonuca benzer bir sonuç elde edilmiştir. Ancak karışımdan adsorpsiyon sonucu rutin ve kersetin için elde edilen adsorpsiyon kapasitesi değerlerinin apigenin için elde edilen değere oranının her bir bileşikle ayrı ayrı elde edilen değerlerle kıyaslandığında çok daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu nedenle geliştirilen yeni APBA bağlı adsorbanın bir karışım içerisinde komşu hidroksil grubu içeren bileşikler daha seçici adsorpladığı sonucuna varılmıştır.



**Şekil 3.6. APBA ligandı taşıyan poli(CMS-ko-DVB) mikroküreler kullanarak apigenin, kersetin ve rutinden oluşan üçlü flavonoid karışımından her bir molekülün adsorpsiyon kapasitesi. flavonoid başlangıç konsantrasyonu: 0.02 mg/ml, pH: 8,5**

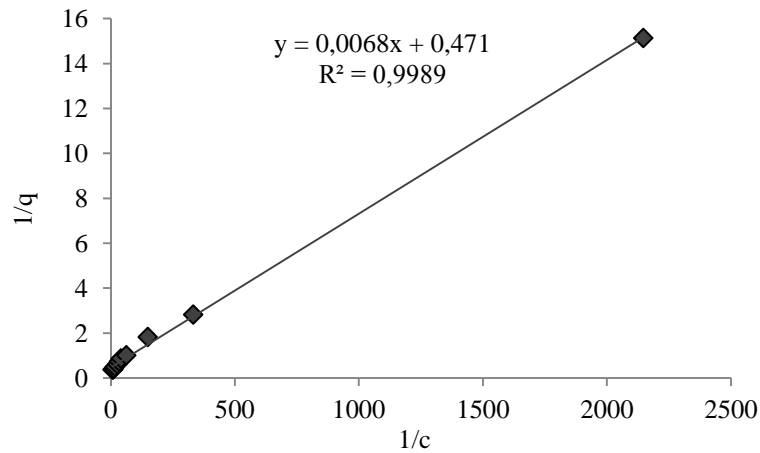
### 3.4. APBA Bağlı Poli(CMS-ko-DVB) Mikropartiküllerle Flavonoid Adsorpsiyonunun Adsorpsiyon Modelleri ile Uyumu

Kersetinin APBA fonksiyonel gruplu poli(CMS-ko-DVB) yüzeyine adsorpsiyonunu Langmuir ve Freundlich modelleri ile açıklanmaya çalışılmıştır. Birinci model tek tabakalı diğeri ise çok tabakalı adsorpsiyonu ifade etmek için geliştirilmiş adsorpsiyon modelleridir. Farklı kersetin miktarları için denge adsorpsiyon kapasitesi değerleri her iki modelin lineerleştirilmiş formlarına uygulanarak grafikler çizilmiştir. Adsorpsiyonun hangi modelle uyumlu olduğu çizilen grafiğin doğrusallığı ile ilgilidir. Kersetin için adsorpsiyon izotermi kullanılarak Langmuir parametreleri, Eşitlik 3.1'deki Langmuir eşitliği kullanılarak hesaplanmıştır.

$$q = q_0 \cdot c / (K + c) \quad (3.1)$$

Burada;  $q_0$ , kersetin'in c denge konsantrasyonunda adsorbe olmuş dengedeki kersetin miktarını (mg kersetin / g partikül) ve K değeri ise Langmuir sabitini (mg kersetin / ml tampon çözeltisi) göstermektedir.

$1/q$  değerleri  $1/c$  değerlerine karşı grafiğe çizilerek elde edilen doğrunun eğiminden ve y eksenini kestiği noktadan  $q_0$  değeri 2,12 mg/g, K değeri ise 0,026 mg/ml olarak bulunmuştur (Şekil 3.7).  $q_0$  değeri Şekil 3.4'ten elde edilen maksimum adsorpsiyon kapasitesi değeri olan 2,6 mg/g ile karşılaştırıldığında birbirine çok yakın değerler olmadığı görülmektedir. Bu sonuç adsorpsiyon tipinin tek tabakalı adsorpsiyon olamayabileceği düşüncesini uyandırmaktadır.



Şekil 3.7. Kersetin flavonoidi için Langmuir izotermi

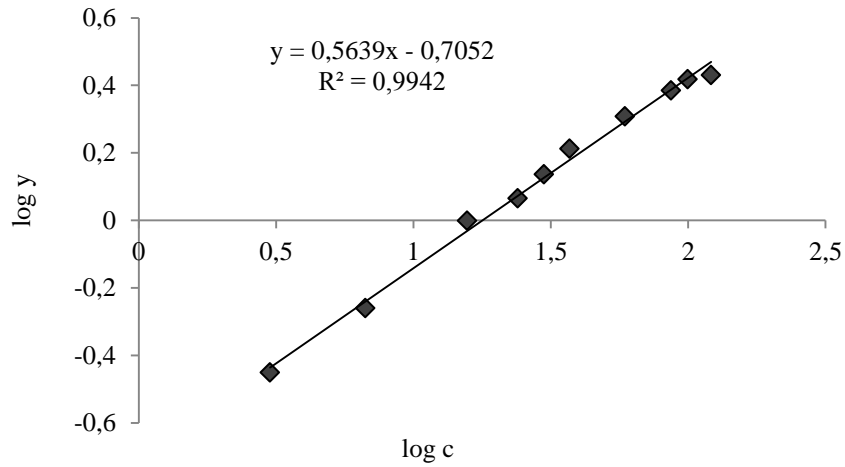
Kersetin için adsorpsiyon izotermi, Freundlich parametreleri kullanılarak aşağıdaki Freundlich eşitliği (Eşitlik 3.2) ile hesaplanmıştır.

$$y = k.C^n \quad (3.2)$$

Bu eşitlikte; y adsorbentın gramı başına adsorblanmış adsorbatın gram miktarını (mg/g); C, çözeltinin konsantrasyonunu (g/L); n, 0,1 ile 0,5 aralığında değişen bir sabiti ve k diğer bir ampirik sabiti göstermektedir. Bu ampirik sabit (k) sıcaklık ve adsorbentın yapısıyla önemli ölçüde değişmesine rağmen, iki farklı adsorbente ait k değerlerinin oranı farklı çözeltiler için sabittir. Eşitlik 3.2'nin logaritması alındığında;

$$\log y = n \log C + \log k \quad (3.3)$$

eşitliği elde edilir. Bu eşitliğe göre  $\log C$ 'ye karşı  $\log y$ 'nin grafiği bir doğrudur ve sabitler, eğim (n) ve kesim noktasından (k) elde edilir. Şekil 3.8'deki grafiğe göre n değeri 0,5639, k sabiti ise 0,2948 olarak hesaplanmıştır.



**Şekil 3.8. Kersetin flavonoidi için Freundlich izotermi**

Sonuçlar Langmuir modeli ile çizilen grafiğin (Şekil 3.7) bir doğru ile temsil edilmesi durumunda, doğrunun R<sup>2</sup> değerinin 0,9989, ancak aynı veriler Freundlich modeline göre çizildiğinde (Şekil 3.8) lineer bölgede bu değer 0,9942 olduğu görülmüştür. Bu nedenle APBA bağlı poli(CMS-ko-DVB) mikropartiküllerin kersetin ile olan adsorpsiyon davranışının her iki modele de uygun olabileceği sonucuna varılmıştır.



Yapılan tez çalışmasında yapısında komşu hidroksil grubuna sahip flavonoid bileşiklerine karşı ilgisinin olduğu gösterilen, küresel, eşboyutlu, makrogözenekli olarak üretilmiş ve APBA bağlı poli(CMS-ko-DVB) mikropartiküllerle *Hypericum perforatum* toprak üstü kısımlarının etanol ve etil asetat özütünden flavonoid adsorpsiyon çalışmaları yapılarak antioksidan aktivitesi daha yüksek bir karışım oluşturulması amaçlanmıştır.

Kuru haldeki *Hypericum perforatum* bitkisinin etanol özütünün pH'ı 8,5-9 arasında tutulan metanol-su (85/25, v/v) ortamındaki çözeltisi APBA bağlı partiküllerle etkileştirilmiştir. Etkileşim sonrası partiküller etanol-su (70/30, v/v) ortamında desorbe edilmiştir. *H. perforatum* bitkisinin etanol özütünün pH:8,5 metanol-su ortamında derişimi 0,2 mg/ml olacak şekilde hazırlanan çözelti ile yapılan adsorpsiyon çalışmaları sonunda adsorpsiyon sonrası çözeltide kalan katı miktarı, adsorpsiyon sonrası desorbe edilmiş toplam katı miktarı ve etanol özütü stok çözeltisinin adsorpsiyon öncesi içerdiği toplam katı miktarı sırasıyla 135,5 mg, 60,3 mg, ve 200 mg olarak hesaplanmıştır. Bu değerler Eşitlik 2.10'da yerine konulduğunda desorpsiyon yüzdesi %93 olarak bulunmuştur.

Etanol ekstraktı, adsorpsiyon sonrası geride kalan adsorpsiyon ortamı ve desorpsiyon ortamının taşıyıcı faz olarak %1 asetik asit içeren metanol-asetonitril-su (40:15:45, v/v/v) ortamı kullanılarak alınmış HPLC kromatogramları sırasıyla Ek U, Ek Ü ve Ek V'de gösterilmektedir. Buradan görüleceği üzere desorpsiyon ortamının pikleri diğer ortamlara göre sayıca azalmış ve daha belirgindir. Bu sonuç desorpsiyon ortamında daha az sayıda ve benzer moleküler yapıya sahip maddelerin bulunduğu şeklinde yorumlanabilir. Bu bileşiklerin aşağıdaki yorumlarla birleştirildiğinde kersetin tarzında yapılar olduğu tahmin edilmektedir.

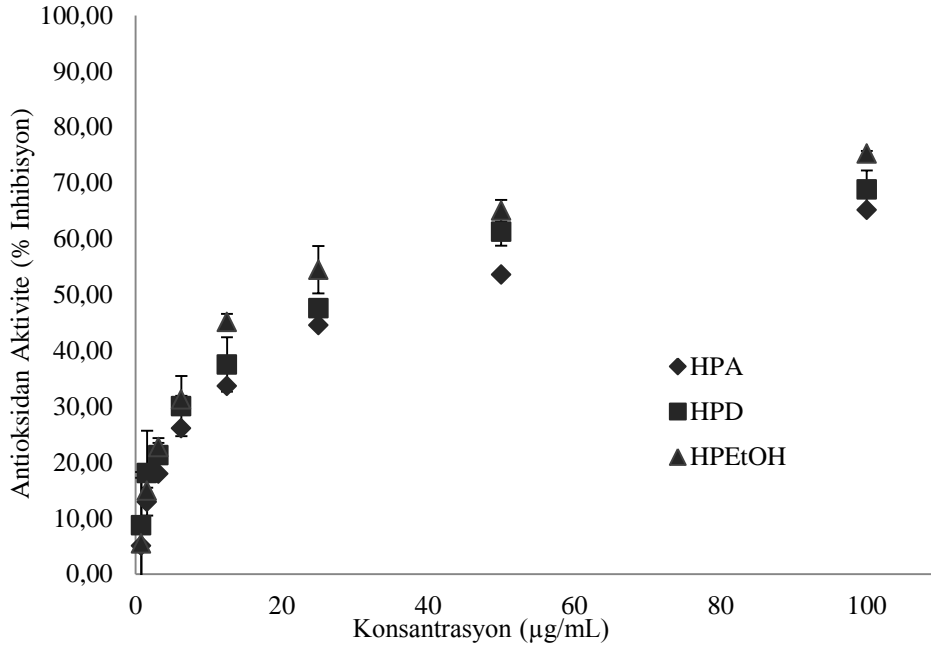
*H. perforatum* etanol özütü (HPEtOH) poli(CMS-ko-DVB) adsorbanına tutunmadan kalan özütteki bileşenler (HPA) ve poli(CMS-ko-DVB) adsorbanına tutunan bileşenler (HPD) olmak üzere üç ayrı fraksiyonun antioksidan aktivitesi ile toplam flavonoid miktarları karşılaştırıldı. Bu çalışmada üretilen boronik asit fonksiyonlu poli(CMS-ko-DVB) mikropartikülün antioksidan olarak davranan bileşenleri adsorpsiyonunu ortaya koymak amacıyla bu aktivite çalışmaları yapıldı.

