

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**LC-ESI-MS VE ON-LİNE HPLC-ABTS YÖNTEMLERİYLE BELİRLENEN
GİLABURU, KIZILCIK, KOKULU ÜZÜM VE KARAYEMİŞ MEYVELERİNİN
BİYOAKTİF FENOLİK BİLEŞİMİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimyager Ayça AKTAŞ

HAZİRAN 2012

TRABZON

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**LC-ESI-MS VE ON-LİNE HPLC-ABTS YÖNTEMLERİYLE BELİRLENEN
GİLABURU, KIZILCIK, KOKULU ÜZÜM VE KARAYEMİŞ MEYVELERİNİN
BİYOAKTİF FENOLİK BİLEŞİMİ**

Kimyager Ayça AKTAŞ

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
"YÜKSEK LİSANS (KİMYA)"
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 25.05.2012
Tezin Savunma Tarihi : 11.06.2012**

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Murat KÜÇÜK

Trabzon 2012

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalında

Ayça AKTAŞ tarafından hazırlanan

**LC-ESI-MS VE ON-LİNE HPLC-ABTS YÖNTEMLERİYLE BELİRLENEN
GİLABURU, KIZILCIK, KOKULU ÜZÜM VE KARAYEMİŞ MEYVELERİNİN
BİYOAKTİF FENOLİK BİLEŞİMİ**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 22 / 05 / 2012 gün ve 1457/2 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI

Üye : Prof. Dr. Murat KÜÇÜK

Üye : Doç. Dr. Ahmet ALVER

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“ LC-ESI-MS ve On-line HPLC-ABTS Yöntemleriyle Belirlenen Gilaburu, Kızılcık, Kokulu Üzüm ve Karayemiş Meyvelerinin Biyoaktif Fenolik Bileşimi ” adlı bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır.

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca bana danışmanlık yapan, meslek hayatındaki tecrübelerinden her daim faydalandığım Sayın Hocam Prof. Dr. Murat KÜÇÜK’e,

Yurtdışında bana danışmanlık sunan ve Belçika Gent Üniversitesi, Kimya Bölümü’ndeki laboratuvar imkanlarından yararlanmamı sağlayan Sayın Prof. Dr. Patrick Sandra’ya,

Gent Üniversitesi’ndeki deneysel çalışmalarım boyunca rehberlik yapan Bram Miserez ve Seppe De Smet’e ayrıca tez yazımında yardımlarını esirgemeyen Dr. Frederic LYNEN’e,

Yurtdışındaki deneyimlerini benimle paylaşan Yrd. Doç. Dr. Emine AKYÜZ TURUMTAY’a,

Çalışmalarımda her türlü laboratuvar imkanlarını sağlayan KTÜ Fen Fakültesi Kimya Bölümü’ne, bölümdeki tüm hocalarıma ve laboratuvar çalışmalarında yardımlarını ve güler yüzlerini esirgemeyen BAL grubundaki arkadaşlarım Sezgin AYDEMİR, Zeynep İSKEFİYELİ, Semra ALKAN, Ozan Emre EYÜPOĞLU ve Arş. Gör. Nesibe ARSLAN BURNAZ’a,

Son olarak tüm hayatım boyunca bana inanan ve maddi manevi yönden destekleyen Anneme, Babama ve amcam Halil AKTAŞ’a tüm samimiyetimle teşekkür ederim.

Ayça AKTAŞ

Trabzon, 2012

TEZ BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “ LC-ESI-MS ve On-line HPLC-ABTS Yöntemleriyle Belirlenen Gilaburu, Kızılcık, Kokulu Üzüm ve Karayemiş Meyvelerinin Biyoaktif Fenolik Bileşimi ” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Murat KÜÇÜK‘ün sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 11/06/2012

Ayça AKTAŞ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	III
TEZ BEYANNAMESİ	IV
İÇİNDEKİLER	V
ÖZET	IX
SUMMARY	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
TABLolar DİZİNİ	XVIII
SEMBOLLER DİZİNİ	XIX
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. Oksidatif Stres ve Antioksidanlar	2
1.3. Doğal Ürünlerdeki Biyoaktif Fenolik Bileşikler	8
1.4. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri	11
1.4.1. Trolox Eşdeğeri Antioksidan Kapasite (TEAC/ABTS) Yöntemi	12
1.4.2. Demir (III) İndirgeme / Antioksidan Kuvvet (FRAP) Yöntemi	13
1.4.3. Folin-Ciocalteu Yöntemi ile Toplam Fenolik Madde Tayini	14
1.5. HPLC ile On-line Antioksidan Tespiti	14
1.6. Enzimler	16
1.6.1. Karbonik Anhidraz Enzimi	17
1.6.2. Enzim Aktivitesi ve İnhibisyonu	17
1.7. Çalışmada Kullanılan Kromatografik Teknikler	18
1.7.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	19
1.7.2. HPLC Cihazının Çalışma Prensibi	19
1.7.3. HPLC Cihazı	19
1.7.4. UV-Vis ve MS Dedektör	21
1.8. Çalışmada Kullanılan Meyvelerin Özellikleri	23
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	27
2.1. Meyvelerin Toplanması ve Ekstraktların Hazırlanması	27
2.1.1. Çözücü Ekstraksiyonu	27

2.1.2	Farklı Çözücü Ekstraktlarının Hazırlanması	27
2.2.	On-line HPLC-Antioksidan Aktivite Belirleme	28
2.2.1.	Kullanılan Kimyasallar ve Çözücüler	29
2.2.2.	Kullanılan Cihaz ve HPLC-UV Koşulları	29
2.3.	Meyve Ekstraktlarında Fenolik Bileşiklerin Analizi	30
2.3.1.	Materyaller	31
2.3.2.	Kullanılan Cihaz ve LC-MS Koşulları	31
2.4.	Klasik Yöntemlerle Antioksidan Aktivite Belirleme	31
2.4.1.	Kullanılan Cihazlar	32
2.4.2.	Kullanılan Çözeltiler ve Kimyasallar	32
2.4.3.	ABTS Radikalini Temizleme Yöntemi	33
2.4.3.1.	SC ₅₀ Değerlerinin Bulunması	33
2.4.4.	Demir (III) İndirgeme / Antioksidan Kuvvet (FRAP) Yöntemi	34
2.4.5.	Folin-Ciocalteu Yöntemi ile Toplam Fenolik Madde Tayini	35
2.5.	Karbonik Anhidraz İnhibisyon Etkileri	35
3.	BULGULAR VE TARTIŞMA	37
3.1.	HPLC-UV Metot Geliştirme	37
3.2.	Meyve Sularının ve Farklı Çözücü Ekstraktlarının HPLC-UV Analizlerin Karşılaştırılması	40
3.3	On-line Antioksidan Aktivite Analiz Sonuçları	54
3.3.1.	Standartların On-line HPLC-ABTS ve HPLC-DPPH Analizlerinin Karşılaştırılması	54
3.3.2.	Gilaburu Meyvesinin On-line HPLC-Antioksidan Analiz Sonuçları	57
3.3.3.	Kızılcık Meyvesinin On-line HPLC-ABTS Antiradikal Analiz Sonuçları ...	65
3.3.4.	Kokulu Üzüm Meyvesinin On-line HPLC-ABTS Antiradikal Analiz Sonuçları	73
3.3.5.	Karayemiş Meyvesinin On-line HPLC-ABTS Antiradikal Analiz Sonuçları	81
3.8.	Fenolik Bileşikler	89
3.8.1.	Çarpışmadan Kaynaklanan Ayrışma ile LC-MS Kullanılarak Glikozidik Flavonoidlerin Tanımlanması	89
3.8.1.1.	Heksoz	89
3.8.1.2.	Deoksiheksozlar	90
3.8.1.3.	Heksoz + Pentoz	91

3.8.2.	LC-ESI-MS ve Uygun Standartlarla Karşılaştırılarak İlave Flavonoidlerin Tanımlanması	91
3.8.2.1.	Prosiyanidin Dimer	91
3.8.2.2.	Prosiyanidin Trimer	93
3.8.2.3.	Kateşin	93
3.8.2.4.	Epikateşin	93
3.8.2.5.	Rutin	94
3.8.2.6.	Klorogenik Asit	95
3.8.2.7.	Dikaffeik Asit	96
3.8.3.	Fenolik Bileşiklerin HPLC-UV ve HPLC-ESI-MS ile Tanımlanması	97
3.9.	Antioksidan Aktivite	103
3.9.1.	ABTS Radikal Temizleme Aktivite Tayin Yöntemi	103
3.9.1.1.	Gilaburu Meyvesinin Ekstraktlarındaki ABTS Radikal Temizleme Aktivitesi	105
3.9.1.2.	Kızılcık Meyvesinin Ekstraktlarındaki ABTS Radikal Temizleme Aktivitesi	107
3.9.1.3.	Kokulu Üzüm Meyvesinin Ekstraktlarındaki ABTS Radikal Temizleme Aktivitesi	109
3.9.1.4.	Karayemiş Meyvesinin Ekstraktlarındaki ABTS Radikal Temizleme Aktivitesi	111
3.9.2.	Demir (III) İndirgeme / Antioksidan Kuvvet (FRAP) Yöntemi	113
3.9.2.1.	Gilaburu Meyvesinin Ekstraktlarındaki Demir (III) İndirgeme / Antioksidan Kuvveti	114
3.9.2.2.	Kızılcık Meyvesinin Ekstraktlarındaki Demir (III) İndirgeme / Antioksidan Kuvveti	115
3.9.2.3.	Kokulu Üzüm Meyvesinin Ekstraktlarındaki Demir (III) İndirgeme / Antioksidan Kuvveti	116
3.9.2.4.	Karayemiş Meyvesinin Ekstraktlarındaki Demir (III) İndirgeme / Antioksidan Kuvveti	117
3.9.3.	Folin-Ciocalteu Yöntemi ile Toplam Fenolik Madde Tayini	117
3.9.3.1.	Gilaburu Meyvesinin Ekstraktlarındaki Toplam Fenolik Madde Miktarları..	119
3.9.3.2.	Kızılcık Meyvesinin Ekstraktlarındaki Toplam Fenolik Madde Miktarları..	121
3.9.3.3.	Kokulu Üzüm Meyvesinin Ekstraktlarındaki Toplam Fenolik Madde Miktarları	123
3.9.3.4.	Karayemiş Meyvesinin Ekstraktlarındaki Toplam Fenolik Madde Miktarları	125

3.10.	On-line HPLC-ABTS ve Off-line ABTS Radikal Temizleme Aktivite Yöntemlerin Karşılaştırılması	127
3.11.	Karbonik Anhidraz İnhibisyon Etkileri	128
4.	SONUÇLAR VE ÖNERİLER	129
5.	KAYNAKLAR	133
ÖZGEÇMİŞ		

ÖZET

LC-ESI-MS VE ON-LİNE HPLC-ABTS YÖNTEMLERİYLE BELİRLENEN GİLABURU, KIZILCIK, KOKULU ÜZÜM VE KARAYEMİŞ MEYVELERİNİN BİYOAKTİF FENOLİK BİLEŞİMİ

Ayça AKTAŞ

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Murat KÜÇÜK
2012, 139 Sayfa

Bu çalışmada Doğu Karadeniz Bölgesinde yetişen gilaburu (*Viburnum opulus* L.), kızılçık (*Cornus mas* L.), kokulu üzüm (*Vitis vinifera* L.) ve karayemiş (*Prunus laurocerasus* L.) meyvelerinin meyve suyu ve çekirdek ve zar kısımlarının farklı çözücüler (metanol, asetonitril, su) ile hazırlanan ekstraktlarındaki antioksidan aktivitenin belirlenmesi için on-line HPLC-ABTS ve off-line (klasik) antioksidan aktivite belirleme yöntemlerinden ABTS radikali temizleme aktivitesi, demir (III) indirgeme / antioksidan kuvvet (FRAP) ve Folin-Ciocalteu yöntemi ile toplam fenolik madde tayini yöntemleri kullanıldı. Ayrıca gilaburu meyve suyu ve çekirdek kısmının metanollü ekstraktına HPLC-ESI-MS yöntemi uygulanarak mevcut olan fenolik bileşiklerin yapısının aydınlatılması yapıldı. 14 fenolik standart kullanılarak HPLC-UV metodunun optimizasyonunun ardından bütün meyvelerden elde edilen ekstraktlar analiz edildi. Bu ekstraktlarda bulunan 18 fenolik bileşik, standartların ve literatürde rapor edilen bileşiklerin alıkonma zamanı ve kütle spektrumları ile karşılaştırılarak tanımlandı. Bunlar arasında kateşin, epikateşin, klorojenik asit, prosiyanidin B2, prosiyanidin trimer major pikler olarak tespit edildi. Ekstraktların her birinden oldukça farklı antioksidan bileşim profilleri elde edildi. Bütün klasik ve on-line antioksidan aktivite belirleme yöntemlerine göre gilaburu, kızılçık ve kokulu üzüm meyvelerinin çekirdek kısımlarının zar kısımlarına göre daha yüksek aktiviteye sahip olduğu, fakat karayemiş meyvesinin zar kısımlarının daha yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. On-line ve off-line radikal temizleme aktivite yöntemleri sonuçları arasında doğrusal bir korelasyon olduğu belirlenmiştir. Çalışmada ayrıca bütün meyvelerin meyve suyu ve sulu ekstraktlarının klinik önemi olan karbonik anhidraz enzimini %14-%100 oranında inhibe ettiği bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Gilaburu, Kızılçık, Kokulu üzüm, Karayemiş, On-line HPLC-ABTS/DPPH, Antioksidan, Fenolik, HPLC-ESI-MS, Karbonik anhidraz inhibisyonu.

Master Thesis

SUMMARY

BIOACTIVE PHENOLIC COMPOSITION OF SNOWBALL, EUROPEAN CORNEL, FOX GRAPE AND CHERRY LAUREL DETERMINED WITH LC-ESI-MS AND ON-LINE HPLC-ABTS METHODS

Ayça AKTAŞ

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Chemistry Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Murat KÜÇÜK
2012, 139 Pages

In this study, in order to determine antioxidant activity of the juices and seed and skin extracts prepared with three different solvents (methanol, acetonitrile, water) of the fruits snowball (*Viburnum opulus L.*), European cornel (*Cornus mas L.*), fox grape (*Vitis vinifera L.*) and cherry laurel (*Prunus laurocerasus L.*) grown in Eastern Black Sea Region, an on-line HPLC-ABTS method and off-line (classical) antioxidant activity determination methods, ABTS radical scavenging activity, iron (III) reducing / antioxidant power (FRAP) and total phenolic contents determination with Folin-Ciocalteu reagent were used. In addition, the identification of the structures of the phenolic components of the fruit juice and the seed methanol extract of snowball was made with the use of an HPLC-ESI-MS method. After the optimization of HPLC-UV method by using 14 standard phenolics, all the fruit extracts obtained were analyzed. 18 phenolic compounds in these extracts were identified by comparison of the retention time and mass spectra with those of the standards and with those of the phenolics reported in the literature. Among these, catechin, epicatechin, chlorogenic acid, procyanidin B2, and procyanidin trimer were determined to be the major peaks. Quite different antioxidant composition profiles were obtained from each of the extracts. According to all of the classical and the on-line antioxidant determination methods, the antioxidant activities of the seed extracts of snowball, European cornel and fox grape were higher than those of the skin extracts, while the skin extracts of cherry laurel fruit were determined to have higher activity. A linear correlation was determined between the results of the on-line and the off-line antioxidant/antiradical methods. In addition, the fruit juices and the aqueous extracts of all the fruits were found to inhibit clinically important carbonic anhydrase enzyme in 14-100% range.

Key Words: Snowball, European cornel, Fox grape, Cherry laurel, On-line HPLC-ABTS/DPPH, Antioxidant, Phenolic, HPLC-ESI-MS, Carbonic anhydrase inhibition.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.	E vitamini (5,7,8-Trimetiltokol [α -Tokoferol])'nin formülü	7
Şekil 2.	BHT (2,6 di-tert-butil-4 metil fenol [butillenmiş hidroksitoluen])'nin peroksil radikali ile reaksiyonu	8
Şekil 3.	2,2'-azinobis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS ⁺⁺) radikalinin formülü	13
Şekil 4.	ABTS ⁺⁺ radikal katyonunun absorpsiyon spektrumu	13
Şekil 5.	Demir (III)'ün indirgenme reaksiyonu	14
Şekil 6.	On-line HPLC-antioksidan aktivite belirleme sistemi	15
Şekil 7.	Örülü reaksiyon sisteminin oluşturulma şeması	16
Şekil 8	Karbonik anhidrazın esteraz aktivitesi ile katalizlediği <i>p</i> -nitrofenilin hidroliz reaksiyonu	18
Şekil 9.	HPLC sisteminin şematik diyagramı	20
Şekil 10.	UV-Vis dedektörün şematik diyagramı	22
Şekil 11.	Elektrosprey iyon kaynağının şematik diyagramı	23
Şekil 12.	Karayemiş (<i>Prunus laurocerasus</i> L.) meyvesi	24
Şekil 13.	Kızılcık (<i>Cornus mas</i> L.) meyvesi	25
Şekil 14.	Kokulu Üzüm (<i>Vitis vinifera</i> L.) meyvesi	26
Şekil 15.	Gilaburu (<i>Viburnum opulus</i> L.) meyvesi	26
Şekil 16.	Çözücü ekstraksiyon aparatı	28
Şekil 17.	On-line sistemin fotoğrafı. A: Radikal çözelti kabı, B: Radikal çözelti için pompa, C: Sistem kontrol, D: Direk UV dedektör, E: Reaksiyon zinciri, F: Antioksidan bileşenler için UV dedektör , G: HPLC çözücü pompaları, H: Kolon fırını	30
Şekil 18.	Çalışmada kullanılan fenolik bileşiklerin yapısı	38
Şekil 19.	Standart fenolik bileşiklerin 280 nm'deki HPLC-UV kromatogramları, 1. gallik asit, 2. 3,4-dihidroksibenzoik asit, 3. <i>p</i> -OH benzoik asit, 4. kateşin, 5. vanilik asit, 6. kaffeik asit, 7. siringik asit, 8. epikateşin, 9. vanilin, 10. 4-OH sinnamik asit, 11. rutin, 12. t-resveratrol, 13. kuersetin, 14. kaempferol. Enjeksiyon hacmi 20 μ L ve kolon sıcaklığı 25 $^{\circ}$ C	39
Şekil 20.	Gilaburu meyvesinin çekirdek kısmının metanol (GBCM), asetonitril (GBCA) ve sulu (GBCW) ekstraktlarının 280 nm'deki HPLC-UV kromatogramları	41

Şekil 21.	Gilaburu meyvesinin zar kısmının metanol (GBZM), asetonitril (GBZA) ve sulu (GBZW) ekstraktlarının 280 nm'deki HPLC-UV kromatogramları	42
Şekil 22.	Kızılcık meyvesinin çekirdek kısmının metanol (KZCM), asetonitril (KZCA) ve sulu (KZCW) ekstraktlarının 280 nm'deki HPLC-UV kromatogramları	44
Şekil 23.	Kızılcık meyvesinin zar kısmının metanol (KZZM), asetonitril (KZZA) ve sulu (KZZW) ekstraktlarının 280 nm'deki HPLC-UV kromatogramları	45
Şekil 24.	Kokulu üzüm meyvesinin çekirdek kısmının metanol (KUCM), asetonitril (KUCA) ve sulu (KUCW) ekstraktlarının 280 nm'deki HPLC-UV kromatogramları	47
Şekil 25.	Kokulu üzüm meyvesinin zar kısmının metanol (KUZM), asetonitril (KUZA) ve sulu (KUZW) ekstraktlarının 280 nm'deki HPLC-UV kromatogramları	48
Şekil 26.	Karayemiş meyvesinin çekirdek kısmının metanol (KYCM), asetonitril (KYCA) ve sulu (KYCW) ekstraktlarının 280 nm'deki HPLC-UV kromatogramları	50
Şekil 27.	Karayemiş meyvesinin zar kısmının metanol (KYZM), asetonitril (KYZA) ve sulu (KYZW) ekstraktlarının 280 nm'deki HPLC-UV kromatogramları	51
Şekil 28.	Gilaburu (GBS), kıızılcık (KZS), kokulu üzüm (KUS) ve karayemiş (KYS) meyvelerinin meyve suyu kısımlarının 280 nm'deki HPLC-UV kromatogramları	53
Şekil 29.	Standart fenolik bileşiklerin on-line analizleri (bütün bileşiklerin konsantrasyonu 20 ppm). A: 280 nm'deki UV kromatogram, B: 414 nm'deki ABTS radikal temizleme kromatogramı, C: 521 nm'deki DPPH radikali temizleme kromatogramı. Tanımlama: 1. gallik asit, 2. 3,4-dihidroksibenzoik asit, 3. <i>p</i> -OH benzoik asit, 4. kateşin, 5. vanilik asit, 6. kaffeik asit, 7. siringik asit, 8. epikateşin, 9. vanilin, 10. 4-OH sinnamik asit, 11. rutin, 12. t-resveratrol, 13. kuersetin, 14. kaempferol	55
Şekil 30.	A: Gilaburu meyvesinin çekirdek kısmının metanollü (GBCM) ekstraktının farklı konsantrasyonlarının (stok ve 0.5, 0.3, 0.1 oranında seyreltilmiş) 280 nm'deki on-line HPLC-UV kromatogramları, B: Farklı konsantrasyonlardaki bu numunenin 414 nm'deki on-line HPLC-ABTS kromatogramları	56
Şekil 31.	Gilaburu meyvesinin meyve suyunun (GBS) on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı, C: 521 nm'deki DPPH radikali temizleme kromatogramı	58
Şekil 32.	Gilaburu meyvesinin çekirdek kısmının metanollü (GBCM) ekstraktının on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı, C: 521 nm'deki DPPH radikali temizleme kromatogramı	59

Şekil 33.	Gilaburu meyvesinin zar kısmının metanollü (GBZM) ekstraktının on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı	60
Şekil 34.	Gilaburu meyvesinin çekirdek kısmının asetonitrilli (GBCA) ekstraktının on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı	61
Şekil 35.	Gilaburu meyvesinin zar kısmının asetonitrilli (GBZA) ekstraktının on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı	62
Şekil 36.	Gilaburu meyvesinin çekirdek kısmının sulu (GBCW) ekstraktının on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı	63
Şekil 37.	Gilaburu meyvesinin zar kısmının sulu (GBZW) ekstraktının on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı	64
Şekil 38.	Kızılcık meyvesinin meyve suyunun (KZS) on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikal temizleme kromatogramı	66
Şekil 39.	Kızılcık meyvesinin çekirdek kısmının 1:10 seyreltilmiş metanollü ekstraktının (KZCM) on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı	67
Şekil 40.	Kızılcık meyvesinin zar kısmının metanollü ekstraktının (KZZM) on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı	68
Şekil 41.	Kızılcık meyvesinin çekirdek kısmının 1:10 seyreltilmiş asetonitrilli ekstraktının (KZCA) on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı	69
Şekil 42.	Kızılcık meyvesinin zar kısmının asetonitrilli ekstraktının (KZZA) on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı	70
Şekil 43.	Kızılcık meyvesinin çekirdek kısmının sulu ekstraktının (KZCW) on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı	71
Şekil 44.	Kızılcık meyvesinin zar kısmının sulu ekstraktının (KZZW) on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı	72
Şekil 45.	Kokulu üzüm meyvesinin meyve suyunun (KUS) on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı	74

Şekil 46.	Kokulu üzüm meyvesinin çekirdek kısmının 1:10 seyreltilmiş metanollü ekstraktının (KUCM) on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı	75
Şekil 47.	Kokulu üzüm meyvesinin zar kısmının metanollü ekstraktının (KUZM) on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı	76
Şekil 48.	Kokulu üzüm meyvesinin çekirdek kısmının asetonitrilli ekstraktının (KUCA) on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı ..	77
Şekil 49.	Kokulu üzüm meyvesinin zar kısmının asetonitrilli ekstraktının (KUZA) on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı	78
Şekil 50.	Kokulu üzüm meyvesinin çekirdek kısmının sulu ekstraktının (KUCW) on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı	79
Şekil 51.	Kokulu üzüm meyvesinin zar kısmının sulu ekstraktının (KUZW) on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı	80
Şekil 52.	Karayemiş meyvesinin meyve suyunun (KYS) on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı	82
Şekil 53.	Karayemiş meyvesinin çekirdek kısmının metanollü ekstraktının (KYCM) on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı ..	83
Şekil 54.	Karayemiş meyvesinin zar kısmının metanollü ekstraktının (KYZM) on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı	84
Şekil 55.	Karayemiş meyvesinin çekirdek kısmının asetonitrilli ekstraktının (KYCA) on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı ..	85
Şekil 56.	Karayemiş meyvesinin zar kısmının asetonitrilli ekstraktının (KYZA) on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı	86
Şekil 57.	Karayemiş meyvesinin çekirdek kısmının sulu ekstraktının (KYCW) on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı	87
Şekil 58.	Karayemiş meyvesinin zar kısmının sulu ekstraktının (KYZW) on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı	88
Şekil 59.	Kuersetin-heksozun %10 CID ile elde edilen kütle spektrumu	90

Şekil 60.	Kuersetin-deoksiheksozun %10 CID ile elde edilen kütle spektrumu	90
Şekil 61.	Kuersetin-heksoz+pentozun %10 CID ile elde edilen kütle spektrumu	91
Şekil 62.	Prosiyanidin dimerin %10 CID ile elde edilen kütle spektrumu	92
Şekil 63.	Gilaburunun meyve suyunda gözlenen prosiyanidin dimer (m/z 577 akb) için ekstrakte iyon kromatogramı	92
Şekil 64.	Prosiyanidin trimerin %10 CID ile elde edilen kütle spektrumu	93
Şekil 65.	Kateşinin %10 CID ile elde edilen kütle spektrumu	94
Şekil 66.	Epikateşinin %10 CID ile elde edilen kütle spektrumu	94
Şekil 67.	Rutin %10 CID ile elde edilen kütle spektrumu	95
Şekil 68.	Klorojenik asitin %10 CID ile elde edilen kütle spektrumu	96
Şekil 69.	Dikaffeik asitin %10 CID ile elde edilen kütle spektrum	96
Şekil 70.	Gilaburunun meyve suyunun (GBS) HPLC-UV kromatogramları, I: 280 nm'deki kromatogram, II: 280 nm'deki büyütülmüş kromatogram, III: 280 nm'deki uzun gradientli kromatogram	98
Şekil 71.	Gilaburunun çekirdek kısmının metanolik (GBCM) ekstraktının HPLC-UV kromatogramları, A: 280 nm'deki kromatogram, B: 280 nm'deki büyütülmüş kromatogram	100
Şekil 72.	ABTS yöntemine göre, kullanılan standartların konsantrasyon-absorbans grafikleri	104
Şekil 73.	Gilaburu meyvesinin bütün ekstraktlarının ve kullanılan standartların 734 nm'deki absorbansa dayalı ABTS radikali temizleme aktivitesi tayini sonucu elde edilen SC ₅₀ değerleri (birim, standartlar için mg/mL, numuneler için seyrelme oranı)	105
Şekil 74.	ABTS yöntemine göre, gilaburu meyvesinin bütün ekstraktlarındaki seyrelme oranı-absorbans grafikleri	106
Şekil 75.	Kızılcık meyvesinin bütün ekstraktlarının ve kullanılan standartların 734 nm'deki absorbansa dayalı ABTS radikali temizleme aktivitesi tayini sonucu elde edilen SC ₅₀ değerleri (birim, standartlar için mg/mL, numuneler için seyrelme oranı)	107
Şekil 76.	ABTS yöntemine göre, kıızılcık meyvesinin bütün ekstraktlarındaki seyrelme oranı-absorbans grafikleri	108
Şekil 77.	Kokulu üzüm meyvesinin bütün ekstraktlarının ve kullanılan standartların 734 nm'deki absorbansa dayalı ABTS radikali temizleme aktivitesi tayini sonucu elde edilen SC ₅₀ değerleri (birim, standartlar için mg/mL, numuneler için seyrelme oranı)	109
Şekil 78.	ABTS yöntemine göre, kokulu üzüm meyvesinin bütün ekstraktlarındaki seyrelme oranı-absorbans grafikleri	110

Şekil 79.	Karayemiş meyvesinin bütün ekstraktlarının ve kullanılan standartların 734 nm'deki ABTS radikali temizleme aktivitesi analizi sonucu elde edilen SC ₅₀ değerleri (mg/mL)	111
Şekil 80.	ABTS yöntemine göre, karayemiş meyvesinin bütün ekstraktlarındaki seyrelme oranı-absorbans grafikleri	112
Şekil 81.	FRAP yöntemine göre, Trolox konsantrasyonu-absorbans grafiği	113
Şekil 82.	Gilaburu meyvesinin bütün ekstraktlarının Fe (III) indirgeme / antioksidan kuvveti (FRAP) değerleri (µM TEAC; Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite)	114
Şekil 83.	Kızılcık meyvesinin bütün ekstraktlarının Fe (III) indirgeme / antioksidan kuvveti (FRAP) değerleri (µM TEAC; Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite)	115
Şekil 84.	Kokulu üzüm meyvesinin bütün ekstraktlarının Fe (III) indirgeme / antioksidan kuvveti (FRAP) değerleri (µM TEAC; Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite)	116
Şekil 85.	Karayemiş meyvesinin bütün ekstraktlarının Fe (III) indirgeme / antioksidan kuvveti (FRAP) değerleri (µM TEAC; Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite)	117
Şekil 86.	Folin-Ciocalteu yöntemine göre gallik asit (GA) konsantrasyon-absorbans grafiği	118
Şekil 87.	Folin-Ciocalteu yöntemine göre kateşin konsantrasyon-absorbans grafiği .	119
Şekil 88.	Folin-Ciocalteu yöntemine göre gilaburu meyvesinin bütün ekstraktlarının gallik asit eşdeğeri (GAE, µg/mL) cinsinden toplam fenolik madde miktarları	119
Şekil 89.	Folin-Ciocalteu yöntemine göre gilaburu meyvesinin bütün ekstraktlarının kateşin eşdeğeri (KE, µg/mL) cinsinden toplam fenolik madde miktarları	120
Şekil 90.	Folin-Ciocalteu yöntemine göre kıızılcık meyvesinin bütün ekstraktlarının gallik asit eşdeğeri (GAE, µg/mL) cinsinden toplam fenolik madde miktarları	121
Şekil 91.	Folin-Ciocalteu yöntemine göre kıızılcık meyvesinin bütün ekstraktlarının kateşin eşdeğeri (KE, µg/mL) cinsinden toplam fenolik madde miktarı ...	122
Şekil 92.	Folin-Ciocalteu yöntemine göre kokulu üzüm meyvesinin bütün ekstraktlarının gallik asit eşdeğeri (GAE, µg/mL) cinsinden toplam fenolik madde miktarları	123
Şekil 93.	Folin-Ciocalteu yöntemine göre kokulu üzüm meyvesinin bütün ekstraktlarının kateşin eşdeğeri (KE, µg/mL) cinsinden toplam fenolik madde miktarları	124

Şekil 94.	Folin-Ciocalteu yöntemine göre karayemiş meyvesinin bütün ekstraktlarının gallik asit eşdeğeri (GAE, $\mu\text{g/mL}$) cinsinden toplam fenolik madde miktarları	125
Şekil 95.	Folin-Ciocalteu yöntemine göre karayemiş meyvesinin bütün ekstraktlarının kateşin eşdeğeri (KE, $\mu\text{g/mL}$) cinsinden toplam fenolik madde miktarları	126
Şekil 96.	Bütün numunelerin on-line HPLC-ABTS kromatogram alanı ile off-line %ABTS temizleme tayin sonuçlarının karşılaştırma grafiği	127
Şekil 97.	Bütün meyvelerin meyve suları ve çekirdek ve zar kısımlarının sulu ekstraktlarının sığır karbonik anhidraz enzimi %inhibisyonları	128

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. En sık karşılaşılan serbest radikaller ve bazı özellikleri	3
Tablo 2. Antioksidanlar ve reaksiyonları	6
Tablo 3. Bazı polifenollerin kimyasal yapısı	10
Tablo 4. Numune kodları	28
Tablo 5. Geliştirilen HPLC-UV metodunun parametreleri	39
Tablo 6. Gilaburunun meyve suyu ve çekirdek kısmının metanollü ekstraktının LC-ESI-MS ile çarpışma kaynaklı ayrışma sayesinde tespit edilen moleküler iyon ([M-H] ⁻) m/z değerleri ve başlıca fragmentler	89
Tablo 7. Gilaburunun meyve suyunda (GBS) HPLC-ESI-MS ile tespit edilen fenolik bileşikler	99
Tablo 8. Gilaburunun çekirdek kısmının metanollü ekstraktındaki (GBCM) HPLC-ESI-MS ile tespit edilen fenolik bileşikler	101
Tablo 9. Bütün numunelerin çalışmada kullanılan yöntemlerdeki çözücüye göre aktivite sıralaması	131

SEMBOLLER DİZİNİ

ABTS	2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
APCI	Atmosferik Basınç Kimyasal İyonlaşma
BCA	Sığır Karbonik Anhidraz
BHA	Butillenmiş Hidroksi Anisol
BHT	Butillenmiş Hidroksi Toluen
CA	Karbonik Anhidraz
CID	Çarpışmadan Kaynaklanan Ayrışma
CUPRAC	Cu(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite
C18	Oktadesil
DAD	Diyot Serili Dedektör
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPPH	2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
ESI	Elektro Sprey İyonlaştırma
EU	Enzim Ünitesi
FRAP	Demir (III) İndirgeme / Antioksidan Kuvvet
GAE	Gallik Asit Eşdeğeri
GSH-Px	Glutasyon Peroksidaz
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HPLC-MS	Yüksek Performanslı Sıvı kromatografisi-Kütle Spektrometrisi
HPLC-UV	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi-Ultraviyole Dedektör
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
KE	Kateşin Eşdeğeri
kV	Kilo Volt
LC-MS	Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi
LC-UV-ESI-MS	Sıvı Kromatografisi-Ultraviyole-Elektro Sprey İyonlaştırma-Kütle Spektrometrisi
MS	Kütle Spektrometrik Dedektör
ORAC	Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz
ppm	Milyonda Kısım

PTFE	Politetrafloroetilen
PVDF	Polivinildiflorür
RP	Ters Faz
RP-LC	Ters Faz- Sıvı Kromatografisi
RSD	Bağıl Standart Sapma
RT	Tutulma Zamanı
SC ₅₀	%50 Temizleme Konsantrasyonu
SOD	Süperoksit Dismutaz
SOR	Serbest Oksijen Radikalleri
TEAC	Trolox Eşdeğeri Antioksidan Kapasite
TF	Toplam Fenolik
TPTZ	(2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazin
TRAP	Total Radikal Yakalama Antioksidan Kapasitesi
UV	Ultraviyole
Vis	Görünür

1. GENEL BİLGİLER

1.1.Giriş

Doğal kaynaklı bileşenlerin çeşitliliği ve modern tıpta kullanılan ilaçların çoğunun bitki kökenli oluşu araştırmacıları giderek artan miktarda tıbbi bitkilere çekmektedir. Bitki ekstraktlarındaki biyoaktif bileşenlerin belirlenmesi ve yapılarının aydınlatılması eskiden olduğu gibi klasik yöntemlerle yapılmaya devam ederken, daha hızlı ve az maliyetli yeni yöntemlerin geliştirilmesi sağlanmıştır. Günümüzde farklı dedektörlerle (UV, MS) kombine edilen on-line-HPLC ile biyoaktivitenin aynı anda ölçüldüğü yöntemler geliştirilmiştir. Bu açıdan antioksidan bileşenlerin belirlenmesi için ilk geliştirilen yöntemler arasında DPPH ve ABTS radikalini temizleme aktivitesine dayalı on-line HPLC çalışmaları literatürde giderek artmaktadır. ABTS ve DPPH radikalleri nispeten kararlı yapılardır ve bu sebeple de antioksidan testlerde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Mevcut çalışmanın amacı da çalışılan meyve ekstraktlarındaki bileşenlerin etkin bir şekilde ayrılması ve ayrılan bileşenlerin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi için kromatografik şartların optimize edilmesidir.

Doğu Karadeniz Bölgesi'nde yetişen gilaburu, kızılıçık, kokulu üzüm ve karayemiş meyvelerinin meyve sularında ve çekirdek ve zar kısımlarının farklı çözücüler (metanol, asetonitril, su) ile hazırlanan ekstraktlarında on-line HPLC-ABTS ile antioksidan aktivitenin belirlenmesinin yanı sıra ayrıca off-line (klasik) antioksidan aktivite yöntemleriyle de antioksidan aktivite belirlenip, testler arasındaki korelasyon incelendi. Gilaburu meyve suyunda ve çekirdek kısmının metanollü ekstraktındaki fenolik bileşiklerin yapısı HPLC-ESI-MS ile aydınlatıldı.

Çalışmada aynı zamanda bütün meyvelerin meyve suyu ve sulu ekstraktlarında literatürde pek çalışılmamış olan sığır eritrosit karbonik anhidraz %inhibisyon değerleri belirlendi.

Birçok çalışmada meyve ve sebze ağırlıklı beslenmenin kardiyovasküler hastalıkları, kanser oluşumunu ve diğer yaşlanmayla ilgili hastalıkları engellediği gösterilmiştir (Yao vd., 2004). Bu açıdan çalışılan meyvelerin antioksidan özelliklerinin belirlenmesi ve fenolik bileşenlerinin aydınlatılması çalışmaları değerli yapmaktadır.

1.2. Oksidatif Stres ve Antioksidanlar

Oksijen, oksidasyon tepkimelerinde rol alması nedeniyle canlılar için hayati önemi olan bir moleküldür. Hücresel yapılar için yüksek konsantrasyondaki oksijen molekülü toksik olması sebebiyle hücreyi risk altına almaktadır. Ancak anaerobik canlılar da dahil olmak üzere toksik etkili olan moleküler oksijen değil, tam indirgenmemiş oksijen metabolitleri olan serbest oksijen radikalleridir. Radikal metabolitler, aslında aerobik organizmaların kaçınılmaz bileşikleri olup hücrelerde kontrollü kullanımları ile bir dizi enzimin sentezi ve birçok organizmanın antibakteriyel savunmasında önemlidir. Ancak radikal reaksiyonlarını kontrol ederek belli bir düzeyin üstüne çıkmasını engelleyen yani serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunmak için bunları nötralize eden antioksidan unsurlar bulunmaktadır. Vücudumuzda serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların antioksidanlar tarafından nötralize edilme hızı arasında bir denge bulunmaktadır (Halliwell, 1999). Organizma bu dengeyi sağladığı sürece serbest radikallerden etkilenmemektedir. Eğer bu denge serbest radikaller lehine bozulursa hücrede serbest radikaller artar. Serbest radikallerin hücrede artışı ve hücre fonksiyonları üzerinde yaptığı olumsuz etkiye 'oksidatif stres' denir.

Oksidatif stresin dejeneratif hastalıkların gelişiminde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Nöronlardaki, yani sinir-beyin hücrelerindeki oksidatif stres kendini Alzheimer ve Parkinson hastalığı gibi nöro-dejeneratif hastalıklar olarak göstermektedir. Oksidatif hasar damar iç yüzeyindeki hücrelerde ise ateroskleroz denilen damar sertliğinin gelişiminde rol alarak kalp-damar, beyin-damar ve diğer damar hastalıklarına neden olmaktadır. Hücre DNA (deoksiribonükleik asit)'sına gelen oksidatif hasar ise kanser gelişimine yol açmaktadır (Robbins ve Cotron, 2010).

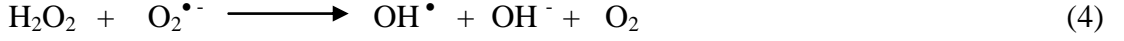
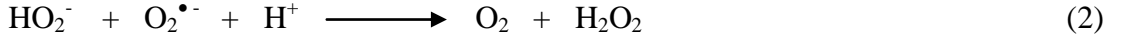
Serbest radikaller, dış atomik orbitallerinde bir veya daha fazla çift oluşturmamış elektron içeren yüksek enerjili, kararlı olmayan atom ve moleküllerdir. Serbest radikallerdeki bu ortaklanmamış elektron serbest radikallere büyük bir reaktiflik kazandırarak hücredeki protein, lipid, DNA ve nükleotid koenzimler gibi birçok biyolojik metabolite zarar vermektedir (Halliwell, 1996). Serbest radikaller uzun yıllar yüksek enerji fizikçileri ve radyasyon biyologlarının ilgi alanı olarak algılanmış ve çok daha sonra normal metabolizmaya ait bir ürün olduğu anlaşılmıştır. Günümüzde radikallerin hücre molekülerinde değişimlere ve gen mutasyonlarına yol açtığı ve bunların yanı sıra yaşlanma, hücresel hasar ve doku yıkımında rol aldığı kabul edilmektedir (Storz ve Imlayt,

1999). Radikaller, oksijen içerip içermediğine göre, serbest oksijen radikalleri (SOR) ve oksijen içermeyen radikaller olarak ikiye ayrılır (Dündar ve Aslan, 2000). İçerdiği iki eşleşmemiş elektrondan dolayı moleküler oksijenin kendisi de aynı zamanda “biradikal” olup diğer radikallerle kolayca reaksiyon verebilme yeteneğine sahiptir. Moleküler oksijen organizmalar için indirgenmiş karbon bileşiklerinin oksidasyonunda enerji oluşturmak üzere kullanılan en son elektron alıcısı olup tam olarak suya indirgenebilmesi için dört elektrona ihtiyaç duymaktadır. Biyolojik sistemlerde sıklıkla oluşabilen serbest oksijen radikalleri Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1. En sık karşılaşılan serbest radikaller ve bazı özellikleri

Serbest Radikalin ve Radikal Üreten Türün		
Adı	Simgesi	Kimliği
Hidrojen radikali	H•	Bilinen en basit radikal
Süperoksit radikali	O ₂ • ⁻	Oksijen metabolizmasının ilk ara ürünü
Hidroksil radikali	OH•	En toksik (reaktif) oksijen metaboliti radikali
Hidrojen peroksit	H ₂ O ₂	Reaktivitesi çok düşük, moleküler hasar yeteneği zayıf
Singlet oksijen	¹ O ₂	Yarılanma ömrü kısa, güçlü oksidatif form
Perhidroksil radikali	HO ₂ •	Lipidlerde hızlı çözünerek lipid peroksidasyonunu artırmaktadır
Peroksil radikali	ROO•	Perhidroksile oranla daha zayıf etkili, lipidlere lokalize olma yeteneği
Triklorometil radikali	CCl ₃ •	CCl ₄ metabolizması ürünü, karaciğerde üretilen bir radikal
Tiyil radikali	RS•	Sülfürlü ve çiftlenmemiş elektron içeren türlerin genel adı
Alkoksil radikali	RO•	Organik peroksitlerin yıkımı ile üretilen oksijen metaboliti
Azot monoksit	NO•	L-argininden <i>in vivo</i> üretilir
Azot dioksit	NO ₂	NO'in oksijen ile reaksiyonundan üretilir

Serbest radikallerin oksijenle reaksiyonu oldukça hızlıdır ve biyolojik sistemlerde bulunan serbest radikallerin çoğu oksijenden oluşan radikallerdir. Moleküler oksijenin bir elektron almasıyla süperoksit (O₂•⁻), iki elektron almasıyla hidrojen peroksit (H₂O₂), üç elektron almasıyla ise hidroksil (OH•) radikali oluşmaktadır .



Oksijen bazı demir-kükürt içeren yükseltgenme-indirgenme enzimleri ve flavoproteinler tarafından indirgenir. Süperoksit radikali, diğer radikallere oranla daha az toksik etkiye sahiptir ve yüklü olduğu için hücre membranından doğrudan geçemez. Ancak eritrosit membranlarındaki anyon kanalından geçebilir. Süperoksit radikalının kendisi tek başına zarar vermezken, süperoksitin nitrik oksit ile reaksiyonu sonucu peroksinitrit denilen reaktif bir oksijen türevini oluşturur.

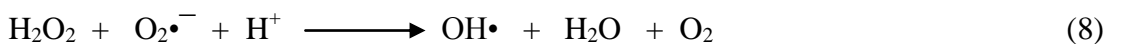


Peroksinitrit doğrudan proteinlere zararlı etkilerinin yanı sıra, azot dioksit (NO_2^\bullet) radikali, hidroksil radikali (OH^\bullet) ve nitronyum iyonu (NO_2^+) gibi farklı toksik ürünlere dönüşür. Süperoksit radikali kuvvetli bir indirgeyici ajandır. Özellikle hem grupları, Fe-S grupları ile ve prostetik grup olarak geçiş metalleri (Fe, Cu gibi) içeren gruplarla etkileşim gösterir.

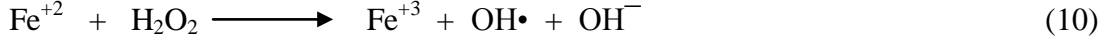
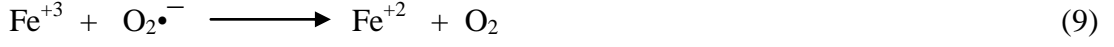


Bakırlı bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD), çok reaktif olan ve hücre hasarına yol açan süperoksiti hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijene çevirir. Süperoksitten daha az etkili olan hidrojen peroksit ise dokularda bulunan katalaz, peroksidaz ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi enzimler tarafından su ve oksijen gibi daha zayıf etkili ürünlere dönüştürülür.