Çizelge 3.2 ve Şekil 3.9'da görüldüğü üzere  $\beta$ -Karoten-Linoleik asit sistemleriyle hesaplanan toplam antioksidan aktiviteye göre üç fraksiyon aynı konsantrasyonda

karşılaştırıldığında antioksidan aktivitenin; HPEtOH> HPD> HPA şeklinde olduğu görülmektedir. Yapılan adsorpsiyon desorpsiyon çalışmaları sonrası poli(CMS-ko-DVB) mikropartiküllerinin adsorbe ettiği bileşenlerin antioksidan aktivitesinin adsorbe edemediklerine göre daha yüksek olduğu söylenebilir. *H. perforatum* bitkisinin flavonoid bileşenleri bakımından oldukça zengin olduğu hatta biflavonoid yapılı bileşikler taşıdığı daha önceleri rapor edilmiştir (Bronz vd., 1983; Sakar ve Tamer, 1990; Butterweck vd., 1997; Butterweck vd., 2000; Barnes vd., 2001; Kitanov, 2001; Flausino vd., 2002). Yapılan bu bilimsel araştırma sonuçlarına bakıldığında test edilen her üç fraksiyonunda oldukça yüksek oranda antioksidan

**Çizelge 3.2. *H. perforatum* bitkisinin etanol özütünün antioksidan aktivitesinin adsorpsiyon öncesi (HPEtOH) ve sonrası (HPA ve HPD) karşılaştırılmalı değerleri**

Konsantrasyon (ppm)	Antioksidan Aktivitesi (%inhibisyon)		
	HPA	HPD	HPEtOH
0.78	5.09 ±11.18	8.75±9.56	5.50±11.73
1.56	12.90±14.88	18.09±7.58	14.93±0.54
3.12	17.94±10.56	21.29±3.08	22.70±0.8
6.25	26.10±9.44	30.08±5.37	31.27±0.67
12.5	33.64±8.45	37.53±4.89	45.13±1.47
25	44.52±8.41	47.57±1.12	54.48±4.24
50	53.63±4.85	61.28±2.49	65.06±1.95
100	65.15±11.17	68.84±3.38	75.28±0.44
500	93.34±2.36	82.43±2.78	93.94±0.26
1000	97.37±4.44	93.99±13.24	97.26±0.35
2000	117.86±5.16	105.43±17.33	98.54±0.04



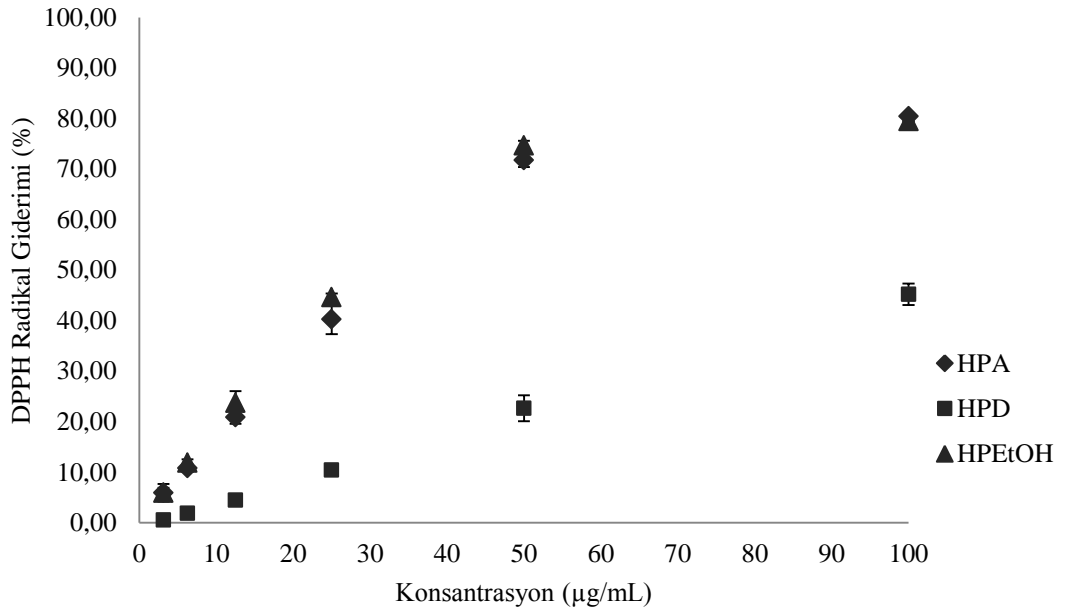
**Şekil 3.9. H. perforatum bitkisinin etanol özütünün antioksidan aktivitesinin adsorpsiyon öncesi (HPEtOH) ve sonrası (HPA ve HPD) karşılaştırılması olarak gösterimi**

aktivite göstermesi şaşırtıcı değildir. Her bir fraksiyon için yapılan testlerde sekiz farklı konsantrasyon kullanıldı ve artan konsantrasyonda aktivitenin de arttığı ortaya konuldu.

Aynı fraksiyonların DPPH radikal giderim aktiviteleri de test edilmiştir. Çizelge 3.3 ve Şekil 3.10'da görülen sonuçlara göre artan konsantrasyonla radikal giderme aktivitelerinin de her üç ortam için de arttığı görülmektedir. Radikal giderim aktivitesinin karşılaştırılmasında kullanılan  $EC_{50}$  (Etkili konsantrasyon, µg dwb/ml) değerleri HPEtOH, HPA ve HPD için sırasıyla 28, 30, ve 110 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre boronik asit fonksiyonlu poli(CMS-ko-DVB) mikropartikül adsorbanına tutulan bileşenler tutunmayanlara oranla daha az oranda radikal giderim kapasitesine sahiptir. HPD ortamının diğer ortamlara göre  $EC_{50}$  değerinin daha yüksek olması (radikal giderim yeteneğinin daha düşük olması) ve toplam flavonoid miktarının HPA ortamı ile aynı olması bu ortamdaki bileşiklerin diğer ortamlardan farklı olduğunu ortaya koymaktadır.

**Çizelge 3.3. H. perforatum bitkisinin etanol özütünün DPPH radikal giderim aktivitesinin adsorpsiyon öncesi (HPeEtOH) ve sonrası (HPA ve HPD) karşılaştırılmalı değerleri**

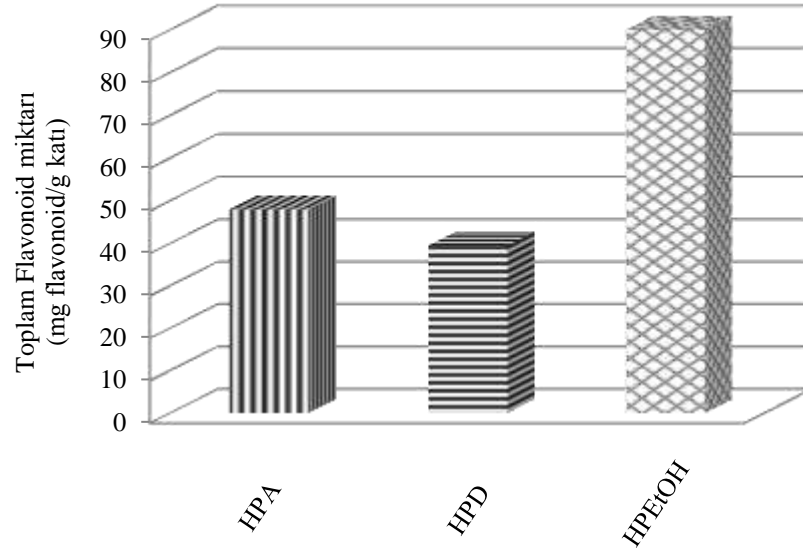
Konsantrasyon (ppm)	DPPH Radikal Giderim Aktivitesi (%inhibisyon)		
	HPA	HPD	HPeEtOH
3.125	5.91±1.74	0.52±0.54	5.89±1.02
6.25	10.77±0.68	1.86±0.98	11.89±0.65
12.5	20.85±1.28	4.44±0.95	23.70±2.31
25	40.26±2.94	10.42±1.04	44.61±0.75
50	71.71±1.32	22.63±2.58	74.66±0.92
100	80.42±0.45	45.22±2.13	79.46±0.15



**Şekil 3.10. H. perforatum bitkisinin etanol özütünün DPPH radikal giderim aktivitesinin adsorpsiyon öncesi (HPeEtOH) ve sonrası (HPA ve HPD) karşılaştırılmalı olarak gösterimi**

Üzerine çalıştığımız üç ayrı fraksiyonun taşıdığı toplam flavonoid miktarları Şekil 3.11’de karşılaştırılmalı olarak verilmektedir. HPeEtOH’nın 1 gramlık özütünde 90 mg flavonoid yapılı bileşik varken poli(CMS-ko-DVB) partiküllerine tutulan kısımda ise 39,5 mg flavonoid bulunmaktadır. Bu durum poli(CMS-ko-DVB) adsorbanının flavonoid yapılı bileşikleri adsorpsiyon yeteneğinin olduğunu göstermektedir. Ancak

Şekil 3.11’den görüldüğü üzere en düşük flavonoid miktarına sahip fraksiyon olan desorpsiyon sonrası oluşan ortamın (HPD) Şekil 3.9’daki antioksidan aktivitesinin adsorpsiyon sonrası geriye kalan ortamın (HPA) antioksidan aktivite değerlerinden, daha yüksek antioksidan aktivite gösteren flavonoid yapıları bileşiklerin geliştirilmiş olan adsorbanla izole edilebilmesi ile açıklanabilir (Aehle vd., 2004; Yang vd., 2009).



**Şekil 3.11. *H. perforatum* bitkisinin etanol özütünün ve bu özüt kullanılarak yapılan adsorpsiyon ve desorpsiyon çalışmaları sonrası oluşan ortamlarının toplam flavonoid miktarlarının karşılaştırılması**

Şekil 3.9 ve Şekil 3.10’a göre adsorban ile ortamdan ayrılıp desorbe edilmiş özütün (HPD) ayırma öncesi özütün (HPEtOH) aktivitesine göre DPPH radikal giderim aktivitesinin düşük,  $\beta$ -Karoten antioksidan aktivitenin ise hemen hemen aynı olduğu görülmektedir. Desorpsiyon sonrası geride kalan ortamın (HPA) DPPH radikal giderim aktivitesi HPEtOH ile çok yakınken antioksidan aktivitesi HPD’den düşüktür. Bu sonuçları açıklayabilmek için başka bir grup tarafından *H. perforatum* bitkisi ile yapılmış çalışma incelenmiştir (Silva vd., 2008).

*H. perforatum* bitkisinin etanol özütünün içerdiği bileşenlerin DPPH ve AAPH (2,2'-Azobis(2-metilpropionamidin) dihidroklorid) giderimi için aktivite değerlerinin bileşenlere göre artan sırada kampferol < klorojenik asit < luteolin < kersitrin < izokersitrin < rutin < kersetin < hiperozit ve rutin < kersetin < klorojenik asit < hiperozit olduğu ifade edilmiştir. Aynı özütün lipid peroksidasyon inhibisyon

değerleri bileşenler bazında küçükten büyüğe klorojenik asit< hiperesin< rutin< kersitrin< izokersitrin< hiperozit< apigenin< biapigenin< luteolin< kamferol< kersetin şeklinde sıralanabilir. Bir başka çalışmada Türkiye'deki *H. perforatum* bitkisinin ana bileşenlerinin içeriği kuru ağırlık başına; klorojenik asit (0.03–1.86), rutin (0–8.77), hiperozit (5.41–22.28), apigenin-7-O-glikozit (0.1–0.33), kersitrin (1.22–3.98), kersetin (1.07–1.76), and hiperisin (0.44–4.06) olarak verilmektedir (Hosni vd., 2010; Çırak vd., 2007). Bu değerlere göre bitkideki miktarı en yüksek bileşenler için bitki içerisindeki bileşenlerin konsantrasyonunu hiperozit> rutin> hiperesin> kersitrin> kersetin şeklinde sıralanabilir. Bu yapılar dikkate alındığında hiperesinin moleküler yapısından dolayı çalışılan adsorpsiyon ortamı olan metanol-su ortamında çözünürlüğü çok düşük olduğundan adsorplanabilmesi beklenmemektedir. Bu durumda geride kalan rutin, hiperozit, kersitrin, ve kersetinin adsorplanması olasılığı daha yüksektir. Bu bileşiklerin radikal giderimi sıralamasının hiperozit> rutin> kersitrin> kersetin şeklinde olduğu, oksidasyon giderim sıralamasının ise kersetin> hiperozit> kersitrin> rutin yüksek seviyelerde aktivite gösteren bileşikler olduğu görülmektedir. Bu bileşiklerden hiperozit, kersetin ve rutinin ortak yönü komşu hidroksil grubu içermeleridir. Dört bileşiğin de yapılarının desorpsiyon ortamında bulunma olasılığı bulunmaktadır. Ancak kersetin hariç diğer bileşikler glikozit yapılı ve kersetine göre büyük moleküllerdir. Bu nedenle kersetinin diğer üç bileşiğe göre adsorplanma ve desorpsiyon ortamında bulunma ihtimali daha yüksektir. Bu ihtimalin söz konusu olması durumunda desorpsiyon ortamının antioksidan aktivitesinin artış nedeni kersetinin diğer bileşiklere göre en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olmasıyla açıklanabilir.

*H. perforatum* ile yapılan başka bir çalışmada *H. perforatum* etanol özütü kullanılarak hekzan, bütanol ve etil asetat fraksiyonları oluşturulmuştur (Silva vd., 2005). Etil asetat kısmı bir kolon vasıtasıyla farklı fraksiyonlara ayrılmıştır. Fraksiyonlardan biri içerisinde yüksek oranda kersetin ve eser miktarda kamferol ve biapigenin moleküllerini içermektedir. Bir diğer fraksiyonda ise kersetinin glikozitleri olan rutin, hiperozit, izokersitrin, hiperozit-asetil, kersetin-3-ramnozid molekülleri bulunmaktadır. Çalışma sonuçları içerisinde kersetin bulunan ortamın diğer tüm fraksiyonlara göre daha yüksek antioksidan aktivite ve glikozitlerin olduğu ortamların ise daha yüksek antiradikal giderime sahip oldukları açıkça ortaya konulmuştur. Elde edilen sonuç kersetin gibi glikozit içermeyen flavonoidlerin

polaritesinin rutin gibi glikozit içeren türevlerine göre daha düşük olması ile açıklanmıştır. Bu sonuçlar şu ana kadar elde edilen sonuçlarla birlikte değerlendirildiğinde desorpsiyon ortamının antioksidan etkisinin daha yüksek olması yine yüksek olasılıkla glikozit içermeyen komşu hidroksil grubuna sahip kersetinin yüksek oranda seçici olarak adsorplanmış olabileceği ile açıklanabilir.