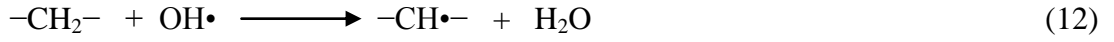
Cu^{+2} gibi geçiş metalleri ve radikal türlerle daha kolay reaksiyona giren süperoksit, hidrojen peroksit ile “Haber-Weiss” tepkimesini vererek oldukça toksik ve aktif olan hidroksil radikalini oluşturur.



Demir iyonları katalizörlüğünde ise “Fenton tepkimesi” gerçekleşir ve reaksiyon ortalama 4000 kez hızlanır.



Hidroksil radikali bütün oksijen türleri arasında reaktivitesi en yüksek olandır ve yarılanma ömrü çok kısadır. Canlı sistemlerde oluştukları anda büyük hasara sebep olur. Proteinlerde sülfhidril grupları ve yağ asitleri, bu radikallerin etkisinde kaldıklarında farklı reaktivitelere sahip ikincil radikaller oluştururlar.



Hücre ve dokular, radikal ürünleri ve reaksiyonlarını inhibe eden bir sisteme sahiptir. Serbest radikallerle reaksiyona girerek onlarla bağ oluşturup otooksidasyon veya peroksidasyonun ilerlemesini önleyen maddelere antioksidan denir. Antioksidan savunma sisteminin görevi herhangi bir yolla oluşan radikalın reaktif karakterine bağlı olarak biyomoleküllere ve hücresel yapılara saldırmasını önlemektir. Antioksidan maddeler başlıca altı mekanizma ile çalışırlar. Bunlar; (a) oluşan serbest radikalleri toplayıcı ve giderici etkileri ile bağlayarak veya kararlı hale getirerek, (b) zincir kırıcı etki ile serbest radikal üreten kimyasal reaksiyonları durdurarak, (c) baskılayıcı etki ile reaksiyon hızını azaltarak, (d) onarıcı etki ile lipid, protein ve DNA gibi yapılarda oluşmakta olan biyolojik moleküler hasarı rejenere ederek, (e) hücresel kinaz kayıplarını önleyerek oksidasyon reaksiyonlarını durdurarak ve (f) organizmadaki SOD gibi antioksidan enzimler ile enzimatik olmayan antioksidanların sentezini artırarak etkilerini gösterirler. Birçok bilimsel araştırma antioksidanların kanser ve kalp hastalığı gibi kronik hastalıkların riskini azalttığını göstermektedir (Miller vd., 2000; Visioli, 1995; Schwenke, 1998; Aruoma, 1998).

Antioksidan maddelerin bir kısmını özellikle yediğimiz meyve ve sebzeler aracılığıyla vücudumuza alırken, bir kısmını ise vücudun kendisi serbest radikallere karşı bir savunma sistemi olarak üretir. Vücudun serbest radikallere karşı savunma olarak ürettiği antioksidanlara endojen antioksidanlar, dışarıdan alınanlara ise ekzojen antioksidanlar denir. Endojen antioksidanlar enzimatik etki gösteren ve enzimatik etki

göstermeyen antioksidanlar olarak ikiye ayrılır. Ekzojen antioksidanlar ise doğal ve yapay antioksidanlar olarak iki gruba ayrılabilir. Endojen antioksidanlar daha spesifik roller yüklendiği çalışmalarda intraselüler, membransal ve ekstraselüler olarak üç gruba ayrılırlar (Tablo 2).

Tablo 2. Antioksidanlar ve reaksiyonları

Türü	Antioksidan	Reaksiyonu
İntraselüler antioksidanlar	Süperoksit dismutaz	Süperoksidin giderilmesi reaksiyonlarında katalizör
	Katalaz	H ₂ O ₂ ' nin yüksek konsantrasyonlarının giderilmesini katalizler
	Glutasyon peroksidaz	H ₂ O ₂ ' nin düşük konsantrasyonlarının giderilmesinde kullanılır
	Stokrom oksidaz	Oksijen indirgenmesi basamaklarında reaktif tür oluşumunu önler
Membransal antioksidanlar	E Vitamini	Membran lipidlerinde çözünerek peroksidasyon zincirini kırar
	β karoten	Radikal türleri toplar, ayrıca singlet oksijen oluşumunu inhibe eder
	Koenzim Q	Mitokondriyel enerji metabolizmasında bir antioksidan
Ekstraselüler antioksidanlar	Askorbik asit	Hidroksil radikal giderici
	Laktoferrin	Düşük pH'lı ortamlarda demir iyonlarını bağlar
	Albumin	Hem proteini ve bakır metal iyonlarını bağlar
	Bilirubin	Önemli bir peroksil radikali toplayıcısıdır
	Ürik asit	Genelde metal bağlayıcı olarak çalışırken değişik radikalleri de toplar
	Serüloplazmin	Süperoksit radikalini nötralize eder, bakır iyonlarını bağlar

Reaktif oksijen metabolitleri, SOD, GSH-Px, katalaz ve sitokrom oksidaz gibi selüler antioksidan enzimlerce indirgenir (Dekkers, 1996). SOD, organizmada substrat olarak serbest radikal kullanan tek enzim olup süperoksidin H₂O₂'e ve oksijene dönüşümünü katalizler.

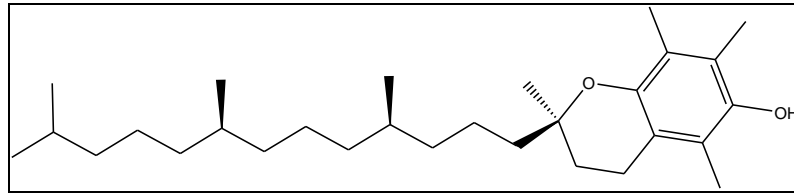


Hidrojen peroksit ise GSH-Px ve katalaz katalizörlüğünde aynı reaksiyonlarla indirgenir.



Diğer bir selüler antioksidan enzim olan strom oksidaz, mitokondriyal elektron transport zincirinde üretilen reaktif oksijen metabolitlerini mitokondri aktif merkezinde bloke ederek salınımını engeller. Bunu yaparken demir bakır gibi oksidan metal iyonlarını oluşturduğu bir havuzcukta toplar. Antioksidan enzimlerden SOD aktivitesi, bakır, çinko ve mangan ile, GSH-Px ise selenyum elementleri ile ilişkilidir. Bu enzimlerin toksik karakterli indirgenme ürünlerini elimine etmeleri, hücrelerin normal metabolizması sürdükçe gerçekleşen bir aktivitedir. Glutasyon, bilirubin, radikal tutucu özelliği ile ürik asit, albumin, bakır iyonlarını bağlayarak metal katalizli reaksiyonları sınırlayan seruloplazmin, hemoglobin, ferritin birer endojen kaynaklı enzimatik olmayan antioksidanlardır.

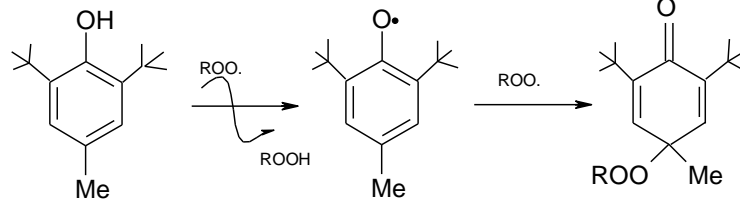
Sadece zarlarda aktif bir antioksidan olan E vitamini (Şekil 1), lipid peroksidasyonunun erken aşamasında serbest radikal türlerini yok ederek ya da oluşumlarını engelleyerek zar fosfolipidlerindeki çoklu doymamış yağ asitlerini oksidanların zararlı etkilerinden koruyarak oksidatif strese karşı ilk savunma hattını oluşturur (Kaczmariski, 1999). E vitamini, radikallerin yok edilmesi, zincirin kırılması, baskılama, bozulan yapıların onarılması ve endojen savunma sistemlerinin güçlendirilmesi gibi mekanizmaların tamamını kullanarak antioksidan görevini yerine getirdiğinden antioksidan kapasitesi çok geniş ve yüksektir.



Şekil 1. E vitamini (5,7,8-Trimetiltokol [α -Tokoferol])'nin formülü

Sentetik olarak üretilen ve daha çok antioksidan aktivite tayinlerinde standart olarak kullanılan Trolox, rutin, butillenmiş hidroksi toluen (BHT), butillenmiş hidroksi anisol (BHA) gibi antioksidanlar da mevcuttur. Peroksil radikaliyle iki aşamada etkileşerek çok

daha az reaktif ürünlere dönüştüren 2,6 di-tert-butil-4 metil fenol yani BHT önemli bir sentetik antioksidandır (Şekil 2).



Şekil 2. BHT (2,6 di-tert-butil-4 metil fenol [butillenmiş hidroksitoluen])'nin peroksil radikali ile reaksiyonu

1.3. Doğal Ürünlerdeki Biyoaktif Fenolik Bileşikler

Bitkisel kökenli bütün gıdalarda daima, farklı nitelikte ve miktarda çeşitli fenolik bileşikler bulunmaktadır. Fenolik bileşikler meyve ve sebzelerin kendilerine özgü buruk tadını verir. Fenolik bileşikler veya polifenoller, bitkilerde en fazla bulunan sekonder metabolitler olup günümüzde 8000'den fazla fenolik yapının bulunduğu belirtilmektedir (Harborne J. B, 1993). Fenolik bileşiklerin yapısı altı üyeli aromatik halkaya bağlı bir hidroksil grubu (-OH) şeklindedir. Bitkilerde bol miktarda bulunan fenolik bileşikler fenolik asitler ve flavonoidler olarak iki gruba ayrılırlar. Fenolik asitler de başlıca hidroksibenzoik ve hidroksisinamik asitler olarak ikiye ayrılırlar. Hidroksibenzoik asitler C₆-C₁ fenilmetan yapısında olup, bunlar gallik asit, protokatekuik asit, *p*-hidroksibenzoik asit ve vanilik asit gibi asitlerdir. Hidroksisinamik asitler ise C₆-C₃ fenilpropan yapısındadır. Fenilpropan halkasına bağlanan OH grubunun konumu ve yapısına göre farklı özellikler gösterirler. Çok yaygın bulunanları kafeik asit, ferulik asit, *p*-kumarik asit ve *o*-kumarik asitlerdir.

Flavonoidler gıdalarda en yaygın bulunan polifenoller olup bitkileri UV ışıklarına ve mikroorganizmalara karşı korurlar. Flavonoidler birçok sebze ve meyvede bol miktarda bulunurlar (Williams vd., 2004). Flavonoidler 3 karbonlu zincir ile bağlı iki benzen halkasını içeren C₆-C₃-C₆ iskeletinde bileşiklerdir. Flavonoidlerin yapısındaki OH grupları, reaktif özelliklerinden dolayı kolaylıkla glikozillenir. Yapısal olarak antosiyanidinler, flavonlar ve flavonoller, flavanonlar, flavon-3-ol'ler ve proanthosiyanidinler olarak beş farklı gruba ayrılırlar. Bunlardan antosiyanidinler doğada serbest halde bulunmazlar,

şekerlerle glikozit yapmış olarak bulunurlar ve antosiyanin adını alırlar. Antosiyaninler meyve ve sebzelerin pembe, kırmızı ve mor tondaki çeşitli renklerini veren suda çözünebilir nitelikteki renk pigmentleridir. Bunlar bir aglikon (antosiyanidin), şeker ve bazen fenolik ve minor asitlerden oluşur. Bağlanan şekerlere ve bağlanma pozisyonuna göre adlandırılırlar. Şeker kısmı genellikle ramnoz, galaktoz, ksiloz ve arabinozdan meydana gelir. Meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunan antosiyanidinler; pelargonidin, siyanidin, peonidin, delfinidin, petunidin ve malvinidindir. Flavonlar ve flavonollar da antosiyanidinler gibi şekerlerle glikozit halinde bağlanmış olarak bulunurlar.

Flavon-3-ol'ler üçüncü karbon atomunda bir OH grubu içerirler. Hem kimyasal hem de enzimatik olarak hava oksijeni ile kolaylıkla kondanse olarak proantosiyanidinleri oluştururlar. Tablo 3'de bazı polifenollerin kimyasal yapısı ve isimleri gösterilmiştir.

Fenolik asitler, polifenoller ve flavanoidler gibi antioksidanlar serbest radikallerle reaksiyona girerek birçok hastalığın oluşumunu engellerler (Garcia-Lafuente vd., 2009; Pop-Schwerin, 2010). Birçok çalışmada meyve ve sebze ağırlıklı beslenmenin kardiyovasküler hastalıkları, kanser oluşumunu ve diğer yaşlanmayla ilgili hastalıkları engellediği gösterilmiştir (Yao vd., 2004; Duthie vd., 2000).

Bu olumlu etkiler özellikle meyve ve sebzelerde bolca bulunan polifenoller, flavonoidler, karotenoidler, antosiyaninler, askorbik asit (C vitamini) ve α -tokoferol (E vitamini) gibi antioksidan aktivite gösteren çeşitli bileşiklerin varlığında oluşur. Son zamanlarda araştırmaların odak noktası olan fenolik bileşiklerin tayini için pek çok analiz metodları geliştirilmiştir. Ultraviyole (UV) veya kütle spektrometrisi (MS) dedeksiyonuyla birlikte ters faz- sıvı kromatografisi (RP-LC) doğal ürünlerdeki fenolik bileşiklerin tayininde kullanılan en önemli analiz metodudur. Metod da fenollerin ayrılması için mobil faz olarak çoğunlukla metanol veya asetonitril ve asitle modifiye edilmiş su fazlarıyla çalışan C_{18} apolar kolonlar kullanılmaktadır (Lindsay, 1987). Sıklıkla kullanılan asitler ise formik asit, asetik asit ve trifloroasetik asittir.

Fenolik bileşiklerin LC-MS (sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi) ile tanımlanmasında atmosferik basınç kimyasal iyonlaşma (APCI) ve elektro sprey iyonlaştırma (ESI) gibi iyonlaşma metotları kullanılmaktadır. Son zamanlarda ilave yapısal bilgi sağlamak için pek çok durumda çarpışmadan kaynaklanan ayrışma kullanımı pozitif veya negatif MS tipinde ESI ile bağlı LC kullanılarak bu bileşikler tanımlanmıştır.

Tablo 3. Bazı polifenollerin kimyasal yapısı

Sınıf	Ad	Yapı
Flavonol	R2= OH; R1=R3= H : Kaempferol R1=R2= OH; R3= H : Kuersetin R1=R2=R3= OH : Mirisetin	
Flavon	R1=H; R2= OH : Apigenin R1=R2= OH : Luteolin	
Flavanol	R1=R2= OH; R3= H : Kateşin R1=R2= OH : Epikateşin	
Flavanon	R1= H; R2= OH : Naringenin R1=R2= OH : Eriodiktol	
Hidrobenzoik asit	Gallik asit	
Hidrosinnamik asit	R ₁ = H: Kafeik asit R ₁ = kuinik asit: Klorogenik asit	

Bu çalışmada sadece gilaburu (*viburnum opulus*) meyvesinin, çözücü ekstraksiyonu kullanılarak elde edilen çekirdek kısmının metanollü ekstraktındaki ve meyve suyundaki fenolik bileşikler LC-UV-ESI-MS metoduyla karakterize edilmiştir.

1.4. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

Hücrelere zarar veren serbest radikalleri etkin bir şekilde süpürerek zehir etkisi düşük olan veya zehir etkisi göstermeyen ürünlere dönüştüren antioksidan bileşikler sağlıklı bir yaşam için vazgeçilmezdir. Bu nedenle antioksidanların saptanması, özellikle gıda, biyokimya ve tıp alanlarında oldukça önemlidir. Bazı ciddi hastalıkların önlenmesinde besinlerdeki antioksidanların büyük rolü olduğunun kanıtlanması, gıdaların antioksidan içeriklerinin belirlenmesi ve hastalıkların teşhis ve tedavisi gibi amaçlarla kullanılmak üzere birçok antioksidan kapasite saptama yöntemlerinin geliştirilmesine olanak sağlamıştır.

Antioksidan kapasitenin ölçümü için literatürde verilen yirmiden fazla yöntem vardır. Bunlar kullanılan kimyasal reaksiyon açısından temel olarak iki sınıfta toplanabilir.

- 1- Hidrojen atomu transferi (HAT) reaksiyonuna dayananlar
- 2- Tek elektron transferi (ET) reaksiyonuna dayananlar

Her iki esasa dayanan yöntemler bir örneğin koruyucu antioksidan kapasitesi yerine radikal veya oksidan süpürücü kapasitesini ölçmeye yöneliktir. Hidrojen transferi reaksiyonuna dayanan analiz yöntemlerinin çoğu azo bileşiklerinin bozunması sonucu oluşan peroksil radikallerinin antioksidan ve substrat tarafından yarışmalı bir şekilde giderilmesi prensibine dayanır. Bu esasa göre sıklıkla kullanılanlar Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi (ORAC) (Cao ve Alessio, 1993), Total Radikal Yakalama Antioksidan Kapasitesi (TRAP) (Wayner vd., 1993), ve Crosin Bleaching yöntemleridir.

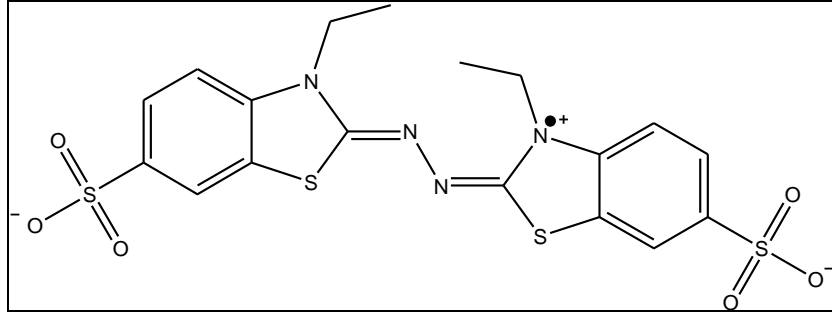
Elektron transferi reaksiyonuna dayanan analiz yöntemleri ise antioksidan maddenin indirgendiğinde renk değiştiren bir oksidan maddeyi indirgeme kapasitesinin ölçümüne dayanır. Renk değişiminin derecesi numunedeki antioksidan derişimi ile bağlantılıdır. Bu yöntemler arasında Cu(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) yöntemi, Trolox Eşdeğeri Antioksidan Kapasite (TEAC/ABTS) yöntemi (Apak ve Güçlü, 2004), DPPH[•] radikali temizleme aktivitesi yöntemi, Demir (III) İndirgeme / Antioksidan Kuvvet (FRAP) yöntemi ve Folin-Ciocalteu Yöntemi ile Toplam Fenolik Madde Tayini sıralanabilir.

Bahsedilen tüm yöntemler meyve, bitki ve gıda gibi numunelerde antioksidan kapasitenin belirlenmesinde kullanılabilir. Fakat örnekteki antioksidan maddelerin moleküler çeşitliliği bu yöntemlerle elde edilen sonuçlar arasında her zaman doğrusal bir ilişki oluşmasını engelleyebilir. Literatür sonuçlarından da açıkça görülmektedir ki tek bir antioksidan yöntem ile numunenin antioksidan kapasitesi hakkında bilgi vermek uygun değildir. Bu çalışmada kullanılan antioksidan aktivite tayin yöntemlerinin prensipleri aşağıda verilmiştir.

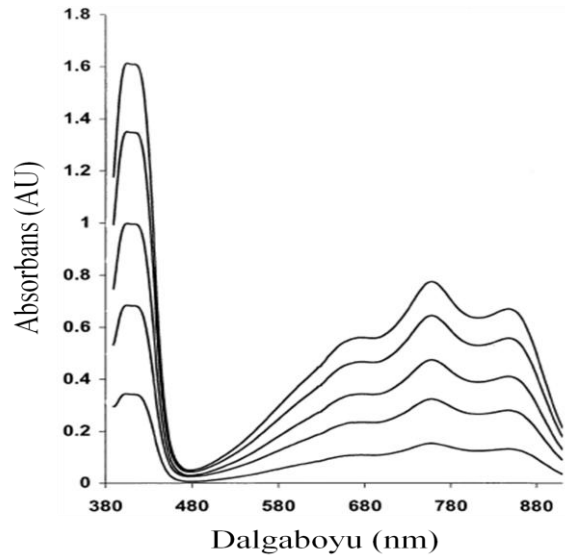
1.4.1. Trolox Eşdeğeri Antioksidan Kapasite (TEAC/ABTS) Yöntemi

Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite olarak ifade edilen TEAC/ABTS yöntemi, ilk olarak Miller ve arkadaşları (Miller, 1993) tarafından geliştirilmiştir. Orijinal yöntemde ABTS^{•+} radikal katyonu, H₂O₂ ile metmiyoglobinin reaksiyona girmesiyle oluşan ferrilmiyoglobin ile ABTS arasındaki etkileşimden oluşmaktadır. Burada analiz edilen maddenin (antioksidanın) ABTS^{•+} radikalini indirgeme yeteneği ölçülmektedir. Ancak bu madde ferrilmiyoglobini de indirgeyebilir. Re ve arkadaşları (Ree vd, 1999) tarafından modifiye edilen TEAC yönteminde ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)) molekülünün potasyum persülfat ile oksidasyonu sonucu ABTS^{•+} radikal katyonu (Şekil 3) oluşmaktadır ve aktivite ölçümü bu dönüşümün 734 nm'de fotometrik olarak ölçülmesine dayanmaktadır. Yani sisteme antioksidan ilave edilmeden önce radikal katyonu oluşturulmaktadır. Oluşturulan radikal katyonu oda sıcaklığında ve karanlık ortamda iki gün dayanıklıdır. Antioksidanlar varlığında ABTS^{•+} radikal katyonunun absorpsiyonunda belirli bir süre içindeki azalmadan (Miller vd., 1994) yararlanarak toplam antioksidan kapasite Trolox cinsinden bulunur (Wang vd., 2004). Geliştirilen metodun orijinal metottan farkı hem suda hem organik çözücülerde çözüldüğünden hem hidrofilik hem de hidrofobik antioksidan aktivite tayininde kullanılabilir olması ve bir renk giderimi yöntemi olmasıdır.

ABTS^{•+} radikal çözeltisi mavi-yeşil renklidir ve karakteristik absorpsiyon spektrumu 414, 645, 734 ve 815 nm'de maksimum absorpsiyon vermektedir (Şekil 4), (Ree vd., 1999).



Şekil 3. 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS^{•+}) radikalinin formülü

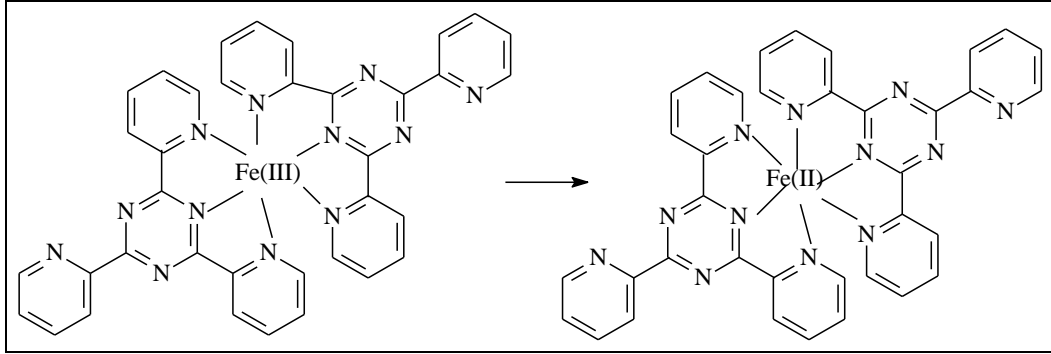


Şekil 4. ABTS^{•+} radikal katyonunun absorpsiyon spektrumu

1.4.2. Demir (III) İndirgeme / Antioksidan Kuvvet (FRAP) Yöntemi

Benzie ve Strain (Benzie ve Strain, 1996; Benzie vd., 1999) tarafından geliştirilen bu yöntemde demir (III)'in indirgenme kapasitesi yoluyla antioksidanların toplam miktar tayini yapılmaktadır. Düşük pH'da Fe⁺³'ün Fe⁺²'ye indirgenmesi mavi renkli [Fe(II)-TPTZ] (TPTZ, (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazin) kompleksinin oluşmasına neden olur (Şekil 5). Oluşan bu kompleks 595 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon vermektedir. Sonuçlar askorbik asit kullanılarak veya Trolox eşiti olarak ifade edilir. FRAP sonuçları analiz zamanına bağlı olarak değişebilir. Örneğin bazı polifenoller (kafeik asit, ferulik asit ve tannik asit gibi) daha yavaş reaksiyon verirler ve aktivitelerini belirlemek için daha

uzun reaksiyon zamanı gerekmektedir. Yöntem sadece demir iyonunu temel almaktadır. Bu nedenle mekanik ve fizyolojik olarak antioksidan aktivitesi için uygun değildir. Ancak diğer yöntemlerin aksine FRAP yöntemi basit, hızlı ve ucuzdur.



Şekil 5. Demir (III)'ün indirgenme reaksiyonu

1.4.3. Folin-Ciocalteu Yöntemi ile Toplam Fenolik Madde Tayini

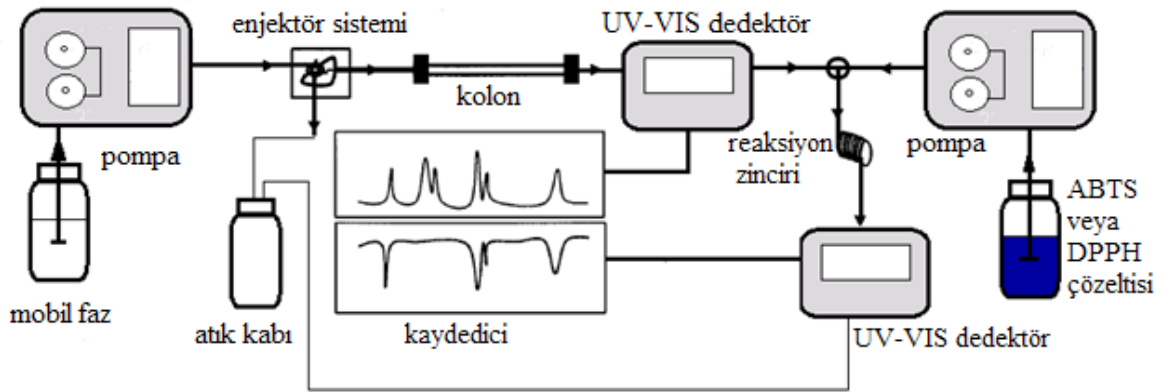
Bu metot Singleton ve Rossi tarafından önerilmiş olup daha sonra farklı uygulayıcılar tarafından geliştirilmiştir. Folin-Ciocalteu reaktifi fosfomolibdat ve fosfotungstat karışımı bir reaktiftir. Yöntem, suda ve diğer organik çözücülerde çözülmüş olan fenolik bileşiklerin Folin reaktifi ile alkali ortamda renkli kompleks oluşturması esasına dayanır. Oluşan mor menekşe renkli kompleks 765 nm'de maksimum absorbans oluşturur (Singleton vd., 1999; Vinson vd., 2005). Folin-Ciocalteu reaktifi ile toplam fenolik madde miktarı tayini hemen hemen tüm antioksidan çalışmalarda örnekteki fenolik içeriğinin tayininde kullanılan standart bir yöntemdir.

1.5. HPLC ile On-line Antioksidan Tespiti

Son on yıldır kromatografik ayrılma ve on-line antioksidan aktivite yöntemlerinin birleştirilmesi üzerine yapılan çalışmalar araştırmacıların büyük ilgisini çekmiştir. Literatür çalışmalarına bakıldığında ilk uygulanan yöntem HPLC (yüksek basınçlı sıvı kromatografisi)'den ayrılan antioksidan bileşiklerin on-line kemilüminesans ile aktivitelerinin ölçülmesidir (Dapkevicius vd., 1999). Bu metod çok hassas olmasına

rağmen, çok özel cihazlar gerektirmesi, pahalı olması ve kararlı olmayan reaktifler gibi dezavantajlara sahiptir.

Daha sonra bu yöntem Koleva ve arkadaşları tarafından farklı radikal çözeltiler kullanılarak geliştirilmiştir (Koleva vd., 2000; Koleva vd., 2001). Ayrıca farklı araştırmacılar tarafından parametreler değiştirilerek yapılan çalışmalarda bulunmaktadır (Dapkevicius vd., 2001; Pukalskas vd., 2002; Bandoniene ve Murkovic, 2002; Pukalskas vd., 2005). Uygulanan on-line antioksidan yöntemlerde ilk önce HPLC ile örnek içerisinde bulunan antioksidan bileşikler ayrılır ve kolon çıkışında bulunan UV dedektör ile her bir antioksidan bileşik tespit edilir. Dedektörden çıkan antioksidan maddeler sisteme ilave edilen radikal çözelti (DPPH[•] veya ABTS^{•+}) ile reaksiyona girer. Bu reaksiyon sonucunda nötral bir form oluşur ve bu form sisteme bağlı olan ikinci bir UV dedektörü ile her bir antioksidan maddenin negatif piki olarak tespit edilir. Yöntem çok basit ve hızlı olmasının yanında bütün kompleks ekstraktlara, besinlere ve ilaçlara uygulanabilir. Aşağıda on-line antioksidan belirleme sisteminin bir şeması verilmiştir (Niederlander vd., 2008) (Şekil 6).

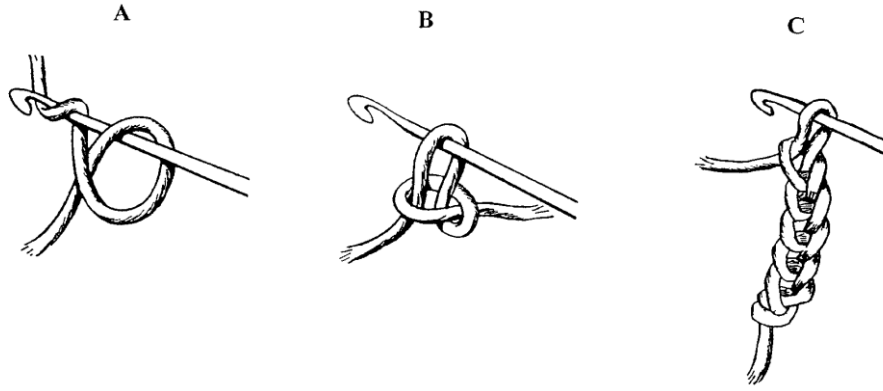


Şekil 6. On-line HPLC-antioksidan aktivite belirleme sistemi

ABTS radikalinin daha kararlı ve suda çözünür olmasından dolayı genellikle on-line ABTS metodu on-line DPPH metoduna göre daha çok tercih edilir. Ayrıca on-line ABTS metodu ile suda çözünebilen antioksidan bileşiklerde tayin edilir ve daha az toksik özelliğe sahiptir. ABTS^{•+} radikal katyonu, peroksidisülfat, miyoglobin hidrojen peroksit, peroksil radikali ve mangan (IV) oksit gibi farklı oksidanlar ile hazırlanabilir (Miller ve Rice-Evans, 1996). Bu çalışmada ise ABTS radikali mangan (IV) oksit kullanılarak hazırlandı. Bu renkli radikal 5-35 °C arasındaki sıcaklıklarda ve pH 3-7.4 arasında kararlıdır. ABTS^{•+}

radikal katyonunun kararlı olması, hazırlanma prosedürüne ve deneysel koşullara (konsantrasyon, pH, zaman, çözücü bileşenleri ve sıcaklık) bağlıdır (Villano vd., 2004).

Ayrılan antioksidan bileşiklerin ve radikal çözeltilerin reaksiyonun gerçekleştiği yer reaksiyon zinciridir. Reaksiyon zinciri genellikle politetrafloroetilen (PTFE)'den diğer bir adıyla Teflon'dan yapılmıştır. Teflon kullanılan hiçbir kimyasal çözücü ve madde ile kimyasal bir reaksiyon vermez ve UV ışığına karşı kararlıdır. Sahip olduğu çok küçük iç çapı ile kromatografik koşturmalarda piklerin iç içe girmesini engellemektedir. Kullanılan radikal çözeltilerin antioksidan bileşiklerle daha iyi reaksiyona girmesi için reaksiyon zinciri Şekil 7'deki gibi örülerek hazırlanır (Kuhlmann ve Krauss, 1997).



Şekil 7. Örülü reaksiyon sisteminin oluşturulma şeması

1.6. Enzimler

Enzimler canlı hücreler tarafından sentezlenen ve canlı metabolizmasındaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün oluşturmadan yüzde yüzlük bir ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Enzimlerin büyük çoğunluğu protein yapısındadır ve kendilerine özgü üç boyutlu yapıya sahiptir. Aynı tür reaksiyonlar enzimler tarafından defalarca gerçekleştirilebilir. Enzimler substratlarına ve katalizledikleri reaksiyon tiplerine son derece spesifiktirler. Genellikle bir enzim sadece bir reaksiyonu veya aynı tip benzer reaksiyonları katalizler.

1.6.1. Karbonik Anhidraz Enzimi

Karbonik anhidraz (CA) enziminin, hayvan dokularında, bitki hücrelerinde ve bakteriler gibi hemen hemen bütün organizmalarda bulunduğu bilinmektedir. Bu enzim ilk olarak memeli eritrositlerinden izole edilmiş olup daha sonraki yıllarda insan, balık ve sıçan eritrositlerinden, sığır kemiği, sığır lökositleri, çeşitli bakteriler ve bitki kaynaklarından saflaştırılmıştır. CA enzimi, karbonik asit meydana getirmeden farklı bir yol izleyerek CO₂ ve HCO₃⁻'in birbirlerine dönüşmesi reaksiyonlarını katalizleyen enzimdir (Smith ve Ferry, 2000). Enzim HCO₃⁻ ve H⁺ oluşturarak hem CO₂'in uzaklaştırılmasında hem asit-baz dengesinin korunmasında önemli rol oynar. Organizmada CO₂ taşınması, üre döngüsü, asit-baz dengesinin düzenlenmesi, elektrolit sekresyonu, sindirim ve hücredeki iyon değişimi gibi olaylarda rol alır.

Aynı canlı türünde aynı reaksiyonu katalizleyen ancak farklı kimyasal ve fiziksel özellikleri olan enzimlere izoenzim denir. İzoenzimler kofaktörlerine, substratlarına ve inhibitörlerine karşı farklı ilgilere sahiptirler. İzoenzimlerin en önemli özellikleri arasında aminoasit sayısı ve sırasının farklı olması, izoelektrik noktalarının farklı olması, elektroforetik özelliklerinin farklı olması ve her bir izoenzimin farklı geninin olması sayılabilir. İzoenzimler farklı dokulara lokalize olmanın yanı sıra bir hücrenin farklı subsellüler fraksiyonlarında da yerleşebilirler.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda çeşitli memeli dokularında 14 farklı CA izoenzimlerinin olduğu ortaya konmuştur (Supuran ve Scozzafava, 2002). Bunlardan CA I, CA II, CA III ve CA VII sitozolik formda; CA IV, CA IX, CA XII ve CA XIV membrana bağlı; CA V mitokondriyel form; CA VI tükürük gibi çeşitli salgılarda bulunan karbonik anhidraz inhibitörleridir (Parkkila vd., 1998). Bunların yanı sıra ayrıca katalitik etkisi olmayan CA VIII, CA X ve CA XI formları da canlılardan izole edilmiştir.

Göz hastalıkları alanında kullanılan karbonik anhidraz inhibitörleri göz içi basıncını düşürücü etkisi olan en kuvvetli ilaçlar arasındadır.

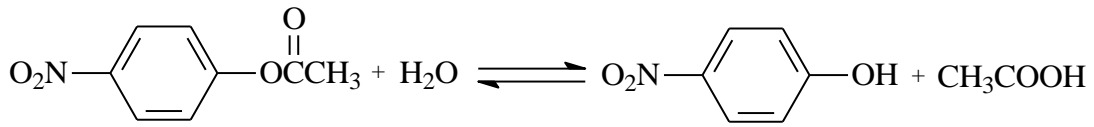
1.6.2. Enzim Aktivitesi ve İnhibisyonu

CA enziminin iki aktivitesi mevcuttur. Birincisi, CA'nın fizyolojik aktivitesi olan CO₂-hidrataz aktivitesidir. İkincisi ise in vitro şartlarda gerçekleştirdiği spektrofotometrik

olarak takip edilebilen esteraz aktivitesidir. Bu çalışmada esteraz aktivitesi yöntemi uygulanmıştır.

a-) CO₂-hidrataz aktivitesi: Bu yöntemde CO₂'in hidrasyonu sonucu açığa çıkan H⁺ iyonundan ileri gelen pH değişiminin brom timol mavisi indikatörü ile belirlenip, geçen sürenin ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Bu yönteme göre CA aktivitesi için bir enzim ünitesi (EU) enzimsiz olarak meydana gelen CO₂ hidratasyonu süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır. Enzimin aktivitesi; enzimsiz CO₂ hidratasyon süresi (t₀) ile enzimli reaksiyon süresi (t_c) arasındaki farkın t_c' ye bölünmesi ile belirlenir (Maren, 1960).

b-) Esteraz aktivitesi: Bu yöntem karbonik anhidrazın esteraz aktivitesine sahip olması esasına dayanmaktadır. Yöntemin prensibine göre, karbonik anhidraz enzimi substrat olarak kullanılan *p*-nitrofenilasetatı 348 nm'de absorpsiyon veren *p*-nitrofenol veya *p*-nitrofenolata hidroliz etmektedir. Buradan absorbansın ölçülmesi ve aktivitenin hesaplanması temel alınmıştır. Reaksiyon mekanizması Şekil 8' de gösterilmiştir.



Şekil 8. Karbonik anhidrazın esteraz aktivitesi ile katalizlediği *p*-nitrofenilin hidroliz reaksiyonu

Karbonik anhidraz inhibitörleri aromatik ve heterosiklik sülfonamidler, inorganik ve metal kompleks anyonlarıdır.

1.7. Çalışmada Kullanılan Kromatografik Teknikler

Kromatografi, bir karışımdaki iki yada daha fazla bileşenin, birbiriyle karışmayan biri sabit, diğeri hareketli faz (sıvı veya gaz) olan iki fazlı bir sistemde ayrılması ve saflaştırılması yöntemidir.

Başlangıçta kromatografi terimi, bitkisel pigmentleri renklerine göre ayırma işleminde kullanıldı, fakat zamanla uygulama alanı genişleyerek değişti. Örneğin; gaz kromatografisi (GC), ince tabaka kromatografisi (TLC), süperkritik akışkan kromatografisi

(SFC), kapiler elektrokromatografi, karşı-takımlı kromatografi ve bu çalışmada da kullanılan yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC).

1.7.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Sıvı kromatografisi yönteminin özel bir uygulaması olan yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yönteminde, sabit faz olarak kullanılan dolgu maddelerinin çok küçük tanecik boyut da küçültülmesi ile hareketli faz ile etkileşen sabit faz yüzey alanı büyür. Dolgu maddesinin tanecik çapının yanında kolon çapında küçültülmesi kolon verimini arttırırken akış hızını küçültür. Akış hızını belli bir değerin altına düşürmeden daha küçük çaplı tanecik kullanarak kolon verimini arttırmak için basınç uygulanması gerekir. Bu yüksek verimdeki kolonların ve oldukça yüksek basınçların kullanıldığı HPLC en yaygın kullanılan kromatografi türüdür. HPLC günümüzde kimya, biyokimya, analitik kimya, biyoteknoloji, farmokoloji, bitki kimyası ve çevresel analiz gibi alanlarda sıklıkla kullanılmaktadır.

1.7.2. HPLC Cihazının Çalışma Prensibi

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi, çalışma prensibi temel olarak örneğin uygun çözücü (mobil faz) içinde çözülmesi ve bu karışımın yüksek basınç altında dolgulu (sabit faz) kolondan geçirilmesi esasına dayanır. Bileşikler, kullanılan kromatografik yöntemlere göre polarite farklılıklarından dolayı kolonu farklı hızlarda terk ederler. Göç hızlarındaki farklılık bileşenlerin ayrılmalarına neden olur. En hızlı hareket eden bileşen kolondan en önce çıkar, en yavaş hareket eden ise kolondan en son çıkar. Kolondan çıkan hareketli faz bir dedektöre gelir ve yazıcıda zamana bağlı sinyalin kaydedildiği kromatogramda görülür. Bileşiğin kolondan çıktığı zaman alıkonma zamanıdır.

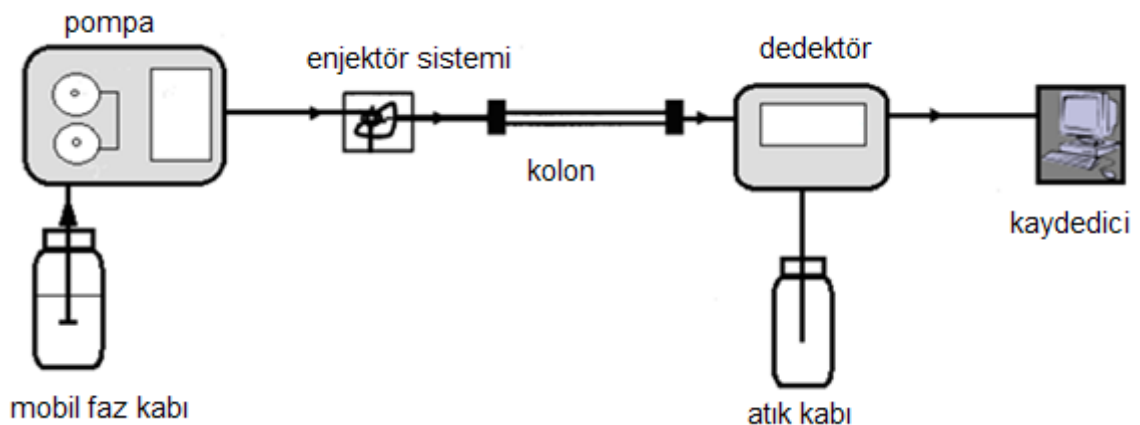
1.7.3. HPLC Cihazı

Bir HPLC cihazının ana parçaları şematik olarak Şekil 9.'da gösterilmiştir. HPLC cihazında beş ana birim bulunmaktadır. Bunlar 1) Yüksek basınç pompası 2) Hareketli faz kabı 3) Örnek enjeksiyon sistemi 4) Kolon 5) Dedektör.

HPLC’de pompanın fonksiyonu, hareketli fazı kolondan kontrollü bir akış hızıyla geçirmektir. Günümüzde 1200 bar’a kadar üretilebilen yüksek basınçlı pompalar dakikada bir mililitrelik mobil faz akışını sağlarlar.

Kolonlar kromatografinin en önemli parçasıdır. HPLC cihazında ayrılmanın olduğu analitik kolon ve ayrıca analitik kolonun giriş kısmına takılarak çözücülerden gelebilecek toz ve kirlilikleri tutan ve dolgu maddesinin çözünmesini de engelleyerek kolonun ömrünü uzatan koruyucu kolon kullanılmaktadır. HPLC kolonlarının genellikle iç çapları 2.1-4.6 mm ve boyları 30-300 mm arasında olup paslanmaz çelikten üretilirler. Dedektörler kolondan çıkan örnek bileşenlerin varlığını ve miktarını belirlemek için kullanılır (Sandra, 2004).

HPLC’de kullanılacak olan çözücülerin saflığı önemlidir. Çünkü çözücüler içindeki safsızlıklar, düzgün bir baseline elde edilememesine, istenmeyen piklerin çıkmasına ve sabit faz yüzeyinde tutulup kromatografik alıkonma zamanının değişmesine neden olur. Çözücü kablarının içindeki filtreler, mobil faz içerisindeki küçük parçacıkların gözenekleri ve boruları tıkanmasına engel olur. Mobil fazda çözünmüş hava da problem oluşturan etmenlerden biridir. Bu hava, pompa başında bir kabarcık oluşturursa mobil fazın akışını azaltır ya da durdurur. Dedektörde oluşan kabarcık ise sahte pikler meydana getirir. Bunun için mobil faz hazırlanırken ultrasonik banyoda havası uzaklaştırıldıktan sonra uygun filtrelerden vakum uygulanarak süzülmesi gerekir. Daha pratik bir yöntem ise HPLC sisteminde akışın bir parçası olan ‘degasser’ ünitesinin kullanılmasıdır.



Şekil 9. HPLC sisteminin şematik diyagramı

1.7.4. UV-Vis ve MS Dedektör

HPLC için geliştirilen dedektörler ayrılan bileşenlerin ışın absorpsiyonu, floresans, elektrokimyasal etkisi, kırılma indisi ve iletkenlik özelliklerinin ölçümüne dayanır. Kullanılacak dedektör sistemi, analiz yapılacak örneğin cinsine uygun olmalıdır. Bu anlamda son yıllarda çoğunlukla kullanılan dedektörler UV dedektör, refraktif indeks dedektörü, floresans dedektör ve kütle spektrometresidir. Bu çalışmada yalnızca UV ve MS dedektörler kullanılmıştır.