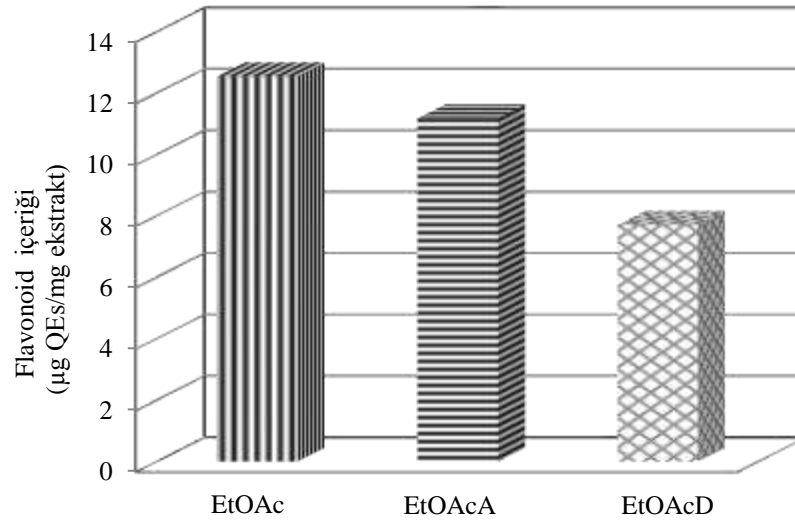
*H. perforatum* bitkisinin etanol özütünün antioksidan ve antiradikal gideriminin çok yüksek olması nedeniyle bu ortamda adsorpsiyon ile yapılabilecek fraksiyonlar sonucu adsorbanın seçiciliğininin açıkça ortaya konulamadığı düşünülmektedir. Bu nedenle ayırımın daha etkili olabileceği antioksidan ve antiradikal aktivite gösteren bileşiklerin daha yüksek oranda olabileceği *H. perforatum* etanol özütünün etil asetat fraksiyonundan, geliştirmiş olduğumuz poli(CMS-ko-DVB) mikropartiküllerle adsorpsiyon/desorpsiyon çalışmaları yapılmıştır.

Kuru haldeki *Hypericum perforatum* bitkisinin etanol özütü etil asetat ile ekstrakte edilmiştir. Etil asetat ekstraktının pH'ı 8,5-9 arasında tutulan metanol-su (85/25, v/v) ortamındaki çözeltisi APBA bağlı partiküllerle etkileştirilmiştir. Etkileşim sonrası partiküller etanol-su (70/30, v/v) ortamında desorbe edilmiştir. *H. perforatum* bitkisinin etil asetat özütünün pH:8,5 metanol-su ortamında derişimi 0,2 mg/ml olacak şekilde hazırlanan çözelti ile yapılan adsorpsiyon çalışmaları sonunda adsorpsiyon sonrası çözeltilde kalan katı miktarı, adsorpsiyon sonrası desorbe edilmiş toplam katı miktarı ve etil asetat özütü stok çözeltisinin adsorpsiyon öncesi içerdiği toplam katı miktarı sırasıyla 36 mg, 55 mg, ve 100 mg olarak hesaplanmıştır. Bu değerler Eşitlik 2.10'da yerine konulduğunda desorpsiyon yüzdesi %84 olarak bulunmuştur.

Etil asetat fraksiyonu (EtOAc) adsorpsiyon ortamı (EtOAcA) ve desorpsiyon ortamı (EtOAcD) için toplam flavonoid miktarı,  $\beta$ -Karoten antioksidan aktivitesi ve DPPH radikal giderim aktivitesi ölçümleri yapılmış, sonuçlar sırasıyla Şekil 3.12, Şekil 3.13 ve Şekil 3.14'te verilmiştir.

Şekil 3.12'den görüleceği üzere desorpsiyon ortamı toplam flavonoid içeriği (yaklaşık 8 mg/g kuru ekstrakt) diğer ortamlara göre daha düşüktür. Buna rağmen EtOAcD antioksidan aktivitesi EtOAc ve EtOAcA göre daha yüksektir (Şekil 3.13). Bu farklılık Şekil 3.9'daki farka göre daha belirgindir. Hem etanol ekstresinde hem de etil asetat fraksiyonunda adsorpsiyon ile ayrılmış bileşenler yüksek antioksidan

aktiviteye neden olmuşlardır. DPPH radikal giderim aktivitelerinin incelendiği durumda Şekil 3.14'te desorpsiyon ortamının en düşük aktiviteyi gösterdiği, adsorpsiyon sonrası geriye kalan ortamının ise çok net olarak hatta etil asetat ekstraktına göre daha yüksek aktivite gösterdiği görülmektedir. Tüm bu sonuçlar ancak desorpsiyon ortamında yüksek antioksidan özellikli bileşiklerin adsorpsiyon sonrası geriye kalan ortamda ise yüksek radikal giderimine sahip bileşiklerin olmasıyla açıklanabilir (Silva vd., 2005).

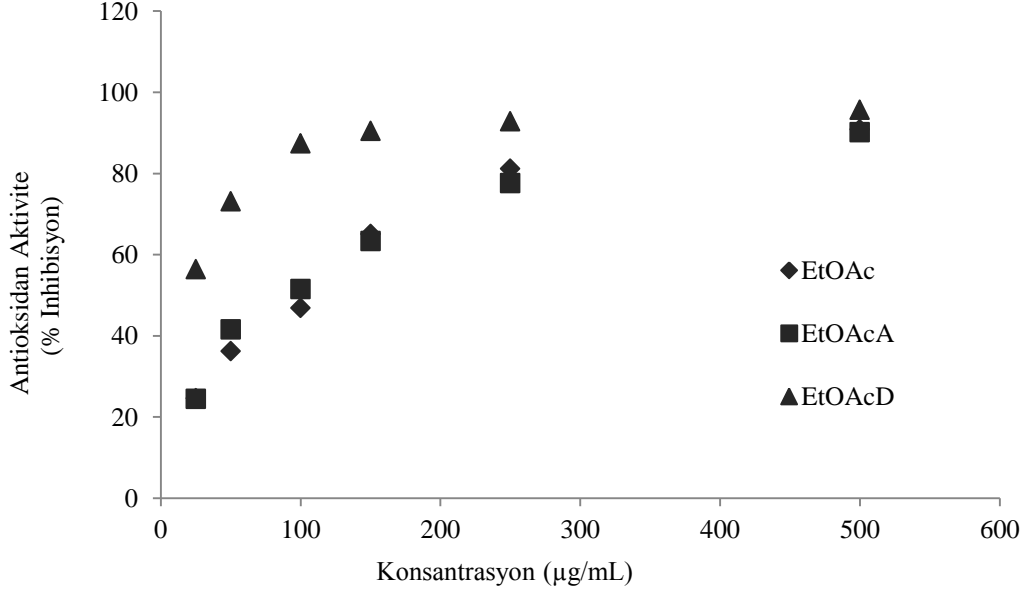


**Şekil 3.12. *H. perforatum* bitkisinin etilasetat ekstraktı ve bu ekstrakt kullanılarak yapılan adsorpsiyon ve desorpsiyon çalışmaları sonrası oluşan ortamların toplam flavonoid miktarlarının karşılaştırılması**

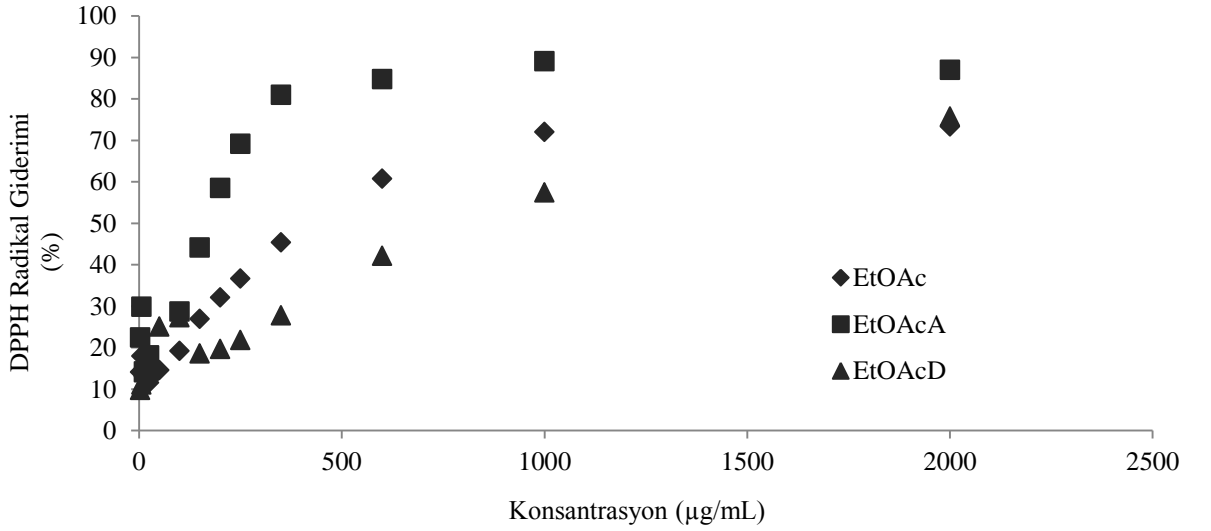
Etanol ekstraktının sonuçları değerlendirilirken yapılan yorumlar burada da geçerlidir. Polaritesi daha düşük olan komşu hidroksil grubu içeren kersetin gibi moleküller daha yüksek antioksidan aktivite göstermekte bu moleküllerin glikozitleri olan rutin, hiperozit ve izokersitrin daha polar olmaları nedeniyle antioksidan aktiviteden ziyade yüksek radikal giderim aktivitesi göstermektedir. Bu moleküller de komşu hidroksil grubu içermekte ve glikozit grubu içermeyen moleküllere göre yapıları daha büyüktür. Adsorpsiyon durumunda sterik engellemeden dolayı büyük moleküllerin kersetine kıyasla partikül yüzeyine daha az tutunması beklenmektedir (Şekil 3.5). Kısaca *Hypericum perforatum* etil asetat ekstraktında yüksek oranda bulunan kersetinin komşu hidroksil gruplarından yakalanarak adsorplandığı ve bu



moleküllerin desorpsiyonu sonucu yapılan antioksidan aktivite çalışmalarında belirgin olarak yüksek aktiviteye neden olduğu düşünülmektedir.



Şekil 3.13. *H. perforatum* bitkisinin etil asetat özütünün antioksidan aktivitesinin karşılaştırılmalı olarak gösterimi



Şekil 3.14. *H. perforatum* bitkisinin etil asetat özütünün DPPH radikal giderim aktivitesinin karşılaştırılmalı olarak gösterimi

Adsorpsiyon sonrası geride kalan adsorpsiyon ortamının etil asetat ekstraktına göre yüksek DPPH radikal giderim değeri göstermesi gibi bir davranışa (Şekil 3.14) literatürde rastlanmamıştır. Genellikle adsorban kullanılarak ayrılan bileşiklerin (geride kalan değil) DPPH gideriminin ham ekstrakta göre daha çok artması yönünde sonuçlar bulunmuştur (Aehle vd., 2004; Geng vd., 2009). Buradaki sonuç, EtOAc ortamının bileşiminin adsorpsiyon sonrası (geride kalan) farklılaşması ile açıklanabilir. Kullanmış olduğumuz APBA bağlı poli(CMS-ko-DVB) partiküllerin yüzeyleri, takılan ligand dışında aşırı apolar karakterdedir. Dolayısıyla adsorbanın glikozit türevli benzeri yapılara göre daha apolar yapıda olan kersetini daha çok yakalama olasılığı bulunmaktadır. Bunun yanısıra apolar karakterdeki fenolik yapılar haricindeki diğer moleküllerinde EtOH ortamından adsorplanmış olma ihtimali yüksektir. Adsorpsiyon öncesi apolar karakterdeki fenolik olmayan diğer yapıların fenolik yapıların etkinliğine fiziksel etkileşimler nedeniyle yapmış olduğu engelleme bu bileşiklerin adsorban fazı ile uzaklaştırılması ile azaltılmış olabilir. Bu durumda geride kalan EtOAc ortamındaki rutin, hiperozit, izokersitin ve kampferol tarzı moleküllerin DPPH antiradikal aktivite giderim etkinliğinin artmış olması muhtemeldir.

Şekil 3.14'te radikal giderim aktivitesinin karşılaştırılmasında kullanılan IC<sub>50</sub> (µg dwb/ml) değerleri EtOAc, EtOAcA ve EtOAcD için sırasıyla 360, 170 ve 800 olarak bulunmuştur. Bu değerler etanol ekstraktı değerleri ile kıyaslandığında oldukça artmıştır ve daha düşük radikal giderim anlamına gelmektedir. Bunun anlamı etanol ekstraktının antiradikal bileşikler açısından daha zengin bileşime sahip olması ile açıklanabilir. Etil asetat ekstraktında bulunmayan fakat *Hypericum perforatum* etanol ekstraktında oldukça yüksek miktarda bulunan fenolik asitlerin (klorojenik asit, neoklorojenik asit vb) eksikliği bu düşüşe neden olmuş olabilir (Silva vd., 2005).

#### 4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Geliştirilmiş olan adsorbanın benzer amaçlarla kullanılan diğer adsorbanlara göre en önemli farkı komşu hidroksil gruplarına olan seçiciliğidir. Literatürdeki adsorbanlar iyonik olmayan yapıda olup fiziksel etkileşimlerle (özellikle hidrojen bağı ile) hem radikal giderici hem de antioksidan özellikli bileşikleri belli oranlarda ayırabilmekte ve sonuçta her iki özelliği gösteren orta derecede aktif karışımlar elde edilmektedir. Çalışılan *Hypericum perforatum* bitkisi içerisinde komşu hidroksil grubu içeren moleküllerin DPPH gideriminin orta ve alt seviyelerde, antioksidan aktivitesinin ise daha iyi olması geliştirilmiş olduğumuz adsorbanın ayırdığı özütün antioksidan özelliklerini ön plana çıkarmıştır. Antioksidan aktivitenin özellikle klorojenik asit oranı yüksek olan bitki özütlerinde daha yüksek olması beklenmektedir.

Çay çiçekleri kullanılarak yapılan bir çalışmada radikal giderim aktivite değerinin yüksek oranda komşu hidroksil grupları içeren epi-kateşin-3-gallat ve epi-gallokateşin-3-gallat'a bağlı olduğu gösterilmiştir (Yang vd., 2009). Bu flavonoid yapılı bileşiklerin yapısındaki komşu hidroksil grupları bulunduğundan dolayı geliştirilen adsorbanın çay çiçekleri ile yapılacak izolasyon çalışmaları sonucu hem radikal giderici hem de antioksidan özellikli karışımları oluşturabileceği öngörülmektedir.

Tezde üretilmiş adsorban partiküllerin eş boyutlu olması daha sonra HPLC uygulamaları ile flavonoid tarzı moleküllerin hassas analizinde kolon dolgu maddesi olarak kullanımını da mümkündür. Ayrıca bu adsorban yapıların oligonükleotid ve glikozid tarzı komşu hidroksil yapılarını içeren bileşiklerin izolasyonunda denenme ve başarılı olma potansiyeli yüksektir.

## KAYNAKLAR

- Aehle E, Le-Grandic, S. R., Ralainirina, R, Baltora-Rosset, S., Mesnard, F, Prouillet, C, Maziere, J.C. ve Fliniaux, M. A. (2004) Development and Evaluation of an Enriched Natural Antioxidant Preparation Obtained from Aqueous Spinach (*Spinacia Oleracea*) Extracts by an Adsorption Procedure. *Food Chem* 86: 579–585.
- Barnes, J., Anderson, L.A. ve Phillipson, J.D. (2001) St. John Wort (*Hypericum Perforatum* L.): a Review of its Chemistry Pharmacology and Clinical Properties. *J Pharm Pharmacol* 53: 583–600.
- Brondz, I., Greibrokk, J. ve Aasen, A. J. (1983) n-Alkanes of *Hypericum Perforatum*: a Revision. *Phytochemistry* 2: 295–296.
- Butterweck, V., Wall, A., Lieflander-Wulf, U., Winterhoff, H. ve Nahrsted, A. (1997) Effects of the Total Extract and Fractions of *Hypericum Perforatum* in Animal Assays for Antidepressant Activity. *Pharmacopsychiatry* 30: 117–124.
- Butterweck, V., Jurgenliemk, G., Nahrstedt, A. ve Winterhoff, H. (2000) Flavonoids from *Hypericum Perforatum* Show Antidepressant Activity in the Forced Swimming Test. *Planta Med* 66: 3–6.
- Butterweck, V., Bockers, T., Korte, B., Wittkowski, W. ve Winterhoff, H. (2002) Long-term Effects of St. John's Wort and Hypericin on Monoamine Levels in Rat Hypothalamus and Hippocampus. *Brain Res* 930: 21–29.
- Cakir, A., Duru, M. E., Harmandar, M., Ciriminna, R., Passannanti, S. ve Piozzi, F. (1997) Comparison of the Volatile Oils of *Hypericum Scabrum* L. and *Hypericum Perforatum* L. from Turkey. *Flavour and Fragrance Journal* 12: 285–287.
- Cakir, A., Mavi, A., Yildirim, A., Duru, M. E., Harmandar, M. ve Kazaz, C. (2003) Isolation and Characterization of Antioxidant Phenolic Compounds From the Aerial Parts of *Hypericum hyssopifolium* L. by Activity-Guided Fractionation. *J Ethnopharmacol* 87: 73–83.
- Cheng, C. M., Micale, F. J., Vanderhoff, J. W. ve El-Aasser, M. S. (1992) Synthesis and Characterization of Monodisperse Porous Polymer Particles. *J Polym Sci Part A, Polym Chem* 30 (2): 235–244.
- Chung, M. I., Lai, M. H., Yen, M. H., Wu, R. R. ve Lin, C. N. (1997) Phenolics from *Hypericum Geminiflorum*. *Phytochemistry* 44: 943–947.
- Cicek, H. (2005) Nucleotide Isolation By Boronic Acid Functionalized Hydrogel Beads. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 20 (3): 245–257.
- Crittenden, J. C., Sanongraj, S., Bulloch, J. L., Hand, D. W., Rogers, T. N., Speth, T. F. ve Ulmer, M. (1999) Correlation of Aqueous-Phase Adsorption Isotherms. *Environ Sci Technol* 33 (17): 2926–2933.

- Çirak, C., Radusien, J., Karabük, B. S. ve Janulis, V. (2007) Variation of Bioactive Substances and Morphological Traits in *Hypericum Perforatum* Populations from Northern Turkey. *Biochem Syst Ecol* 35: 403–409.
- Decosterd, L. A., Stoeckli-Evans, H., Chapuis, J. C., Msonthi, J. D., Sordat, B. ve Hostettmann, K. (1989) New Hyperforin Derivatives from *Hypericum Revolutum* Vahl with Growth-inhibitory Activity Against a Human Colon Carcinoma Cell Line. *Helv Chim Acta* 72: 464–471.
- Decosterd, L. A., Hoffmann, E., Kyburz, R., Bray D. ve Hostettmann, K. (1991) A New Phloroglucinol Derivative from *Hypericum Calycinum* with Antifungal and in vitro Antimalarial Activity. *Planta Med* 57: 548–551.
- Dias, A. C. P., Tomas-Barberan, F. A., Fernandes-Ferreira, M. ve Ferreres, F. (1998) Unusual Flavonoids Produced by Callus of *Hypericum Perforatum*. *Phytochemistry*, 48: 1165–1168
- Flausino, O. A., Zangrossi, H., Salgado, J. V. ve Viana, M. B. (2002) Effects of Acute and Chronic Treatment with *Hypericum Perforatum* L. (LI 160) on Different Anxiety-Related Responses in Rats. *Pharmacol Biochem Behav* 71: 251–257.
- Forkmann, G. ve Martens, S. (2001) Metabolic Engineering and Applications of Flavonoids. *Curr. Opin. Biotechnol* 12: 155–160.
- Fu, B. Q., Liu, J., Li, H., Li, L., Lee, F. S. C. ve Wang, X.R. (2005) The Application of Macroporous Resins in the Separation of Licorice Flavonoids and Glycyrrhizic Acid. *J Chromatogr A* 1089: 18–24.
- Geng, X. , Ren, P., Pi, G., Shi, R., Yuan, Z. ve Wang, C. (2009) High Selective Purification of Flavonoids from Natural Plants Based on Polymeric Adsorbent with Hydrogen-Bonding Interaction. *J Chromatogr A* 1216: 8331–8338.
- Gunatilaka, A. A. L., Balasubramaniam, S. ve Kumar, V. (1979) 2,3-Dimethoxyxanthone from *Hypericum Mysorensis*. *Phytochemistry* 18: 182–183.
- Havsteen, B. H. (2002) The Biochemistry and Medical Significance of the Flavonoids. *Pharmacol Ther* 96: 67–202.
- He, D. H., Otsuka, H., Hirata, E., Shinzato T., Bando, M. ve Takeda, Y. (2002) Tricalysiosides A–G: Rearranged Ent-Kauranoid Glycosides from the Leaves of *Tricalysia Dubia*. *J Nat Prod* 65: 685–688.
- Hubner, W. D. ve Kirste, T. (2001) Experience with St. John's Wort (*Hypericum Perforatum*) in Children Under 12 Years with Symptoms of Depression and Psychovegetative Disturbances. *Phytotherapy Research* 15: 367–370.
- Hosni, K. , Msaada, K., Taarit, M. B., Hammami, M. ve Marzouka, B. (2010) Bioactive Components of Three *Hypericum* Species from Tunisia: A comparative study. *Industrial Crops and Products* 31: 158–163.
- Ishiguro, K., Yamaki, M., Kashihara, M., Takagi, S. ve Isoi, K. (1990) A Chromene from *Hypericum Japonicum*. *Phytochemistry* 29: 1010–1011.

- Ishiguro, K., Nagata, S., Fukumoto, H., Yamaki, M., Takagi, S. ve Isoi, K. (1991) A Flavanonol Rhamnoside from *Hypericum Japonicum*. *Phytochemistry* 30: 3152–3153.
- Ishiguro, K., Nagata, S., Fukumoto, H., Yamaki, M., Isoi, K. ve Oyama, Y. (1993) An isopentenylated flavonol from *Hypericum japonicum*. *Phytochemistry* 32: 1583–1585.
- Ishiguro, K., Nagata, S., Fukumoto, H., Yamaki, M. ve Isoi, K. (1994) Phloroglucinol derivatives from *Hypericum japonicum*. *Phytochemistry* 35: 469–471.
- Ishiguro, K., Nagareya, N. ve Fukumoto, H. (1998) A Phloroglucinol Derivative from Cell Suspension Cultures of *Hypericum Patulum*. *Phytochemistry* 47: 1041–1043.
- Kitanov, G. M. (2001) Hypericin and Pseudohypericine in Some *Hypericum* Species. *Biochem Syst Ecol* 29: 171–178.
- Maisenbacher, P. ve Kovar, A. (1992) Adhyperforin: a Homologue of Hyperforin from *Hypericum Perforatum*. *Planta Med* 58: 291–293.
- Maria, H. L. R., Dirce, S. ve Suzana, F. D. (2002) Selective Adsorption of Limonin and Naringin from Orange Juice to Natural and Synthetic Adsorbents. *Eur Food Res Technol* 215: 462–471.
- Ogino, K., Sato, H., Aihara, Y., Suzuki, H. ve Moriguchi, S. (1995) Preparation and Characterization of Monodisperse Oligo(Ethylene Glycol) Dimethacrylate Polymer Beads for Aqueous High-Performance Liquid Chromatography. *J Chromatogr A* 699 (1–2): 67–72.
- Ogino, K., Sato H., Tsuchiya K., Suzuki H. ve Moriguchi S. (1995) Synthesis of Monodisperse Macroporous Styrene-Divinylbenzene Gel Particles by a Single-Step Swelling and Polymerization Method. *J Chromatogr A* 699 (1–2): 59–66.
- Öztürk, M., Öztürk, A. F., Duru, M. E. ve Topçu, G. (2007) Antioxidant Activity of Stem and Root Extracts of Rhubarb (*Rheum Ribes*): an Edible Medicinal Plant. *Food Chem* 103: 623–630.
- Pi, G. P., Ren, P., Yu J. M., Shi, R. F., Yuan, Z. ve Wang, C. H. (2008) Separation of Sanguinarine and Chelerythrine in *Macleaya Cordata* (willd) R. Br. Based on Methyl Acrylate-co-Divinylbenzene Macroporous Adsorbents. *J Chromatogr A* 1192: 17–24.
- Rath, G., Potterat, O., Mavi, S. ve Hostettmann, K. (1996) Xanthenes from *Hypericum Roeperanum*. *Phytochemistry* 43: 513–520.
- Ren, P., Zhao, X. L., Zhang, J., Shi, R. F., Yuan, Z. ve Wang, C. H. (2008) Synthesis of High Selectivity Polymeric Adsorbent and its Application on the Separation of Ginkgo Flavonol Glycosides and Terpene Lactones. *React Funct Polym* 68: 899–909.
- Renner, C., Piehler J. ve Schrader, T. (2006) Arginine- and Lysine-Specific Polymers for Protein Recognition and Immobilization. *J Am Chem Soc* 128 (2): 620–628.

- Rijke, E., Out, P., Niessen, W. M. A., Ariese, F., Gooijer, C. ve Brinkman, U. A. T. (2006) Analytical Separation and Detection Methods for Flavonoids. *J Chromatogr A* 1112: 31–63.
- Sakar, M. K. ve Tamer, A. U. (1990) Antimicrobial Activity of Different Extracts from Hypericum Species. *Fitoterapia* 61: 464–466.
- Scordino, M., Mauro A. D., Passerini A. ve Maccarone, E. (2003) Adsorption of Flavonoids on Resins: Hesperidin. *J Agric Food Chem* 51 (24): 6998–7004.
- Senel, S., Camli, S.T., Tuncel, M. ve Tuncel, A. (2002) Nucleotide Adsorption–Desorption Behaviour of Boronic Acid Functionalized Uniform-Porous Particles. *J Chromatogr B* 769: 283–295.
- Silva, B. A, Ferreres, F., Malva, J. O. ve Dias, A. C. P. (2005) Phytochemical and Antioxidant Characterization of Hypericum Perforatum Alcoholic Extracts. *Food Chem* 90: 157–167.
- Silva, B. A., Malva, J. O. ve Dias, A. C. P. (2008) St. John’s Wort (Hypericum Perforatum) Extracts and Isolated Phenolic Compounds are Effective Antioxidants in Several in Vitro Models of Oxidative Stress. *Food Chem* 110: 611–619.
- Sing, K. S. W., Everett, D. H., Haul, R. A. W., Moscou, L., Pierotti, R. A., Rouquerol, J. ve Siemieniewska, T. (1985) Reporting Physisorption Data for Gas/Solid Systems with Special Reference to the Determination of Surface Area and Porosity. *Pure Appl Chem* 57 (4): 603–619.
- Takeda, Y. ve Fatope, M. O. (1988) New Phenolic Glucosides from Lawsonia Inermis. *J Nat Prod* 51: 725-729.
- Trifunovic, S., Vajs, V., Macura, S., Juranic, N., Djarmati, Z., Jankov, R. ve Milosavljevic, S. (1998) Oxidation Products of Hyperforin from Hypericum Perforatum. *Phytochemistry* 49: 1305–1310.
- Tuncel, A. ve Cicek, H. (1997) Uniform Latex Particles. 189-226. Cheremissinoff, N.P., Dekker M. (editörler) *Handbook of Engineering Polymeric Materials*. New York, 888s.
- Tuncel, A., Unsal, E. ve Senel, S. (2003) Polymer Beads in Biomedical Chromatography Elaissari, A. (editor) *Colloidal Polymers, Synthesis and Characterization*. New York, 443s.
- Ugelstad, J. (1978) Swelling Capacity of Aqueous Dispersions of Oligomer and Polymer Substances and Mixtures Thereof. *Macromol Chem* 179 (7): 815–817.
- Ugelstad, J., Kaggerud, K. H., Hansen, F. K. ve Berge, A. (1979) Absorption of Low Molecular Weight Compounds in Aqueous Dispersions of Polymer-Oligomer Particles. *Macromol Chem* 180 (6): 737–744.
- Ugelstad, J., Berge, A., Ellingsen, T., Schmid, R., Nilsen, T. N., Mørk, P. C., Stenstad, P., Hornes, E. ve Olsvik, Ø. (1992) Preparation and Application of New Monosized Polymerparticles. *Prog Polym Sci* 17 (1): 87–161.
- Unsal, E., Çamlı, S., Şenel, S. ve Tuncel, A. (2003) Chromatographic Performance of Monodisperse-Macroporous Particles Produced by “Modified Seeded