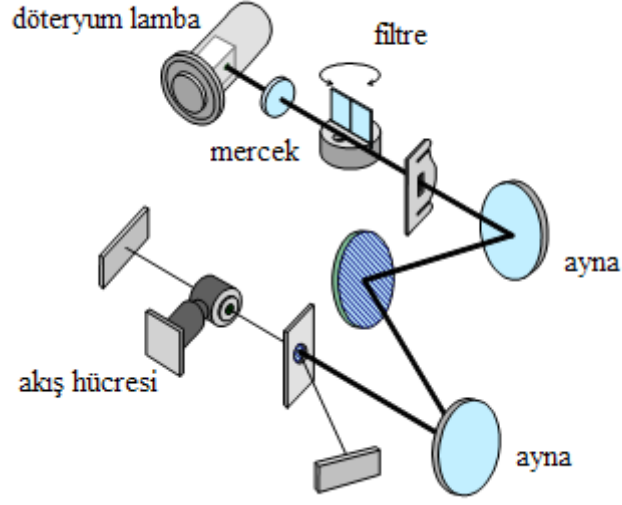
UV-Vis dedektörler, bileşenlerin ultraviyole-görünür ışığı absorplamasına ve bununla ilgili absorbans ölçümüne dayalı olarak çalışırlar. UV-Vis ışığını absorplamayan bileşikler bu dedektör ile tayin edilemezler. Bu dedektörün çalışma prensibi şöyledir. UV-Vis ışık kaynağından gelen ışıklar bir hücreden geçer, bu akış hücresinde kolondan geçen hareketli faz sürekli akmaktadır. Hücre içerisinde ışık yönü ile sıvı akış yönü çakışıktır. Örnekten gelen bileşen akış hücresine geldiğinde ışık absorpsiyonu olur. Buradan çıkan ışıklar dalga boyu seçiciye yani bir monokromatöre buradan da UV dedektörüne girerler. Burada ışık şiddeti ölçülür. Bu dedektörlerde her bir bileşenin absorpsiyon dalga boyunun farklı olması durumunda her bir bileşen için dalga boyu ayarlanabilir, bu yüzden seçimli dedektörlerdir (URL-1, 2010).

Tipik UV-Vis spektrofotometresi, bir ışık kaynağı, bir monokromatör, bir dedeksiyon hücresi ve bir dedektör içerir (Şekil 10). Işık kaynağı olarak bir UV lambası, örneğin döteryum lambası, kullanılır. İkinci bir ışık kaynağı olan tungsten lamba ise spektrumun görünür bölgesindeki dalga boyları için kullanılır. Monokromatör ile ışık şiddetini ölçmede en çok kullanılan dedektör fotodiyot dizisi dedektörüdür. Fotodiyot dizisi dedektörü (PDA veya DAD) ile birçok dalga boyunda aynı anda çok hızlı bir biçimde ölçüm yapmak mümkün olduğundan bilgisayarlı cihazlarda bu tür dedektör tercih edilir.

Pek çok organik molekül ultraviyole veya görünür ışığı absorplar. Absorbans direk olarak ışık yolu (b) ve çözeltinin konsantrasyonu (c) ile Lambert Beer kanununa göre orantılıdır.

$$A = \varepsilon b c$$

ε : Bileşenin molar absorplama katsayısı

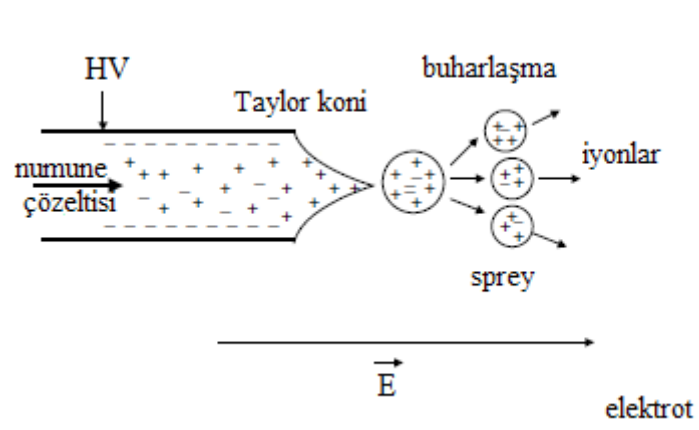


Şekil 10. UV-Vis dedektörün şematik diyagramı

Kütle spektrometrik dedektörde (MS), atom veya moleküllerden gaz fazında iyonlar oluşturulur ve bu iyonlar kütlelerine göre birbirinden ayrılarak kaydedilir. Bir maddenin kütle spektrumunun elde edilebilmesi için bunun önce gaz fazına geçirilmesi ve daha sonra iyonlaştırılması gerekir. Numune önce kütle spektrometresinin vakum altında tutulan giriş kısmına gönderilir ve madde gaz fazında değilse ısıtılarak gaz fazına geçmesi sağlanır. Gaz haline getirilmiş maddenin molekülleri ince bir delikten difüzyon ile iyonlaşma bölgesine sızar. Örneğin ve uygulamanın türüne göre çeşitli iyonlaştırma teknikleri uygulanır. HPLC-MS için kullanılan en yaygın iki iyonlaştırıcı, elektrosprey ve atmosferik basınç kimyasal iyonlaştırmadır. Her ikisi de iyonlaşmanın atmosferik basınçta gerçekleştiği ılımlı iyon kaynaklarıdır. Bu çalışmada iyonlaştırıcı olarak elektrosprey kullanılmıştır. ESI, genellikle büyük polar moleküllerin iyonlaştırılmasında moleküler parçalanmanın önüne geçebilmek için kullanılan ılımlı bir iyonlaştırma tekniğidir (URL-2, 2010).

LC-ESI-MS'de analit 20–500 $\mu\text{l dk}^{-1}$ tipik akış hızında kaynağa gönderilir. Kolondan çıkan eluat tipik olarak 2,5 kV'dan 4 kV'luk alanda zıt elektroda karşı yüksek bir potansiyel farka sahip elektrosprey iğneden geçer. Isıtılan buharlaştırma gazı (genellikle azot) iğnenin polaritesi kadar bir yüzey yükü ile iğneden yüklü damlaların iyi bir püskürtme oluşturması için kullanılır. Damlalar iğneden zıt elektrot üzerinde kaynak numune hunisine doğru püskürtülür. Damlalar iğne tepesi ve huni arasındaki elektrik alandan çapraz geçerek çözücü buharlaşır. Bu damlaların yüzey gerilimi yüke dayanamayacak kadar küçülmelerine sebep olur ki bu noktada Coulomb patlaması

gerçekleşir ve damlalar parçalanır. Bu süreç küçük damlalar üretir ki sonunda yüklü analit molekülleri gaz haline gelinceye kadar tekrarlanır. Bu yüklü analit molekülleri tek ya da çok yüklü olabilirler. Elektrosprey süreci Şekil 11’de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 11. Elektrosprey iyon kaynağının şematik diyagramı

1.8. Çalışmada Kullanılan Meyvelerin Özellikleri

Latince adı *Prunus laurocerasus* olan karayemiş, Gülgiller (Rosaceae) familyasına ait olup küçük beyaz renkli çiçekler açan ve daha çok rutubetli yerlerde yetişen bir meyvedir (Şekil 12). Güneybatı Asya, Güneydoğu Avrupa ve Anadolu’da doğal olarak yetişir. Türkiye’de Trabzon, Giresun, Ordu ve Rize civarında yüksek dağlık bölgelerde doğal olarak bulunur (Alasalvar vd., 2005). Bitkiye ülkemizde değişik yöresel adlar verilir. Bunlar arasında en yaygın olarak kullanılanlar "taflan", "karayemiş", "laz kirazı", "laz üzümü" ve "laz yemişi" gibi isimlerdir. Olgunlaştığı zaman siyaha yakın (koyu mor) bir renk alan bu meyve yaklaşık 8-10 mm boyunda, yuvarlak tanelidir ve mayhoş-buruk bir tada sahiptir. Meyveleri yenilebilir fakat çekirdekleri amigdalin içerdiği için zehirlidir. Taze yada kurutulmuş olarak tüketildiği gibi, reçel, pekmez ve marmelat yapımında da kullanılmaktadır. Yapılan bilimsel çalışmalarda, başta şeker hastalığı olmak üzere, üreme hormonlarını geliştirme, astım, sindirim düzenleme, bronşit, demir eksikliğini giderme ve prostat problemlerini önleme gibi birçok hastalığın tedavisinde önemli rol oynadığı belirlenmiştir (Baytop, 1999).



Şekil 12. Karayemiş (*Prunus laurocerasus* L.) meyvesi

Kızılcıkgiller (Cornaceae) familyasına ait olan kızılçık, çoğunluğu çalı veya ağaç halinde odunsu karakterdeki bir ağaç türüdür. Anadolu'nun çoğu bölgesinde Kiren adı ile anılır. Yaprakları koyu yeşil ve her iki yüzü tüylüdür. Asya ve Avrupa'nın yanısıra Anadolu'nun çoğu bölgesinde özellikle Karadeniz'de bol miktarda yetişir. Kızılcık meyveleri (Şekil 13) koyu kırmızı renkli ve tadı ekşi olup, taze ya da kurutulmuş olarak tüketildiği gibi, reçel ve marmelat yapımında da kullanılır. Kızılcıkta bol miktarda flavanoid (izoflavon) ve karotenoid gibi antioksidanlar bulunur. Antioksidan etkisiyle, normal metabolik faaliyetleri sırasında oluşan ve hücrelere saldırarak yapılarını bozan kararsız moleküller olan serbest radikallere karşı vücudu korur. Kızılcığın halk arasındaki faydaları aşağıda sıralanmıştır.

- Mideye kuvvet verir.
- Vücut direncini artırır.
- Bağırsak yaralarına iyi gelir.
- Ağız yaralarını giderir ve mikrop öldürücüdür.
- İltihaplanmayı önler ve allerjileri azaltır.
- Ateş düşürücü özelliği vardır.
- Kanın pıhtılaşmasını sağlar.
- Böbrek taşlarının düşürülmesine yardımcı olur.
- Kızılcık ağacının kabukları ishali kesmeye yardımcı olurken, meyveleri ise ishal yapıcıdır.
- Ayrıca geleneksel Çin Tıbbı'nda görme keskinliğini arttırmak amacıyla kullanılır.



Şekil 13. Kızılcık (*Cornus mas* L.) meyvesi

Kokulu üzüm (Şekil 14), Üzümgiller (Vitaceae) ailesine aittir. Salkım oluştuğunda açık yeşildir, sonra pembe-kırmızı renk alır. Olgunlaşınca siyah veya siyah-mor renk alır. Üzüm, yıllık 58 milyon tonluk üretim ile dünyadaki en çok üretilen meyvedir. Türkiye ise tahmini 3 650 000 ton üzüm üretimi ile altıncı büyük üreticidir (Faostat, 2004). Üzümler polifenol içeriği bakımından zengin kaynaklardır (Vinson vd., 2001). Üzümde basit fenolik bileşiklerin (benzoik asit) yanı sıra kompleks polifenollerde bol miktarda bulunur (Bonilla vd., 1999). Özellikle kokulu üzümün kabuklarında bulunan resveratrol maddesi kansere karşı savaşmakta, antioksidan görevi sayesinde yağlı bileşiklerin kılcal damarlarda birikmesini engellemekte ve böylece kalp hastalıklarına karşı insanları korumaktadır. İçerisinde bulunan meyve asitleri ve lifli yapısından dolayı mideye zarar vermeden böbrek ve bağırsak sisteminin çalışmasını düzenler ve kanın temizlenmesine yardımcı olur.

Latince adı *Viburnum opulus* olan ve üzüm meyvesine benzeyen gilaburu (Şekil 15), Kayseri ve çevresinde yaygın olarak yetişmektedir. Meyveleri küre şeklinde olup, olgunlukta kırmızı renk alırlar. Acımsı bir tadı vardır ve gilaburu asitli tadından dolayı suyu sıkılarak tüketilir. Geleneksel bir içecek olarak tüketilen gilaburu ayrıca reçel ve marmelat yapımında da kullanılır. Türkiye’de tedavi amaçlı olarak pek çok alanda kullanılır (Baytop 1999). Hanımeligiller (Caprifoliaceae) familyasından olan gilaburu, ‘Kartopu’ adıyla anılır. Gilaburu suyunda vücuttan zararlı maddelerin atılmasına yardımcı olan antioksidan maddeler vardır. Gilaburunun halk arasında bilinen faydaları aşağıda verilmiştir.

- Böbrek kum ve taşlarını eritici etkinliktedir. Diğer yöntemlerin aksine fiziksel parçalama ile değil kimyasal çözünmeyle böbrek taşı erittiği için kişinin ağrı duymayacağı belirtilmektedir.

- Bağışıklık sistemini güçlendirir.
- Kolesterolün düşürülmesine yardım eder.
- Gilaburu suyunda bulunan asitler antikanserojen niteliktedir.
- Yüksek oranda C vitamini içerir.
- Gilaburu kullanımı idrar yolu hastalıklarında tedaviye yardımcıdır.
- Adet düzensizliği ve zorluğu gibi sorunlarda rahatlatıcıdır.
- Hipertansiyonda kardiyovasküler sistemi rahatlatır ve tansiyon rahatsızlığından kaynaklanan kabızlığı engeller.



Şekil 14. Kokulu Üzüm (*Vitis vinifera* L.) meyvesi



Şekil 15. Gilaburu (*Viburnum opulus* L.) meyvesi

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Meyvelerin Toplanması ve Ekstraktların Hazırlanması

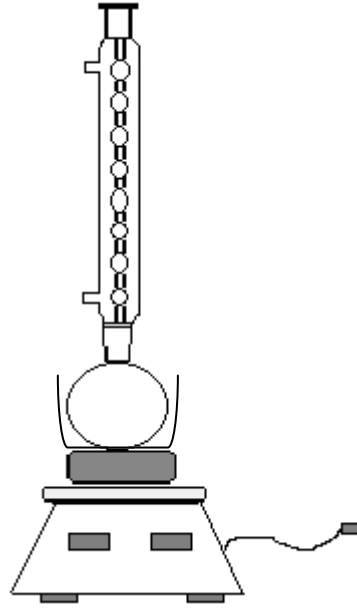
Çalışmada kullanılan meyvelerden karayemiş ve kokulu üzüm Trabzon'un Sürmene ilçesi Üzümlü köyünden, gilaburu Bostancı mahallesinden ve kızılılık ise Maçka ilçesinden 2010'nun yazında toplandı. Toplanan meyveler bol saf su ile yıkandıktan sonra elle ezilerek meyve suları elde edildi. Kalan meyve artıkları saf su ile iyice yıkanarak, çekirdek ve zar kısımları birbirinden ayrıldı ve 40 °C'lik etüvde kurumaya bırakıldı. Kurutulan kısımlar ayrı ayrı metal bir öğütücü yardımıyla toz haline getirildi.

2.1.1. Çözücü Ekstraksiyonu

Çözücü ekstraksiyonu, bir çözücü kullanılarak örnek içerisindeki çeşitli bileşenleri ayırmak için kullanılan bir ekstraksiyon işlemidir. Genellikle katı ve sıvı maddelerden bileşenlerin ayrılmasında kullanılır. Ekstraksiyon çözücüsü hidrofilik (sulu) ve hidrofobik (organik) olabilir. Bu yöntemde Şekil 16'daki gibi bir sistemde geri soğutucu, ısıtıcı, magnetik karıştırıcı ve ekstraksiyon çözücüsü kullanıldı. Ekstraksiyon boyunca çözücü örnek ile 60 °C'de ve 600 rpm karıştırma hızında 2 saat karıştırıldı. Madde kaybının olmaması için bu işlem geri soğutucu altında gerçekleştirildi. Ekstraksiyon sonunda elde edilen çözelti santrifüjlenerek ve filtreden geçirilerek berrak çözelti elde edildi.

2.1.2. Farklı Çözücü Ekstraktlarının Hazırlanması

Her bir meyvenin toz haline getirilen çekirdek ve zar kısımlarından 5 ya da 10 gram tartıldı. Tartılan bütün numuneler 50 ya da 100 mL metanol, asetonitril ve su çözücüleri ile geri soğutucu altında 600 rpm ve 60 °C' de yaklaşık 2 saat ekstraksiyona tabi tutuldu. Daha sonra karışımlardan berrak çözelti elde etmek için 0,45 µm por büyüklüğüne sahip filtrelerden geçirildi. Berrak çözeltiler kromatografik çalışmalarda ve antioksidan aktivitelerde kullanılmak üzere iki kısma ayrılarak -18 °C' de analiz için bekletildi. Bütün ekstraktlar Tablo 4.'deki gibi kodlandı.



Şekil 16. Çözücü ekstraksiyon aparatı

Tablo 4. Numune kodları

Meyvenin kısımları	Ekstraksiyon çözücüleri	Gilaburu	Kokulu Üzüm	Karayemiş	Kızılçık
Meyve suyu	-	GBS	KUS	KYS	KZS
Çekirdek	Metanol	GBCM	KUCM	KYCM	KZCM
Zar	Metanol	GBZM	KUZM	KYZM	KZZM
Çekirdek	Asetonitril	GBCA	KUCA	KYCA	KZCA
Zar	Asetonitril	GBZA	KUZA	KYZA	KZZA
Çekirdek	Su	GBCW	KUCW	KYCW	KZCW
Zar	Su	GBZW	KUZW	KYZW	KZZW

2.2. On-line HPLC-Antioksidan Aktivite Belirleme

Bu bölümde on-line antioksidan metotlarda kullanılacak HPLC-UV metodunun optimizasyonu gerçekleştirildi. Tüm ekstraktlarda tanımlanan optimizasyon koşulları altında HPLC-UV-ABTS kullanılarak antioksidan aktivite belirlendi. Ayrıca ABTS ve DPPH yöntemleri standart ve birkaç numune üzerinde karşılaştırıldı.

2.2.1. Kullanılan Kimyasallar ve Çözücüler

HPLC derecedeki su bir MilliQ su saflaştırma sisteminden (Millipore, Belford, New Hampshire, USA) elde edildi. Analitik derecede fenolik standartlar gallik asit, protokatekuik asit, *p*-OH benzoik asit, kateşin, vanilik asit, kaffeik asit, siringik asit, epikateşin, vanilin, 4-OH sinnamik asit, rutin, t-resveratrol, kuersetin ve kaempferol Sigma Aldrich (Beernem, Belçika)'den satın alındı. Bütün fenolik standartların konsantrasyonu 1000 µg/mL olacak şekilde çözünürlüklerine bağlı olarak metanol ya da asetonitrilde çözülerek hazırlandı. Bütün kromatografik deneylerde ve numune hazırlamada kullanılan HPLC derecede asetonitril, metanol ve formik asit Sigma-Aldrich'den satın alındı.

2.2.2. Kullanılan Cihaz ve HPLC-UV Koşulları

Bütün HPLC-UV-ABTS veya DPPH analizler bir modüler Shimadzu 10A HPLC sisteminde yapıldı (Şekil 17). Enjeksiyon otomatik olarak HP 1050 serisi otosampler (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) ile yapıldı. İki UV dedektörü kullanıldı; birincisi direk olarak sistemden elue edilen bileşenlerin analizindeki 10A VP, ikincisi bileşenlerin antioksidan aktivitelerini ölçen 10A dedektörü (Shimadzu, Kyoto, Japan). Enstrüman LCsolution programı (Shimadzu, Kyoto, Japan) ile kontrol edildi. Mobil faz için 7600 solvent degasser (Jones Chromatography, Cardiff, UK) gaz giderici kullanıldı. ABTS* veya DPPH* radikal çözeltileri 420 HPLC pompası (Kontron Instruments, Watford, UK) ile bir T bağlantı ile sisteme bağlandı. Reaksiyon zincirinin uzunluğu 2,8 m ve iç çapı 0,25 mm olup Teflon'dur.

Tüm antioksidan analizler için Luna C18(2) kolon (25 cm x 3.00 mm i.d., 5 µm partikül; Phenomenex, Torrance, CA, USA) kullanıldı. Analitik kolonu kirlilikten korumak için kolonla aynı özellikte koruyucu kolon (4 x 2 mm) kullanıldı. Hareketli faz (A) %0,1 formik asidin sudaki çözeltisi ve (B) %0,1 formik asidin asetonitrildeki çözeltisinden oluşmaktaydı. Elüsyonda takip eden gradient kullanıldı: başlangıç koşullarına dönmeden önce 0-5 dk (%5 B), 5-20 dk (%15 B), 20-30 dk (%15 B), 30-55 dk (%80 B), 55-56 dk (%100 B), 56-60 dk (%100 B). Enjeksiyon hacmi 20 µL ve kolon sıcaklığı 25 °C'ye ayarlandı. Akış hızı 0,5 mL/dk idi ve birinci dedektör 280 nm'de çalıştırıldı. ABTS ve DPPH çözeltilerinin akış hızı 0,8 mL/dk ve ikinci dedektör radikal çözeltiliye göre sırasıyla 414 ve 521 nm'de çalıştırıldı.

ABTS çözeltisi, 0,02 mM ABTS ve PBS (Fosfat Tamponlu Tuz) tamponu (8 g NaCl, 1.4 g Na₂HPO₄, 0.15 g KCl, 0.27 g KH₂PO₄) 1 L suda hazırlandı ve içerisine 2 g MnO₂ ilave edildi. Fizyolojik pH'daki (7,4) bu çözelti 10 dk oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra vakum altında filtreden (0.2 µm, 47 mm, Nylon Grace) geçirildi. İçerisinde buz olan ve ışık geçirmeyen koruyucu kabına konularak analizde kullanıldı. DPPH çözeltisi, 0,02 g DPPH 750 mL metanolde çözüldü ve içerisine 40 mM 250 mL sitrat tamponu (pH 6) ilave edildi. Hazırlanan çözeltinin içerisindeki gazı gidermek için 30 dk azot gazı çözeltiliye gönderildi. Her iki çözeltilide günlük olarak hazırlandı.



Şekil 17. On-line sistemin fotoğrafı. A: Radikal çözelti kabı, B: Radikal çözelti için pompa, C: Sistem kontrol, D: Direk UV dedektör, E: Reaksiyon zinciri, F: Antioksidan bileşenler için UV dedektör, G: HPLC çözücü pompaları, H: Kolon fırını

2.3. Meyve Ekstraktlarında Fenolik Bileşiklerin Analizi

Bu kısımda gilaburunun metanolik çekirdek ekstraktları ve meyve suyundaki fenolik bileşikler önceden tanımlanan optimizasyon şartlarına göre LC-UV-MS yöntemiyle analiz edildi. Analiz de öncelikle elde edilen kütle spekturumları ile standartların tutulma zamanları karşılaştırıldı. Daha sonra bunlar yaklaşık 600 fenolik bileşiğin moleküler iyonlarını ve fragmentlerini belirten literatür taramasıyla belirlenen kütüphanedeki bileşiklerle karşılaştırıldı.

2.3.1. Materyaller

HPLC enjektör filtreler (17 mm, 0,2 µm, PVDF) Whatman (Clifton, NJ, USA)'dan satın alındı. LC-MS derece asetonitril, su ve metanol Biosolve'den satın alındı.

2.3.2. Kullanılan Cihaz ve LC-MS Koşulları

HPLC-ESI-MS analizleri için DAD dedektörü ile donanımlı bir HPLC (Shimadzu) cihazı iyon sprej ile bağlantılı bir LCQ iyon tuzak enstrüman (Thermo Electron, Brüksel, Belçika) ile bağlandı. Sistem MassLynx programı ile kontrol edildi.

HPLC sisteminin gradient koşulları, kolon sıcaklığı ve dalga boyu antioksidan testlerde kullanılan HPLC sistem ile aynıdır. Tüm analizler için bir Luna C18 kolon (250 x 2.00 mm i.d., 5 µm partikül; Phenomenex, Torrance, CA, USA) kullanıldı. Birbirinden ayrılmamış pikleri daha iyi ayırmak için ayrıca daha uzun gradient kullanıldı. Elüsyondaki uzun gradient koşulları: başlangıç koşullarına dönmeden önce 0-5 dk (%5 B), 5-65 dk (%15 B), 65-66 dk (%40 B), 66-74 dk (%100 B), 74-75 dk (%100 B). Kolonun iç çapına göre ayarlanan akış hızı 0,3 dk/mL idi. Çarpışma gazı olarak ultra yüksek saflıkta helyum (He) kullanıldı ve buharlaştırıcı gaz olarak yüksek saflıkta azot (N₂) kullanıldı. Kütle spektrometrenin optimizasyonu için, 50/50 A ve B hareketli faz çözeltisi içinde 10 ppm quercetin kullanıldı. Optimize edilen negatif elektrosprej iyonlaştırma (ESI) takip eden koşullar kullanılarak elde edildi: iyon sprej voltaj, 4.2 kV; kılıf gazı (N₂), 45 arbitrary birimi; yardımcı gaz azot, 15 birim; kapiler sıcaklık, 225 °C; kapiler voltaj, -47 V ve çarpışmadan kaynaklanan dissosiyasyon (CID) enerjisi %10'a ayarlandı. Full tarama MS analizleri için, m/z 100-1500 aralığında spektrum kaydedildi.

2.4. Klasik Yöntemlerle Antioksidan Aktivite Belirleme

Klasik yöntemlerle antioksidan aktivitenin belirlenmesinde kullanılan madde ve malzemeler KTÜ Fen Fakültesi Kimya Bölümü laboratuvarlarından temin edildi.

2.4.1. Kullanılan Cihazlar

Numunelerin hazırlanmasında kullanılan cihazlar; öğütücü (Waring Commercial Blendor / New hartford, conn. USA.) ve ısıtmalı magnetik karıştırıcı (Heidolph MR 3001 K) kullanıp, bütün numunelerin absorbans ölçümleri UV spektrofotometrede (AT1 Unicam UV2) yapıldı.

2.4.2. Kullanılan Çözeltiler ve Kimyasallar

Çözeltilerin ve standartların hazırlanmasında kullanılan asetik asit, etanol, HCl, metanol Merck firmasından satın alındı.

Folin-Ciocalteu yöntemi ile toplam fenolik madde miktarı tayininde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı; 0.2 N Folin-Ciocalteu reaktifi (Fluka): 2 N'lik hazır satın alınan çözeltiden saf su ile 1:10 oranında seyreltilerek hazırlandı, %7,5'lik Na₂CO₃ (Merck) çözeltisi: 7,5 g Na₂CO₃ 100 mL saf suda çözülerek hazırlandı, stok kateşin: 10 mg kateşin 10 mL saf suda çözüldü (1 mg/mL) ve stok gallik asit: 10 mg gallik asit 10 mL metanolde çözüldü (1 mg/mL).

Demir (III) indirgeme / antioksidan kuvvet (FRAP) yönteminde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı; stok Trolox: 5 mg Trolox 10 ml etanolde çözüldü (0,5 mg/mL), 45 mmol asetik asit: 2,586 mL derişik (%99,5'lik) asetik asit alınıp, hacim yaklaşık 20 mL'ye saf suyla tamamlanıp, sonra üzerine 120 mL metanol ilave edilerek hazırlandı, 0,1 M NaOH: 0,100 g NaOH 25 ml saf suda çözüldü (0,1 M), 300 mM asetat tamponu (A): 45 mmol'lük asetik asite 0,1 M NaOH (Merck) çözeltisi damla damla eklenerek pH= 3,6'ya ayarlanarak hazırlandı, 40 mM HCl çözeltisi: 82 µL derişik (%37) HCl 25 mL saf suda çözüldü, 10 mM TPTZ (B): 0,0468 g TPTZ (Calbiochem), 6 mL 40 mM 25 mL HCl ve 9 mL metanolde çözülerek hazırlandı, 20 mM Fe₃Cl₃.6H₂O (C) (Sigma): 0,0811 g Fe₃Cl₃.6H₂O 6 mL saf su ve 9 mL metanolde çözülerek hazırlandı. FRAP reaktifi: A, B ve C çözeltileri sırasıyla; 10:1:1 oranında karıştırılır. FRAP reaktifi taze olarak hazırlandı.

ABTS radikalini temizleme yönteminde kullanılan çözeltilerin hazırlanışı; 7 mM ABTS: 0,038 g ABTS radikali (C₁₈H₁₈N₄O₆S₄(NH₃)₂) tartılıp 1mL saf su ve 5 ml etanolde çözülerek hazırlandı. 2.45 mM K₂S₂O₈: 0,0066 g potasyum persülfat tartılıp 3 mL saf su ve 1 mL etanolde çözüldü. ABTS radikal çözeltisi: 7 mM ABTS ve 2.45 mM K₂S₂O₈ çözeltileri karıştırılarak hazırlandı.

2.4.3. ABTS Radikalini Temizleme Yöntemi

Bu yöntemde, ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)) molekülünün potasyum persülfat ile oksidasyonu sonucu ABTS^{•+} radikal katyonu oluşmaktadır ve yöntemin esası bu radikalın 734 nm'de fotometrik olarak ölçülmesine dayanmaktadır.

Bu çalışmada bütün meyvelerin meyve suları ve çekirdek ve zar kısımlarının metanol, asetonitril ve su ile ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstraktlar kullanıldı. Bütün numunelere ön deneme yapılarak konsantrasyon aralığı belirlendi. Daha sonra çalışmada kullanılan standartlar BHT, Trolox, gallik asit ve kuersetin 0,05 mg/mL konsantrasyonda hazırlandı. Standartlar ve numuneler stoktan 1:2 oranında seyreltilerek stok + 4 farklı konsantrasyonda hazırlandı. Her bir numune ve standart konsantrasyonu iki paralel çalışıldı. Ayrıca numune/standartın her bir konsantrasyonu için birer kör (numune/standart + ABTS çözücüsü) ve her bir çözücüsü (metanol, asetonitril, su) için de (kontrol tüpleri, ABTS + numune/standart çözücüsü) çalışıldı.

ABTS^{•+} radikalini temizleme tayin yönteminde 7 mM ABTS'nin etanol-sudaki çözeltisinden 6 mL ve 2,45 mM potasyum persülfat çözeltisinden 4 mL alınarak karıştırıldı ve karanlıkta 16-20 saat bekletildi. Örnek içerisindeki lipofilik bileşenlerin analizini sağlamak adına bu karışım %60-40 etanol su çözücü karışımı ile hazırlandı. Kullanıma hazır hale gelen mavi-yeşil renkli ABTS^{•+} radikal çözeltisi, 734 nm'de gösterdiği absorpsiyon 0,70 ($\pm 0,02$) olacak şekilde 1:40 oranında %60-40 etanol-su ile seyreltildi. Numaralandırılan standart ve numune tüplerine 50 μ L örnek ilave edilip üzerlerine 20 saniye ara ile 1950 μ L ABTS^{•+} radikal çözeltisinden eklenip vortekslendi. 20 dakika oda sıcaklığındaki inkübasyon sonunda 734 nm'de absorbans değerleri okundu.

Hesaplamalarda iki paralelin ortalaması alınarak kör değerleri bu ortalamadan çıkarıldı. Bulunan absorbansa karşılık gelen konsantrasyonlar grafiğe geçirilerek SC₅₀ değerleri mg/mL cinsinden hesaplandı.

2.4.3.1. SC₅₀ Değerlerinin Bulunması

SC₅₀, radikal miktarını yarıya indiren numune konsantrasyonudur. SC₅₀ değerinin bulunması için farklı konsantrasyonlarda çalışmak gerekir. Bu nedenle çalışmalarda 5 farklı konsantrasyonda ölçüm yapıldı. Numunelerin yeterli miktarda farklı konsantrasyonu

hazırlanıp uygulanan test sonuçları absorbans ölçümleri yapıldı ve absorbanslar konsantrasyona karşı grafiğe geçirildi. Maksimum absorbansın yarısına karşılık gelen yani ABTS^{•+} absorbansını yarıya düşüren konsantrasyon miktarı SC₅₀ değerini vermektedir. SC₅₀ değeri mg/mL veya mM gibi birimlerle ifade edilmektedir.

Numunelerin aktivitelerinin belirlenmesinde numune konsantrasyonu bilinmediği için numuneler eşit şartlarda hazırlandı. Daha sonra bu numuneler stok olarak kullanılıp bu stoktan belirli oranlarda seyrelmeler yapılarak testlerde kullanıldı. Grafiklerde de seyrelme oranı olarak verildi.

2.4.4. Demir (III) İndirgeme / Antioksidan Kuvvet (FRAP) Yöntemi

Oyaizu (1986) tarafından geliştirilen yöntemle göre indirgeme kuvveti, numunelerin dolaylı olarak toplam indirgeme potansiyelini göstermekte olup Fe⁺³'ün Fe⁺²'ye indirgenmesi ile meydana gelen Fe⁺², 595 nm'de absorbans veren K₃(Fe)CN₆ renkli kompleksini oluşturur. Bu çalışmada kullanılan yöntem, daha sonraları geliştirilen TPTZ-Fe (II) kompleksinin verdiği absorbansın ölçümüne dayanmaktadır.

Bu çalışmada bütün metanollü, asetonitrilli ve sulu ekstraktlar ve meyve suları kullanıldı. Bütün ekstraktlar stok çözeltiliden 1:10 oranında seyreltilerek hazırlandı. Daha sonra çalışmada kullanılan Trolox standardı 1000 µM konsantrasyonda hazırlanarak adım adım seyreltilerek 6 farklı konsantrasyon değeri (1000- 500- 250- 125- 62,5- 31.25 µM) elde edildi.

FRAP reaktifi taze olarak hazırlandı ve kullanımına kadar düşük hızda karıştırıldı. Numune ve standart çözeltileri için hazırlanan deney tüplerine ve numune körü tüplerine önce 100 µL test çözeltileri aktarıldı. Reaktif körü deney tüplerine ise numune yerine 100 µL numune çözücüsü aktarıldı. Daha sonra 3 mL FRAP reaktifi numune ve standart deney tüplerine ve reaktif körü tüplerine 20 saniye ara ile pipetlenirken numune körü tüplerine ise FRAP reaktifinin çözücüsü (%60-40 metanol-su) pipetlendi ve vortekslendi. İlk pipetlenen tüpten başlanarak 20. dakikası dolan tüp alınıp plastik küvete aktarıldı ve absorbans 595 nm'de okundu. Bütün tüplerin absorbansı saf suya karşı okundu.

Sonuçlar indirgeme potansiyeli yüksek ve aynı zamanda standart bir antioksidan madde olan Trolox ile karşılaştırılarak yorumlandı. Konsantrasyona karşı absorbans grafiği çizildi. Bu yöntemde artan absorbans değeri artan indirgeme kuvvetini gösterir.

FRAP değeri = Testte numune absorbansının kalibrasyon grafiğinde karşılık geldiği
[Trolox] μM değeri

Sonuçlar μM TEAC (Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite) olarak verildi.

2.4.5. Folin-Ciocalteu Yöntemi ile Toplam Fenolik Madde Tayini

Bu yöntemde, suda ve organik çözücülerde çözülmüş olan fenolik bileşiklerin Folin reaktifi ile alkali ortamda renkli kompleks oluşturması esasına dayanır. Oluşan mor-menekşe renkli kompleks 765 nm'de maksimum absorbans oluşturur.

Bu çalışmada meyvelerden elde edilen bütün ekstraktlar kullanıldı. Çalışmada kullanılan gallik asit ve kateşin standartlarının konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde metanolde çözüldü ve 7 farklı konsantrasyonla (1000- 500- 250- 125- 62.5-31.25- 15.63 $\mu\text{g/mL}$) çalışıldı. Numuneler tek konsantrasyon olacak şekilde stok çözelti olarak çalışıldı. 50 μL 'lik her bir numune ve standart çözeltisine sırasıyla 2,5 mL saf su ve 250 μL seyreltilmiş Folin-Ciocalteu reaktifi eklendi, vortekslendi ve 3 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Daha sonra, 750 μL (%7,5'lik) Na_2CO_3 eklenerek tekrar vortekslendi ve oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakıldı. Her bir numune ve standart konsantrasyonu 3 paralel çalışıldı. Ayrıca her bir numune ve standardın her bir konsantrasyonu için numune ve reaktif körü çalışıldı. İnkübasyon sonrasında 765 nm'de absorbanlar spektrofotometrede okundu. Hesaplamalarda üç paralelin ortalaması alınarak kör değerleri bu ortalamaдан çıkarıldı ve elde edilen veriler ile grafik çizildi. Toplam fenolik madde miktarı gram ya da mL numune başına μg olarak ifade edildi.

2.5. Karbonik Anhidraz İnhibisyon Etkileri

Meyve suları ve sulu ekstraktların karbonik anhidraz enzimi üzerine etkisinin belirlenmesinde sığır eritrosit karbonik anhidraz enzimi, ve inhibitör aktivitesi karşılaştırması amacıyla sülfanilamid ve asetazolamid standart inhibitörleri kullanılmıştır. Aktivite tayininde enzimin esteraz aktivitesi kullanılmıştır. Aktivite testinde 300 μL numune çözeltisi üzerine 200 μL enzim çözeltisi ilave edilip vorteks karıştırıcıyla karıştırılmış ve 10 dakika oda şartlarında inkübe edilmiştir. Daha sonra bu karışım üzerine 1000 μL tampon ilave edilip karıştırıldıktan sonra 1500 μL 3 mM substrat (*p*-nitrofenil

asetat) çözeltilisi eklenip vortekslenmiştir. Karışımın 348 nm'deki absorbansı 25 dakika boyunca kaydedilmiş ve sonuçlar numune içermeyen kontrol ve enzim içermeyen kör testlerle karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Körlerin çıkarılmasıyla elde edilen sonuçlar kontrol testine göre %inhibisyon olarak belirlenmiştir. %İnhibisyon hesabı aşağıdaki formüle göre yapılmıştır:

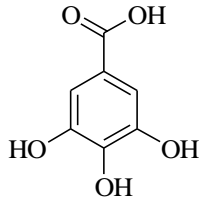
$$\%İnhibisyon = \frac{Aktivite_{Kontrol} - Aktivite_{Numune}}{Aktivite_{Kontrol}} \times 100$$

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

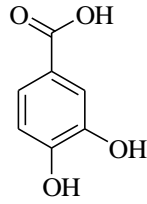
3.1. HPLC-UV Metot Geliştirme

Fenolik bileşiklerin kanser, yaşlanma ve kardiovasküler hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde önemli rolleri vardır. Çalışmada kullanılan dört meyve yerel tıpta kullanılmaktadır. Bu meyvelerin fazla miktarda fenolik bileşik içerdiği sanılmaktadır.

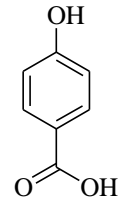
Optimize edilen HPLC-UV metodu kullanılarak 14 standart fenolik bileşiğin (Şekil 18) analizine bir örnek Şekil 19’da gösterilmektedir. Kromatografik analizlerde çoğu polifenolün tanımlanmasında spesifik olan 280 nm dalga boyu seçildi. Temsili polifenol bileşik kullanılarak Van Deemter eğrisi ile optimum akış hızı 0,5 dk/mL olarak ayarlandı. Metot, 45 dakika içinde tüm analitlerin uygun bir şekilde ayrılmasını sağladı. Alıkonma zamanı ve tekrarlanabilirlik aynı standartlarla hazırlanan çözeltinin (20 µg/mL, her bir bileşik için) 3 kez enjeksiyonu ile belirlendi (Tablo 5).



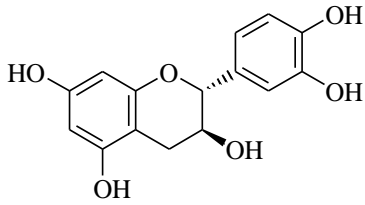
Gallik asit



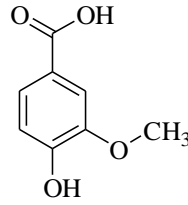
3,4-dihidroksibenzoik asit



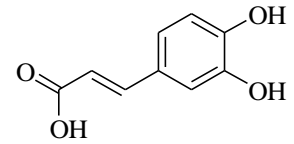
p-OH benzoik asit



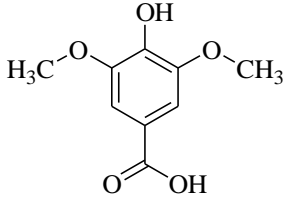
Kateşin



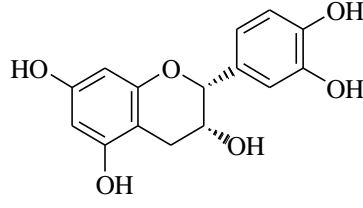
Vanilik asit



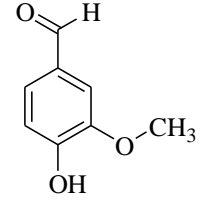
Kaffeik asit



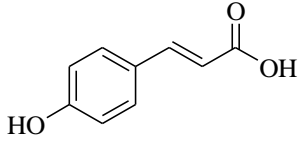
Siringik asit



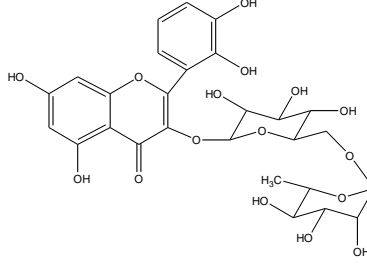
Epikateşin



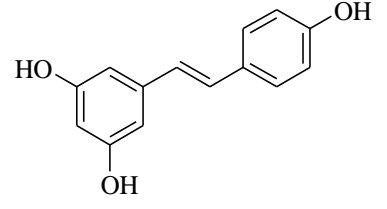
Vanilin



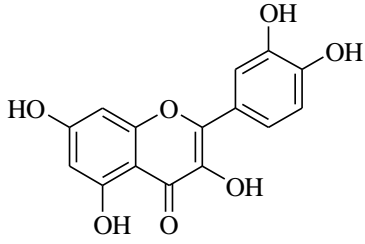
4-OH sinnamik asit



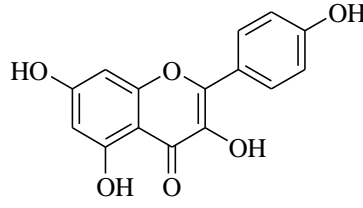
Rutin



t-resveratrol

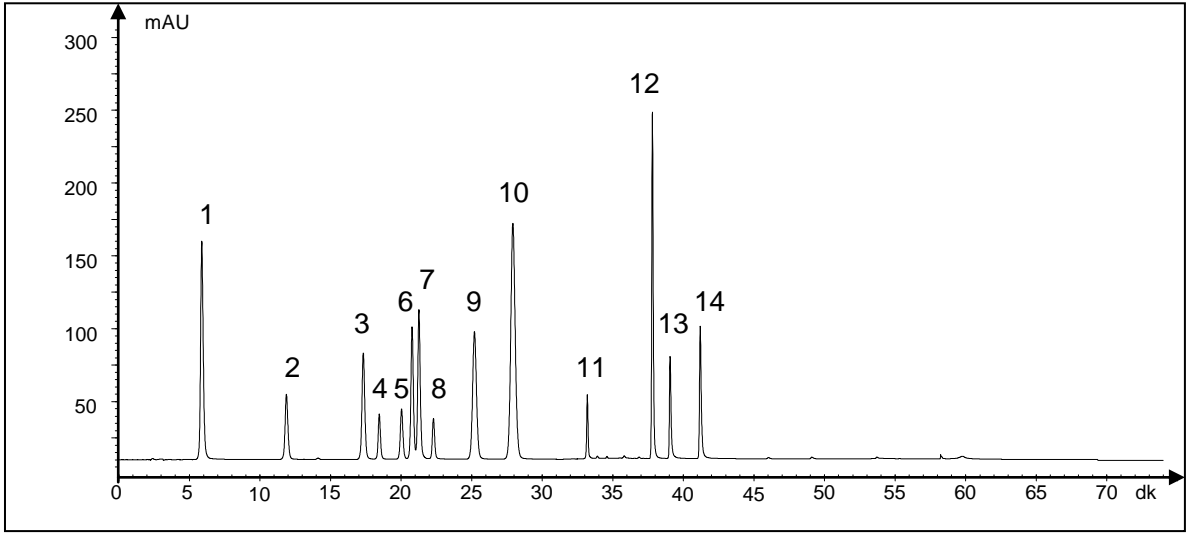


Kuersetin



Kaempferol

Şekil 18. Çalışmada kullanılan fenolik bileşiklerin yapısı



Şekil 19. Standart fenolik bileşiklerin 280 nm'deki HPLC-UV kromatogramları, 1. gallik asit, 2. 3,4-dihidroksibenzoik asit, 3. *p*-OH benzoik asit, 4. kateşin, 5. vanilik asit, 6. kaffeik asit, 7. siringik asit, 8. epikateşin, 9. vanilin, 10. 4-OH sinnamik asit, 11. rutin, 12. t-resveratrol, 13. kuersetin, 14. kaempferol. Enjeksiyon hacmi 20 μ L ve kolon sıcaklığı 25 $^{\circ}$ C

Tablo 5. Geliştirilen HPLC-UV metodunun parametreleri

No	Bileşik	%RSD (RT)	%RSD (Alan)
1	Gallik asit	0,0794	1,7258
2	3,4-dihidroksibenzoik asit	0,0405	4,5306
3	<i>p</i> -OH benzoik asit	0,0488	2,4190
4	Kateşin	0,0218	0,7292
5	Vanilik asit	0,0137	3,3761
6	Kaffeik asit	0,0237	3,0485
7	Siringik asit	0,0266	1,8054
8	Epikateşin	0,0307	3,5090
9	Vanilin	0,0074	3,7139
10	4-OH sinnamik	0,0470	0,6922
11	Rutin	0,0396	2,4545
12	t-Resveratrol	0,0304	3,1849
13	Kuersetin	0,0614	5,1580
14	Kaempferol	0,0198	6,1411

RT: Tutulma zamanı, RSD: Bağıl standart sapma.