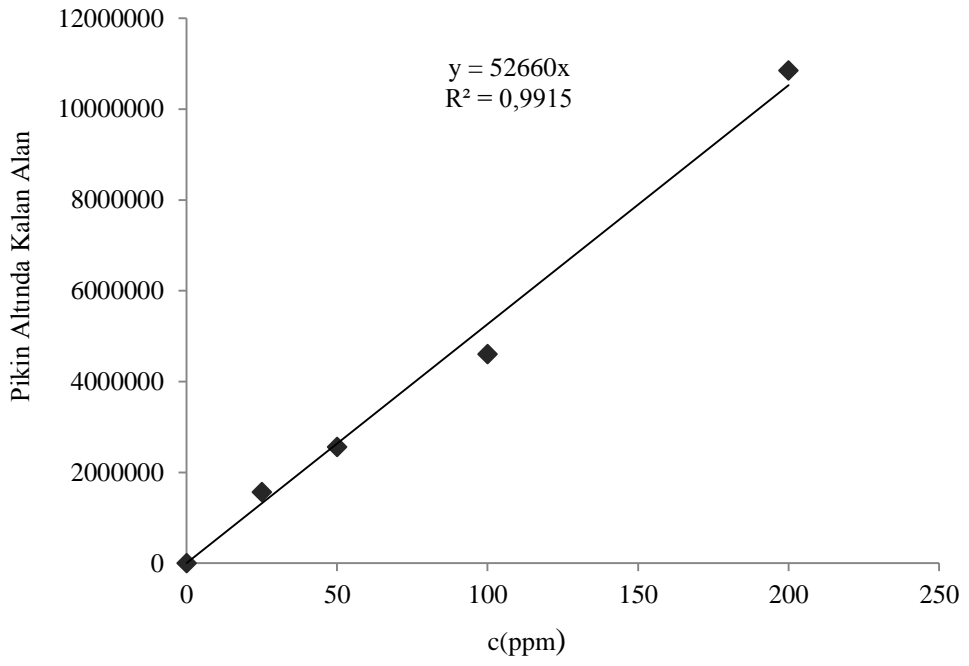
- Polymerization.” I: Effect of Monomer/Seed Latex Ratio. *J Appl Polym Sci* 92: 607–618.
- Unsal, E., Çamlı, S., Tuncel, M., Şenel, S. ve Tuncel, A. (2004) Monodisperse–Porous Particles with Different Polarities by “Modified Seeded Polymerization” and Their Use as Chromatographic Packing in HPLC. *React Funct Polym* 61: 353–368.
- Unsal, E., Çamlı, S. T., Irmak, T., Tuncel, M. ve Tuncel, A. (2004) Monodisperse Poly(Styrene-co-Divinylbenzene) Particles (3.2  $\mu\text{m}$ ) with Relatively Small Pore Size as HPLC Packing Material. *Chromatographia* 60: 553–560.
- Unsal, E., Çamlı, S. T., Teksen, T., Tuncel, M. ve Tuncel, A. (2005) Hydroxyl Functionalized Uniform-Porous Beads, Synthesis and Chromatographic Use. *J Macromol Sci Part A: Pure Appl. Chem* 42:607–621.
- Unsal, E., Elmas, B., Çağlayan, B., Tuncel, M., Patir, S. ve Tuncel, A. (2006) Preparation of an Ion-Exchange Chromatographic Support by A “Grafting From” Strategy Based on Atom Transfer Radical Polymerization. *Anal Chem* 78: 5868–5875.
- Walle, T. (2004) Absorption and Metabolism of Flavonoids. *Free Radical Biol Med* 7: 829-837.
- Wang, Q. C., Hosoya, K., Svec, F. ve Frechet, J. M. J. (1992) Polymeric Porogens Used in the Preparation of Novel Monodispersed Macroporous Polymeric Separation Media for High Performance Liquid Chromatography. *Anal Chem* 64 (11): 1232–1238.
- Wu, Q. L., Wang, S. P., Du, L. J., Yang, J.S. ve Xiao, P. G. (1998) Xanthenes from *Hypericum Japonicum* and *H. Henryi*. *Phytochemistry* 49: 1395–1402.
- Wu, Q. L., Wang, S. P., Du, L. J., Zhang, S. M., Yang, J. S. ve Xiao, P. G. (1998) Chromone Glycosides and Flavonoids From *Hypericum Japonicum*. *Phytochemistry* 49: 1417–1420.
- Xu, M. C., Shi, Z. Q., Shi, R. F., Liu, J. X., Lu, Y. L. ve He, B. L. (2000) Synthesis of the Adsorbent Based on Macroporous Copolymer MA–DVB Beads and its Application in Purification for the Extracts from Ginkgo Biloba Leaves. *React Funct Polym* 43: 297–304.
- Yang, Z., Tu, Y., Baldermann, S., Dong, F., Xuc, Y. ve Watanabe, N. (2009) Isolation and Identification of Compounds from the Ethanolic Extract of Flowers of the Tea (*Camellia Sinensis*) Plant and their Contribution to the Antioxidant Capacity. *Food Sci Technol* 42: 1439–1443.
- Yasukawa, K., Abe, F., Shida, N., Koizumi, Y. T. ve Uchida, K. (1992) High-Performance Affinity Chromatography System for the Rapid, Efficient Assay of Glycated Albumin. *J Chromatogr* 597: 271–275.
- Yuangang, Zu, Li, C., Fu, Y. ve Zhao, C. (2006) Simultaneous Determination of Catechin, Rutin, Quercetin Kaempferol and Isorhamnetin in the Extract of Sea Buckthorn (*Hippophae Rhamnoides* L.) Leaves by RP-HPLC with DAD. *J Pharm Biomed Anal* 41: 714–719.



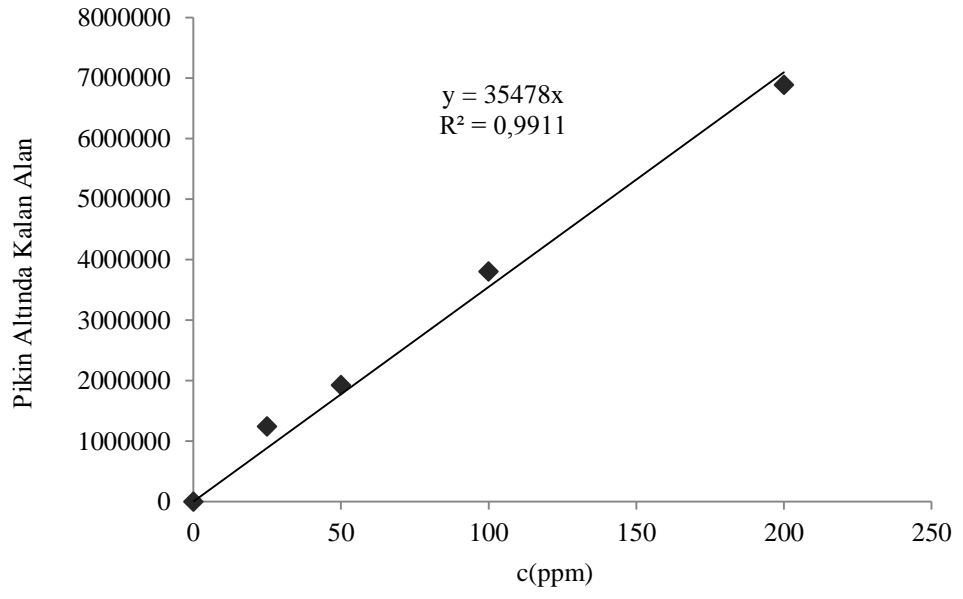
Zhang, Y., Li, S. F., Wu, X. W. ve Zhao, X. (2007) Macroporous Resin Adsorption for Purification of Flavonoids in *Houttuynia cordata* Thunb. *Chin J Chem Eng* 15(6): 872–876.

## **EKLER**

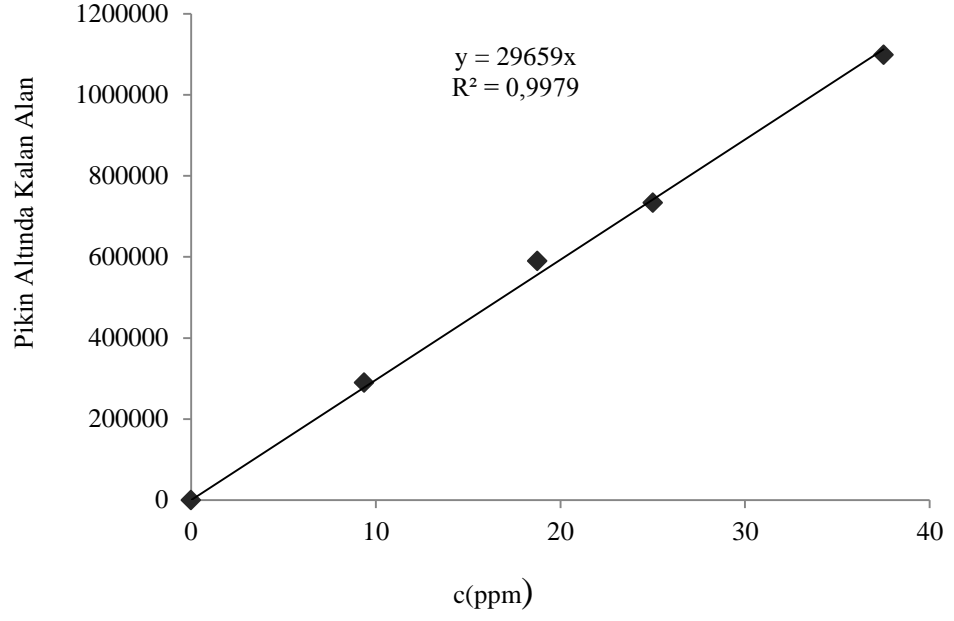
### Ek A. Kerşetin'in pH'8,5'taki HPLC için Kalibrasyon Doğrusu



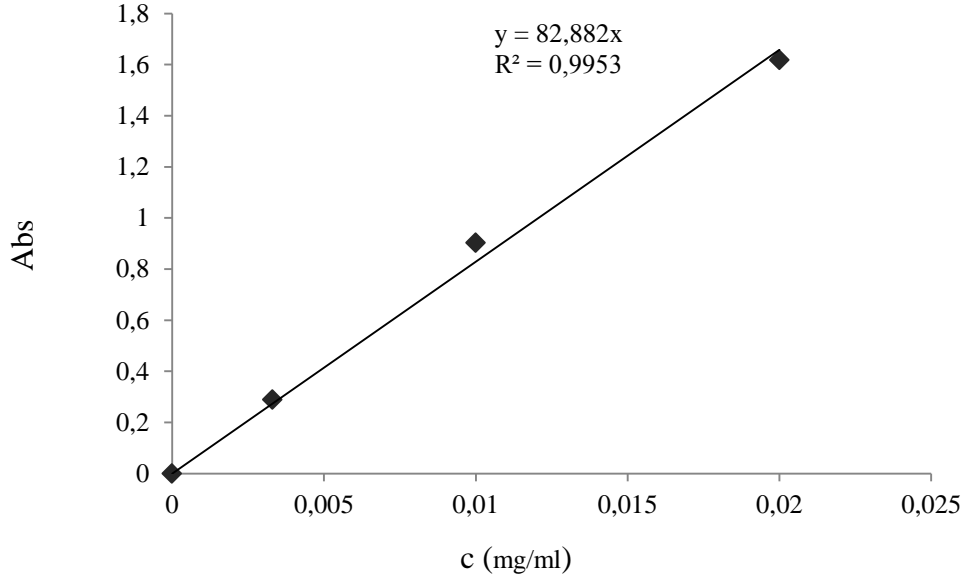
### Ek B. Rutin'in pH'8,5'teki HPLC için Kalibrasyon Doğrusu



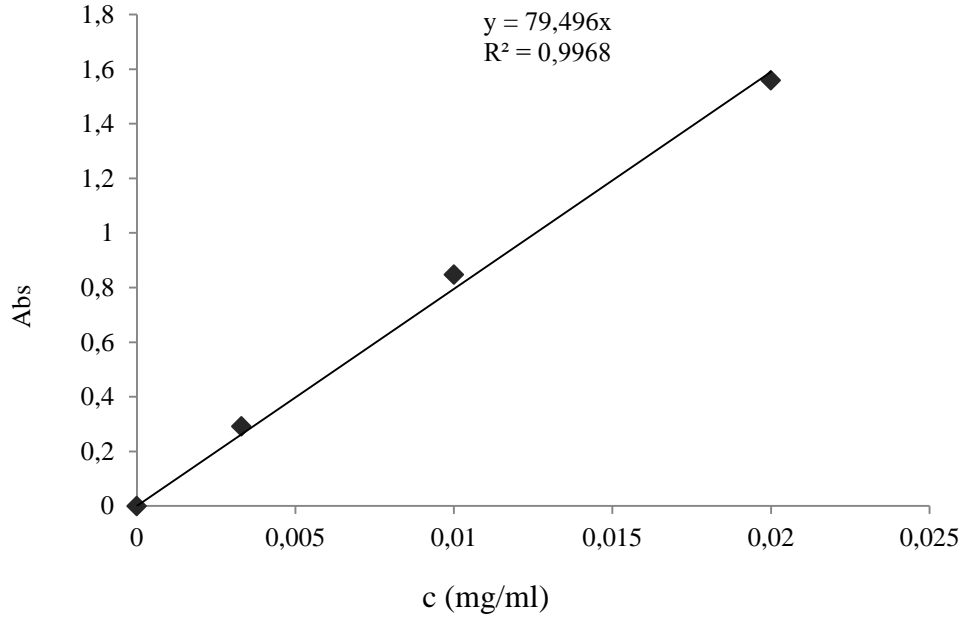
### Ek C. Apigenin'in pH'8,5'teki HPLC için Kalibrasyon Doğrusu