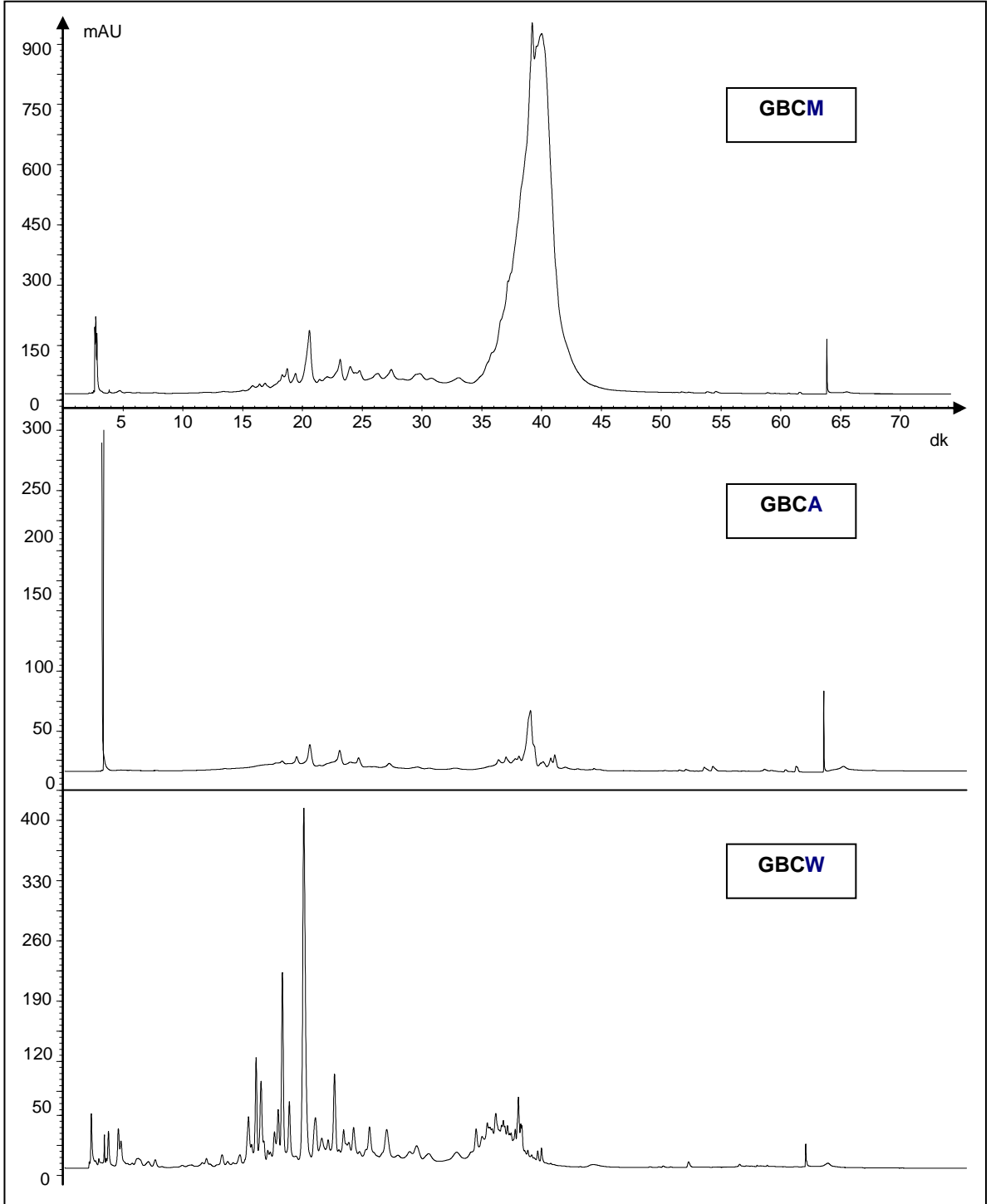
3.2. Meyve Sularının ve Farklı Çözücü Ekstraktlarının HPLC-UV Analizlerin Karşılaştırılması

Fenolik standartlar kullanılarak HPLC-UV metodunun optimizasyonunun ardından, bütün meyvelerden elde edilen ekstraktlar analiz edildi. Sonuçlar, her bir meyveye ait ayrı ayrı çekirdek ve zar kısımlarının farklı çözücüler kullanılması ile elde edilen numunelerin kromatogramları ve bütün meyvelerin meyve sularının karşılaştırılmalı kromatogramları halinde aşağıda verilmiştir.

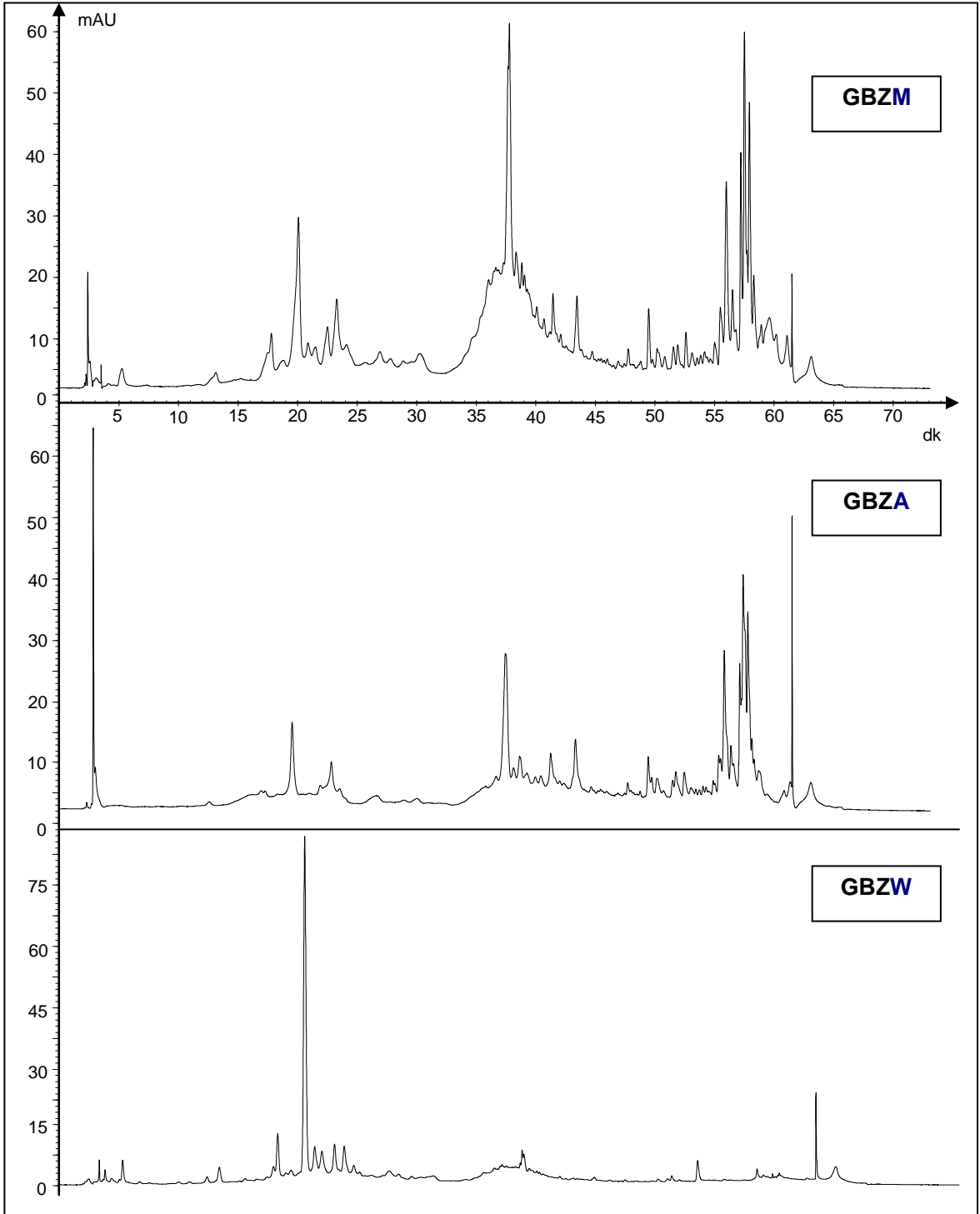
Gilaburunun çekirdek kısımlarının farklı çözücüler (metanol, asetonitril ve su) ile ekstraksiyonundan elde edilen numunelerin kromatogramları Şekil 20'de ve zar kısımlarının farklı çözücüler ile elde edilen numunelerin kromatogramları ise Şekil 21'de verilmiştir. Gilaburu meyvesine ait kromatogramlar, bu numunelerin her birinin önemli derecede farklı kromatogram profillerine sahip olduğunu göstermektedir. Gilaburunun farklı kısımlarından elde edilen bileşik kompozisyonunun karşılaştırılmasında, çekirdek ekstraktlarının zar ekstraktlarına göre daha fazla bileşen içerdiği görülmektedir. Bu sonuç yapılan on-line ve off-line antioksidan testler ile de paralellik göstermektedir.

Farklı çözücü ekstraktlarının karşılaştırılmasında, gilaburunun metanollü ekstraktlarındaki fenolik madde miktarı sulu ve asetonitrilli ekstraktlara göre daha fazladır. Sulu ekstraktlar da asetonitrilli ekstraktlara göre daha fazla fenolik madde içermektedir. Bu profilden görülmektedir ki, bir örnekteki farklı özellikteki fenolik bileşiklerin elue edilmesinde ekstraksiyonda kullanılan çözücünün yapısı ve polaritesi önemlidir. Elde edilen kromatogramlara göre, organik çözücüler daha çok apolar karakterli bileşikler yani bir RP kolondan en son ayrılan bileşikler ekstrete ederken, inorganik çözücüler ise polar bileşikler (kolondan ilk önce ayrılan bileşikler) ekstrete etmektedir. Sulu ekstraktların kromatogram profiline bakıldığında ilk 30 dakikada hemen hemen bütün bileşiklerin erken elue edildiği görülmektedir.

Ayrıca flavonol aglikonların gradient sonunda elue edildiği için (Şekil 19'da kuersetin ve kaempferol) esas piklerin flavonol glikozitlere karşılık gelmeleri mümkündür. Flavonoid glikozitler içerdikleri şeker gruplarından dolayı daha yüksek polariteye sahip olduklarından gradientte daha erken elue edilirler (Şekil 19'da rutin ~ 33 dk).



Şekil 20. Gilaburu meyvesinin çekirdek kısmının metanol (GBCM), asetonitril (GBCA) ve sulu (GBCW) ekstraktlarının 280 nm'deki HPLC-UV kromatogramları

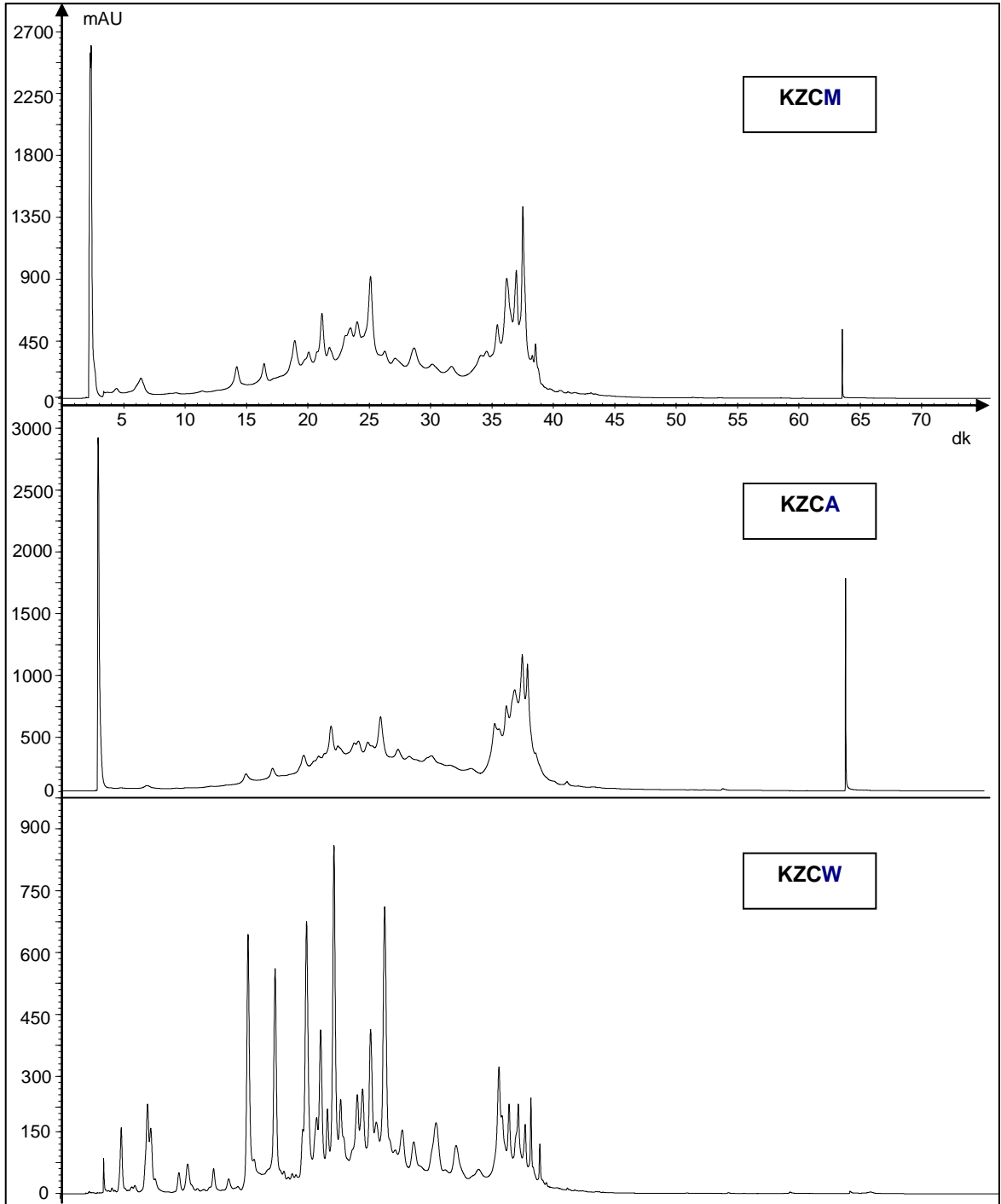


Şekil 21. Gilaburu meyvesinin zar kısmının metanol (GBZM), asetonitril (GBZA) ve sulu (GBZW)ekstraktlarının 280 nm'deki HPLC-UV kromatogramları

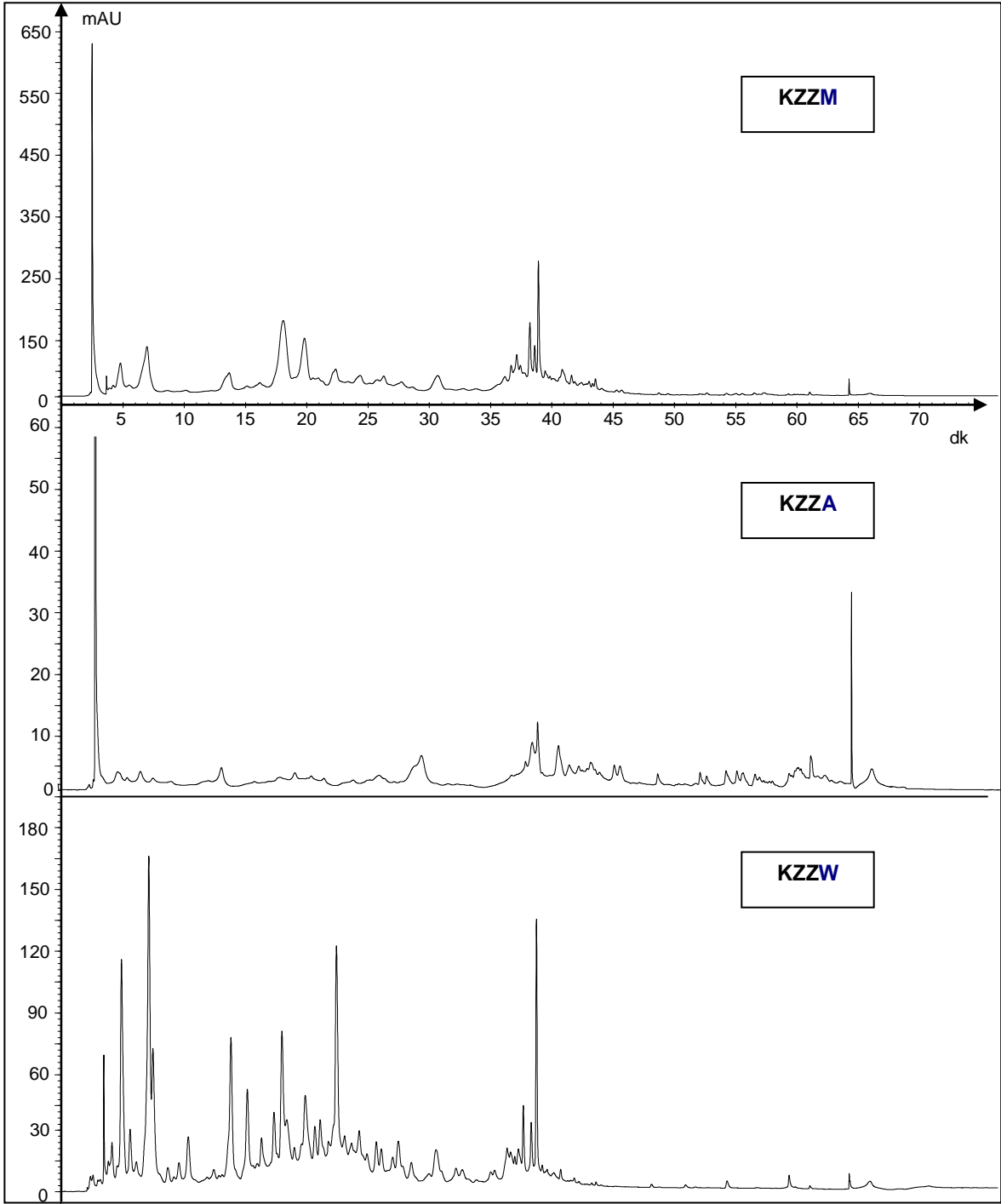
Kızılcık meyvesinin çekirdek kısımlarının farklı çözücüler (metanol, asetonitril ve su) ile ekstraksiyonundan elde edilen numunelerin kromatogramları Şekil 22’de ve zar kısımlarının farklı çözücüler ile elde edilen numunelerin kromatogramları ise Şekil 23’de verilmiştir. Çekirdek ve zar kısımlarının karşılaştırılmasında, çekirdek kısmının daha fazla miktarda fenolik bileşik içerdiği tespit edilmiştir. Yapılan off-line antioksidan aktivite belirleme yöntemlerinde de (ABTS, FRAP ve TF madde miktarı) aynı sonuç elde edilmiştir; çekirdek ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri daha yüksektir.

Kızılcık meyvesinin çekirdek numunelerinde farklı çözücü karşılaştırılmasında, fazla miktarda fenolik bileşikten düşüğe doğru çözücü sıralaması asetonitril-metanol-su şeklindedir. Fakat zar numunelerinde en az fenolik bileşik asetonitrilli numunelerde en fazla ise metanollü numunelerde tespit edilmiştir.

Çekirdek ve zar kısımlarından elde edilen kromatogramların hepsinde 35-40 dakikalar arasında birbirinden ayrılmamış pikler bulunmaktadır. Bunlar genellikle prosiyanidinler yada prosiyanidin türevleridir (Liu vd., 2010).



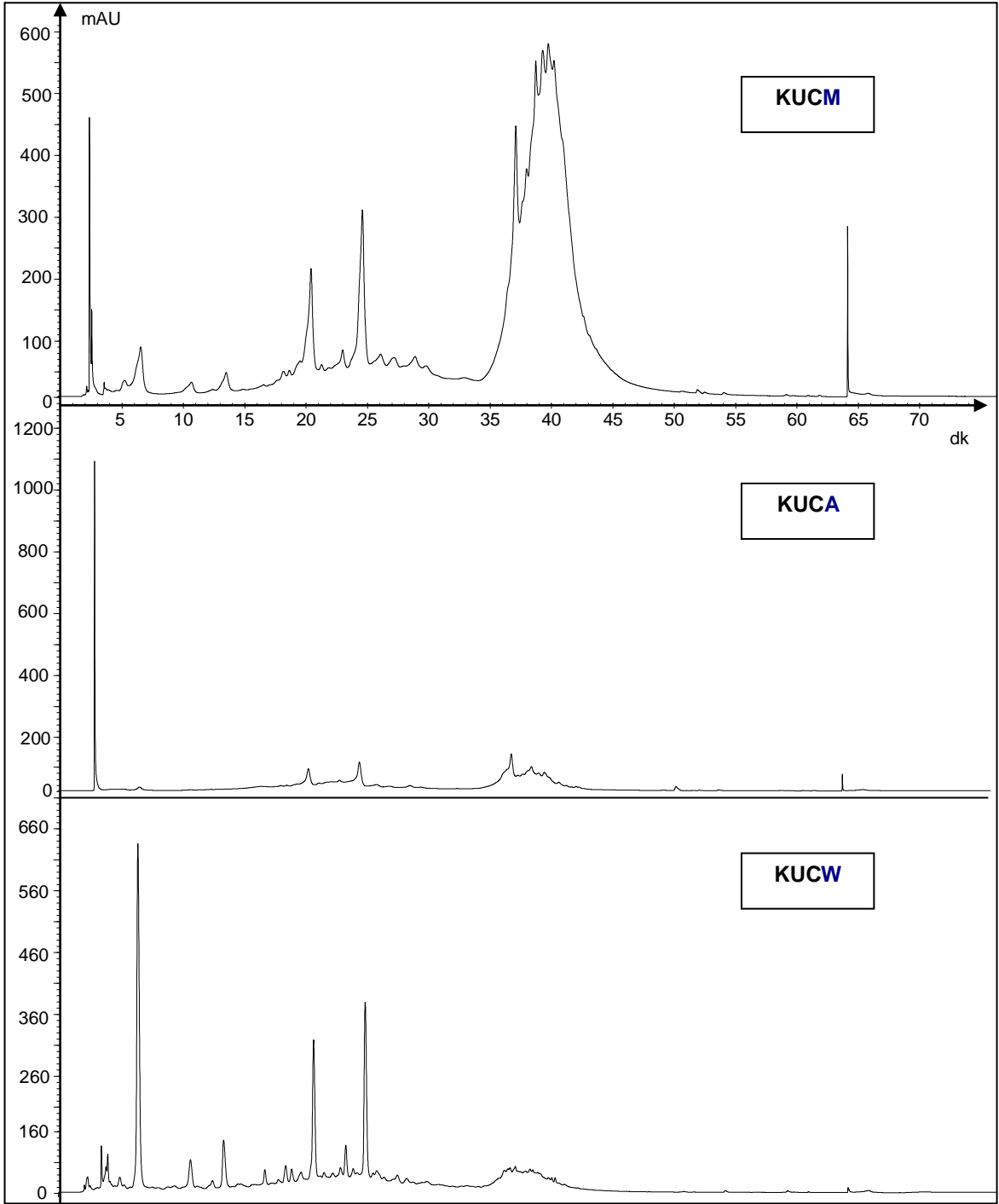
Şekil 22. Kızılcık meyvesinin çekirdek kısmının metanol (KZCM), asetonitril (KZCA) ve su (KZCW)ekstraktlarının 280 nm'deki HPLC-UV kromatogramları



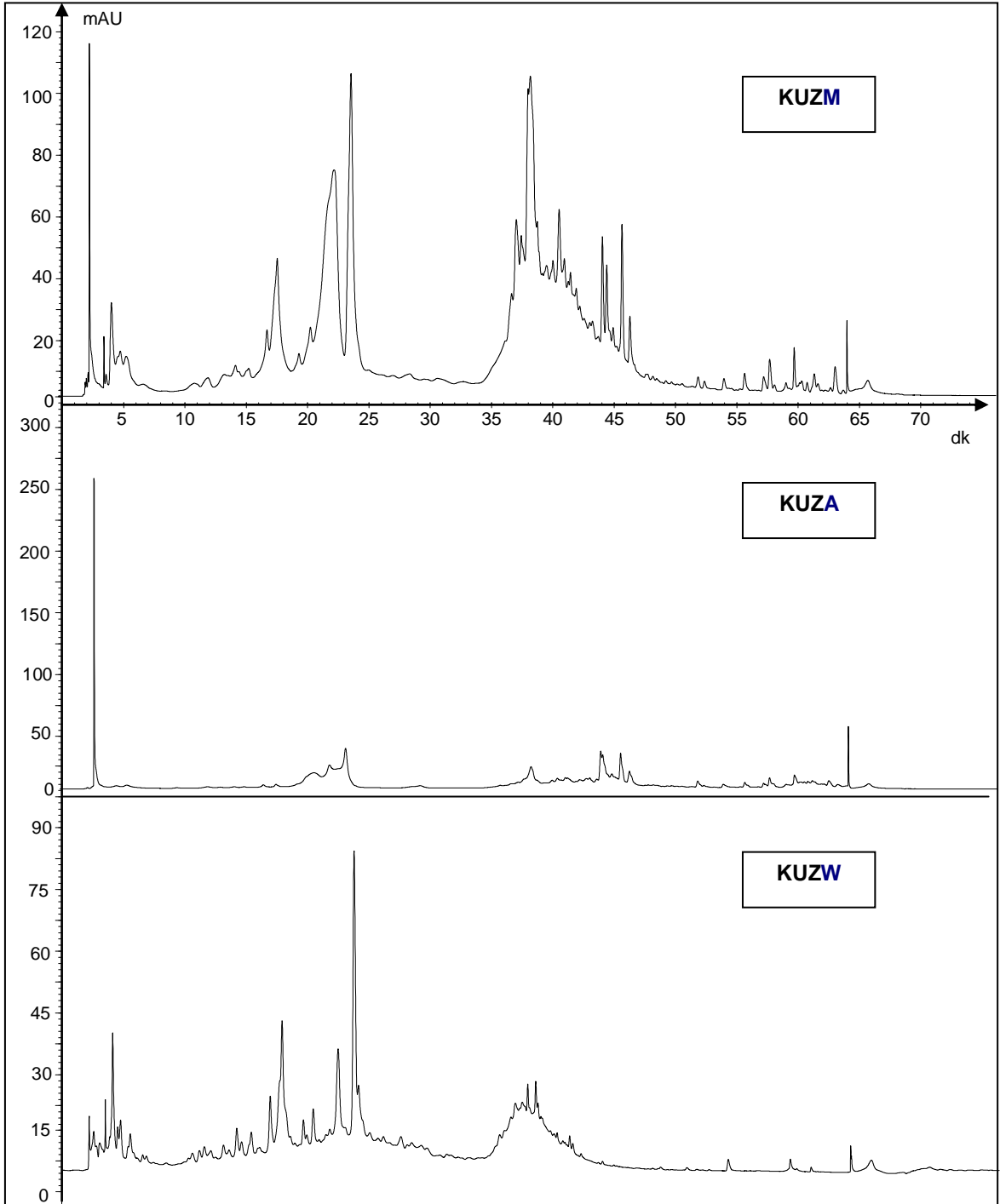
Şekil 23. Kızılcık meyvesinin zar kısmının metanol (KZZM), asetonitril (KZZA) ve sulu (KZZW) ekstraktlarının 280 nm'deki HPLC-UV kromatogramları

Kokulu üzüm meyvesinin çekirdek kısımlarının farklı çözücüler (metanol, asetonitril ve su) ile ekstraksiyonundan elde edilen numunelerin kromatogramlarının karşılaştırması Şekil 24’de, zar numunelerinininki ise Şekil 25’de verilmiştir.

Gilaburu ve kızılılık meyvelerinde olduğu gibi kokulu üzümde de çekirdek ekstraktlarındaki fenolik madde miktarı daha fazladır. Şekil 24’de KUCM numunesine ait kromatogramda skala yaklaşık 600 civarında iken KUCA numunesinde ise 1200 civarındadır. Fakat yapılan on-line ve off-line testlere göre KUCM numunesi en fazla fenolik madde miktarı içermekte ve yüksek aktivite göstermektedir. KUCA numunesinde skalanın 1200 civarında olması 3.dakikalarda gelen pikin fazla miktarda olmasından kaynaklanmaktadır.



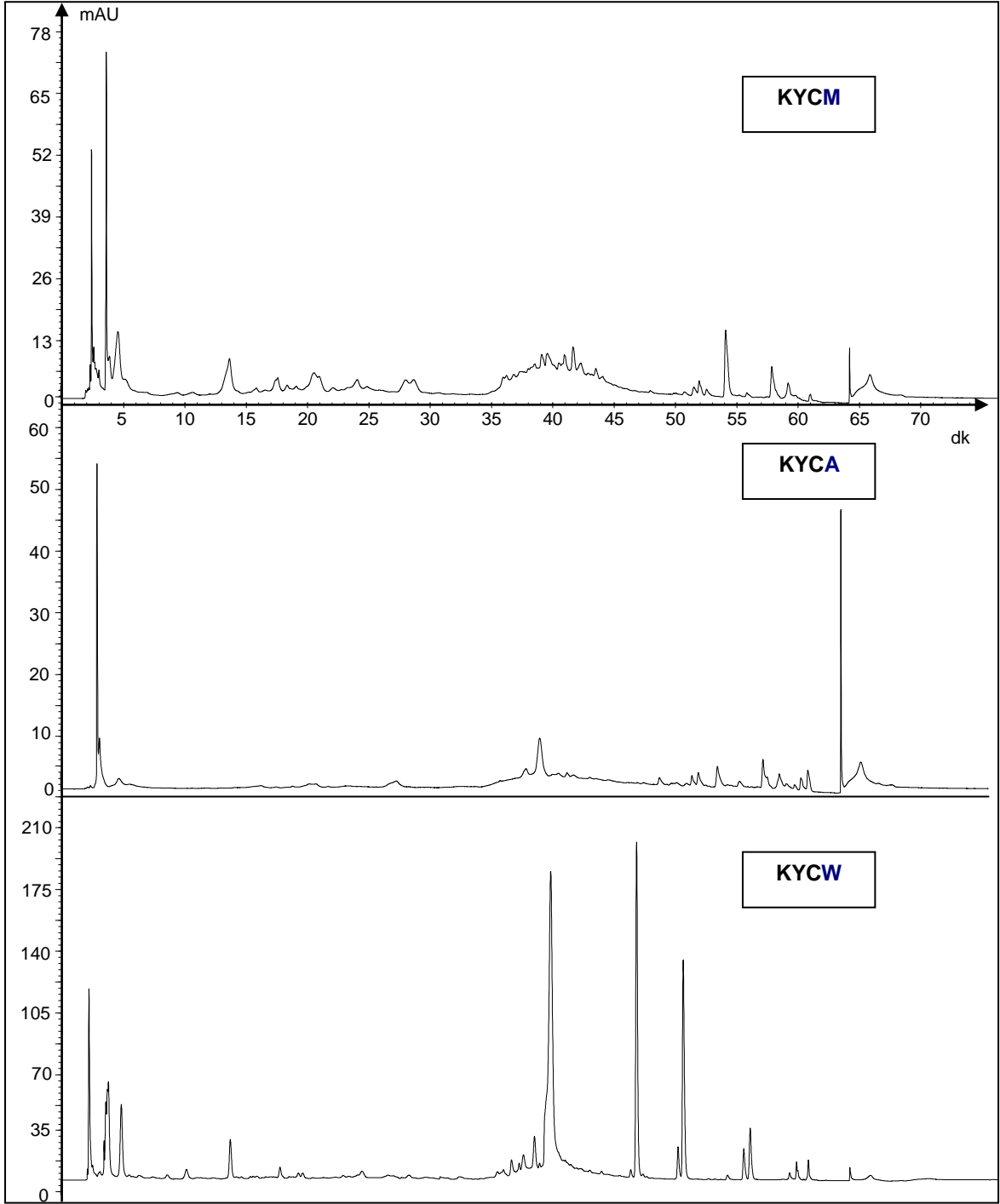
Şekil 24. Kokulu üzüm meyvesinin çekirdek kısmının metanol (KUCM), asetonitril (KUCA) ve sulu (KUCW) ekstraktlarının 280 nm'deki HPLC-UV kromatogramları



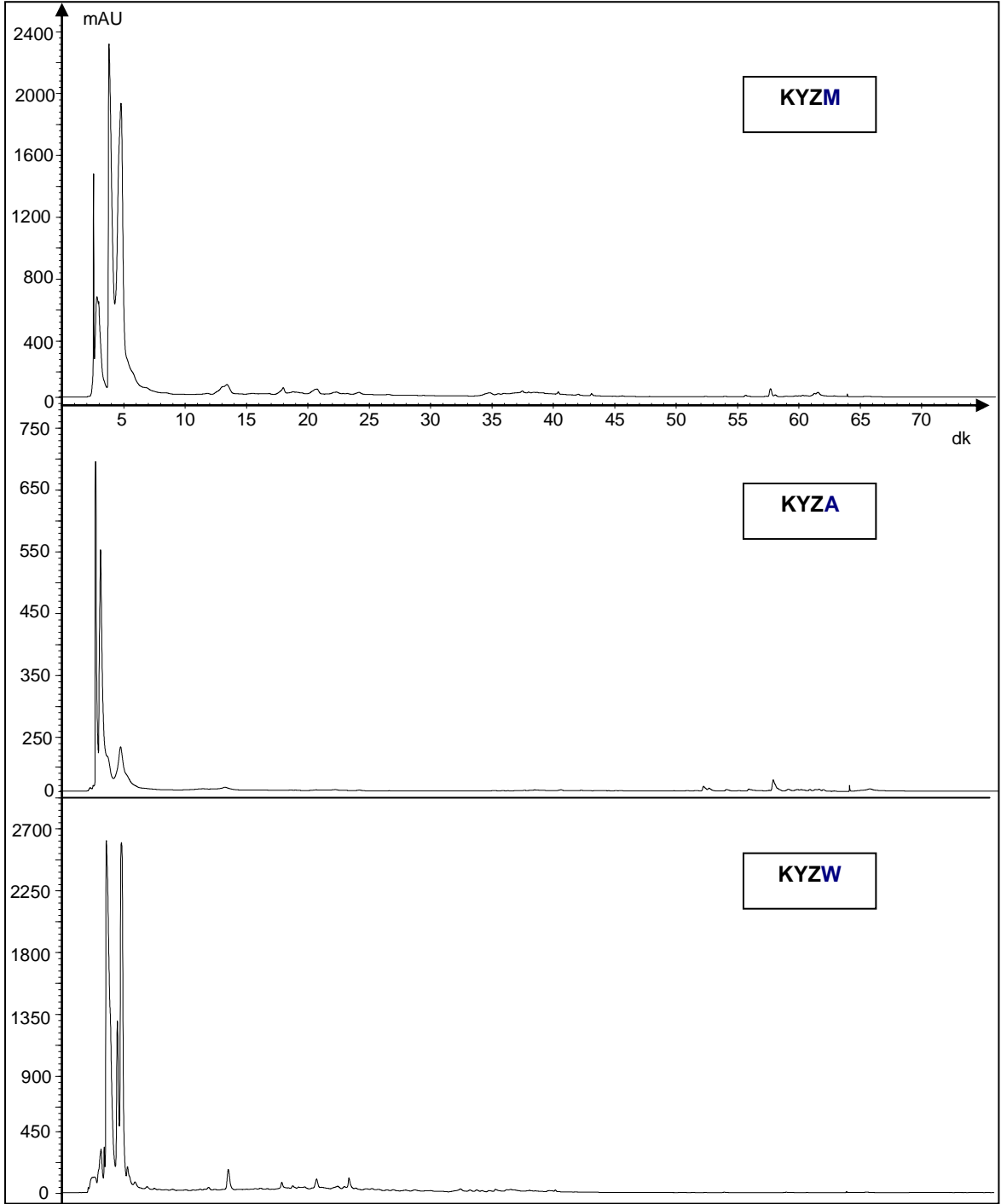
Şekil 25. Kokulu üzüm meyvesinin zar kısmının metanol (KUZM) , asetonitril (KUZA) ve sulu (KUZW) ekstraktlarının 280 nm'deki HPLC-UV kromatogramları

Karayemiş meyvesinin çekirdek kısımlarının farklı çözücüler (metanol, asetonitril ve su) ile ekstraksiyonundan elde edilen numunelerin kromatogramlarının karşılaştırması Şekil 26’da ve zar numunelerinininki ise Şekil 27’de verilmiştir.

Yapılan bütün off-line ve on-line antioksidan testlerde olduğu gibi, diğeri meyvelerin aksine karayemiş meyvesinde zar numunelerinin fenolik madde miktarı ve antioksidan aktivitesi çekirdek numunelerine göre daha yüksektir. Karayemiş meyvesinin zar kısımlarındaki yüksek aktivitenin farklı çözücü karşılaştırılmasında ise en fazla fenolik bileşik metanollü ekstraktlardan elde edilirken, en az bileşik ise asetonitrilli ekstraktlardan elde edilmiştir. Çekirdek numunelerinde ise en fazla fenolik bileşik sulu numunelerden, en az fenolik bileşik ise yine asetonitrilli ekstraktlardan elde edilmiştir.



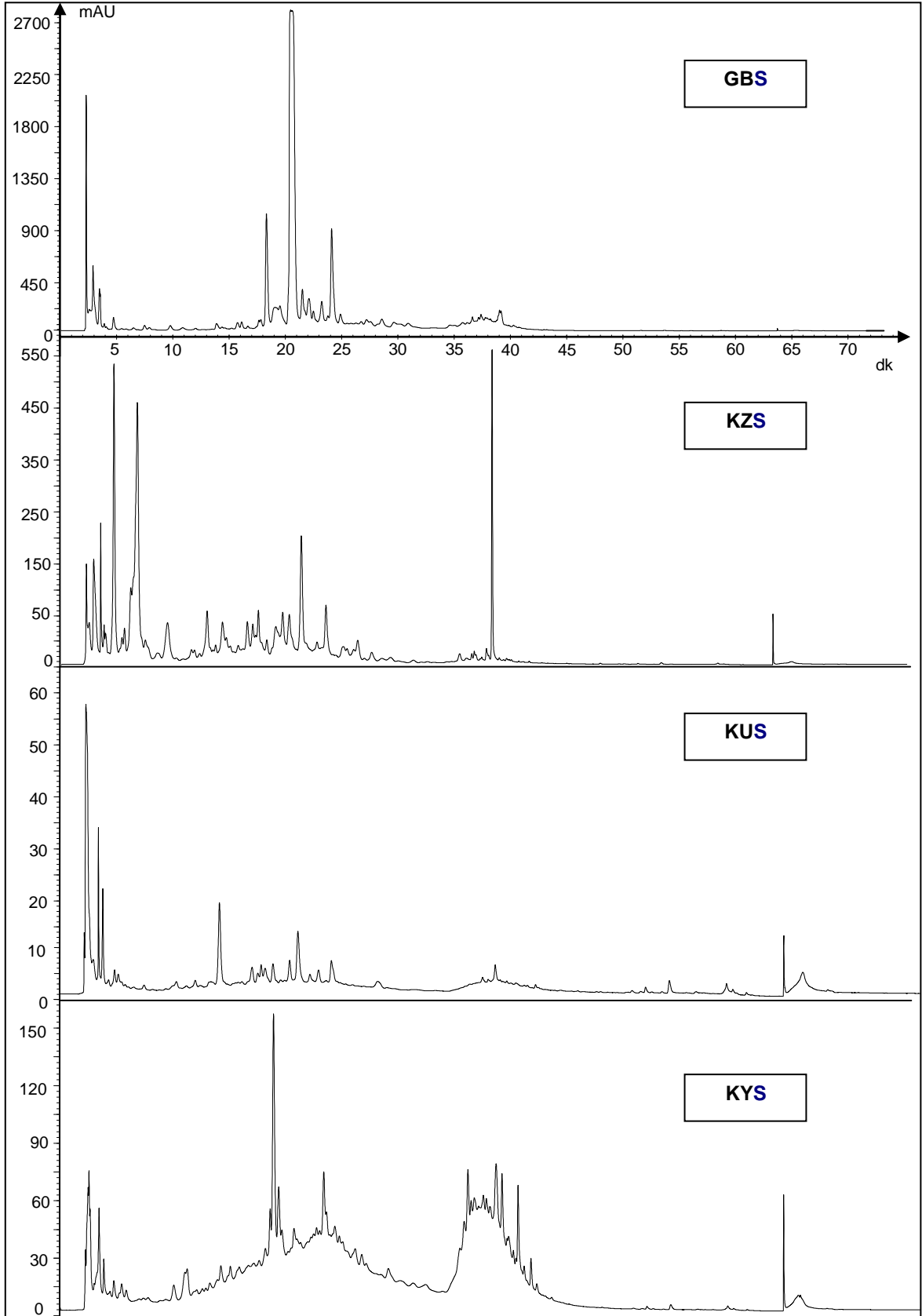
Şekil 26. Karayemiş meyvesinin çekirdek kısmının metanol (KUCM), asetonitril (KUCA) ve sulu (KUCW) ekstraktlarının 280 nm'deki HPLC-UV kromatogramları



Şekil 27. Karayemiş meyvesinin zar kısmının metanol (KYZM), asetonitril (KYZA) ve su (KYZW) ekstraktlarının 280 nm'deki HPLC-UV kromatogramları

Bütün meyvelerin meyve sularından elde edilen kromatogram sonuçları ise karşılaştırma yapılmak üzere sırasıyla gilaburu (GBS), kıızılcık (KZS), kokulu üzüm (KUS) ve karayemiş (KYS) meyve suları olmak üzere Şekil 28’de verilmiştir.

Numunelerdeki fenolik bileşiklerin ayrılmasında RP kolonlar kullanıldığı için meyve suyu numunelerinde polar bileşikler kromatogramların ilk 25 dakikasında kolondan ayrılmıştır. Meyve sularının karşılaştırılmasında gilaburu meyve suyundan elde edilen fenolik bileşik miktarı diğerlerine göre daha fazladır. Meyve sularının içerdiği en fazla fenolik maddeden en aza doğru olan sıralama gilaburu-kızılcık-karayemiş ve kokulu üzüm şeklindedir.