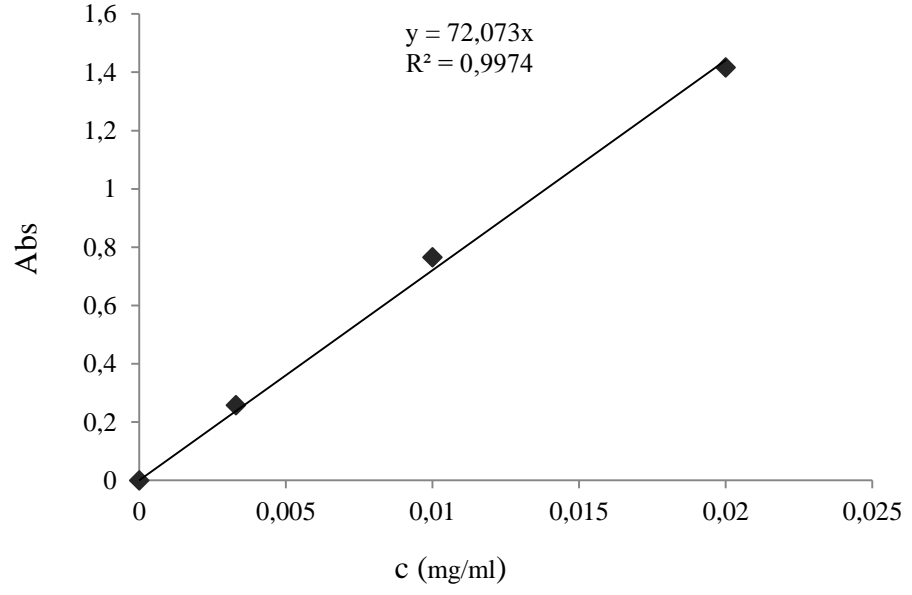
**Ek D. Apigenin'in pH 6'daki UV-Visible Spektrofotometre için Kalibrasyon Doğrusu**



**Ek E. Apigenin'in pH 7'deki UV-Visible Spektrofotometre için Kalibrasyon Doğrusu**

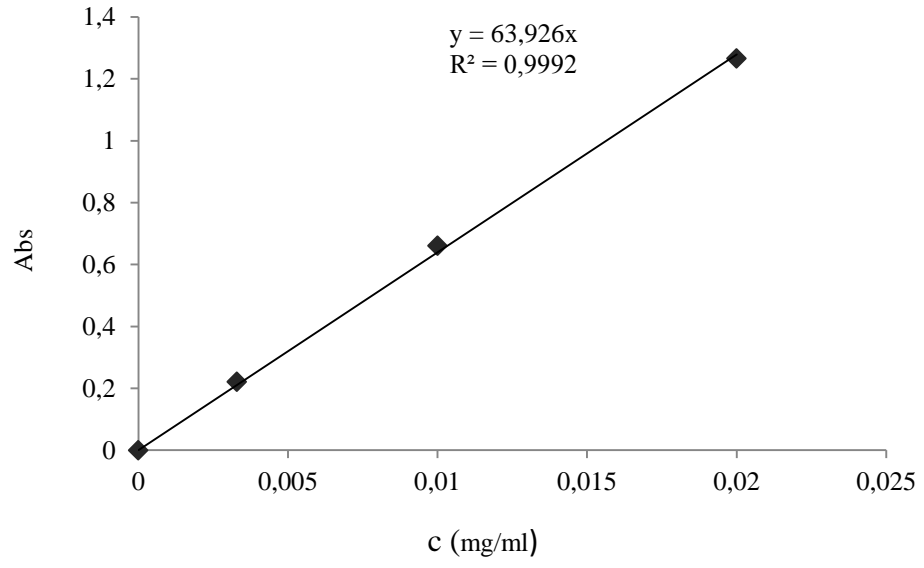


**Ek F. Apigenin'in pH 8'deki UV-Visible Spektrofotometre için Kalibrasyon Doğrusu**

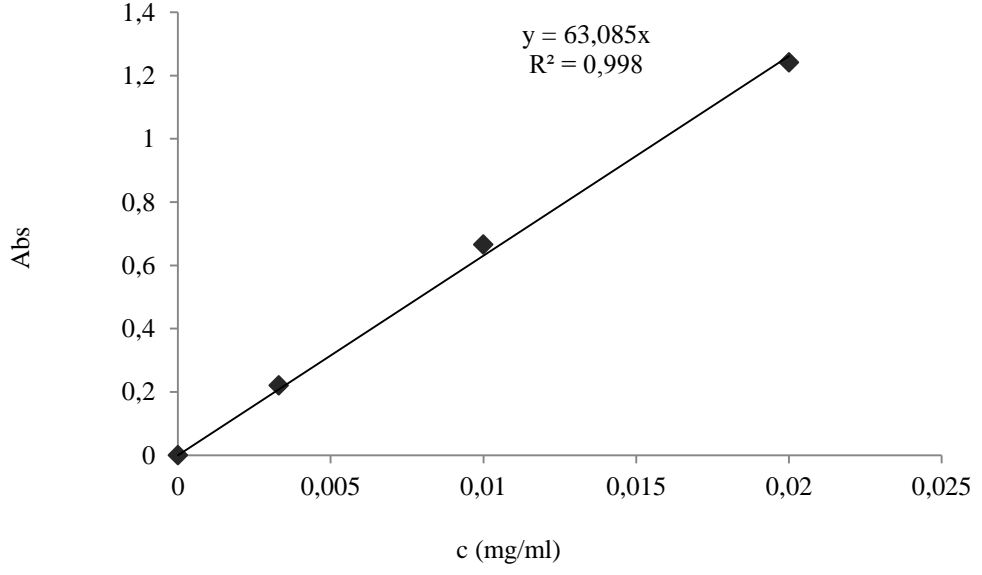




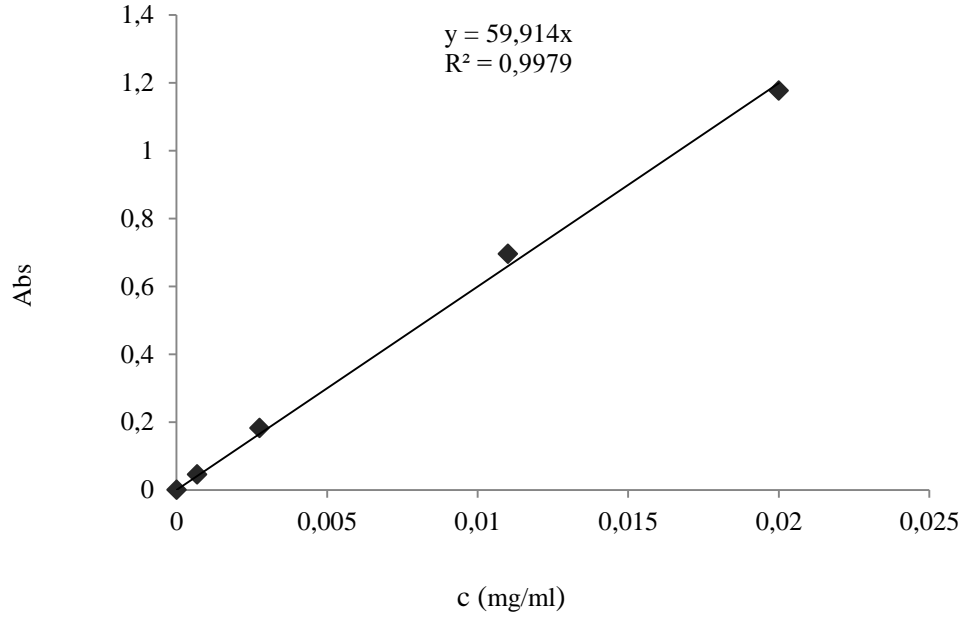
**Ek G. Apigenin'in pH 8,5'taki UV-Visible Spektrofotometre için Kalibrasyon Doğrusu**



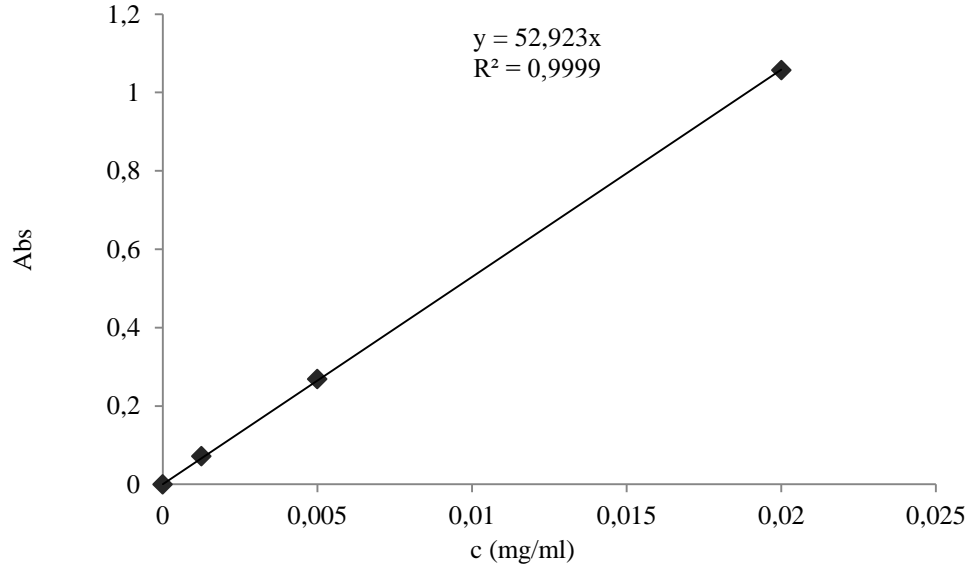
**Ek H. Apigenin'in pH 9'daki UV-Visible Spektrofotometre için Kalibrasyon Doğrusu**



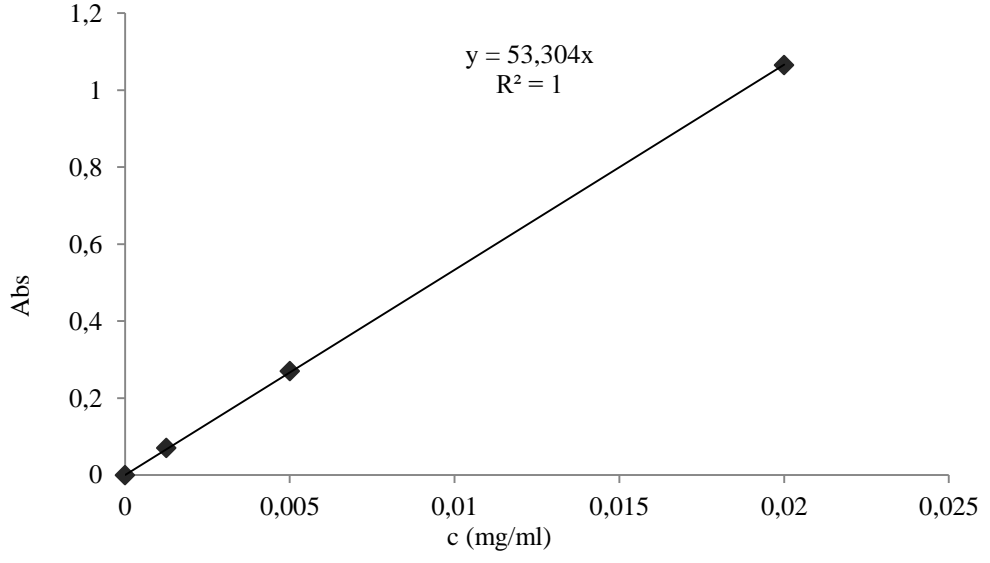
**Ek I. Kersetin'in pH 6'daki UV-Visible Spektrofotometre için Kalibrasyon Doğrusu**



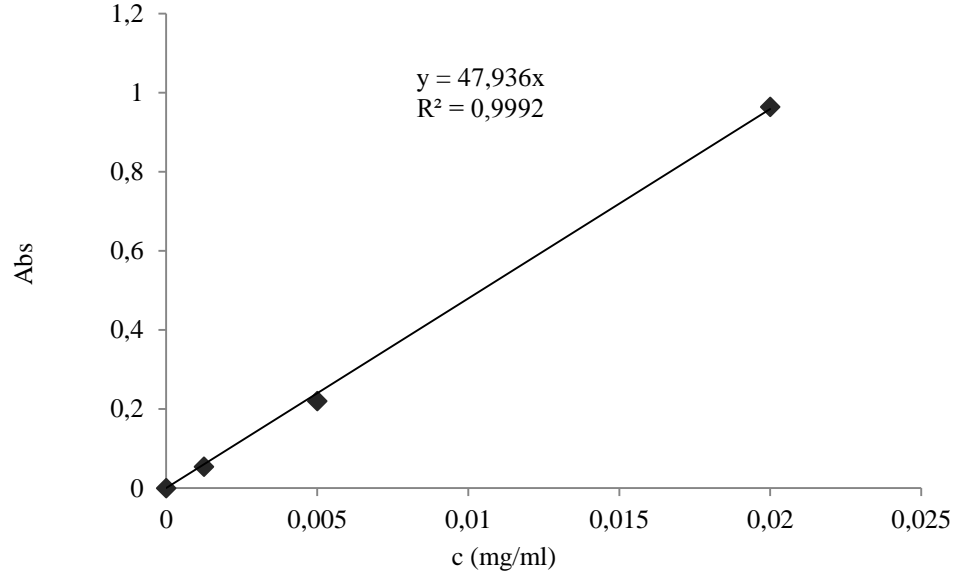
**Ek İ. Kersetin'in pH 7'deki UV-Visible Spektrofotometre için Kalibrasyon Doğrusu**