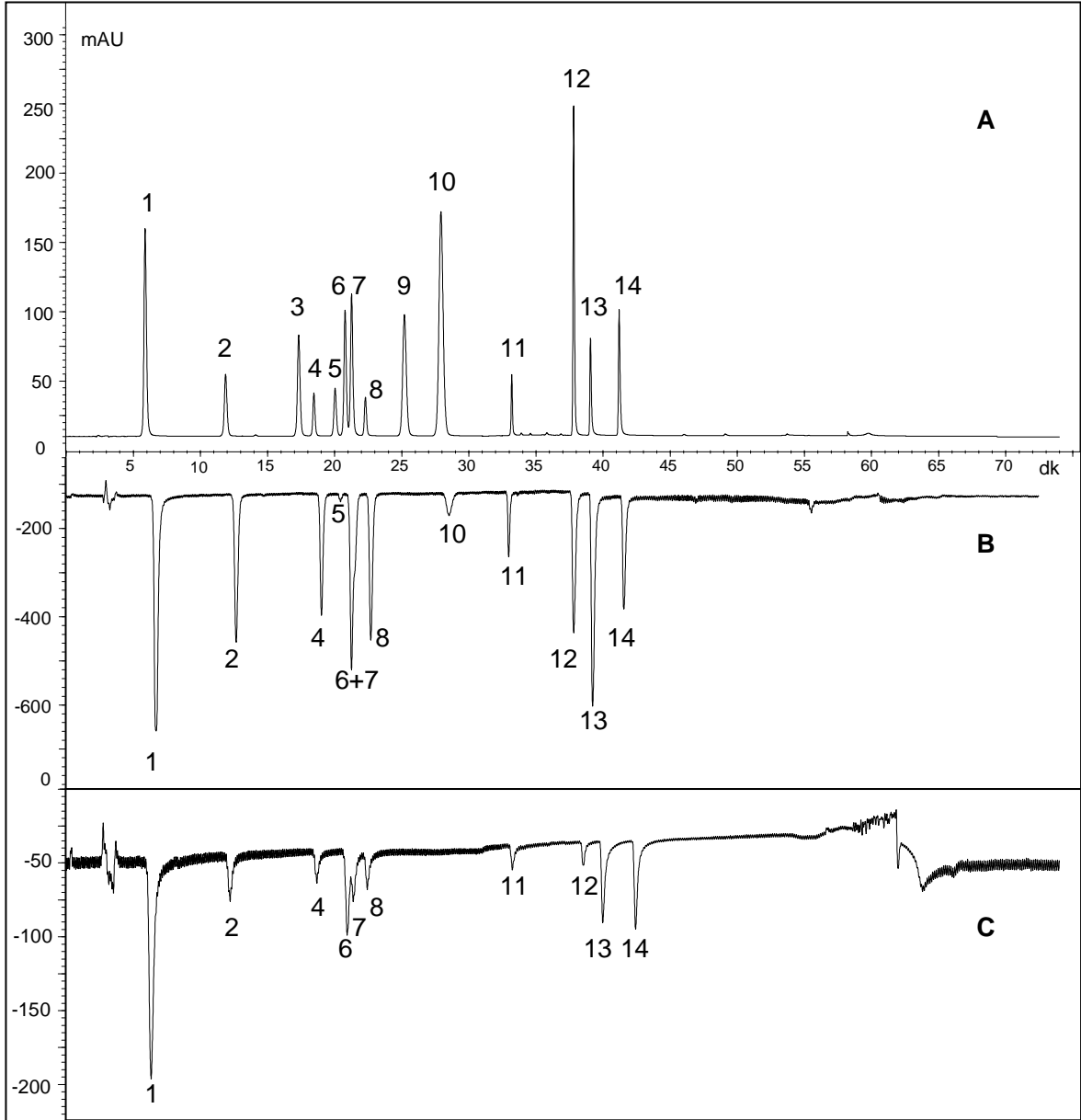
Şekil 28. Gilaburu (GBS), kızılıcık (KZS), kokulu üzüm (KUS) ve karayemiş (KYS) meyvelerinin meyve suyu kısımlarının 280 nm'deki HPLC-UV kromatogramları

3.3. On-line Antioksidan Aktivite Analiz Sonuçları

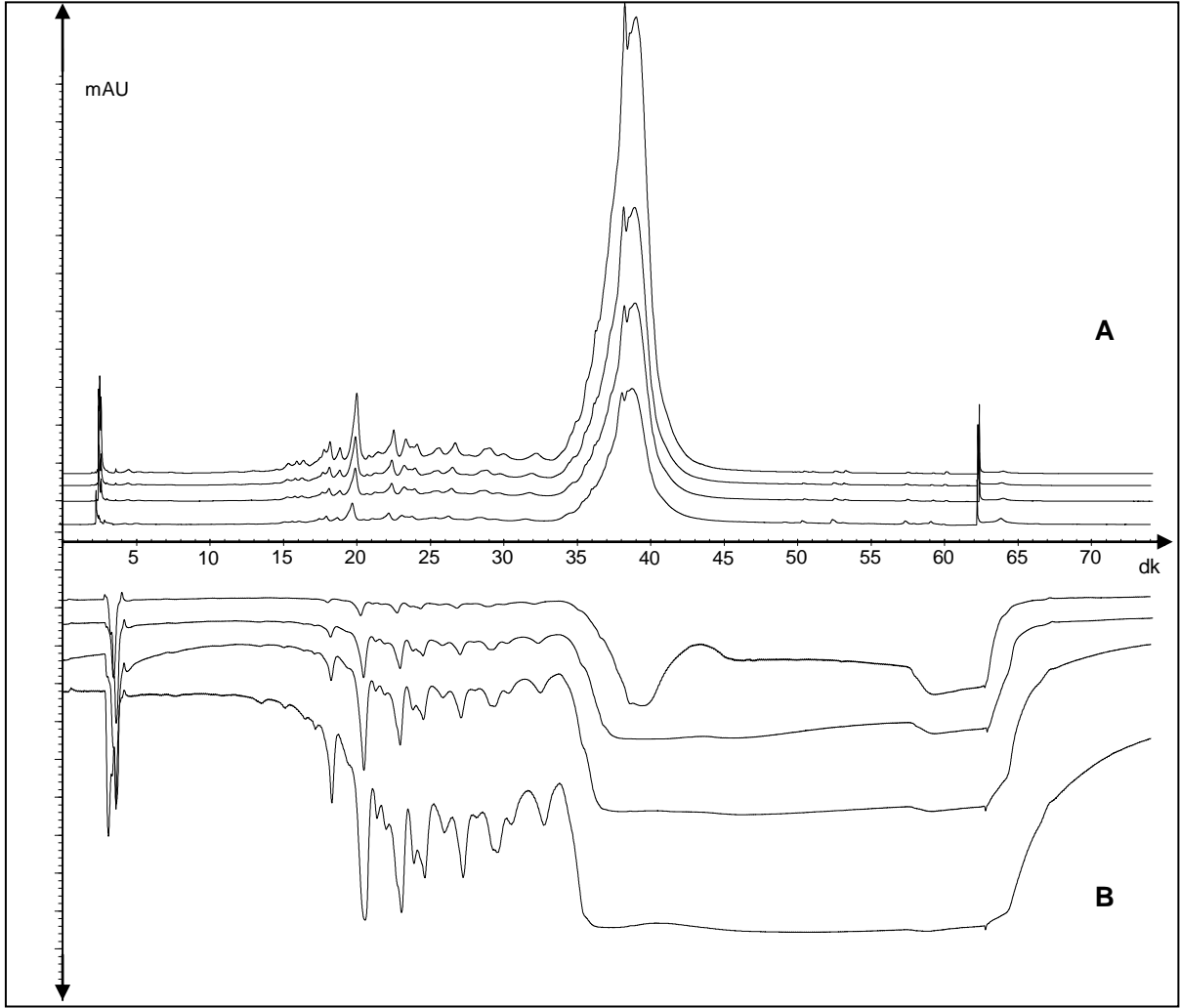
3.3.1. Standartların On-line HPLC-ABTS ve HPLC-DPPH Analizlerinin Karşılaştırılması

On-line HPLC-ABTS ve HPLC-DPPH analizleri antioksidan fenolik bileşiklerin tanımlanmasında kullanılan hemen hemen paralel kimyasal dedeksiyon yöntemleridir. Kromatogramdaki negatif pikler örnek içindeki antioksidan bileşiğin karşılığıdır. Şekil 29'da 14 standart fenolik bileşiğin on-line HPLC-ABTS ve HPLC-DPPH radikali temizleme aktiviteleri 280 nm'deki UV kromatogramla birlikte gösterilmiştir. Her iki yöntemde de SC_{50} değerleri büyük olan *p*-OH benzoik asit ve vanilin dedekte edilememiştir. Ayrıca sadece on-line DPPH yöntemi ile vanilik asit ve 4-OH sinnamik asit de dedekte edilememiştir.

Şekil 30'da konsantrasyon ile ABTS radikal temizleme testi arasındaki ilişki verilmiştir. Bunun içinde gilaburu meyvesinin çekirdek kısmının metanollü ekstraktının (GBCM) stok ve 1:2, 3:10, 1:10 oranında stoktan seyreltilmiş numuneleri kullanılmıştır. Kromatogramlara göre numune konsantrasyonu ile ABTS^{•+} temizleme aktivitesi arasında doğrusal bir korelasyon vardır.



Şekil 29. Standart fenolik bileşiklerin on-line analizleri (bütün bileşiklerin konsantrasyonu 20 ppm). A: 280 nm'deki UV kromatogram, B: 414 nm'deki ABTS radikal temizleme kromatogramı, C: 521 nm'deki DPPH radikali temizleme kromatogramı. Tanımlama: 1. gallik asit, 2. 3,4-dihidroksibenzoik asit, 3. *p*-OH benzoik asit, 4. kateşin, 5. vanilik asit, 6. kaffeik asit, 7. siringik asit, 8. epikateşin, 9. vanilin, 10. 4-OH sinnamik asit, 11. rutin, 12. t-resveratrol, 13. kuersetin, 14. kaempferol



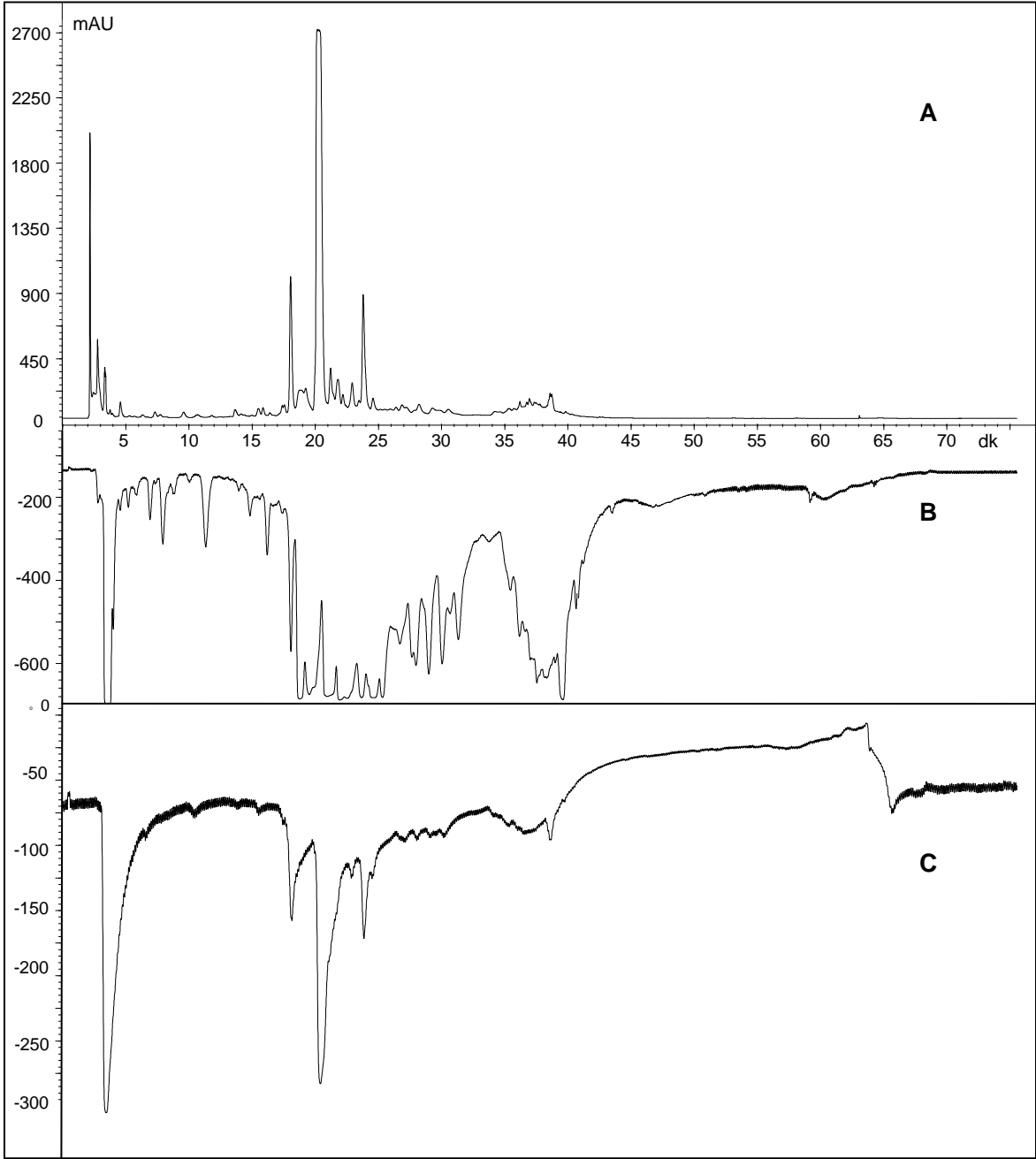
Şekil 30. A: Gilaburu meyvesinin çekirdek kısmının metanollü (GBCM) ekstraktının farklı konsantrasyonlarının (stok ve 0.5, 0.3, 0.1 oranında seyreltilmiş) 280 nm'deki on-line HPLC-UV kromatogramları, B: Farklı konsantrasyonlardaki bu numunenin 414 nm'deki on-line HPLC-ABTS kromatogramları

3.3.2. Gilaburu Meyvesinin On-line HPLC-Antioksidan Analiz Sonuçları

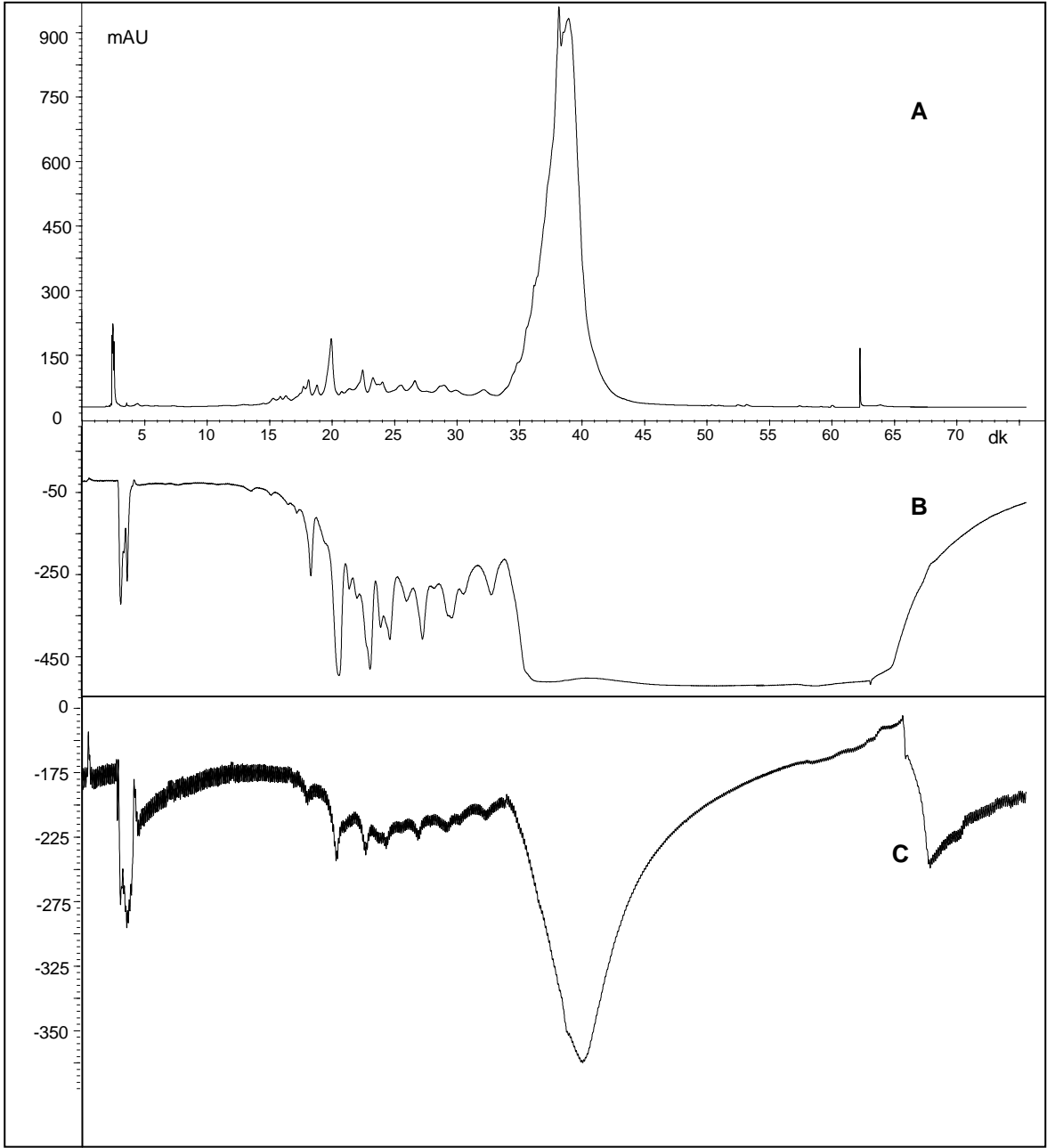
Şekil 31’de gilaburu meyve suyunun (GBS) ABTS ve DPPH radikallerini temizleme kromatogramları verilmiştir. On-line ABTS ve DPPH testlerinin karşılaştırılmasında, ABTS radikal temizleme testinin daha fazla fenolik bileşiğe karşı hassas olduğu görülmektedir. Şekil 32’de ise gilaburu meyvesinin çekirdek kısmının metanollü (GBCM) ekstraktının pozitif ve negatif pikleri verilmiştir. GBS numunesinde olduğu gibi on-line ABTS testinde negatif piklerin sayısı daha fazladır.

ABTS yönteminin daha hassas ve sinyal/gürültü (S/N) oranının daha büyük olmasından dolayı, diğer numunelerin on-line antioksidan aktivitelerinin belirlenmesinde on-line ABTS yöntemi kullanılmıştır.

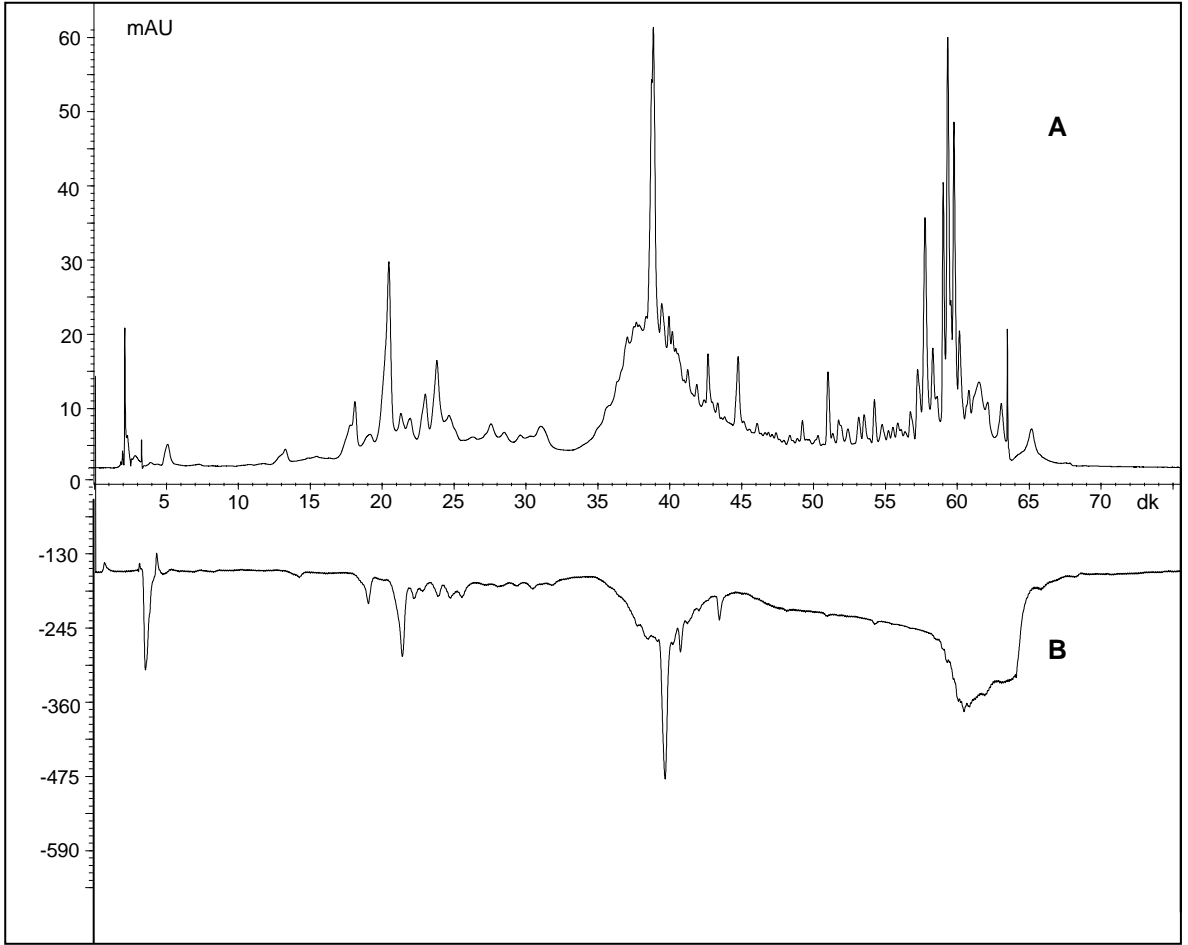
Gilaburu meyvesinin çekirdek kısmının sırasıyla metanol, asetonitril ve su çözücüleri ile hazırlanan ekstraktlarının (GBCM, GBCA, GBCW) on-line ABTS radikali temizleme kromatogramlarındaki (Şekil 32, 34, 36) antioksidan bileşiğin varlığını gösteren negatif piklerin yoğunluğu zar kısımlarının metanol, asetonitril ve sulu ekstraktlarının (GBZM, GBZA, GBZW) kromatogramlarındaki (Şekil 33, 35, 37) negatif piklerden daha fazla olduğu görülmektedir. Gilaburu çekirdek ekstraktlarındaki çözücü karşılaştırılmasında ise en fazla negatif pik, metanollü numunede bulunmaktadır. En az negatif pik ise asetonitrilli numunenin kromatogramından elde edilmiştir. Sonuçlar off-line ABTS test sonuçlarıyla paraleldir.



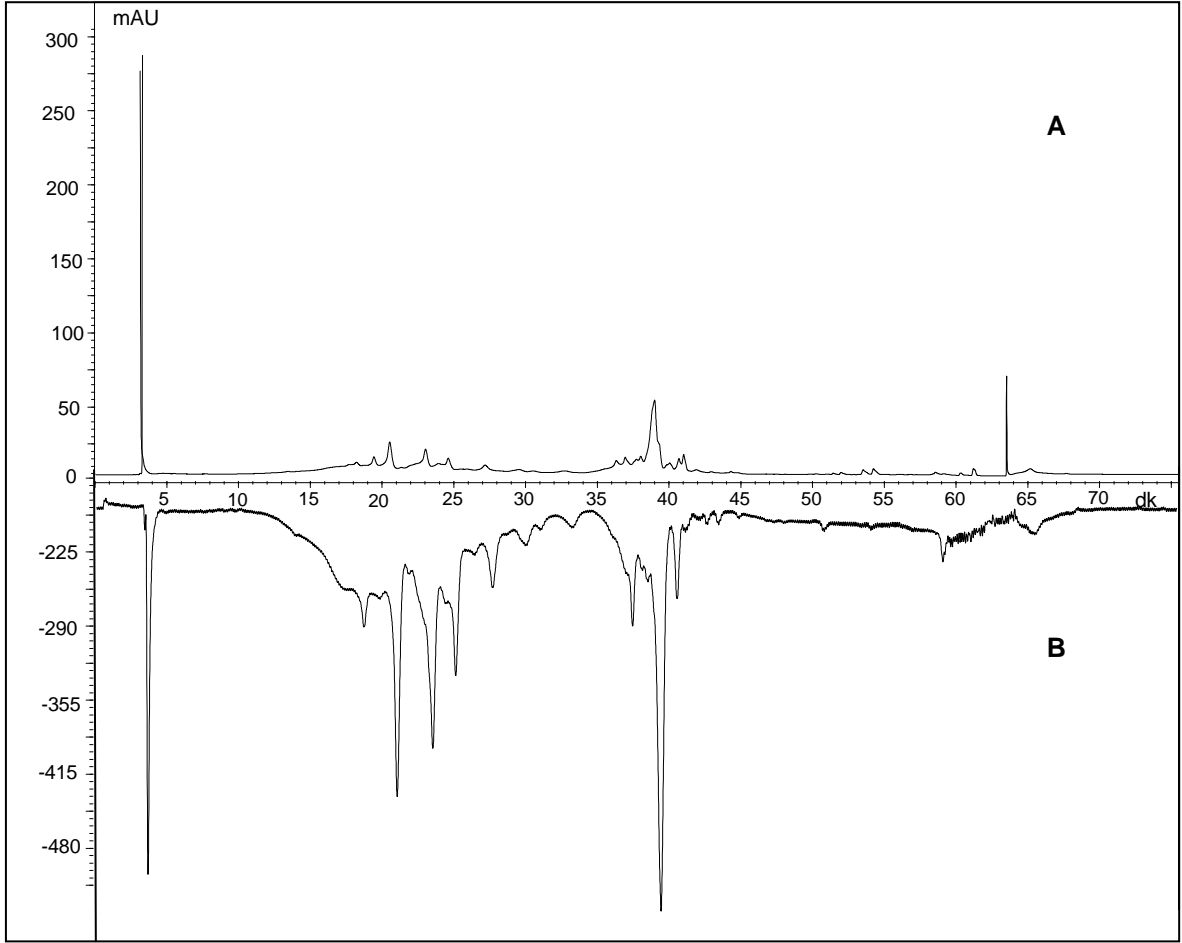
Şekil 31. Gilaburu meyvesinin meyve suyunun (GBS) on-line antioksidan aktivite analizi
A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı, C: 521 nm'deki DPPH radikali temizleme kromatogramı



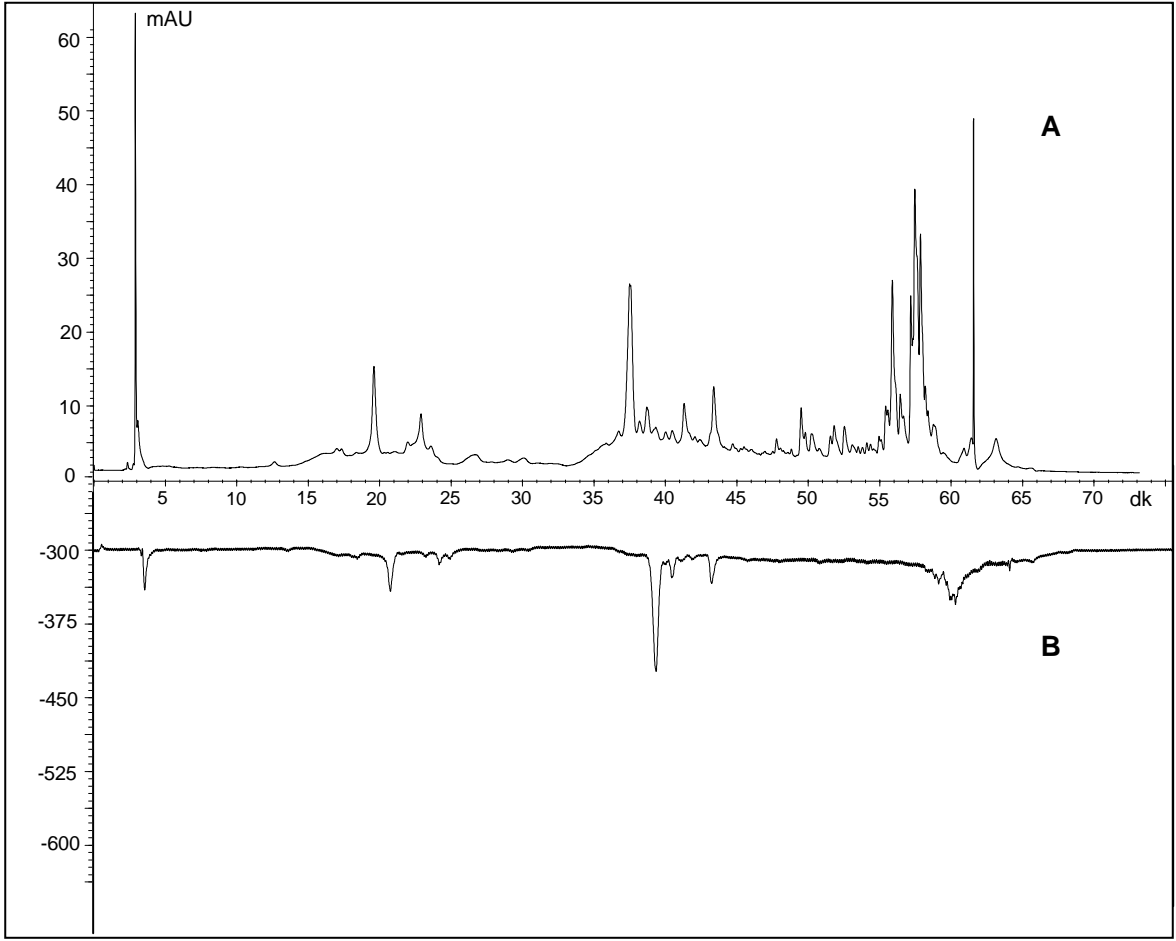
Şekil 32. Gilaburu meyvesinin çekirdek kısmının metanollü (GBCM) ekstraktının on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı, C: 521 nm'deki DPPH radikali temizleme kromatogramı



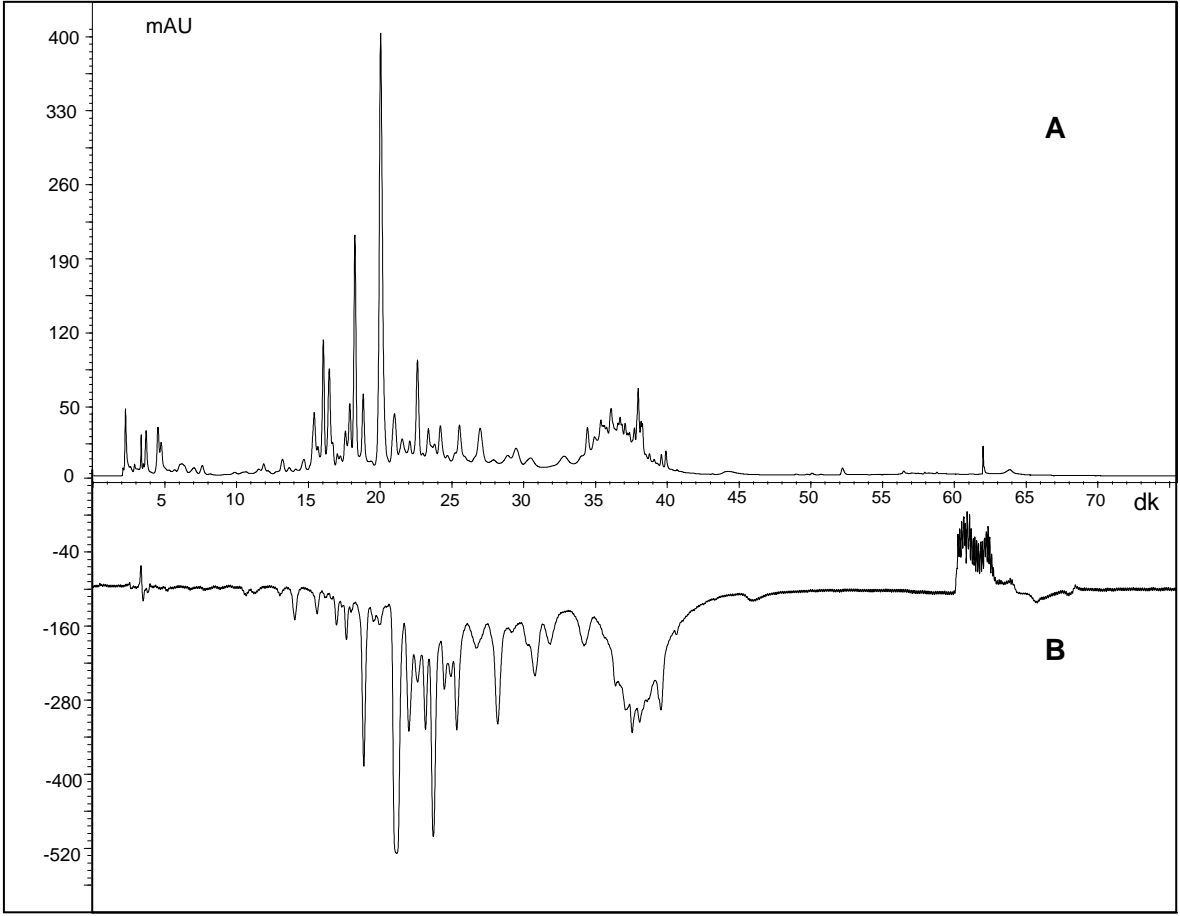
Şekil 33. Gilaburu meyvesinin zar kısmının metanollü (GBZM) ekstraktının on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı



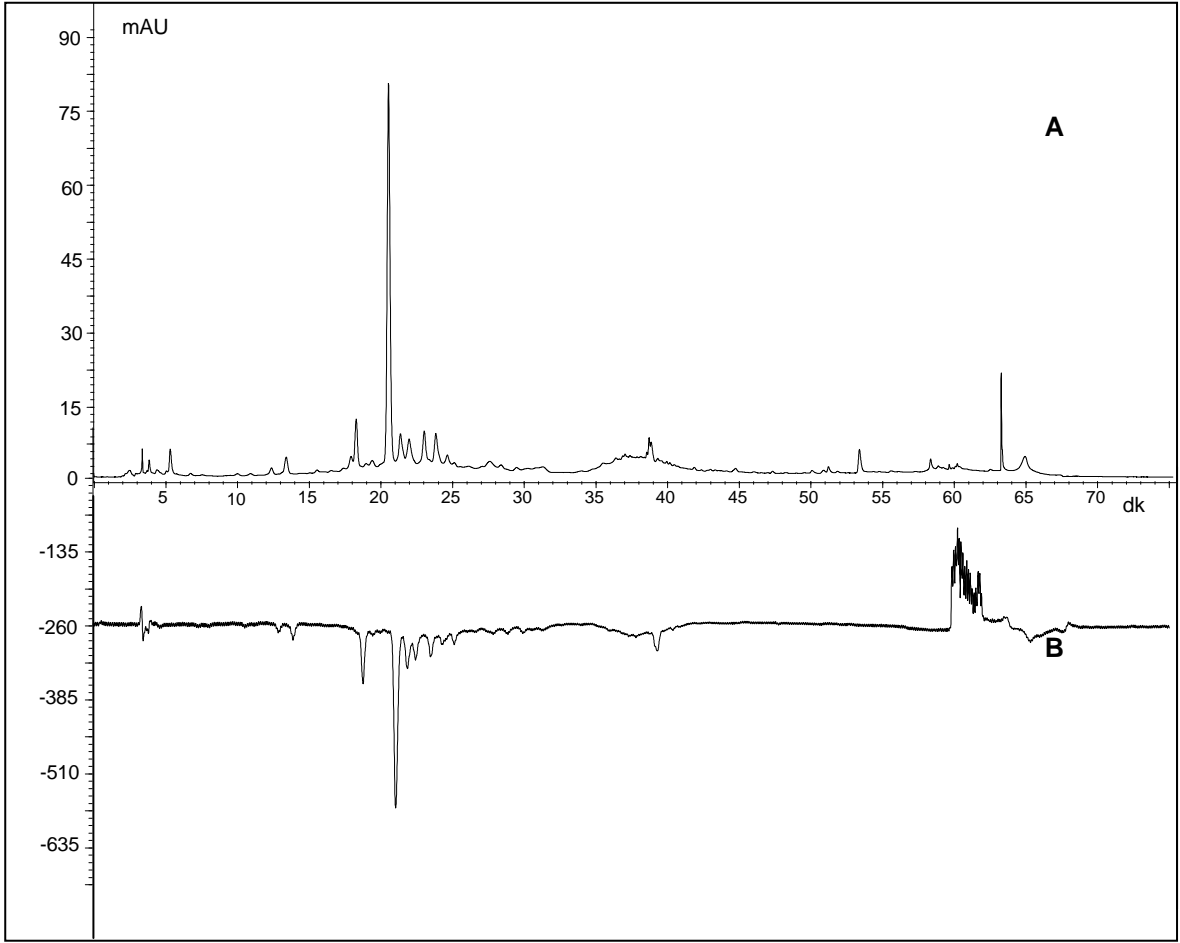
Şekil 34. Gilaburu meyvesinin çekirdek kısmının asetonitrilli (GBCA) ekstraktının on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı



Şekil 35. Gilaburu meyvesinin zar kısmının asetonitrilli (GBZA) ekstraktının on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı



Şekil 36. Gilaburu meyvesinin çekirdek kısmının sulu (GBCW) ekstraktının on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı

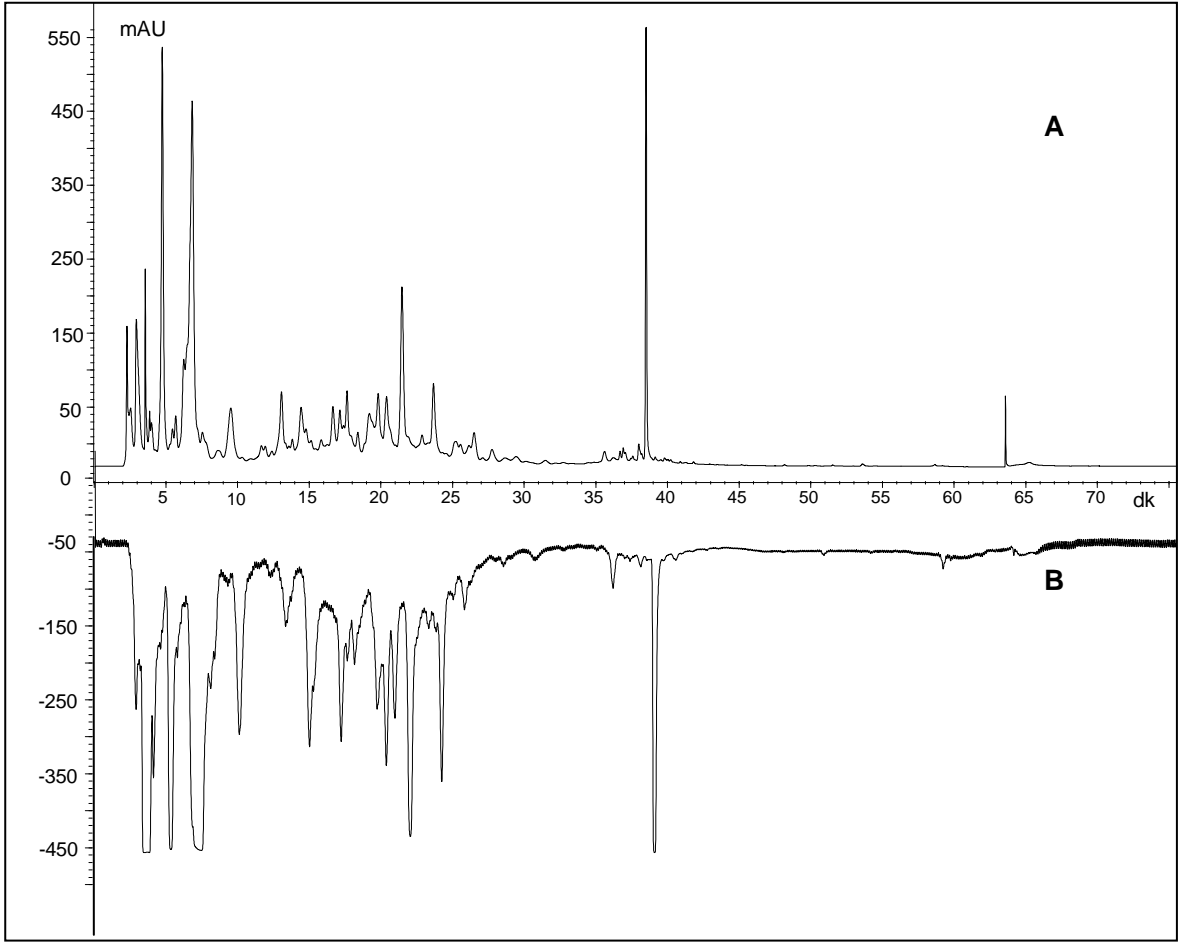


Şekil 37. Gilaburu meyvesinin zar kısmının sulu (GBZW) ekstraktının on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı

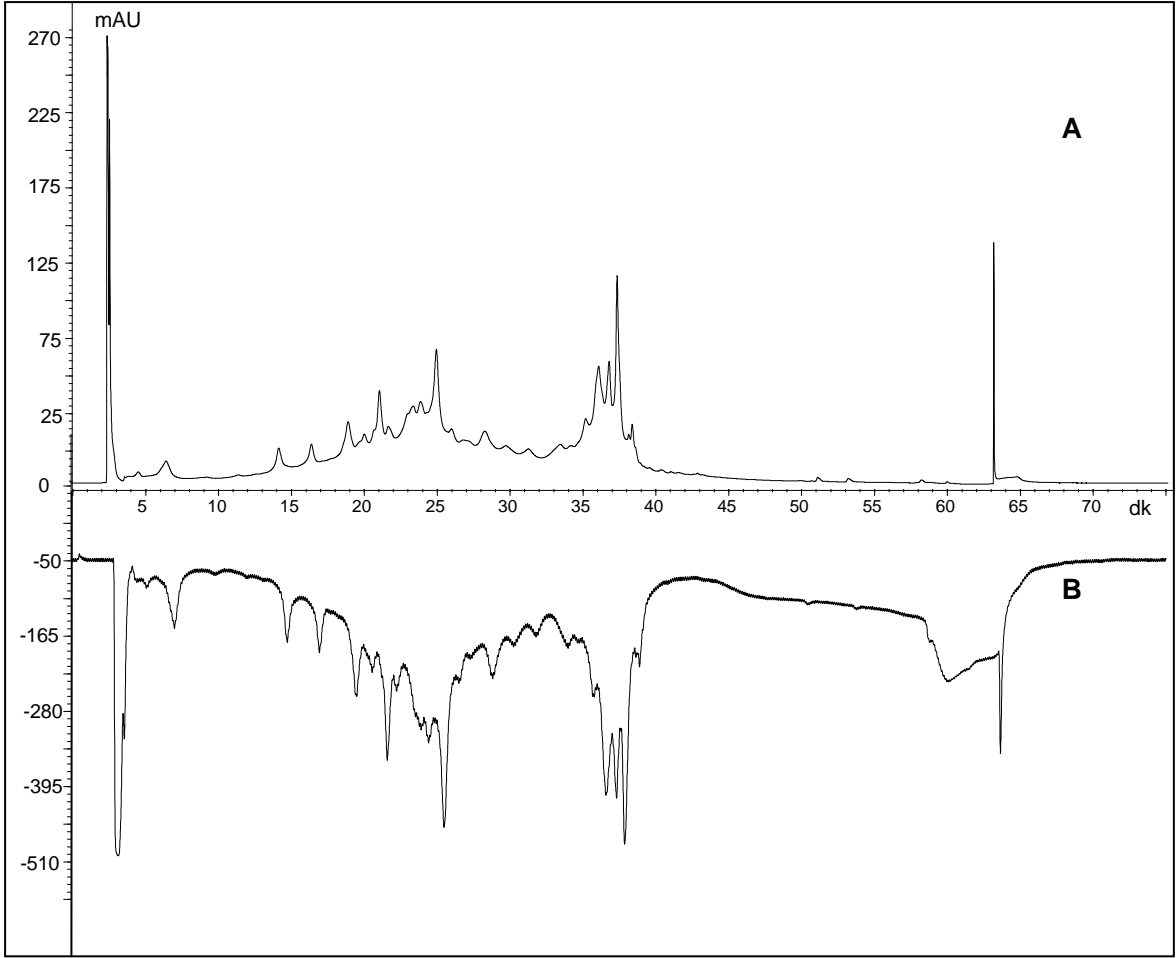
3.3.3. Kızılcık Meyvesinin On-line HPLC-ABTS Antiradikal Analiz Sonuçları

Şekil 38’de kıızılcık meyve suyunun (KZS) ABTS radikal temizleme kromatogramı verilmiştir. RP kolonda 280 nm’de ayrılan hemen hemen her fenolik bileşik on-line ABTS radikal temizleme testine cevap vermiştir. 10-30 dakikaları arasında numunede az miktarda olan herbir bileşiğin büyük bir negatif piki bulunmaktadır. Buda, numunenin içerisindeki az miktarda bulunan bileşiklerin antioksidan özelliğinin yüksek olmasından kaynaklanmaktadır.

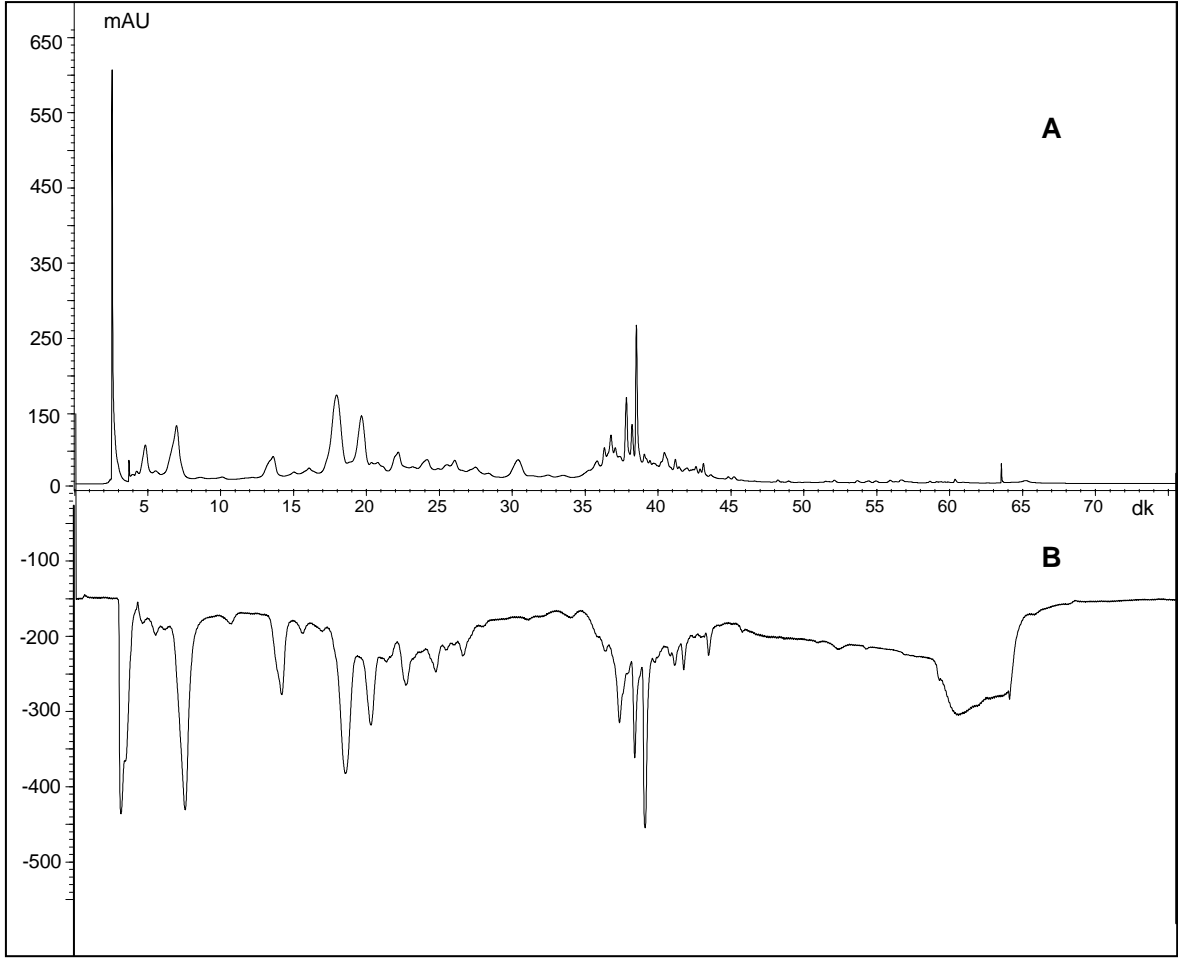
Gilaburu meyvesinde olduğu gibi kıızılcıkta da çekirdek kısmının farklı çözücü ekstraktlarının (sırasıyla KZCM, KZCA, KZCW) on-line ABTS radikali temizleme kromatogramlarındaki (Şekil 39, 41, 43) negatif piklerin boyutunun zar kısmının farklı çözücü ekstraktlarınının (KZZM, KZZA, KZZW) kromatogramlarındaki (Şekil 40, 42, 44) negatif piklerinkinden daha fazla olduğu görülmektedir. Kıızılcık meyvesinin çekirdek kısmının metanollü ekstraktı (KZCM) ile asetonitrilli ekstraktı (KZCA) fazla miktarda fenolik bileşik içerdiği için ABTS radikalini tamamen temizlemiştir. Bunun içinde on-line testte bu numuneler stoktan 1:10 oranında seyreltilerek kullanılmıştır. Zar kısmındaki çözücü karşılaştırılmasında en fazla negatif pik metanollü ekstraktlardan, en az ise asetonitrilli ekstraktlardan elde edilmiştir. Sonuçlar off-line ABTS antioksidan aktivite belirleme yöntemiyle paraleldir.



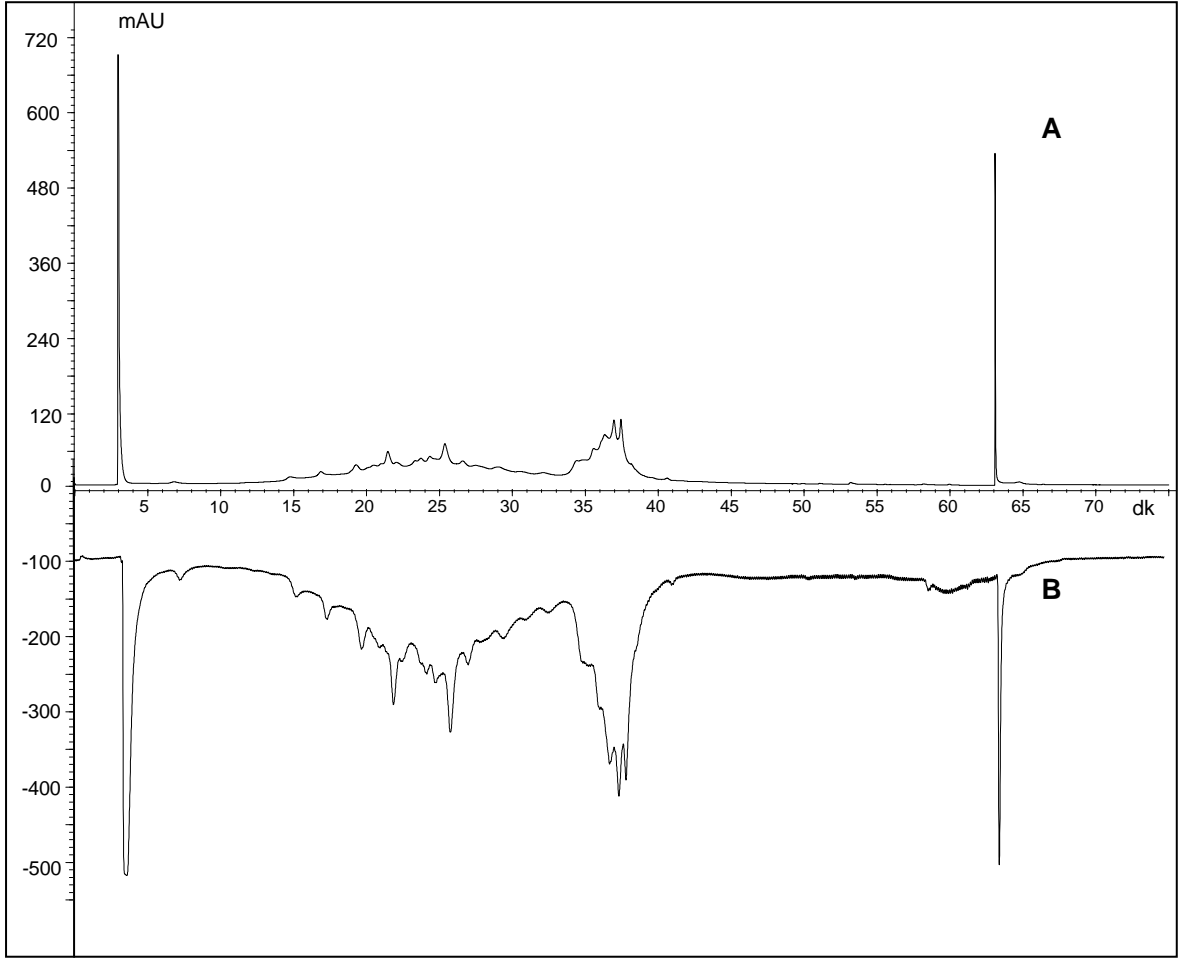
Şekil 38. Kızılcık meyvesinin meyve suyunun (KZS) on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikal temizleme kromatogramı



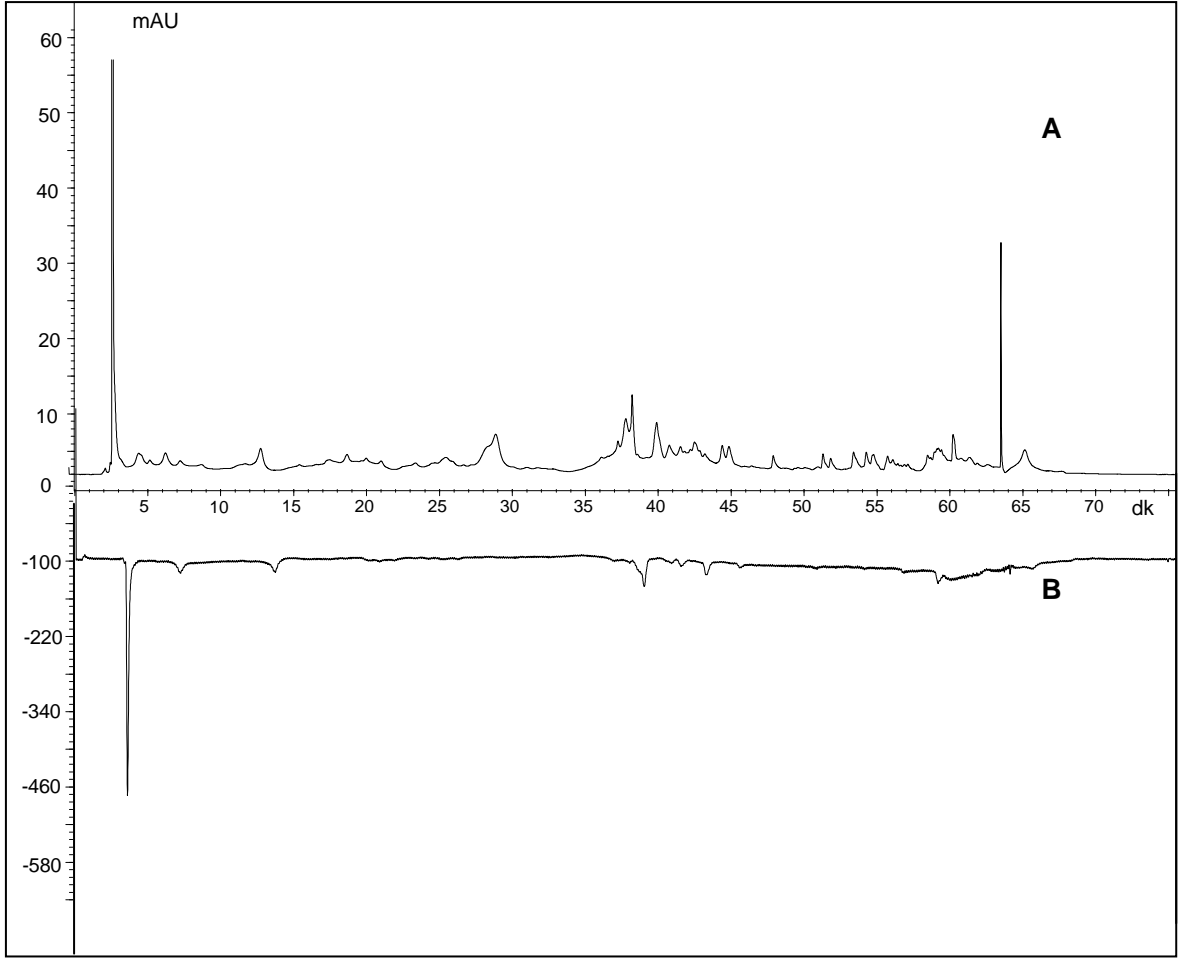
Şekil 39. Kızılcık meyvesinin çekirdek kısmının 1:10 seyreltilmiş metanollü ekstraktının (KZCM) on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı



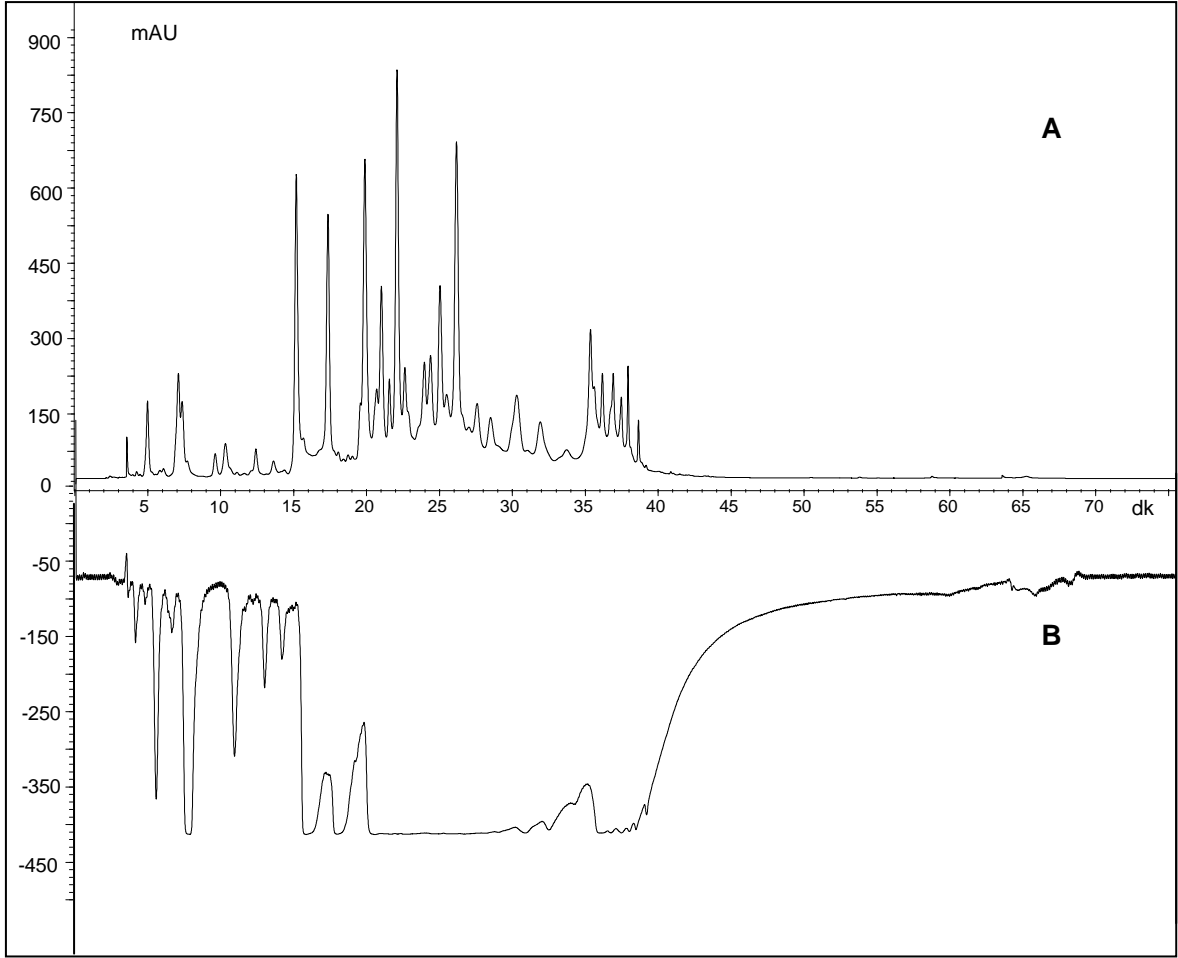
Şekil 40. Kızılcık meyvesinin zar kısmının metanollü ekstraktının (KZZM) on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı



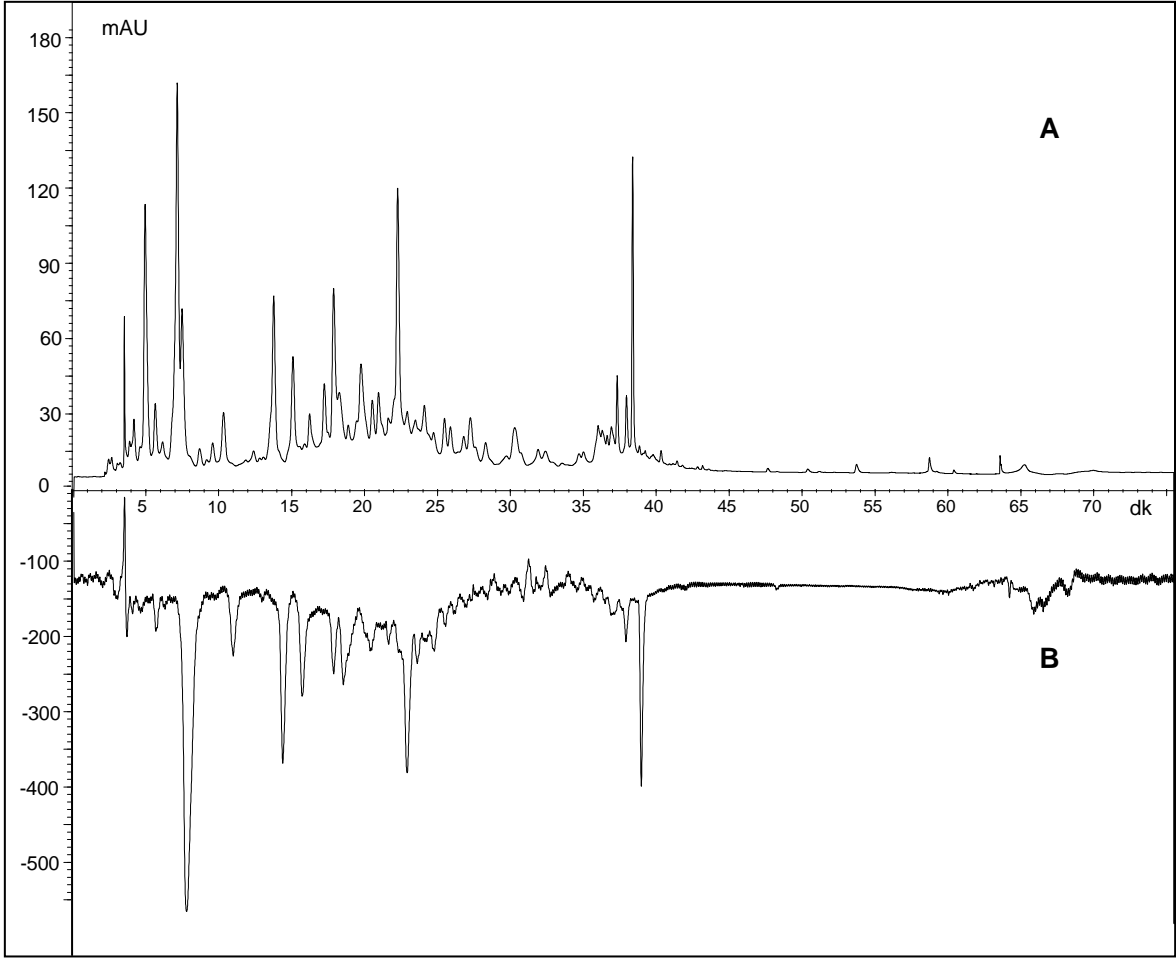
Şekil 41. Kızılcık meyvesinin çekirdek kısmının 1:10 seyreltilmiş asetonitrilli ekstraktının (KZCA) on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı



Şekil 42. Kızılcık meyvesinin zar kısmının asetonitrilli ekstraktının (KZZA) on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı



Şekil 43. Kızılcık meyvesinin çekirdek kısmının sulu ekstraktının (KZCW) on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı



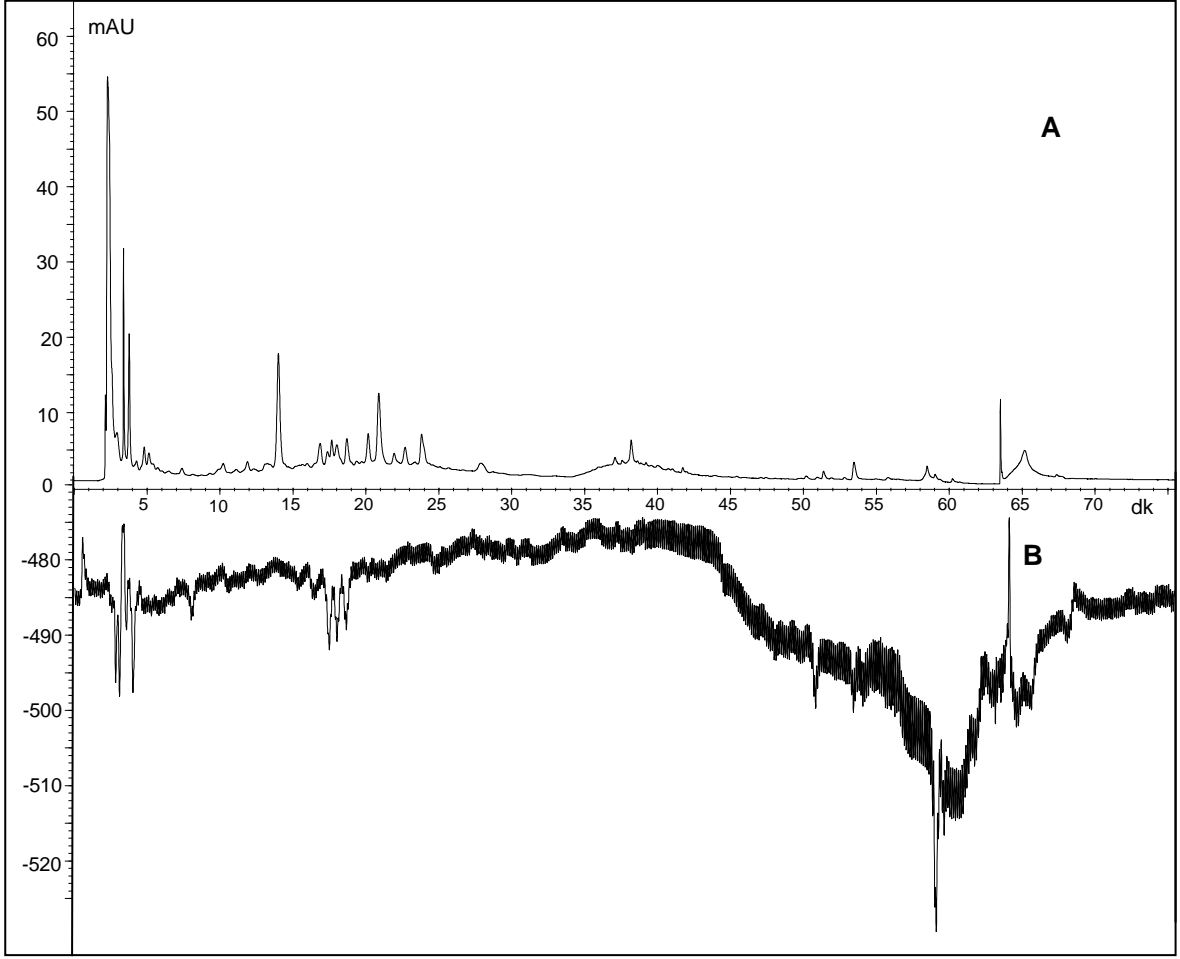
Şekil 44. Kızılcık meyvesinin zar kısmının sulu ekstraktının (KZZW) on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı

3.3.4. Kokulu Üzüm Meyvesinin On-line HPLC-ABTS Antiradikal Analiz Sonuçları

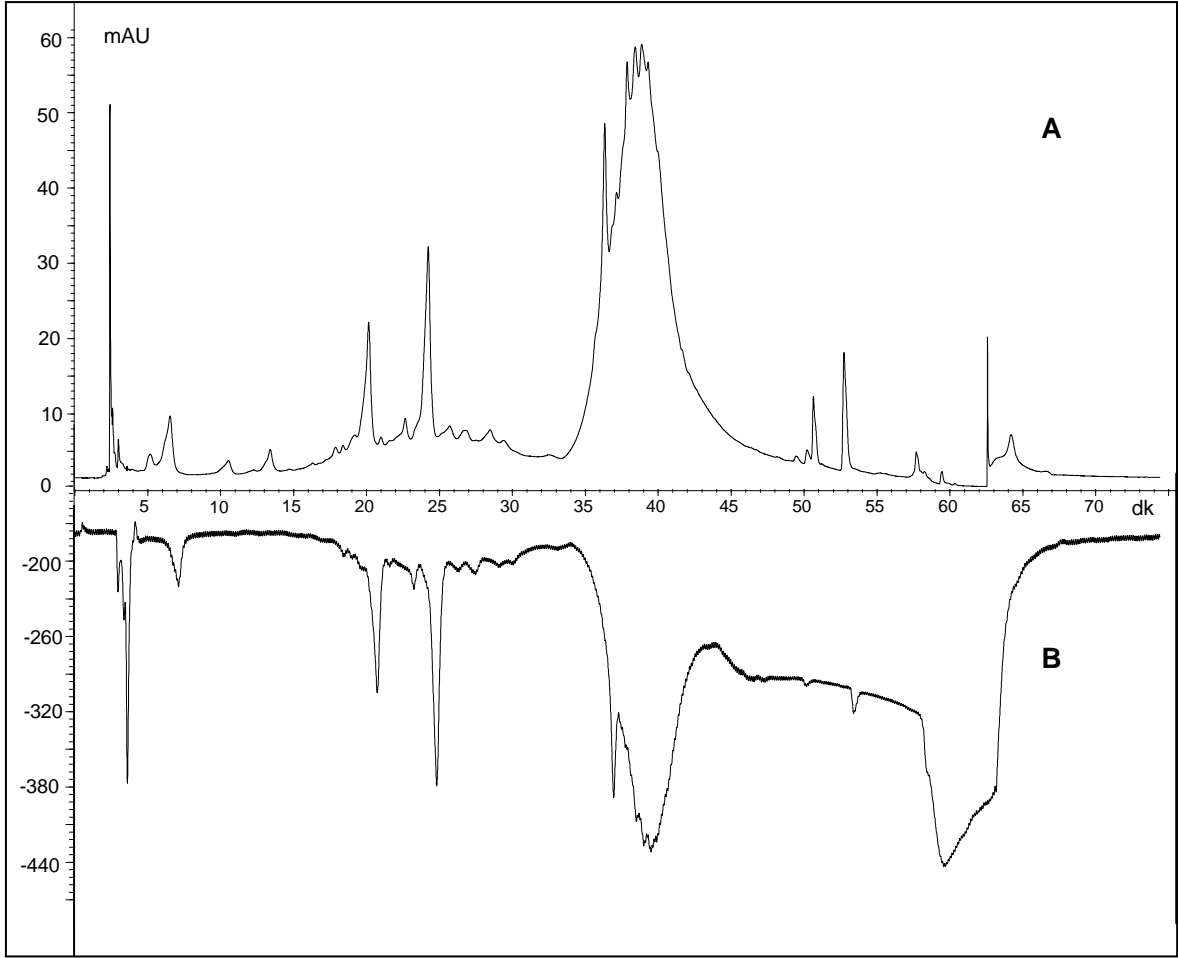
Şekil 45’de kokulu üzüm meyve suyunun (KUS) ABTS radikal temizleme kromatogramı verilmiştir. KUS numunesi on-line ABTS testine karşı bir cevap vermemiştir. KUS numunesi off-line ABTS testinde de kokulu üzümün diğer numuneleri arasında en fazla SC_{50} (0,0882) dolayısıyla da en düşük antioksidan aktivite değerine sahiptir.

Kokulu üzümün çekirdek kısmının farklı çözücü ekstraktlarının (KUCM, KUCA, KUCW) kromatogramları sırasıyla Şekil 46, 48 ve 50’de ve zar kısmının farklı çözücü ekstraktları (KUZM, KUZA, KUZW) ise Şekil 47, 49 ve 51’de verilmiştir. Çekirdek ekstraktlarından elde edilen kromatogramlardaki negatif pik boyutları zar ekstraktlarındakine göre daha fazladır.

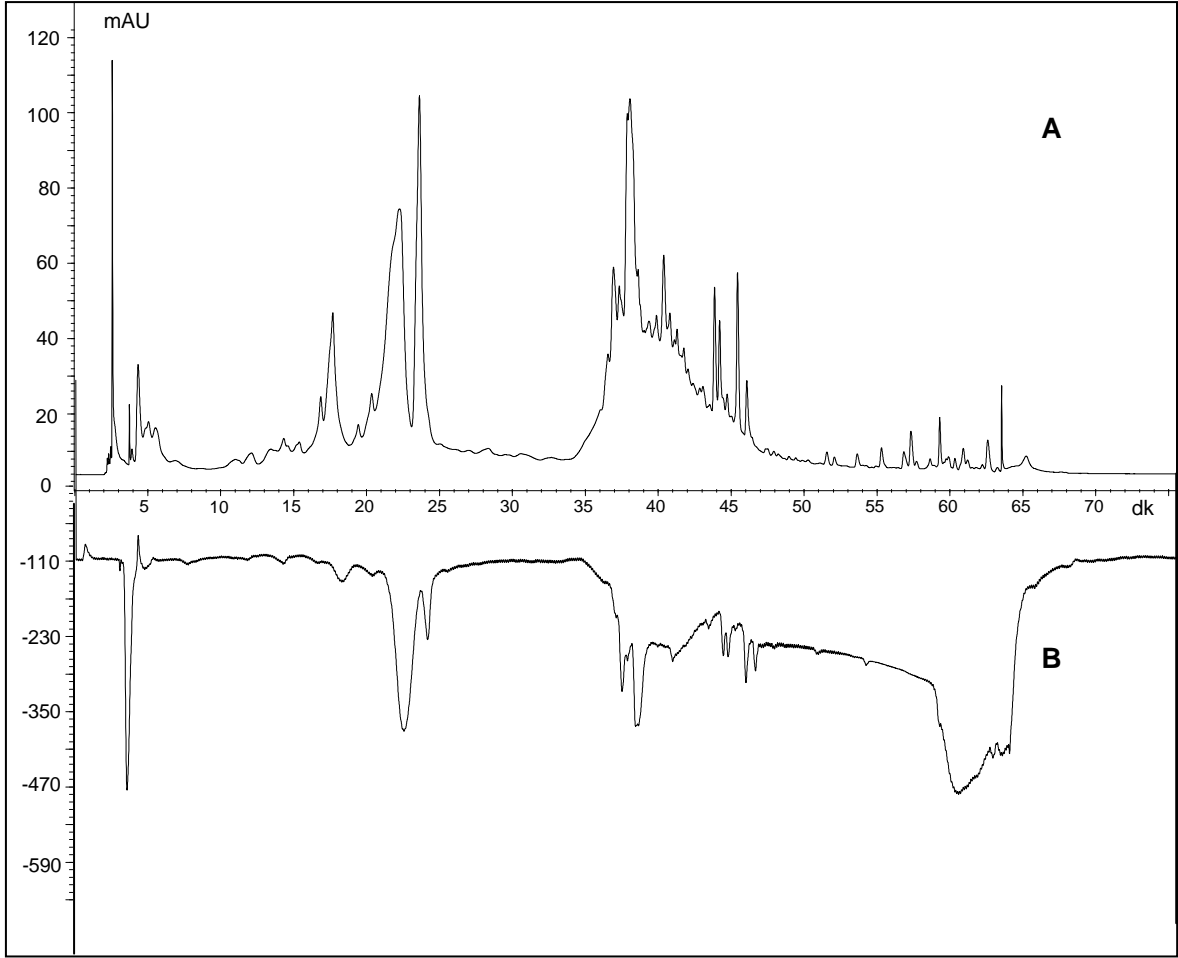
Kokulu üzümde KUCM numunesi 1:10 oranında seyreltilerek çalışılmıştır. Çekirdek ekstraktlarındaki farklı çözücü karşılaştırılmasına göre antioksidan varlığını gösteren en fazla negatif pik metanollü numunede (KUCM), en az ise sulu numunede (KUCW) bulunmaktadır. Sonuçlar off-line ABTS testi ile paraleldir.



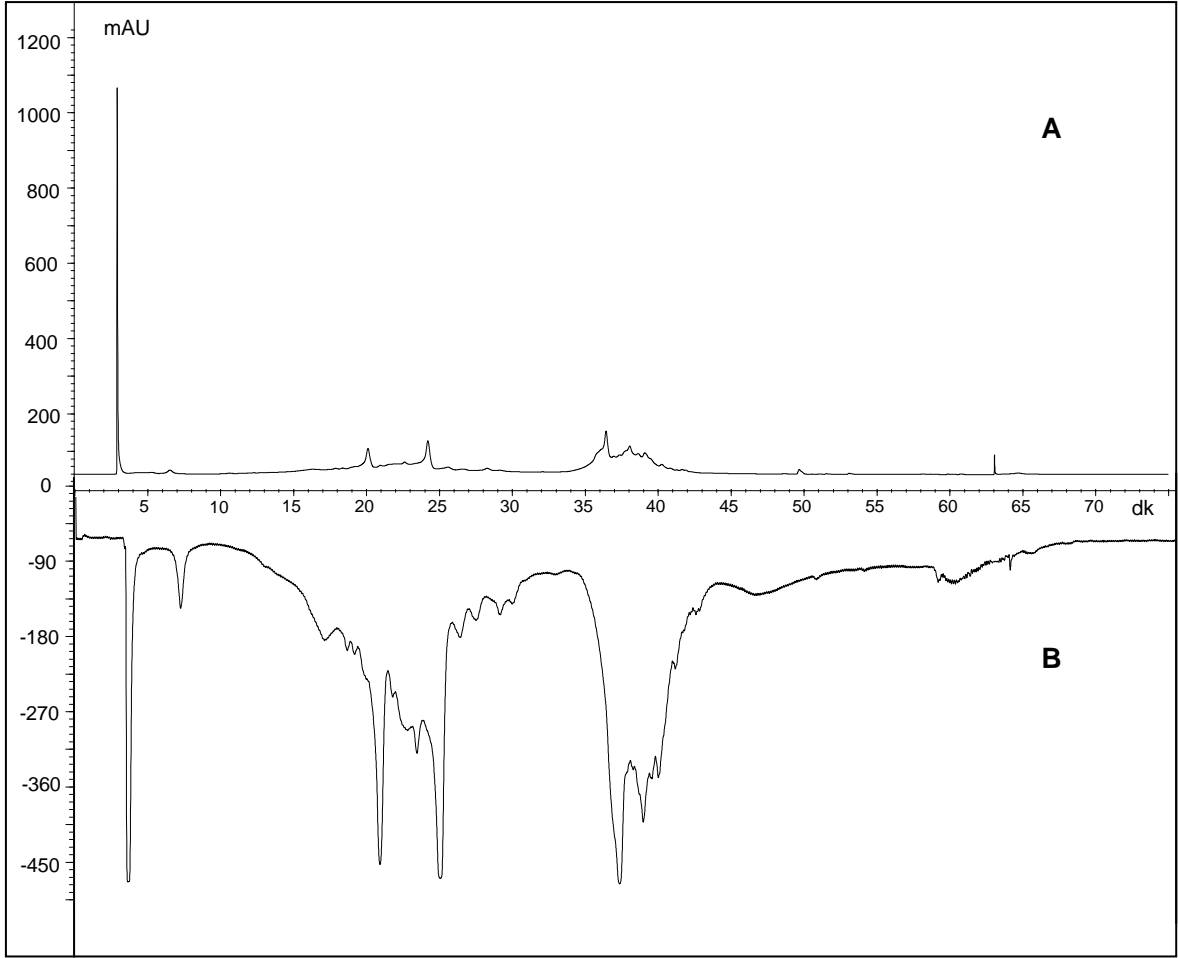
Şekil 45. Kokulu üzüm meyvesinin meyve suyunun (KUS) on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı



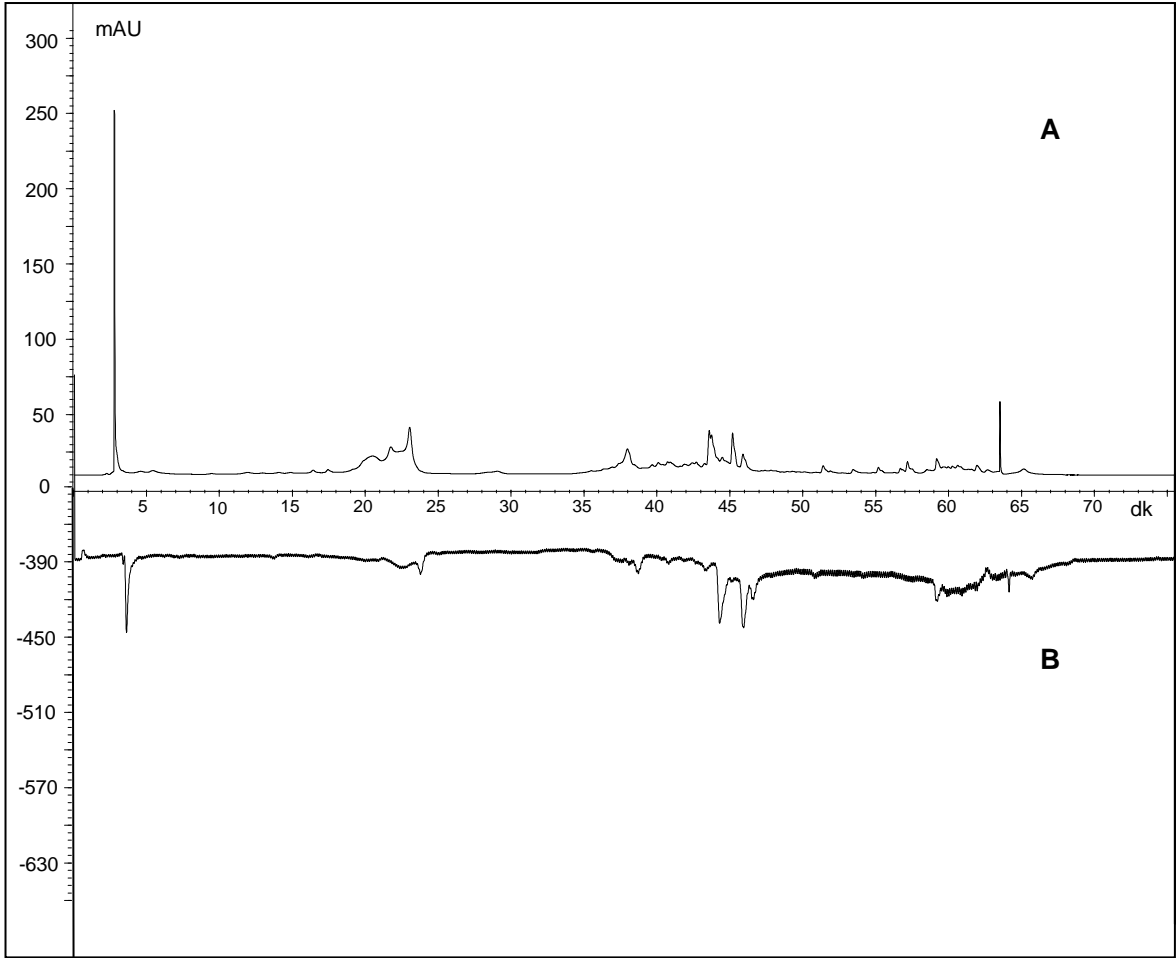
Şekil 46. Kokulu üzüm meyvesinin çekirdek kısmının 1:10 seyreltilmiş metanollü ekstraktının (KUCM) on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı



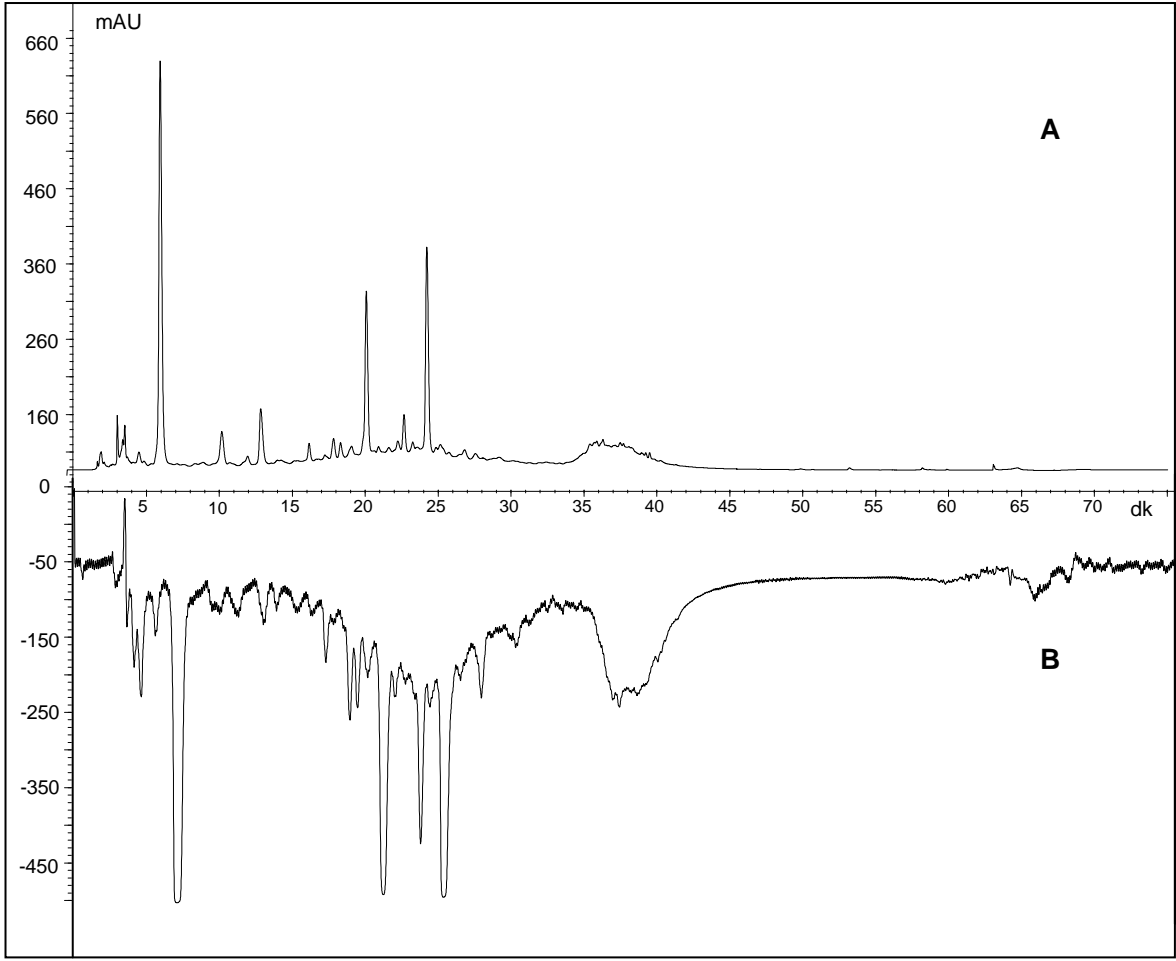
Şekil 47. Kokulu üzüm meyvesinin zar kısmının metanollü ekstraktının (KUZM) on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı



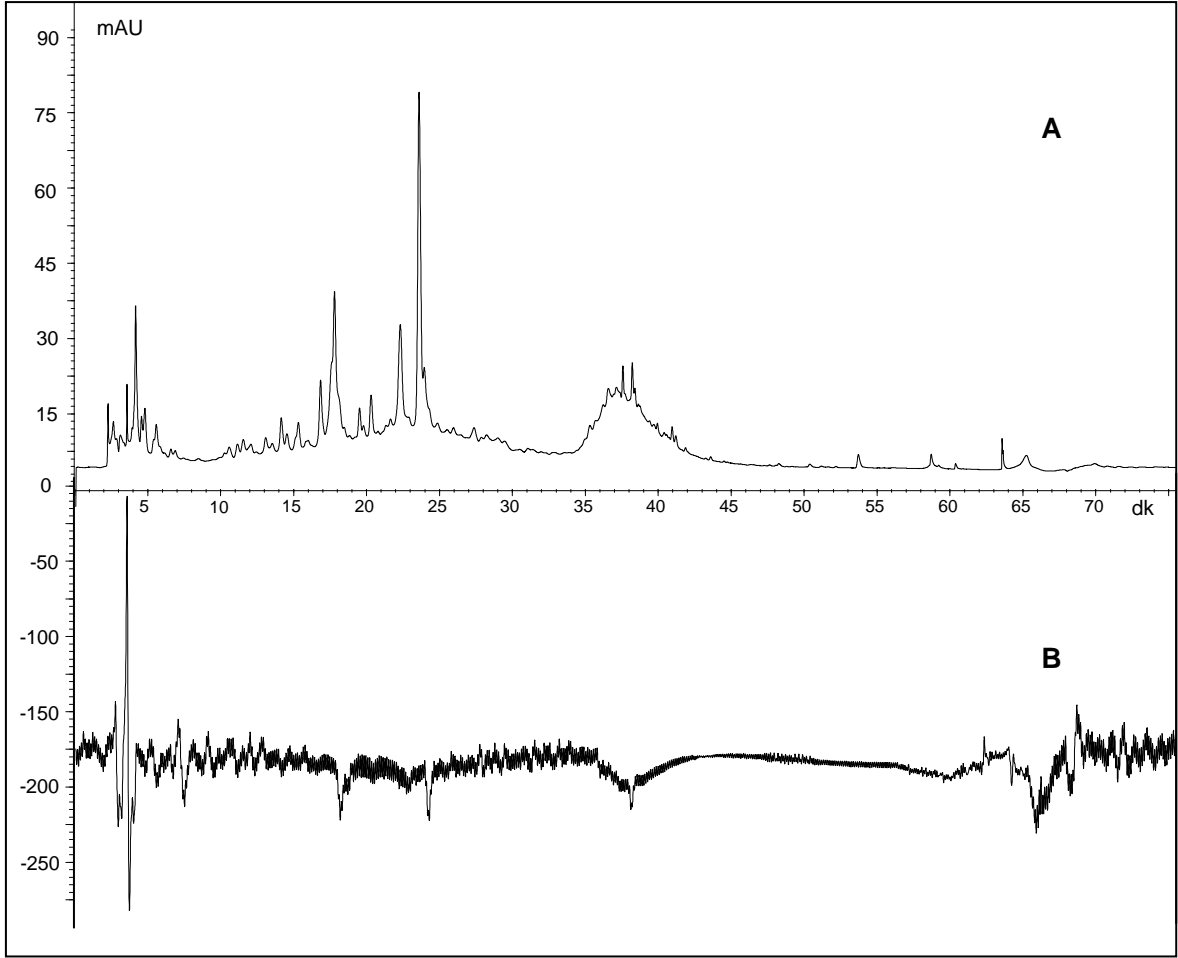
Şekil 48. Kokulu üzüm meyvesinin çekirdek kısmının asetonitrilli ekstraktının (KUCA) on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı



Şekil 49. Kokulu üzüm meyvesinin zar kısmının asetonitrilli ekstraktının (KUZA) on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı



Şekil 50. Kokulu üzüm meyvesinin çekirdek kısmının sulu ekstraktının (KUCW) on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı