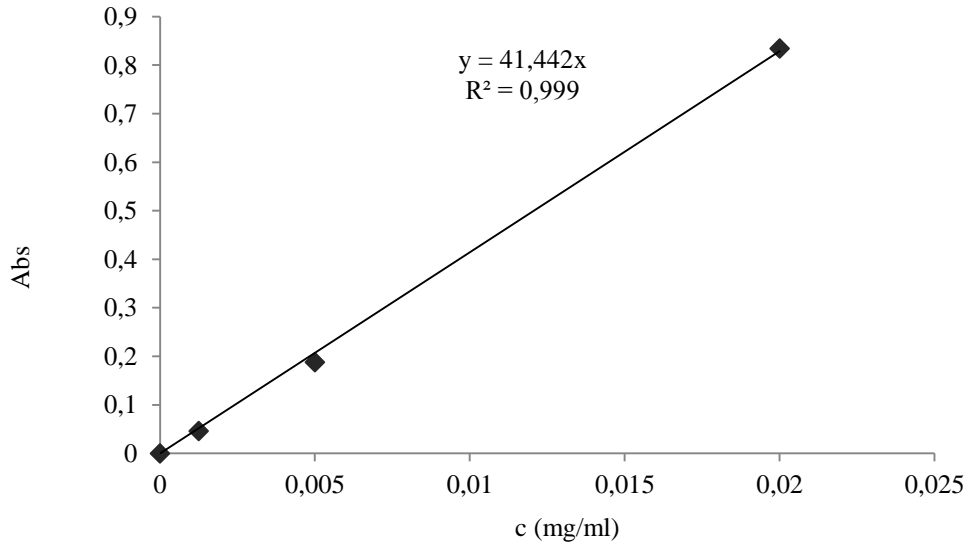
**Ek J. Kersetin'in pH 8'deki UV-Visible Spektrofotometre için Kalibrasyon Doğrusu**



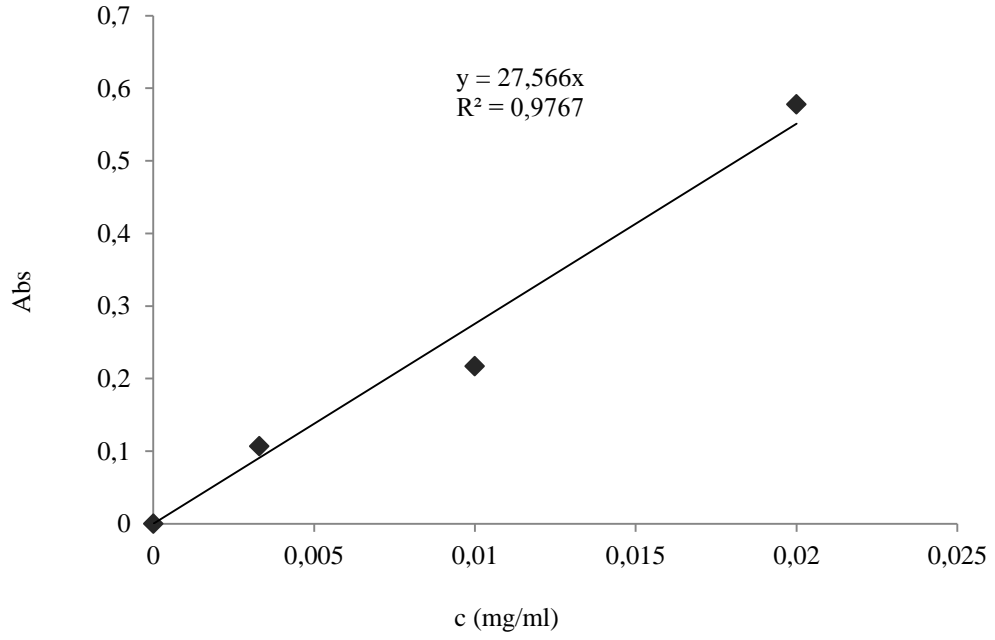
**Ek K. Kersetin'in pH 8,5'daki UV-Visible Spektrofotometre için Kalibrasyon Doğrusu**



**Ek L. Kerasetin'in pH 9'daki UV-Visible Spektrofotometre için Kalibrasyon Doğrusu**

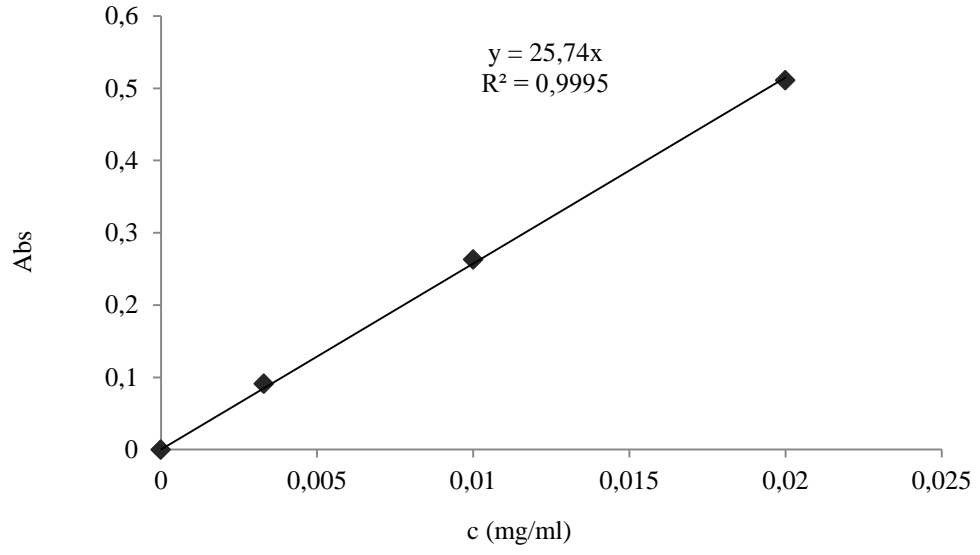


**Ek M. Rutin'in pH 6'daki UV-Visible Spektrofotometre için Kalibrasyon Doğrusu**

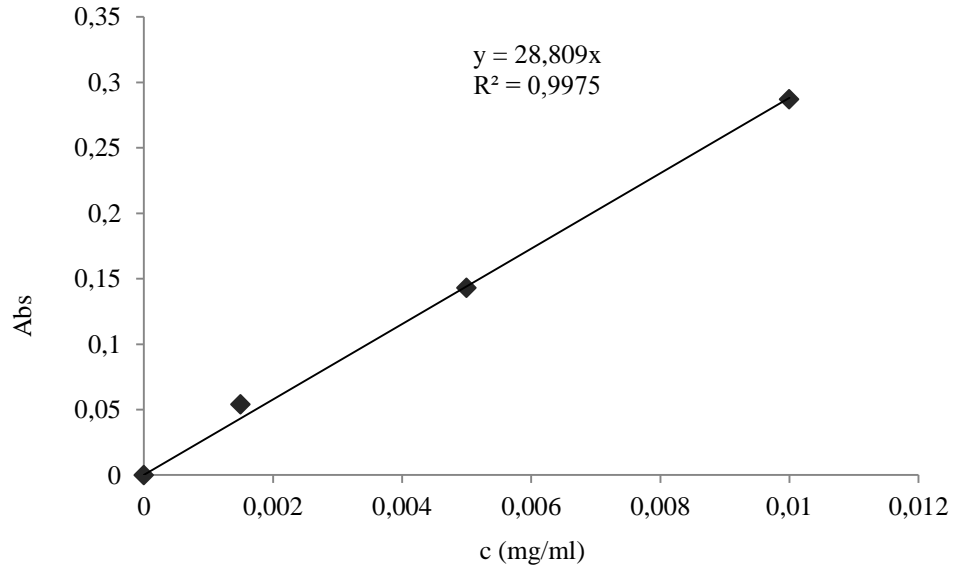




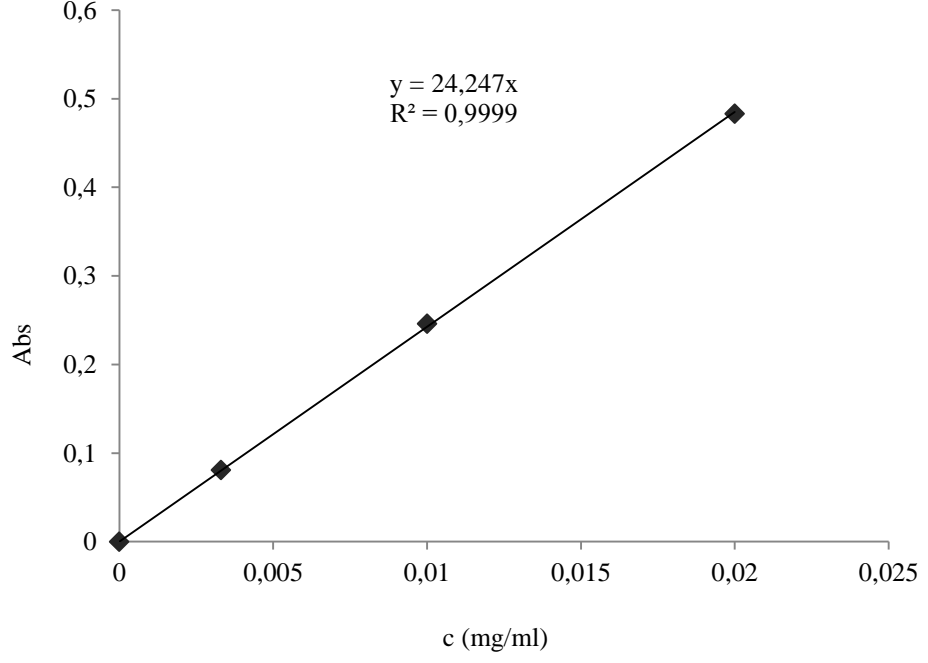
**Ek N. Rutin'in pH 7'deki UV-Visible Spektrofotometre için Kalibrasyon Doğrusu**



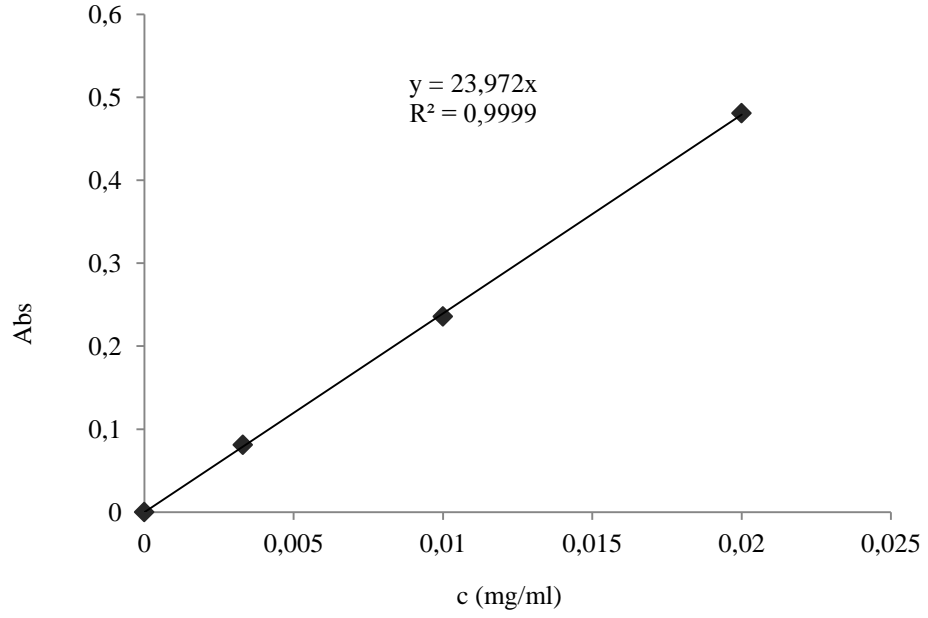
**Ek O. Rutin'in pH 8'deki UV-Visible Spektrofotometre için Kalibrasyon Doğrusu**



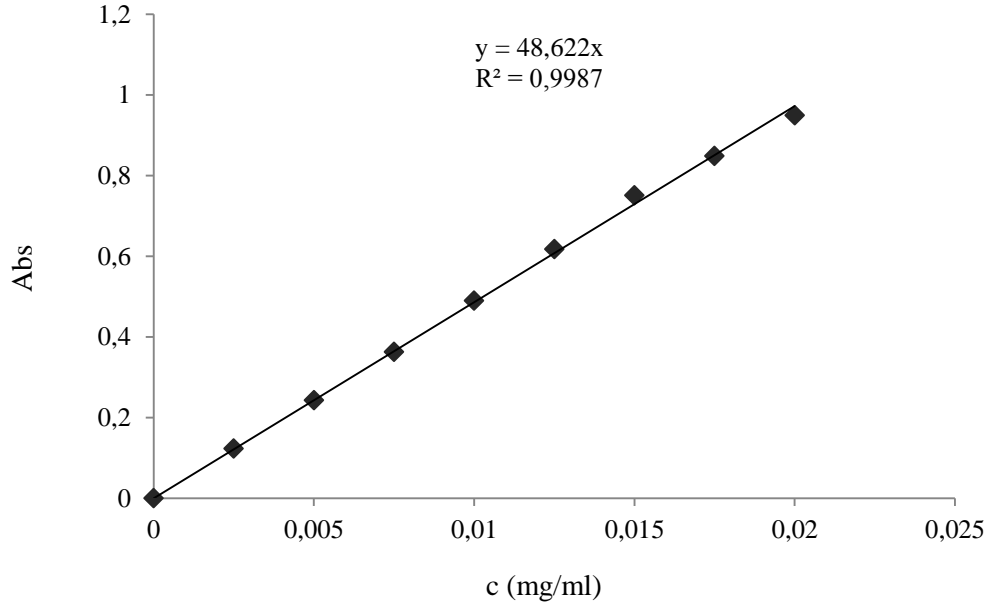
**Ek Ö. Rutin'in pH 8,5'teki UV-Visible Spektrofotometre için Kalibrasyon Doğrusu**