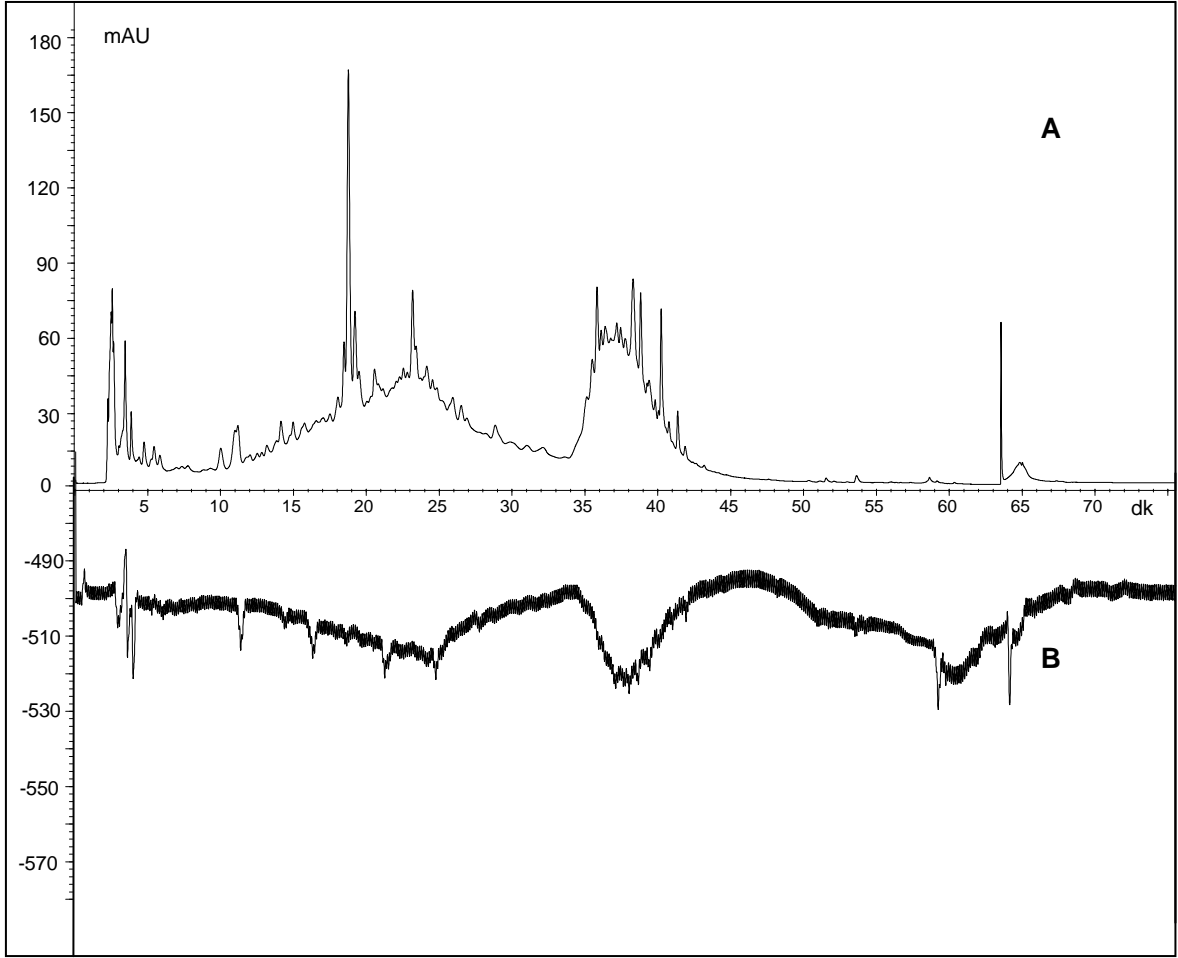


Şekil 51. Kokulu üzüm meyvesinin zar kısmının sulu ekstraktının (KUZW) on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı

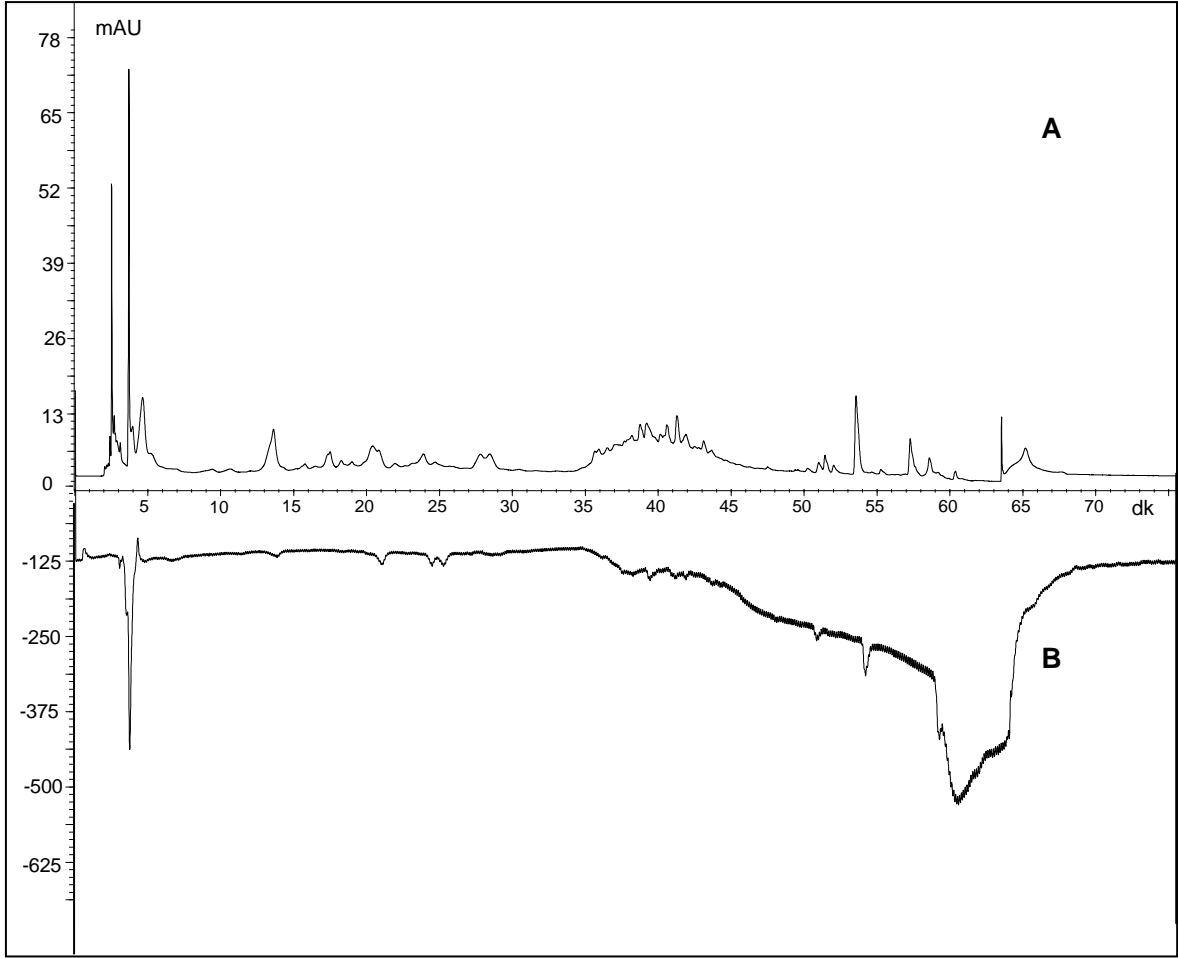
3.3.5. Karayemiş Meyvesinin On-line HPLC-ABTS Antiradikal Analiz Sonuçları

şekil 32’de karayemiş meyve suyunun (KYS), şekil 53, 55, 57’de meyvenin çekirdek kısmının sırasıyla metanollü, asetonitrilli ve sulu ekstraktlarının (KYCM, KYCA, KYCW) on-line ABTS kromatogramları, şekil 54, 56, 58’de ise zar kısmının metanollü, asetonitrilli ve sulu ekstraktlarının (KYZM, KYZA, KYZW) on-line ABTS kromatogramları verilmiştir.

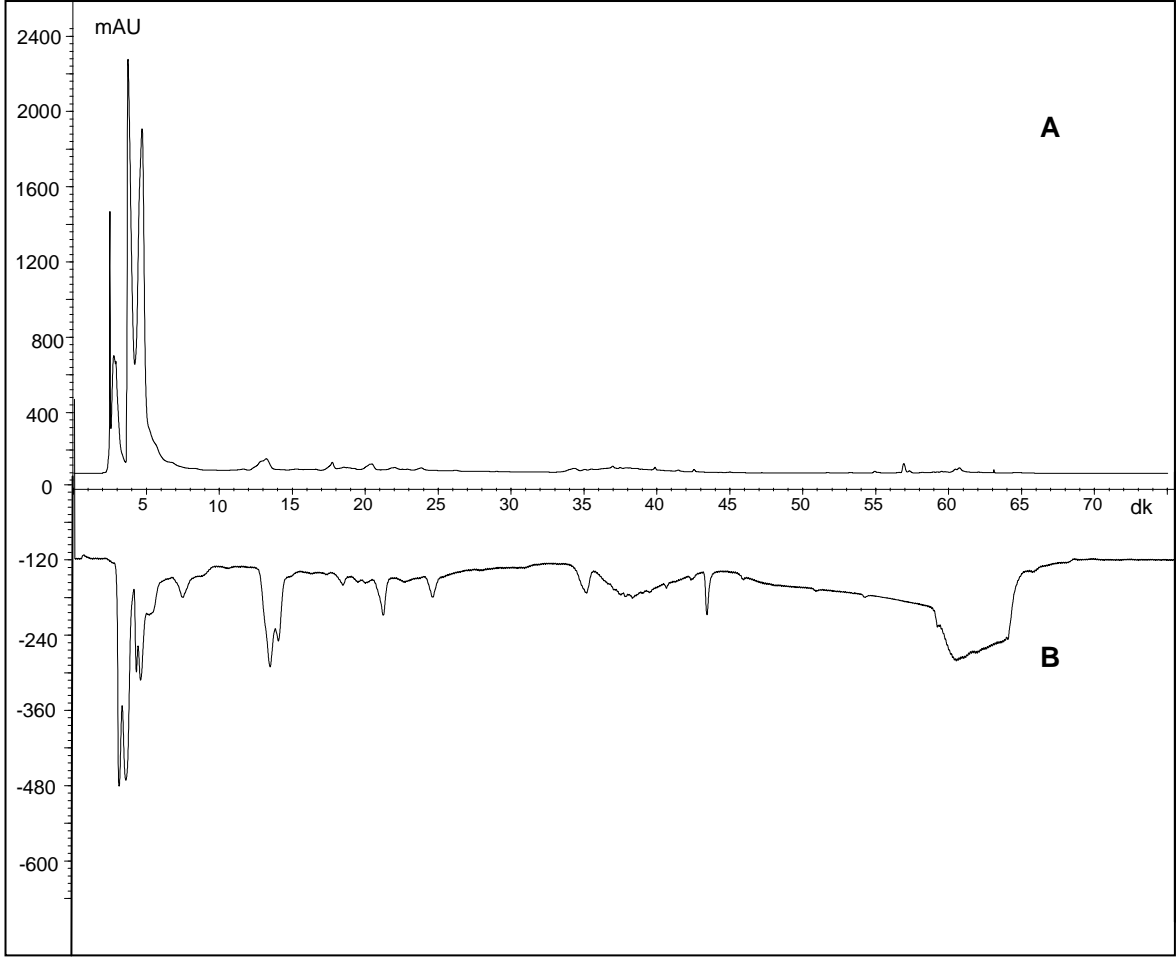
Karayemiş meyvesinin diğer meyvelerin aksine zar kısmının çekirdek kısmına göre daha fazla negatif pik içerdiği görülmektedir. Ayrıca hemen hemen hiç negatif piki bulunmayan numune ise çekirdek kısmının asetonitrilli (KYCA) ekstraktıdır. Bu numunenin off-line ABTS testinde bulunan SC_{50} değeri ise diğer ekstraktlar arasında en fazla (0,1788) olandır. Karayemiş numuneleri arasında antioksidan bileşiklerin varlığını gösteren negatif pik, en fazla zar kısmının metanollü ekstraktında (KYZM) tespit edilmiştir.



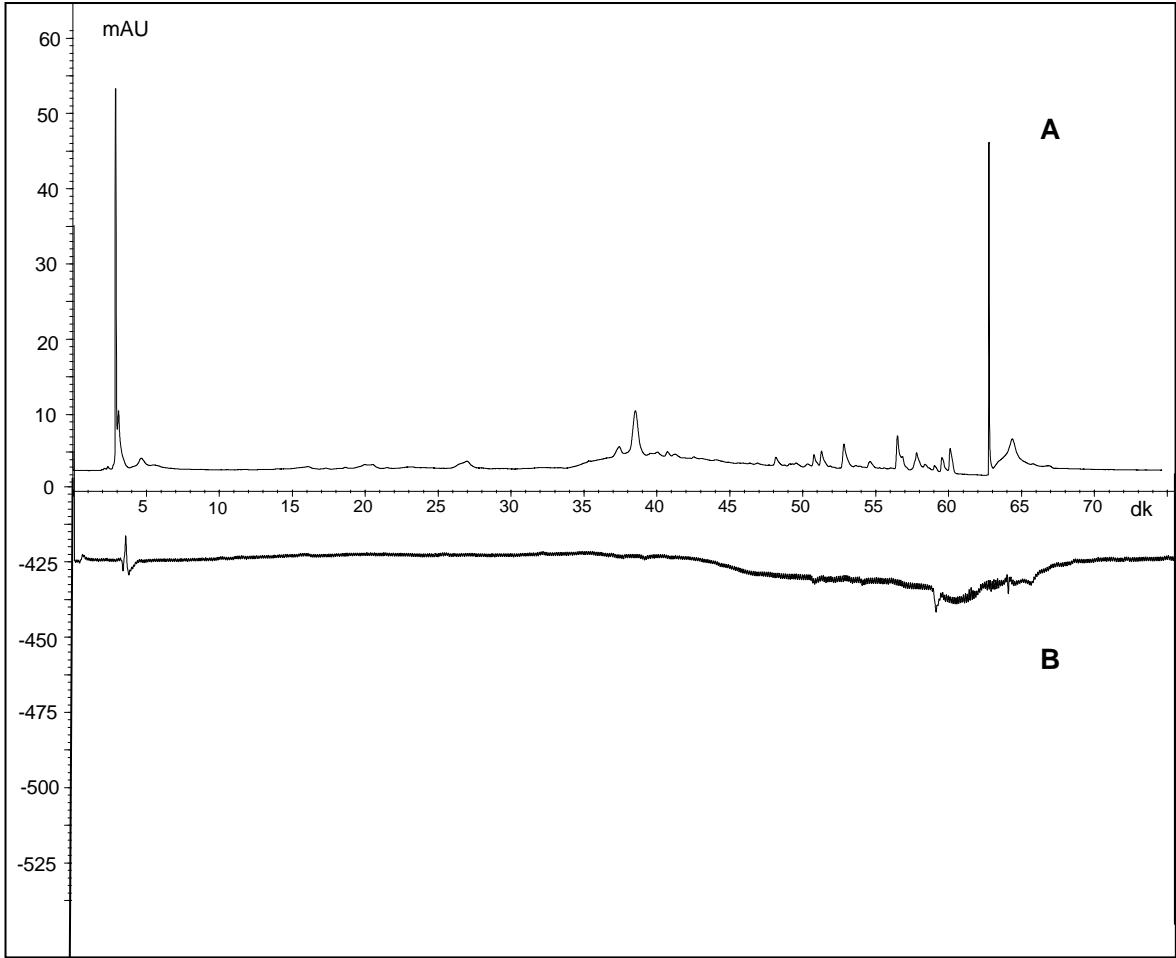
Şekil 52. Karayemiş meyvesinin meyve suyunun (KYS) on-line antioksidan aktivite analizi
A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı



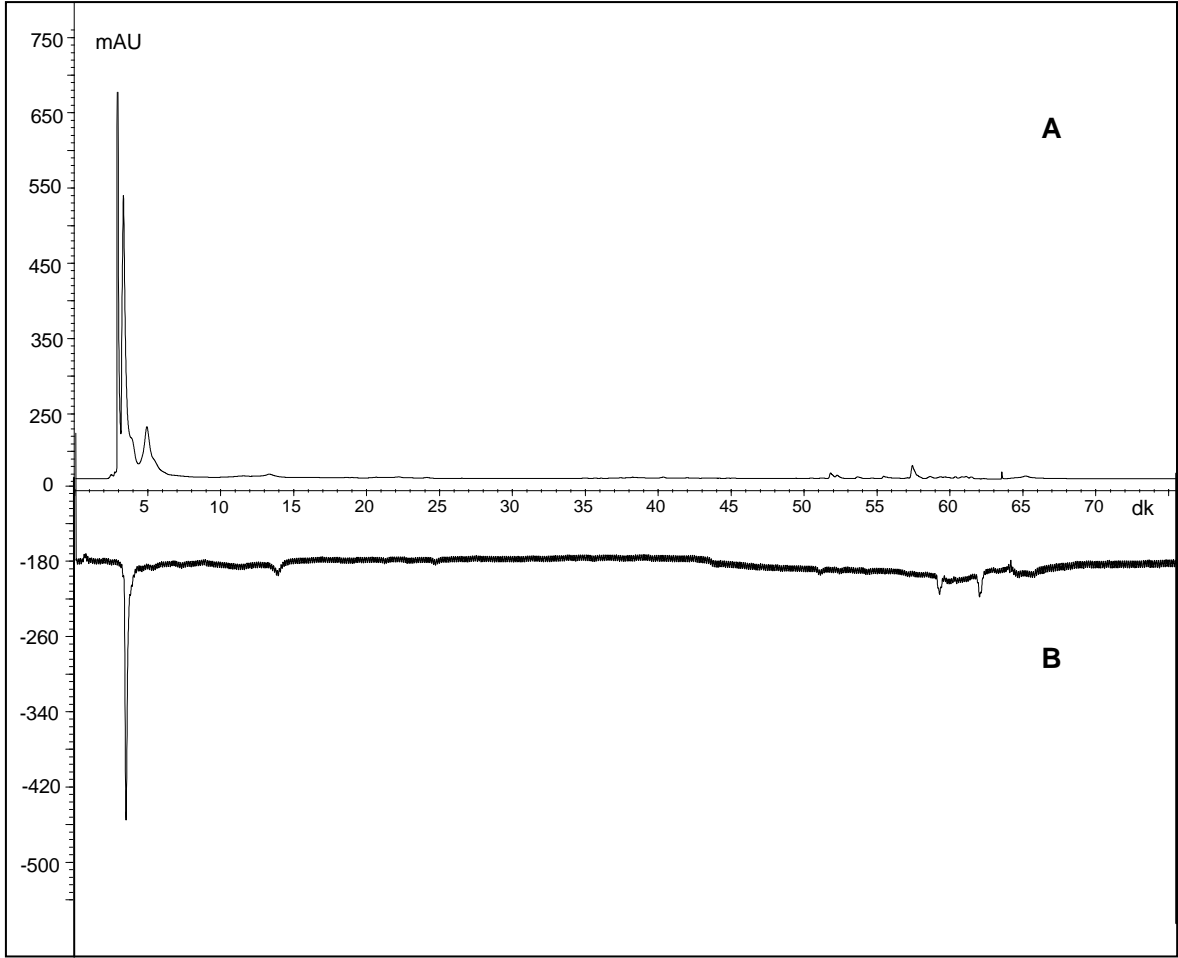
Şekil 53. Karayemiş meyvesinin çekirdek kısmının metanollü ekstraktının (KYCM) online antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı



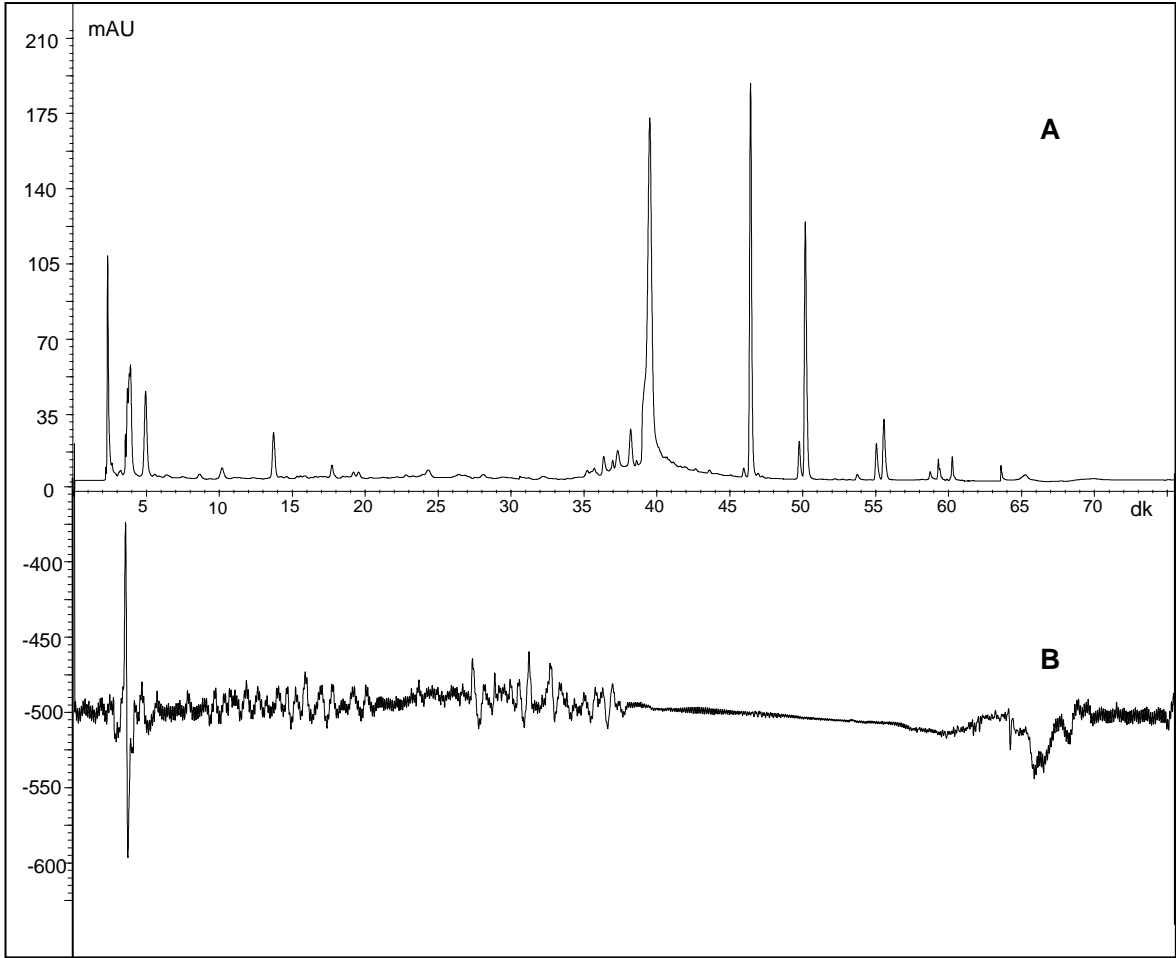
Şekil 54. Karayemiş meyvesinin zar kısmının metanollü ekstraktının (KYZM) on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı



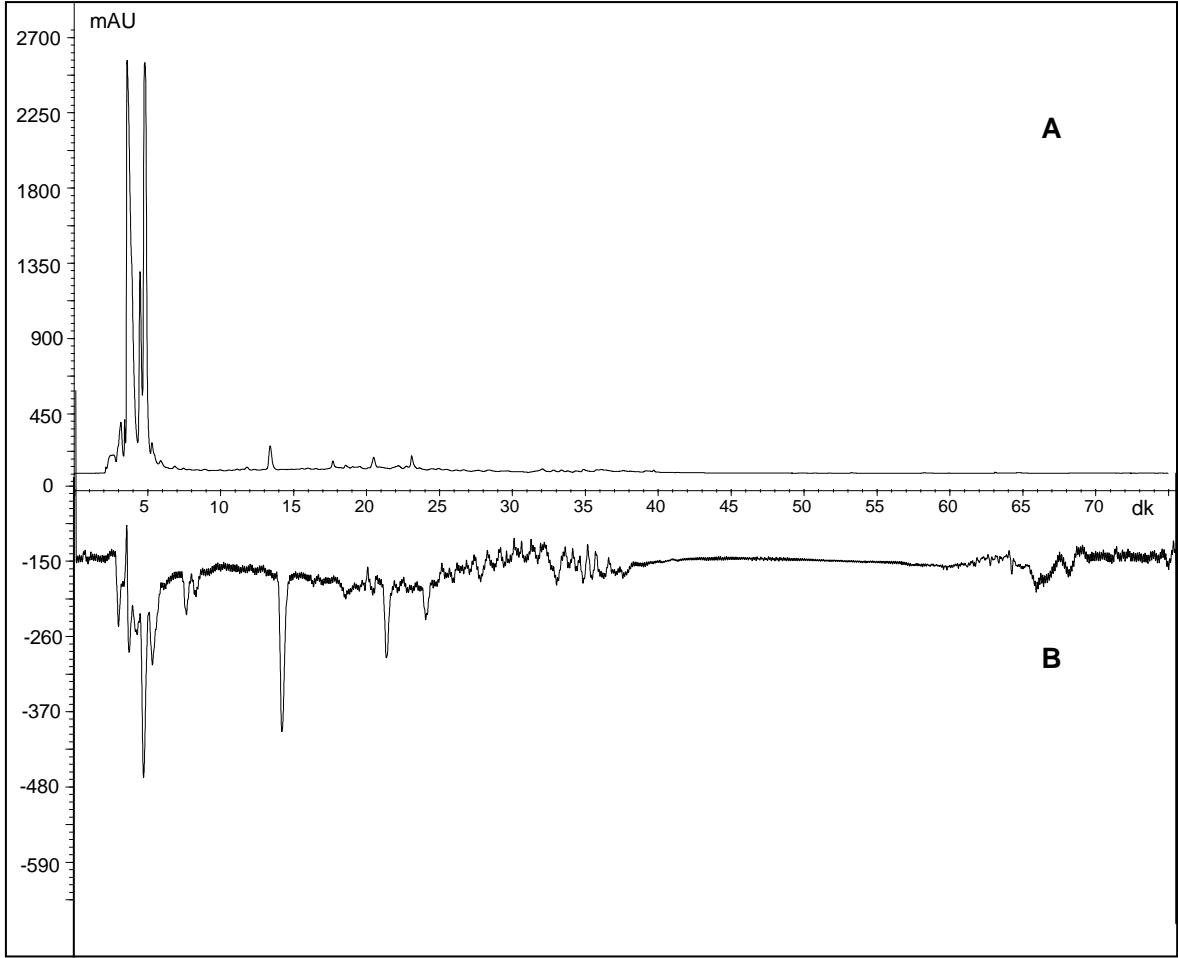
Şekil 55. Karayemiş meyvesinin çekirdek kısmının asetonitrilli ekstraktının (KYCA) online antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı



Şekil 56. Karayemiş meyvesinin zar kısmının asetonitrilli ekstraktının (KYZA) on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı



Şekil 57. Karayemiş meyvesinin çekirdek kısmının sulu ekstraktının (KYCW) on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı



Şekil 58. Karayemiş meyvesinin zar kısmının sulu ekstraktının (KYZW) on-line antioksidan aktivite analizi A: 280 nm'deki UV kromatogramı, B: 414 nm'deki ABTS radikali temizleme kromatogramı

3.8. Fenolik Bileşikler

3.8.1. Çarpışmadan Kaynaklanan Ayrışma ile LC-MS Kullanılarak Glikozidik Flavonoidlerin Tanımlanması

Temsili olarak alınan gilaburunun meyve suyu ve çekirdek kısmının metanollü ekstraktında bulunan 4 tane şeker bağlı flavonol Tablo 6'da gösterilmiştir. Kuersetin aglikonlarından ibaret olan bu flavonollar mevcut yöntemle tanımlanabilir.

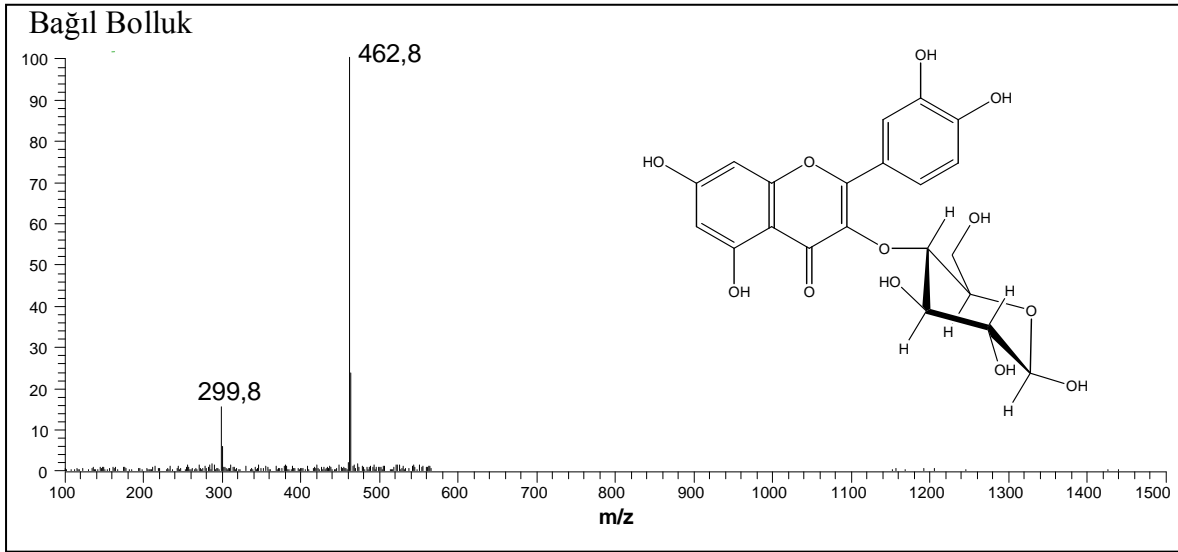
Tablo 6. Gilaburunun meyve suyu ve çekirdek kısmının metanollü ekstraktının LC-ESI-MS ile çarpışma kaynaklı ayrışma sayesinde tespit edilen yapıların moleküler iyon ($[M-H]^-$) m/z değerleri ve başlıca fragmentler

Pik	RT (dk)	Bileşik	$[M-H]^-$	m/z fragment(ler)	Kaynak
31 (GBCM'de)	22,63	Kuersetin-deoksiheksoz	447	300	I, II
S (GBS'de)	31,2	Kuersetin-heksoz+pentoz	595	300	II
V (GBS'de)	36,16	Kuersetin-heksoz	463	300	I, II
Y (GBS'de)	37,86	Kuersetin-deoksiheksoz	447	300, 271, 255, 179	I, II

I: Alonso-Salces vd.,2004; II: Hakkinen ve Auriola, 1998

3.8.1.1. Heksoz

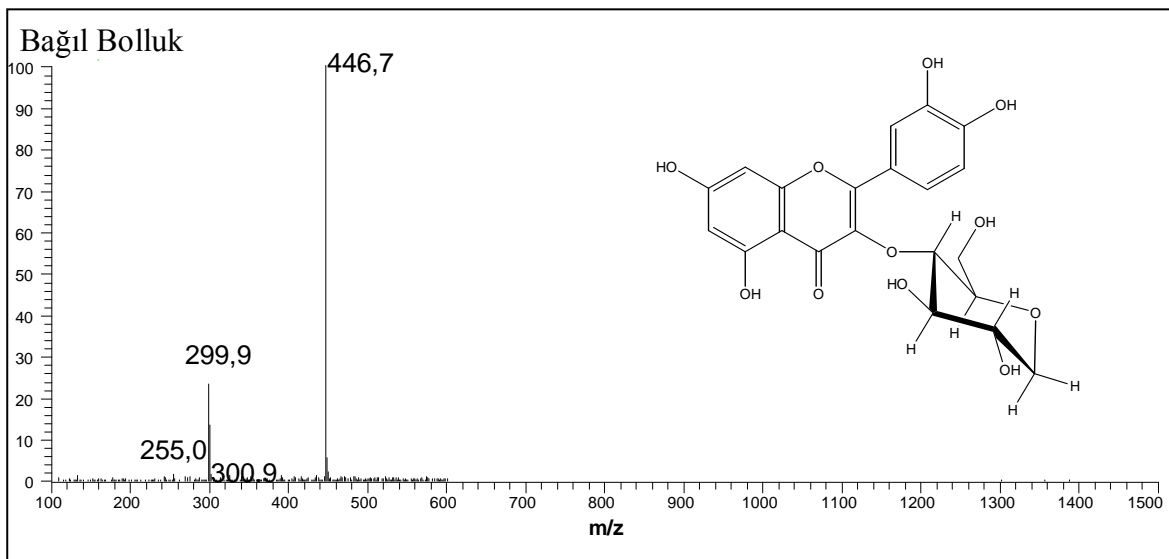
Gilaburunun meyve suyunda (GBS) kuersetine bağlı bir tane heksoz grubu içeren heksozlu monoglikozit gözlemlendi (Tablo 6). Kuersetin-heksozun kütle spektrumu Şekil 59'da gösterilmiştir. Kuersetin-heksoz moleküler iyonu 463 akb olup alıkonma zamanı 36,16'dır. m/z 300'e sahip iyon fragmentasyon sırasında oluşan kuersetine karşılık gelir. 162 akb kütle farkının bir birim heksoz kaybından kaynaklandığı düşünülmektedir (Alonso-Salces vd., 2004; Hakkinen ve Auriola, 1998).



Şekil 59. Kuersetin-heksozun %10 CID ile elde edilen kütle spektrumu

3.8.1.2. Deoksiheksozlar

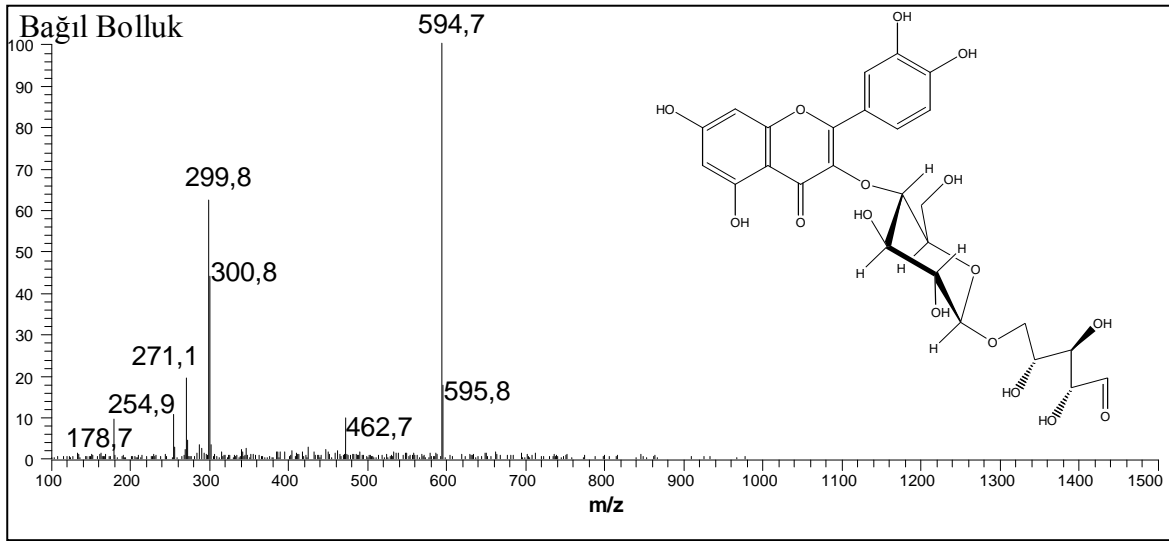
Gilaburunun çekirdek kısmının metanollü ekstraktında (GBCM) ve meyve suyunda (GBS) kuersetine bağlı deoksiheksoz gözlemlendi (Tablo 6). Kuersetin-deoksiheksoz 447 akb olan bir $[M-H]^-$ iyonuna sahip olup, m/z 300'e karşılık gelen fragment iyonu temelde kuersetinin varlığını göstermektedir (Alonso-Salces vd.,2004; Hakkinen ve Auriola, 1998). Kuersetin-deoksiheksozun kütle spektrumu Şekil 60'da gösterilmiştir.



Şekil 60. Kuersetin-deoksiheksozun %10 CID ile elde edilen kütle spektrumu

3.8.1.3. Heksoz + Pentoz

Gilaburunun meyve suyu ekstraktında bir tane kuersetin-heksoz+pentoz flavonol glikoziti tespit edilmiştir (Tablo 6). Moleküler iyon 595 m/z'ye sahip olup tutulma zamanı 31,2'dir. 294 m/z kaybı 162+132 sırasıyla heksoz ve pentoz kaybını açıklar (Hakkinen ve Auriola, 1998). Tespit edilen yapının kütle spektrumu Şekil 61'de gösterilmiştir.



Şekil 61. Kuersetin-heksoz+pentozun %10 CID ile elde edilen kütle spektrumu

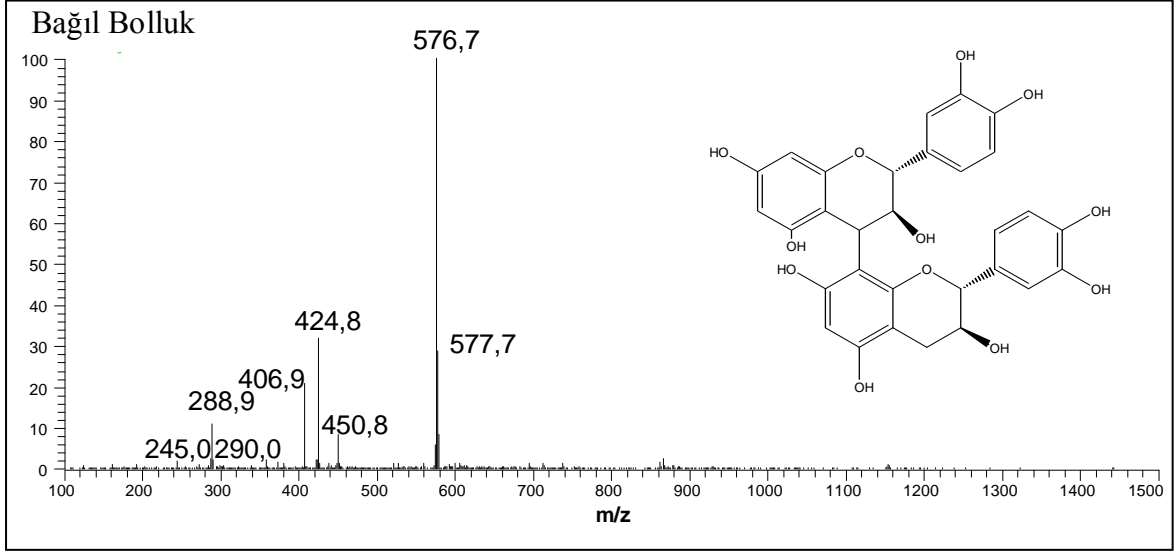
3.8.2. LC-ESI-MS ve Uygun Standartlarla Karşılaştırılarak İlave Flavonoidlerin Tanımlanması

Kateşin, epikateşin, klorojenik asit ve rutin fenolik bileşikleri, standartlarının alıkonma zamanı ve kütle spektrumları ve literatürde rapor edilen verilerle karşılaştırılarak tanımlandı. İlgili kütle spektrumları aşağıda verilmiştir.

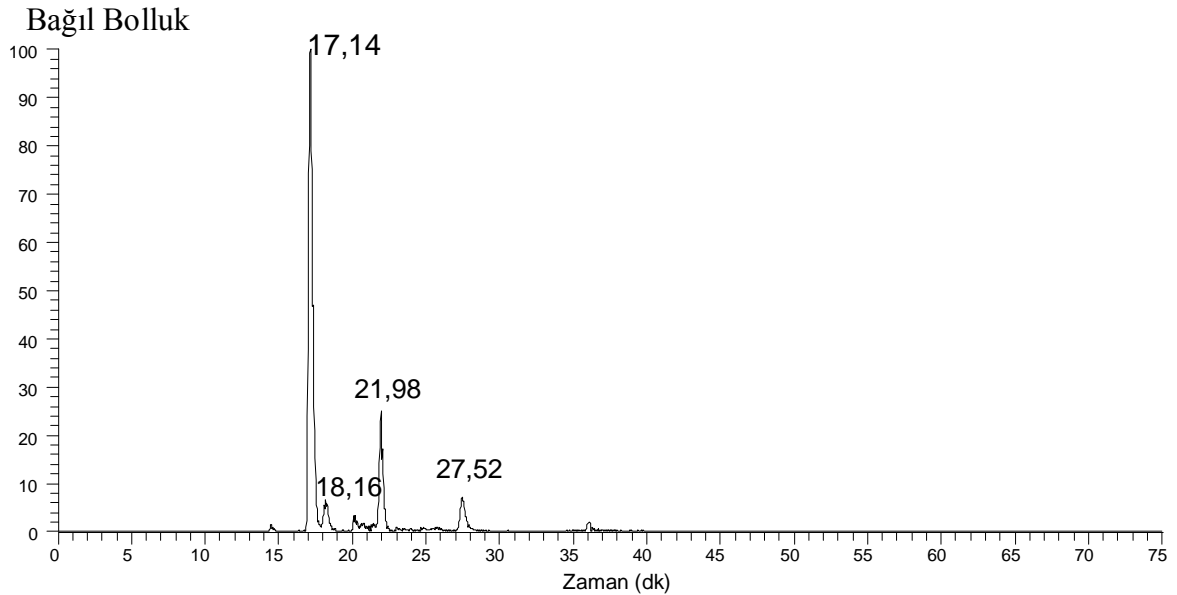
3.8.2.1. Prosiyanidin Dimer

Prosiyanidin dimerin gözlenen moleküler iyonu 577 m/z olup fragment iyonları sırasıyla 451, 425, 407, 289, 245'dir. 425 m/z fragmentinden flavonoidin bir RDA (Retro-Diels-Alder) fisyonu sonucu bir su ayrılması ile 407 m/z ve bir monomer (kateşin veya epikateşin) ayrılması ile 289 m/z fragmenti oluşur (Verardo vd., 2008; Tomas-Barberan vd., 2001). Numuneler içerisinde farklı tutulma zamanlarına sahip prosiyanidin dimerleri

gözlendi. Bunun nedeninin kateşin ve epikateşin bileşiklerinin farklı bağlanma bölgelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Gilaburunun meyve suyunda (GBS) dört farklı prosiyanidin dimer tespit edilmiştir (Şekil 63). Temsili prosiyanidin dimerin kütle spektrumu Şekil 62’de verilmiştir. GBCM numunesinde bir tane A-tip prosiyanidin dimeri gözlenmiştir.



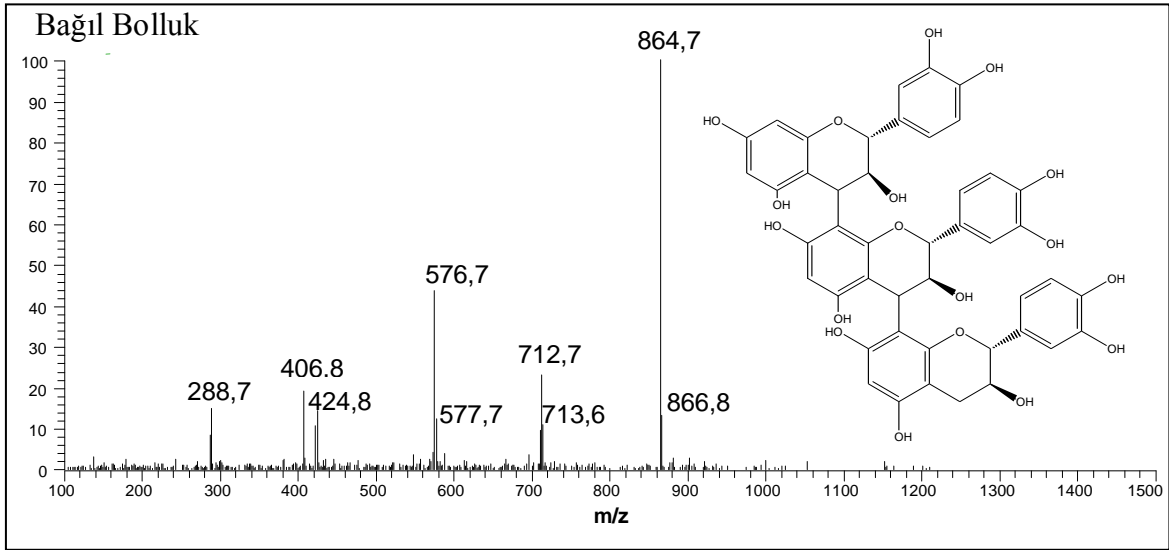
Şekil 62. Prosiyanidin dimerin %10 CID ile elde edilen kütle spektrumu



Şekil 63. Gilaburunun meyve suyunda gözlenen prosiyanidin dimer (m/z 577 akb) için ekstrakte iyon kromatogramı

3.8.2.2. Prosiyanidin Trimer

Moleküler iyonu 865 m/z'ye sahip olan prosiyanidin trimer GBS ve GBCM numunelerinde tespit edildi. Fragment iyonları 713, 577, 425 ve 407 m/z'dir (Hokkanen vd., 2009; Fahleh vd., 2011; Sudjaroen vd., 2005:). Bu trimerik yapının temsili kütle spektrumu Şekil 64'de gösterilmiştir.