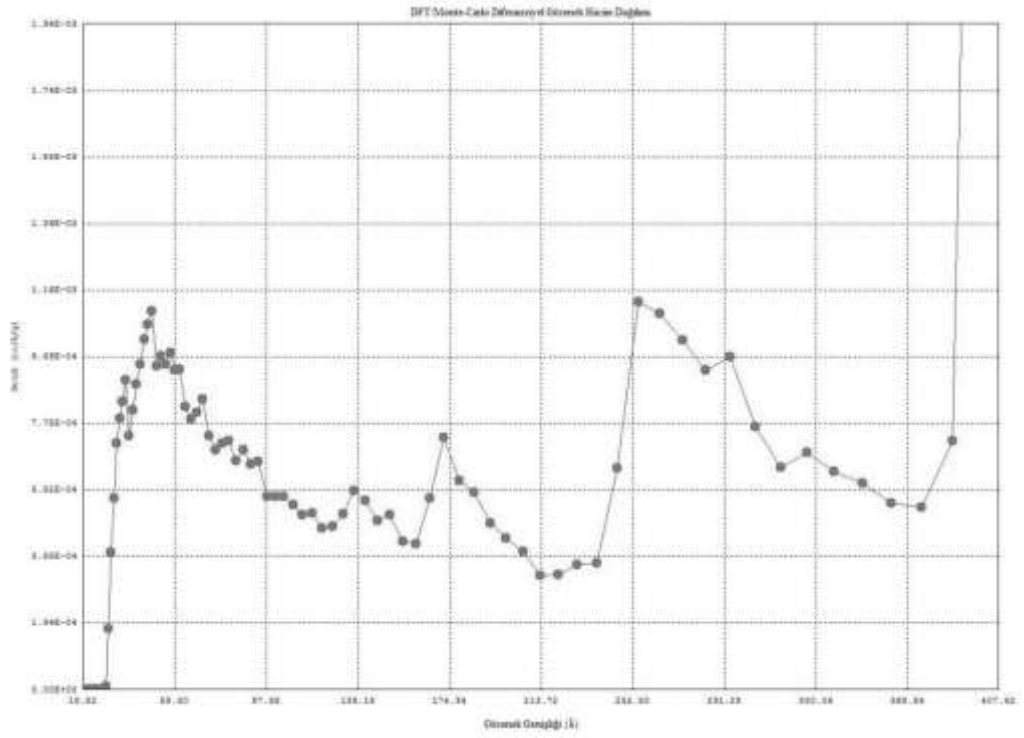
**Ek P. Rutin'in pH 9'daki UV-Visible Spektrofotometre için Kalibrasyon Doğrusu**



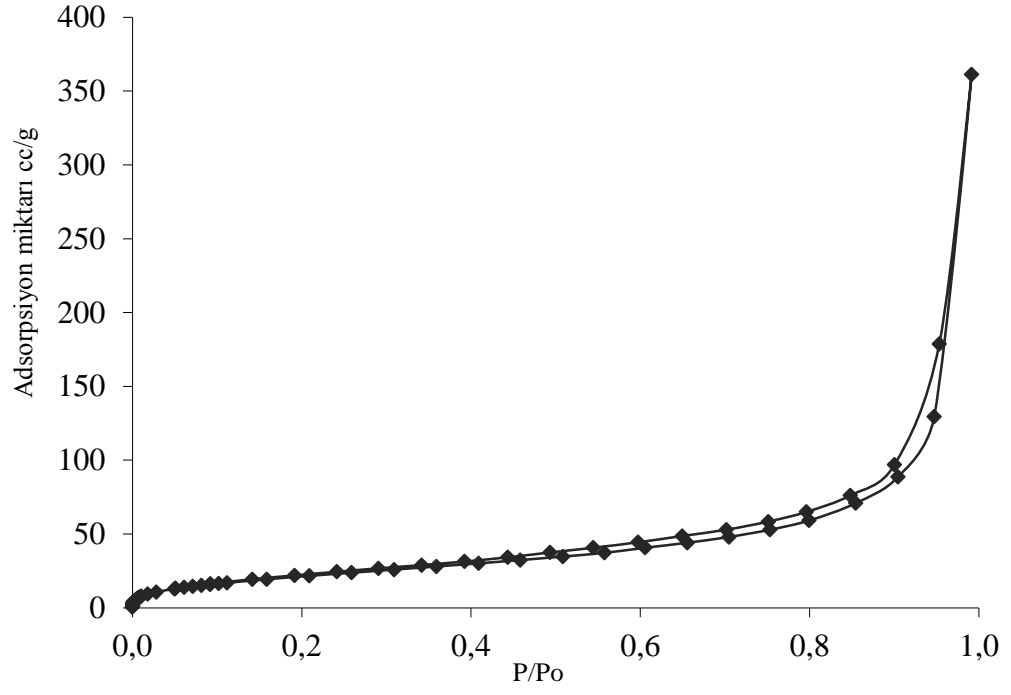
**Ek R. Toplam Flavonoid Tayini için Kersetinin 415 nm'deki Kalibrasyon Doğrusu**



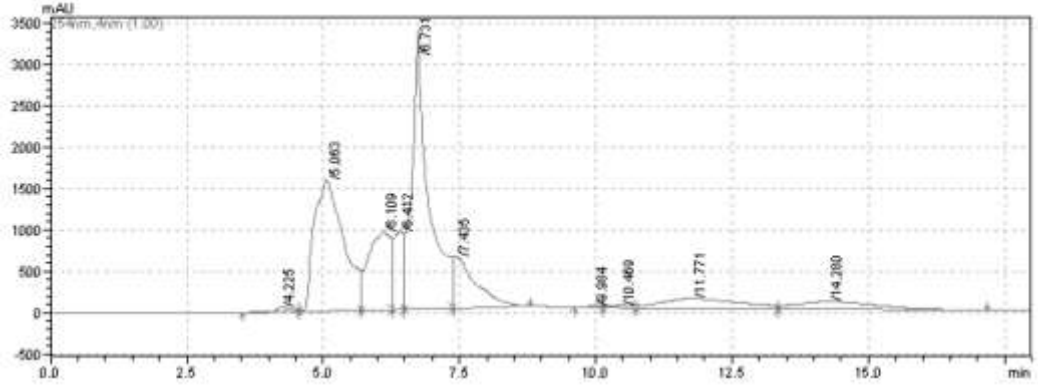
## Ek S. Poli(CMS-ko-DVB) Partiküllerinin Gözenek Hacim Dağılımı



### Ek T. Poli(CMS-ko-DVB) Partiküllerine Ait BET İzotermi

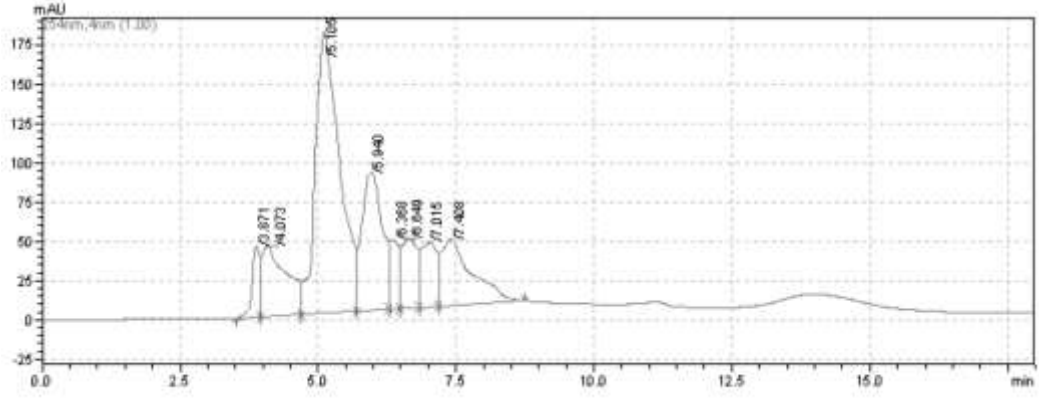


## Ek U. *H. Perforatum* Bitkisinin Etanol Ekstresinin HPLC Kromatogramı

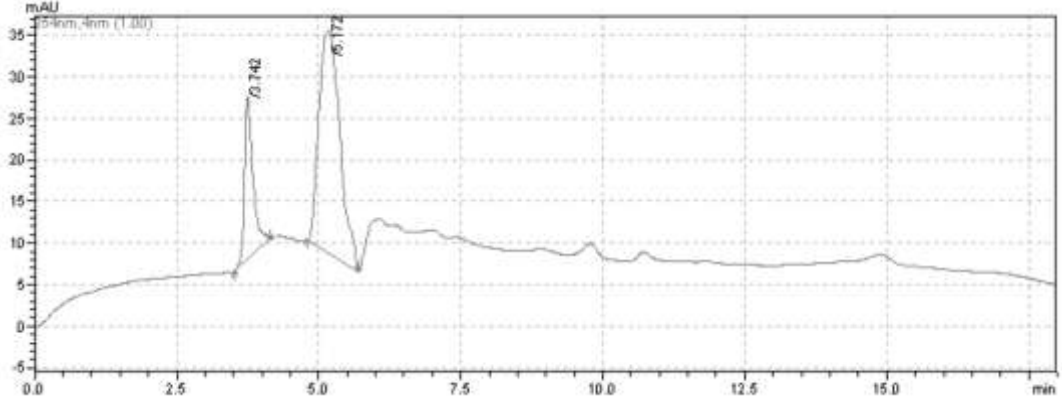




**Ek Ü. *H. Perforatum* Bitkisinin Etanol Özütünün Adsorpsiyon Sonrası Ortamda Kalan Özütün HPLC Kromatogramı**



**Ek V. *H. Perforatum* Bitkisinin Etanol Özütünün Adsorpsiyon Sonrası Ortamdan Ayrılıp Desorbe Edilen Özütün HPLC Kromatogramı**



## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Ad Soyad : Onur ÇETİNKAYA  
Uyruk : T.C.  
Doğum Yeri ve Tarihi: 08/01/1986  
Medeni Hali : Bekar  
Adres : Muğla Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü/MUĞLA  
Tel : 0252 211 1335  
E-posta : onrctnkya@mu.edu.tr

### Eğitim

Alınan Derece	Aldığı Kurum/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lise	Bayraklı Lisesi (Y. D. A.)	2004
Lisans	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi	2009

### İş Tecrübesi

Yıl	Yer	Pozisyon/görev
2005-2009	Eskişehir	Büro Elemanı
2010-	Muğla Üniversitesi	Arş. Görevlisi

### Yabancı Dil

Dil (İngilizce)	Başlangıç	Orta	İleri
Yazma		x	
Konuşma		x	
Anlama			x
Okuma			x

## **Görev Aldığı Projeler**

- 1) Komşu Hidroksil Grubu Taşıyan Flavonoidlerin Boronik Asit Fonksiyonlu Makrogözenekli Eş Boyutlu Poli(4-Klorometilstiren-Ko-Divinilbenzen) Partiküllerle Kesikli Sistemde Ayrılması Ve Bitki Özütlerinin Antioksidan Aktivitesinin Artırılmasına Yönelik Kullanımı, Tübitak Hızlı destek Projesi, **Yardımcı Araştırmacı**, Proje No: 110M382, Başlangıç; 15.10.2010.

## **Eserler**

### **Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler**

- 1) Çiçek H., Çetinkaya O., Ayhan H., Küresel Formda Mikron Boyutlu Gelatin/Alginat Mikrokürelerin Sentezi ve İlaç Salımında Uygulanabilirliği, 3. Ulusal Polimer Bilim ve Teknoloji Kongresi ve Sergisi, 12-14 Mayıs, 95-105, Kocaeli Üniversitesi, Kocaeli, 2010. (Sözlü sunum)
- 2) Hüseyin Çiçek ve Onur Çetinkaya, Eş Boyutlu Küresel Silika Partikülleri Kullanılarak Komşu Hidroksil Grubu İçeren Flavonoidlerin Seçici Olarak İzolasyonu, II. Ulusal Anorganik Kimya Kongresi, Poster: 161,sayfa:189, 19-22 Mayıs, On Sekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale, 2011. (Poster sunumu)
- 3) Onur Çetinkaya, Hüseyin Karababa, Hüseyin Çiçek, Eş Boyutlu Küresel Poli(klorometilstiren-ko-divinilbenzen) Partikülleri Kullanılarak Komşu Hidroksil Grubu İçeren Flavonoidlerin Seçici Olarak İzolasyonu, Uluslar Arası Katılımlı 25. Ulusal Kimya Kongresi, PP198; Sayfa.217, 27 Haziran-2 Temmuz 2011, Atatürk Üniversitesi, Erzurum, 2011. (Poster sunumu).

### **İlgi Alanları :**

- Polimer Bilim ve Teknolojisi (Latex ve partikül üretimi, akıllı polimerler, jeller, nanoteknoloji uygulamaları)
- Biyomühendislik (polimerik ilaç salım sistemleri, teşhis ve tedavi amaçlı polimerik yapıların geliştirilmesi)

### **Hobiler**

- 1) Model maket yapmak
- 2) Yüzmek
- 3) Gitar çalmak
- 4) Film izlemek
- 5) Kitap okumak