Şekil 64. Prosiyanidin trimerin %10 CID ile elde edilen kütle spektrumu

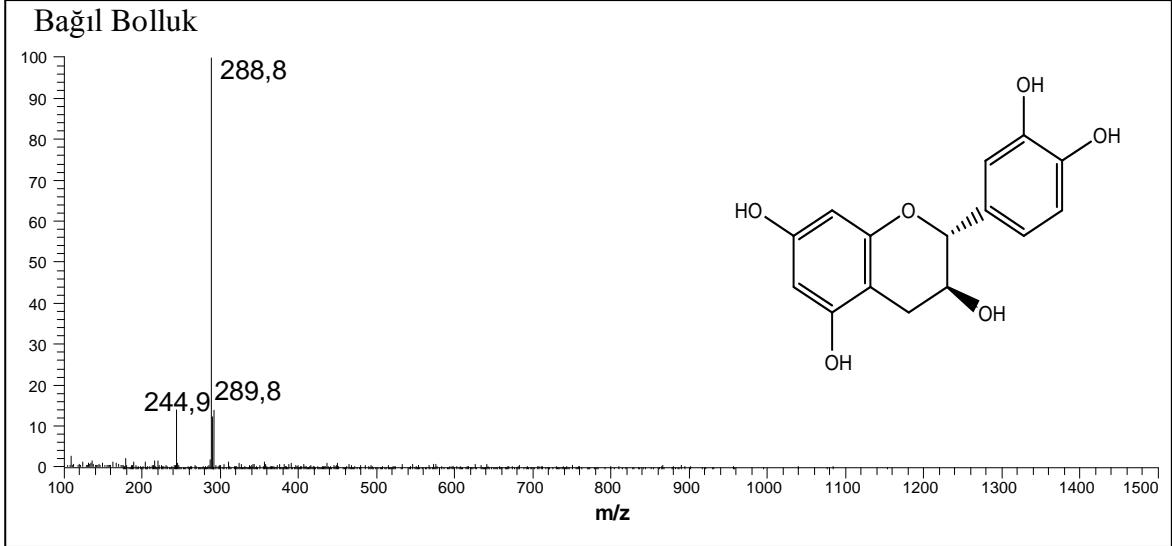
3.8.2.3. Kateşin

Kateşin 289 m/z moleküler iyonuna sahip olup alıkonma zamanı 19,80 dk'dır. Kütle spektrumu Şekil 65'de verilmiştir. 289 ve 245 arasındaki 44 akb farkının bir CO₂ veya –CH₂-CHOH- grubunun kaybindan kaynaklandığı düşünülmektedir (Soong ve Barlow, 2005; Lopes-Lutz vd., 2010).

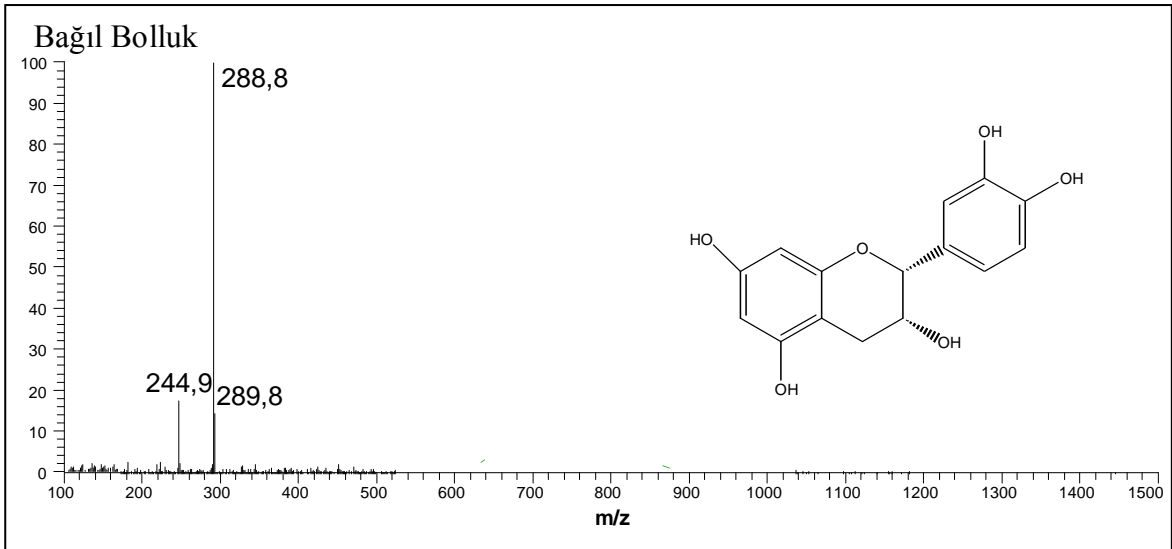
3.8.2.4. Epikateşin

Epikateşin 23,54 dk alıkonma zamanı ve 289 m/z moleküler iyonuna sahiptir. 289 ve 245 negatif moleküler iyonlar arasındaki 44 akb farkının bir CO₂ veya –CH₂-CHOH-

grubunun kaybindan kaynaklandığı düşünülmektedir (Soong ve Barlow, 2005; Lopes-Lutz vd., 2010). Kütle spektrumu Şekil 66'da verilmiştir.



Şekil 65. Katesinin %10 CID ile elde edilen kütle spektrumu

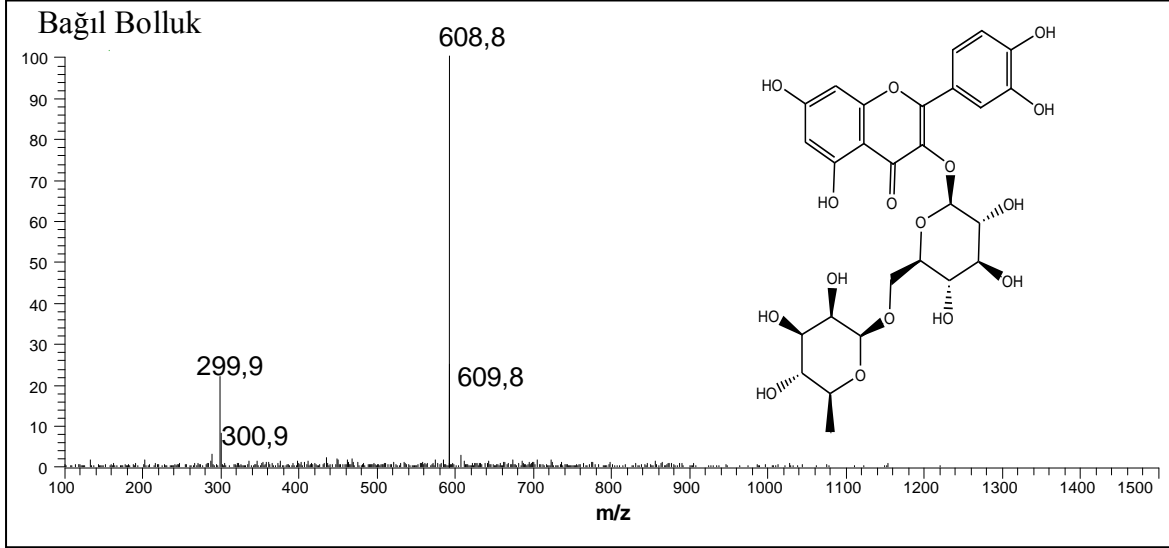


Şekil 66. Epikatesinin %10 CID ile elde edilen kütle spektrumu

3.8.2.5. Rutin

Rutin alıkonma zamanı 35,29 dk ve 609 m/z'li bir negatif moleküler iyon ($[M-H]^-$)'a sahiptir. Fragment iyonu 301 m/z, bir rutin biriminden kaynaklandığı tespit edilmiştir

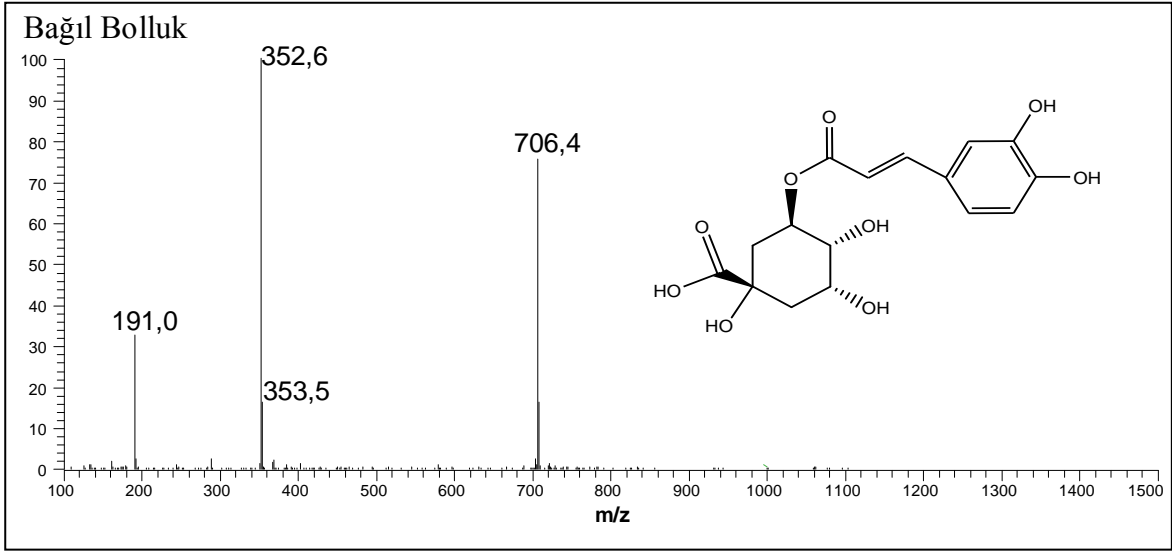
(Vinson vd., 2001; Lopes-Lutz vd., 2010). Temsili standart bileşik ile doğrulanmıştır. Kütle spektrumu Şekil 67’de gösterilmiştir.



Şekil 67. Rutinin %10 CID ile elde edilen kütle spektrumu

3.8.2.6. Klorojenik Asit

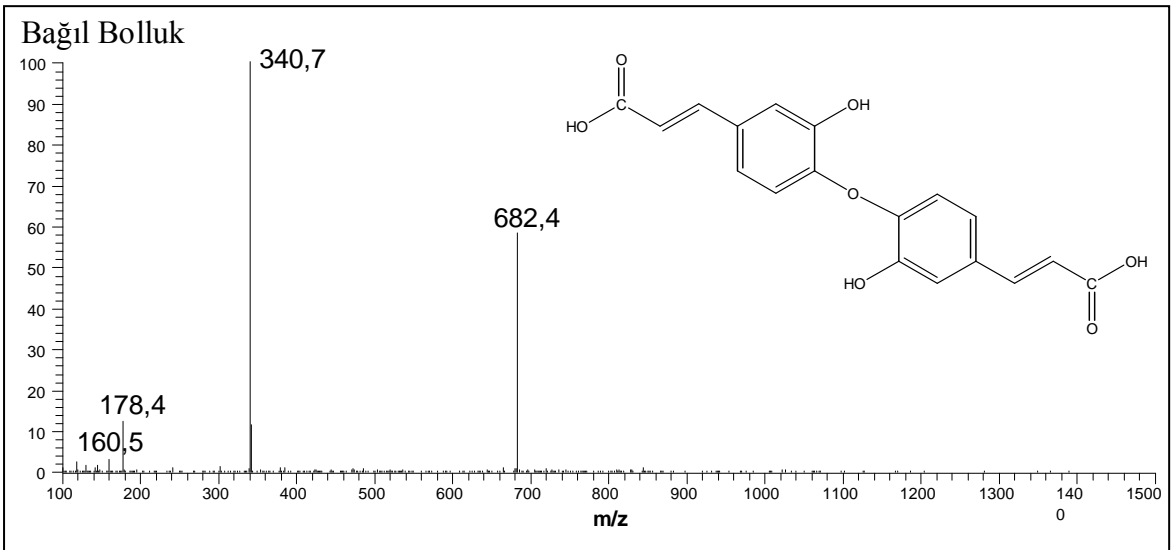
Klorojenik asidin negatif moleküler iyonu 353 m/z olup çeşitli alıkonma zamanlarında farklı numunelerin kromatogramları boyunca gözlemlendi. Klorojenik asidin dimer piki $[2M-H]^-$ 707 m/z ve kuinik asit esterlerinin tipik fragment iyonu $[kuinik\ asit-H]^-$ 191 m/z, klorojenik asidin fragment iyonları olarak tespit edildi (Carini vd., 2001). GBS ve GBCM numunelerinde klorojenik asit fazla miktarda tespit edildi. Özellikle GBS numunesinde 19,26 dk alıkonma zamanına sahip olan büyük bir pik tespit edildi. Kütle spektrumu Şekil 68’de gösterilmiştir.



Şekil 68. Klorojenik asitin %10 CID ile elde edilen kütle spektrumu

3.8.2.7. Dikaffeik Asit

Şekil 69’da gösterilen kütle spektrumunda dikaffeik asidin moleküler iyonu 341 m/z ve fragment iyonları 179, 161, 683 m/z olup, moleküler iyonun dimer moleküler iyonu 341 m/z’dir (Bravo vd., 2006 Bravo vd., 2007). Bir kaffeik asit grubunun ayrılması ile, heksoz grubunun ayrılması sonucu elde edilen fragment iyonu 162 m/z olduğu için bu bileşiğin tanımlanması tam olarak yapılamayabilir. Fakat 682 m/z iyon fragmenti bir kaffeik asidin glikozitinden çok bir kaffeik asit dimerinden kaynaklandığı tespit edilmiştir.



Şekil 69. Dikaffeik asitin %10 CID ile elde edilen kütle spektrum

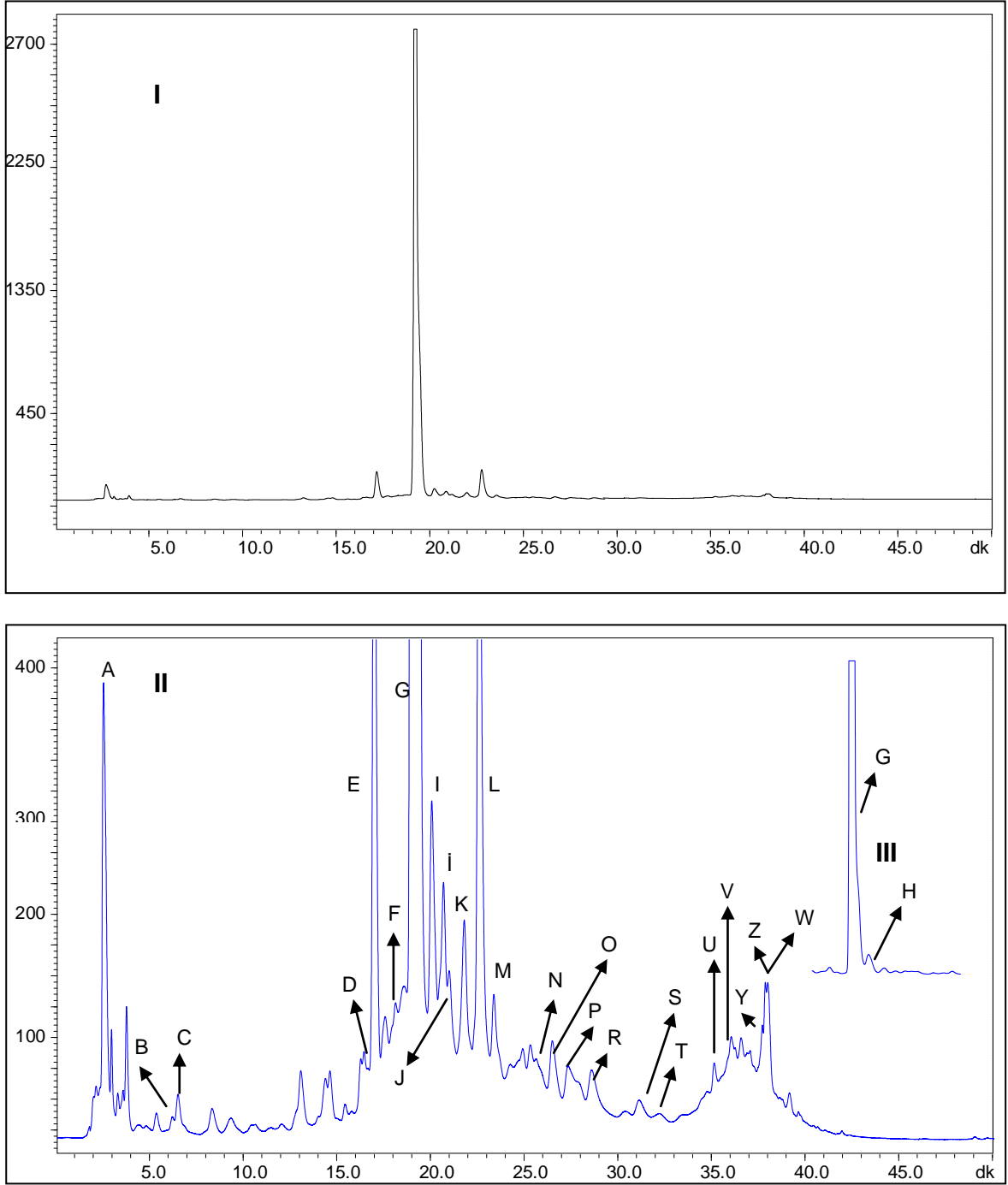
3.8.3. Fenolik Bileşiklerin HPLC-UV ve HPLC-ESI-MS ile Tanımlanması

Tablo 7 ve 8’de sırasıyla GBS ve GBCM numunelerinde HPLC-UV ve HPLC-ESI-MS yöntemleri ile ayrılan ve tanımlanan fenolik bileşiklerin moleküler iyonu ve tipik fragment iyonları gösterilmiştir. Fenolik bileşiklerin daha iyi ayrılmasını sağlamak için kolon değiştirilmeden daha uzun gradient uygulandı (Bölüm 2.3.2).

GBS numunesindeki yaklaşık 19. dakikalarda ayrılan büyük pikin daha uzun gradient ile iki pik olarak ayrılması sağlandı (Şekil 70, III). GBS numunesinde fazla miktarda klorojenik asit tespit edildi. Yapılan literatür taramasında da gilaburu meyvesinin temel fenolik bileşiğinin klorojenik asit olduğu bulunmuştur (Velioglu vd., 2006; Kim vd., 2005).

GBCM numunesinde (Şekil 71 ve Tablo 8) 7,04, 7,48 ve 11,44 dakikalarındaki piklerin moleküler iyonları sırasıyla 613, 613 ve 597 m/z olup sadece 289 m/z fragment iyonuna sahiptirler. Buda bu numunede yapısında 289 moleküler iyonuna sahip kateşin yada epikateşin bileşiklerinin varlığını göstermektedir. Bunlar kateşin (epikateşin)-diheksöz veya kateşin-deoksiheksöz+heksoz olabilir. Fakat bu veri diğer moleküllerin tanımlanmasında yeterli olmayabilir. GBCM numunesinde 35-45 dakikalar arasında (Şekil 22 ve 23) ayrılmamış piklerin bulunduğu bir alan bulunmaktadır. Meyve örneklerindeki bu benzer görünüm örnekte fazla miktarda bulunan oligo veya polimerik proantosiyanidin aglikonlarından kaynaklandığı bilinmektedir (Salminen, 2005).

Kateşin, epikateşin, prosiyanidin B2, prosiyanidin trimer, kuersetin-deoksiheksöz, klorojenik asit ve proantosiyanidin dimer monoglikozit fenolik bileşikleri hem GBS hem de GBCM numunelerinde bulunduğundan, ayırıcı bir özellik değildir. Fakat rutin, kuersetin-heksöz+pentoz, pelargonidin-3-glikozit-vinilguaiacol varyantları ve peonidin-3-glikozit (Pigment A varyant)’leri GBS ve GBCM numuneleri için spesifik birer fenolik bileşiktir.



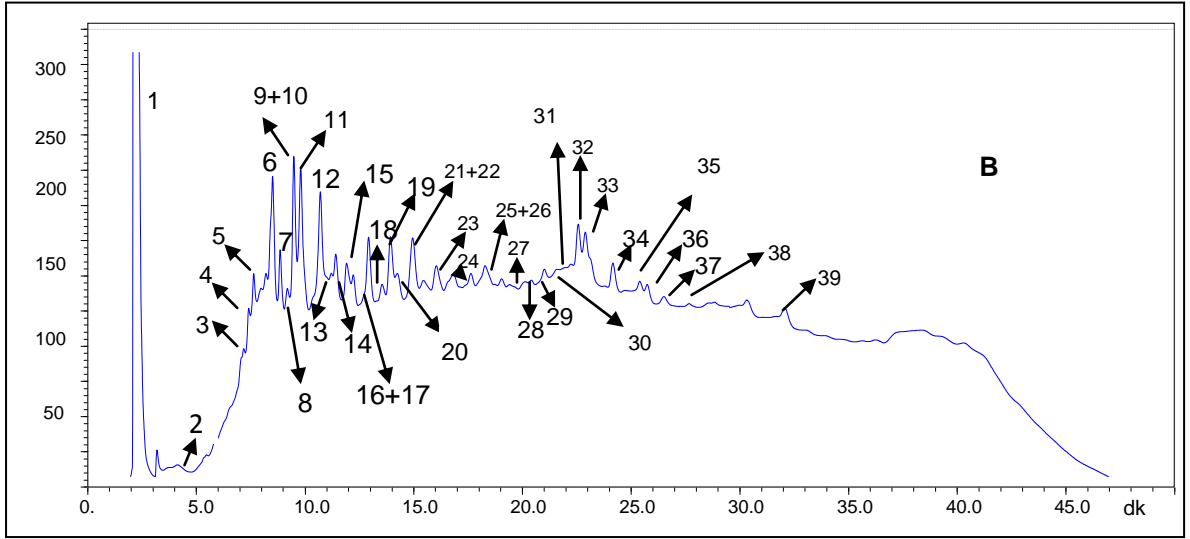
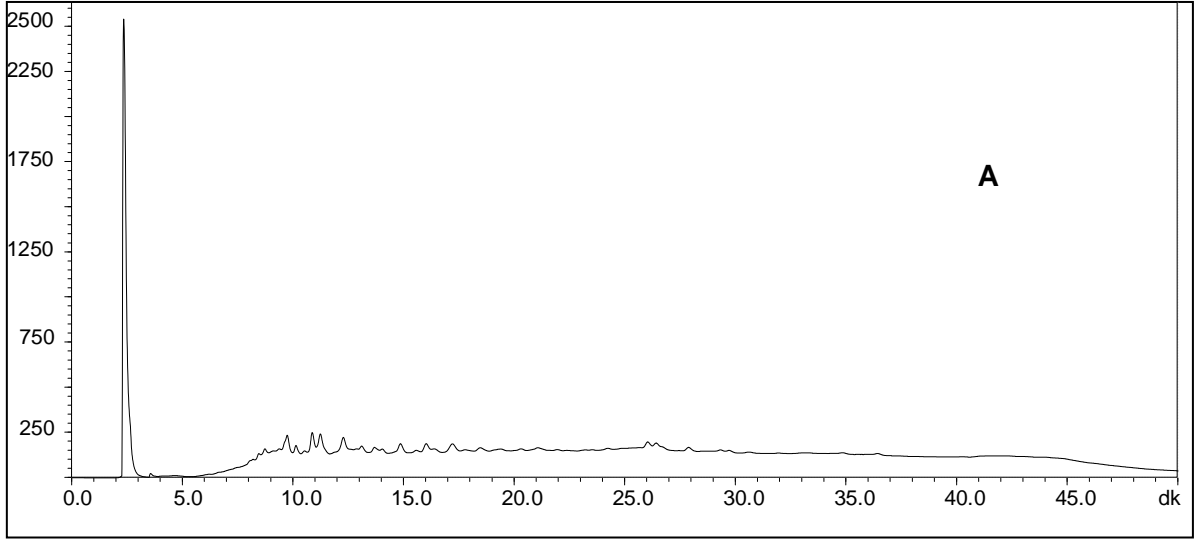
Şekil 70. Gilaburunun meyve suyununun (GBS) HPLC-UV kromatogramları, I: 280 nm'deki kromatogram, II: 280 nm'deki büyütülmüş kromatogram, III: 280 nm'deki uzun gradientli kromatogram

Tablo 7. Gilaburunun meyve suyunda (GBS) HPLC-ESI-MS ile tespit edilen fenolik bileşikler

Bileşik No	RT (dk)	[M-H] ⁻ (m/z)	Fragment iyonlar m/z	Bileşik	Kaynak
A	2,62	337	191, 674 ^a	Kumaroyil-kuinik asit	IX
B	6,14	393	-	T	
C	6,84	393	-	T	
D	16,83	706,9	191, 353	Klorogenik asit dimer	III
E	17,14	577	451, 425, 407, 289	Prosiyanidin B2	V
F	18,12	577	451, 425, 407, 289	Prosiyanidin B2	V
G	19,26 ^b	353	191,707 ^a	Klorogenik asit	III
H	19,26 ^c	289	245	Kateşin	V, XVI
I	20,21	865	577, 289	Prosiyanidin trimer	IV, VI
İ	20,67	865	577, 289	Prosiyanidin trimer	IV, VI
J	21,05	382	-	T	
K	21,98	577	451, 425, 407, 289	Prosiyanidin B2	V
L	22,70	353	191, 707 ^a	Klorogenik asit	III
M	23,54	289	245	Epikateşin	V, XVI
N	25,74	865	577, 289	Prosiyanidin trimer	IV, VI
O	26,71	739	449, 425, 407, 289	Proantosiyandin dimer monoglikozit	VII
P	27,52	577	451, 425, 407, 289	Procyanidin B2	V
R	28,72	739	449, 425, 407, 289	Proantosiyandin dimer monoglikozit	VII
S	31,2	595	300	Kuersetin-heksoz+pentoz	II
T	32,29	613	289	T	
U	35,29	609	300	Rutin	VIII, XVI
V	36,16	463	300	Kuersetin-heksoz	I,II
Y	37,86	447	300	Kuersetin-deoksiheksoz	I,II
Z	38,02	451	341	T	
W	38,22	451	341	T	

^a Dimerik bileşik, ^b ve ^c aynı tutulma zamanlarına sahip olup birbirinden ayrılmamış piklerdir. Uzun gradient ve standartlar kullanılarak tespit edilmişlerdir. T: Tanımlanmadı.

I: Alonso-Salces vd., 2004; II: Hakkinen ve Auriola, 1998; III: Carini vd., 2001; IV: Fahleh vd., 2011; V: Soong ve Barlow, 2005; VI: Sudjaroen vd., 2005; VII: Salminen vd., 2005; VIII: Vinson vd., 2001; IX: Weisz vd., 2009; XVI: Lopes-Lutz vd., 2010



Şekil 71. Gilaburunun çekirdek kısmının metanolik (GBCM) ekstraktının HPLC-UV kromatogramları, A: 280 nm'deki kromatogram, B: 280 nm'deki büyütülmüş kromatogram

Tablo 8. Gilaburunun çekirdek kısmının metanollü ekstraktındaki (GBCM) HPLC-ESI-MS ile tespit edilen fenolik bileşikler

Bileşik No	RT (dk)	[M-H] ⁻ (m/z)	Fragment iyonlar m/z	Bileşik	Kaynak
1	2,35	341	179, 161, 683 ^a	Dikaffeik asit	XIII, XVII
2	4,89	368	206	T	
3	7,04	613	289	T	
4	7,26	827	-	T	
5	7,48	613	289	T	
6	8,45	577	451, 425, 407, 289	Prosiyanidin B2	V
7	8,90	451	289	Kateşin glikozit	XV, XVIII
8	9,15	577	451, 425, 407, 289	Prosiyanidin B2	V
9	9,37	353	191, 707 ^a	Klorogenik asit	III
10	9,63	865	577, 289	Prosiyanidin trimer	IV, VI, XIX
11	9,79	289	245	Kateşin	V, VI
12	10,49	577	451, 425, 407, 289	Prosiyanidin B2	V
13	11,28	353	191	Klorogenik asit	III
14	11,44	597	289	T	
15	11,76	289	245	Epikateşin	V, VI
16	12,62	865	577, 289	Prosiyanidin trimer	IV, VI
17	12,97	579	417	Pelargonidin3-glukozit-vinilguaiacol varyant veya Peonidin-3-Glukozit (Pigment A varyant)	X, XI, XIV
18	13,26	739	449, 425, 407, 289	Proanthocyanidin dimer monoglikozit	VII
19	13,64	577	451, 425, 407, 289	Prosiyanidin B2	V
20	13,96	865	577, 289	Prosiyanidin trimer	IV, VI, XIX
21	14,41	579	417	Pelargonidin3-glukozit-vinilguaiacol varyant veya Peonidin-3-Glukozit (Pigment A varyant)	X, XI, VI
22	14,95	739	449, 425, 407, 289	Proantosiyandin dimer monoglikozit	VII
23	15,81	575	449, 423, 407, 289	Prosiyanidin A-tip Dimer	XII
24	17,18	535	373	T	
25	17,79	865	577, 289	Prosiyanidin trimer	IV, VI, XIX

Tablo 8'in devamı

Bileşik No	RT (dk)	[M-H] ⁻ (m/z)	Fragment iyonlar m/z	Bileşik	Kaynak
26	18,04	577	451, 425, 407, 289	Prosiyanidin B2	V
27	19,92	535	373	T	
28	20,58	579	417	Pelargonidin3-glukozit-vinilguaiacol varyant veya Peonidin-3-Glukozit (Pigment A varyant)	X, XI, VI
29	21,91	579	417	Pelargonidin3-glukozit-vinilguaiacol varyant veya Peonidin-3-Glukozit (Pigment A varyant)	X, XI, VI
30	22,38	579	417	Pelargonidin3-glukozit-vinilguaiacol varyant veya Peonidin-3-Glukozit (Pigment A varyant)	X, XI, VI
31	22,63	447	300	Kuersetin-deoksiheksoz	II
32	22,91	451	341	T	
33	23,35	451	341	T	
34	24,24	519	357	T	
35	24,67	579	417	Pelargonidin3-glukozit-vinilguaiacol varyant veya Peonidin-3-Glukozit (Pigment A varyant)	X, XI, VI
36	25,49	549	387	Pelargonidin3-glukozit (Pigment A varyant)	XI, VI
37	25,86	519	357	T	
38	27,47	451	341	T	
39	31,81	549	387	Pelargonidin3-glukozit (Pigment A varyant)	XI, VI

^a Dimerik bileşik; T: Tanımlanmadı.

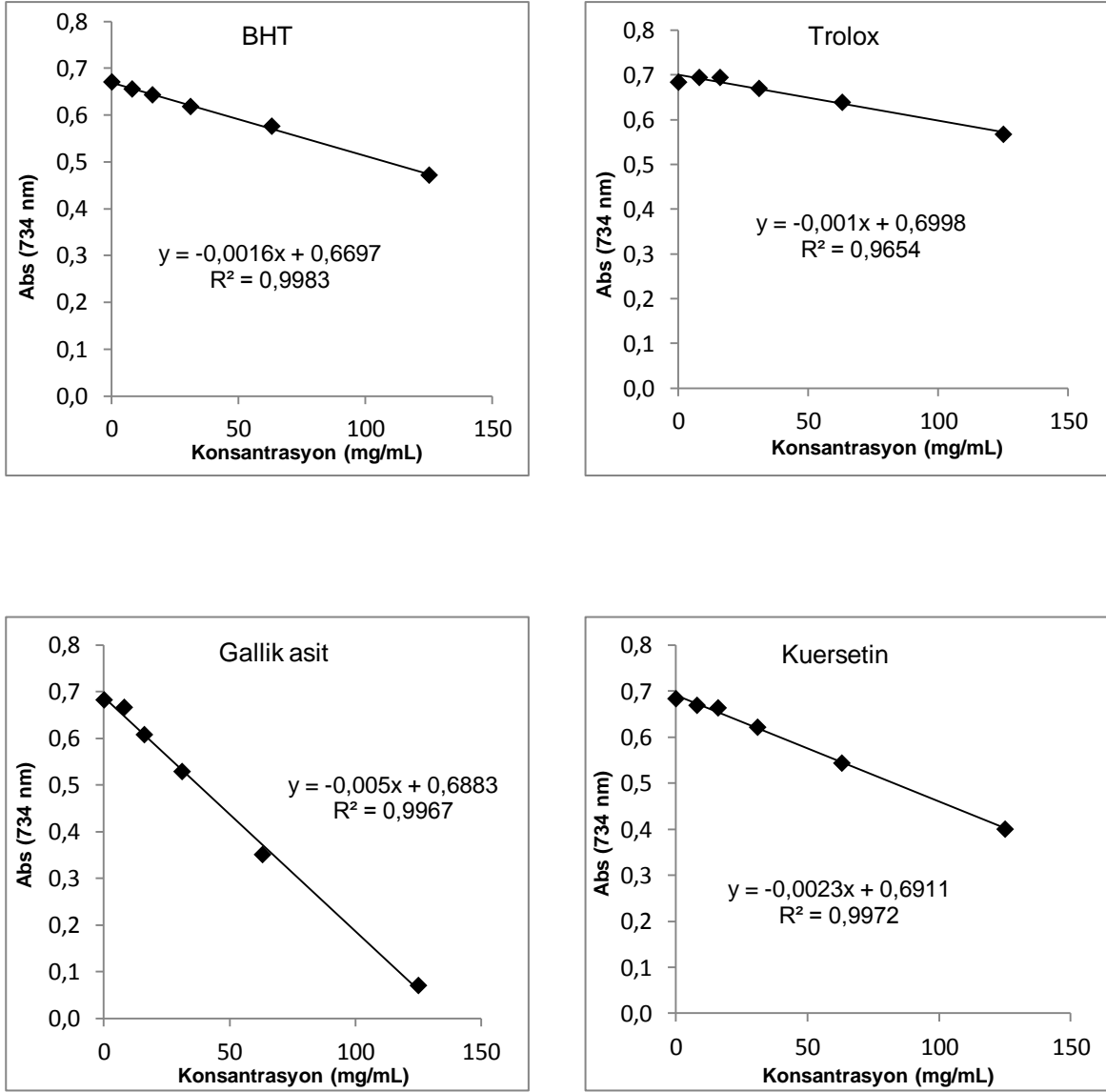
II: Hakkinen ve Auriola, 1998; III: Carini vd., 2001; IV: Fahleh vd., 2011; V: Soong ve Barlow, 2005; VI: Sudjaroen vd., 2005; VII: Salminen vd., 2005; X: Alcalde-Eon vd., 2006; XI: Hayasaka ve Asenstorfer, 2002; XII: Appeldoorn vd., 2009; XIII: Bravo vd., 2006; XIV: Rivas vd., 2006; XV: Verardo vd., 2010; XVII: Bravo vd., 2007; XVIII: Amarowicz vd., 2010; XIX: Amarowicz vd., 2009

3.9. Antioksidan Aktivite

Bütün meyvelerin (gilaburu, kızılıcık, kokulu üzüm ve karayemiş) meyve sularında ve çekirdek ve zar kısımlarından ayrı ayrı metanol, asetonitril ve su çözücülerini kullanılarak elde edilen ekstraktlarında antioksidan aktiviteyi belirlemek üzere ABTS radikal temizleme aktivitesi, demir (III) indirgeme / antioksidan kuvvet (FRAP) aktivitesi ve Folin-Ciocalteu yöntemi ile toplam fenolik madde tayin yöntemleri olmak üzere üç test uygulanmıştır. Antioksidan yöntemlerde standart olarak butillenmiş hidroksi toluen (BHT), Trolox, gallik asit ve kateşin karşılaştırma amaçlı kullanılmıştır.

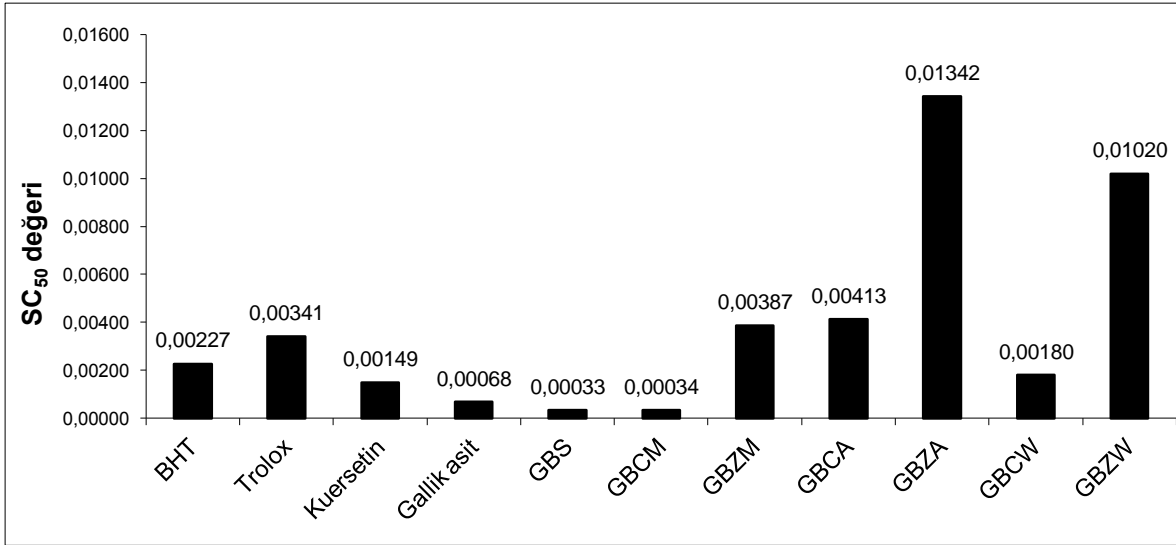
3.9.1. ABTS Radikal Temizleme Aktivite Tayin Yöntemi

Bütün meyvelerin meyve sularında ve çekirdek ve zar kısımlarının metanollü, asetonitrilli, sulu ekstraktlarında antioksidan aktivitelerin belirlenmesinde ABTS radikali temizleme aktivite tayin yöntemi kullanıldı. Standart antioksidanlar olarak BHT, Trolox, gallik asit ve kuersetin kullanıldı. Antioksidan aktivite, numunelerin SC_{50} değerleri belirlenerek karşılaştırılmıştır (Şekil 73, 75, 77, 79). SC_{50} , başlangıç ABTS radikal konsantrasyonunu yarıya düşüren numune konsantrasyonudur ve genelde mg/mL veya mM olarak ifade edilmektedir. Yöntemde kullanılan standartların değişen konsantrasyonları kullanılarak absorbans ölçümlerine dayalı elde edilen grafikler Şekil 72'de gösterilmiştir.



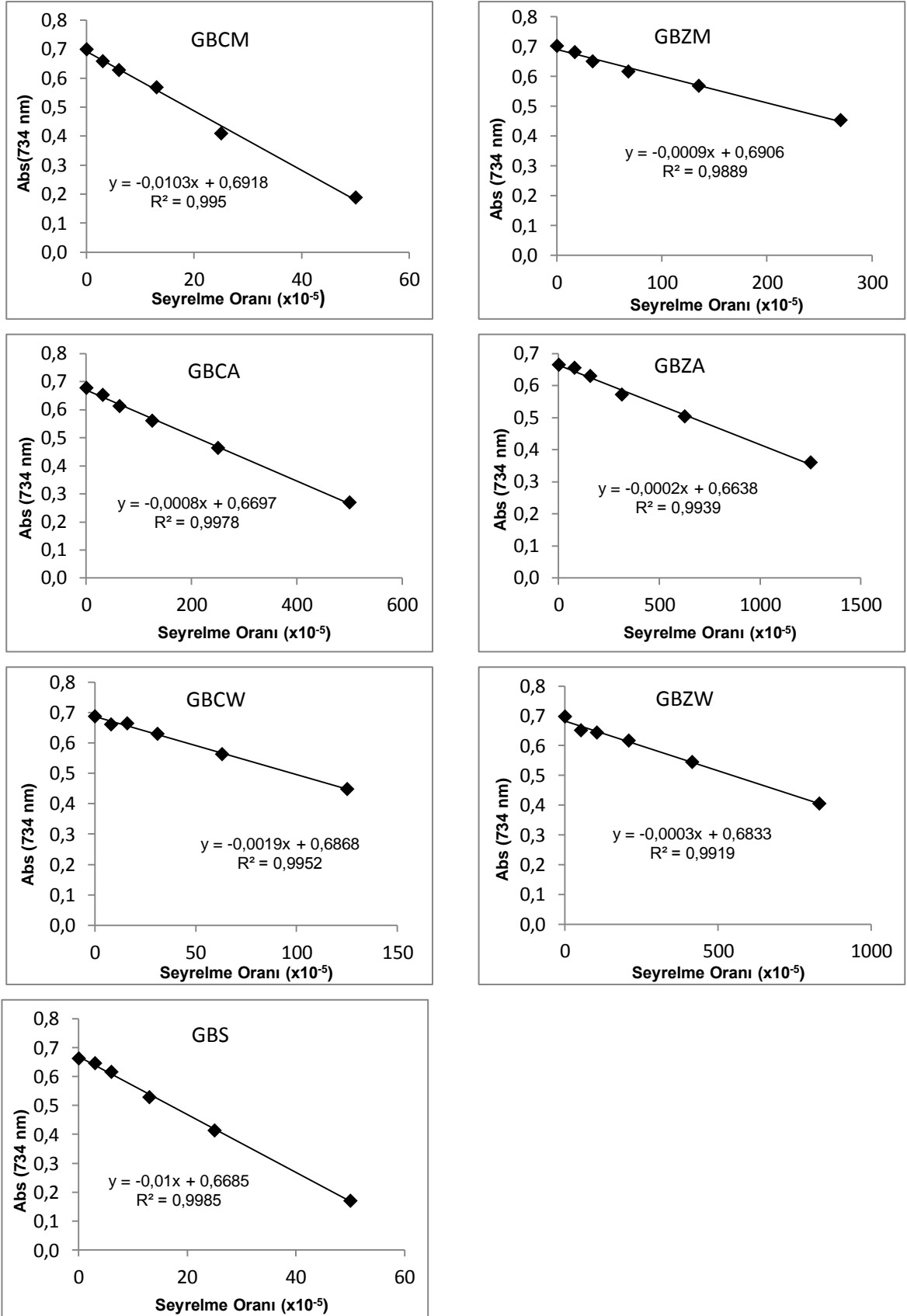
Şekil 72. ABTS yöntemine göre, kullanılan standartların konsantrasyon-absorbans grafikleri

3.9.1.1. Gilaburu Meyvesinin Ekstraktlarındaki ABTS Radikal Temizleme Aktivitesi



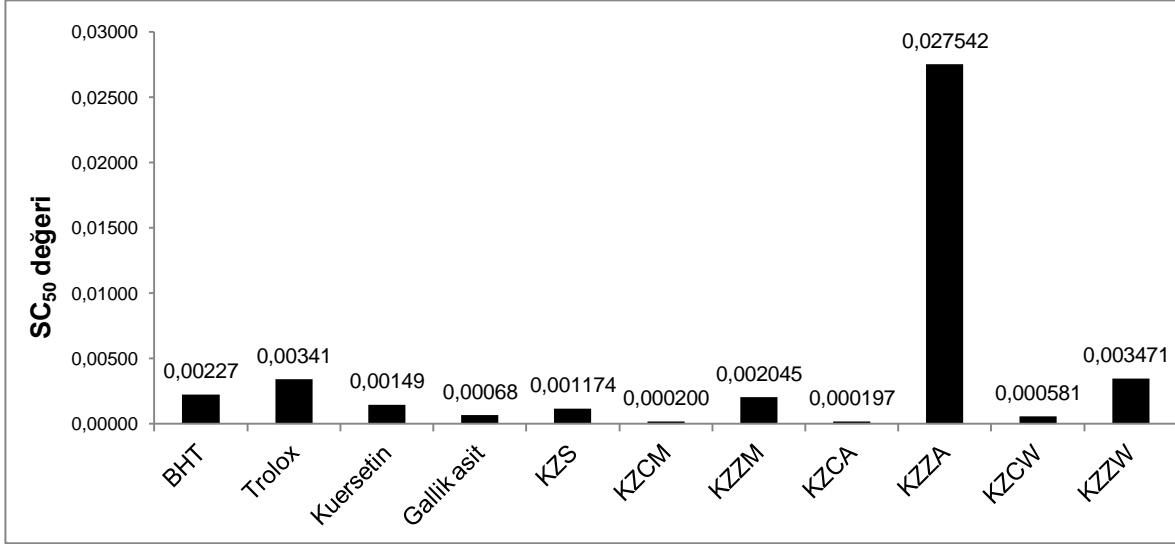
Şekil 73. Gilaburu meyvesinin bütün ekstraktlarının ve kullanılan standartların 734 nm’deki absorbansa dayalı ABTS radikali temizleme aktivitesi tayini sonucu elde edilen SC₅₀ değerleri (birim, standartlar için mg/mL, numuneler için seyrelme oranı)

Şekil 73’de gösterilen gilaburu meyvesinin bütün ekstraktlarının SC₅₀ değerlerine göre, gilaburu meyve suyunda (GBS) ve çekirdek kısmının metanollü (GBCM) ekstraktının diğer gilaburu numunelerine göre 5,4–40 katı daha yüksek aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Gilaburunun çekirdek ve zar kısımları karşılaştırıldığında, çekirdek ekstraktlarının ABTS radikal temizleme aktivitelerinin 3–11 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca çözücü karşılaştırılmasında metanollü ekstraktların asetonitrilli ve sulu ekstraktlara oranla daha yüksek aktiviteye sahip olduğu, en düşük aktiviteye ise asetonitrilli numunelerin sahip olduğu görülmektedir. Gilaburu meyvesinin bütün ekstraktlarının seyrelme oranı–absorbans grafikleri Şekil 74’de verilmiştir. SC₅₀ değerleri bu grafiklerden elde edilmiştir.



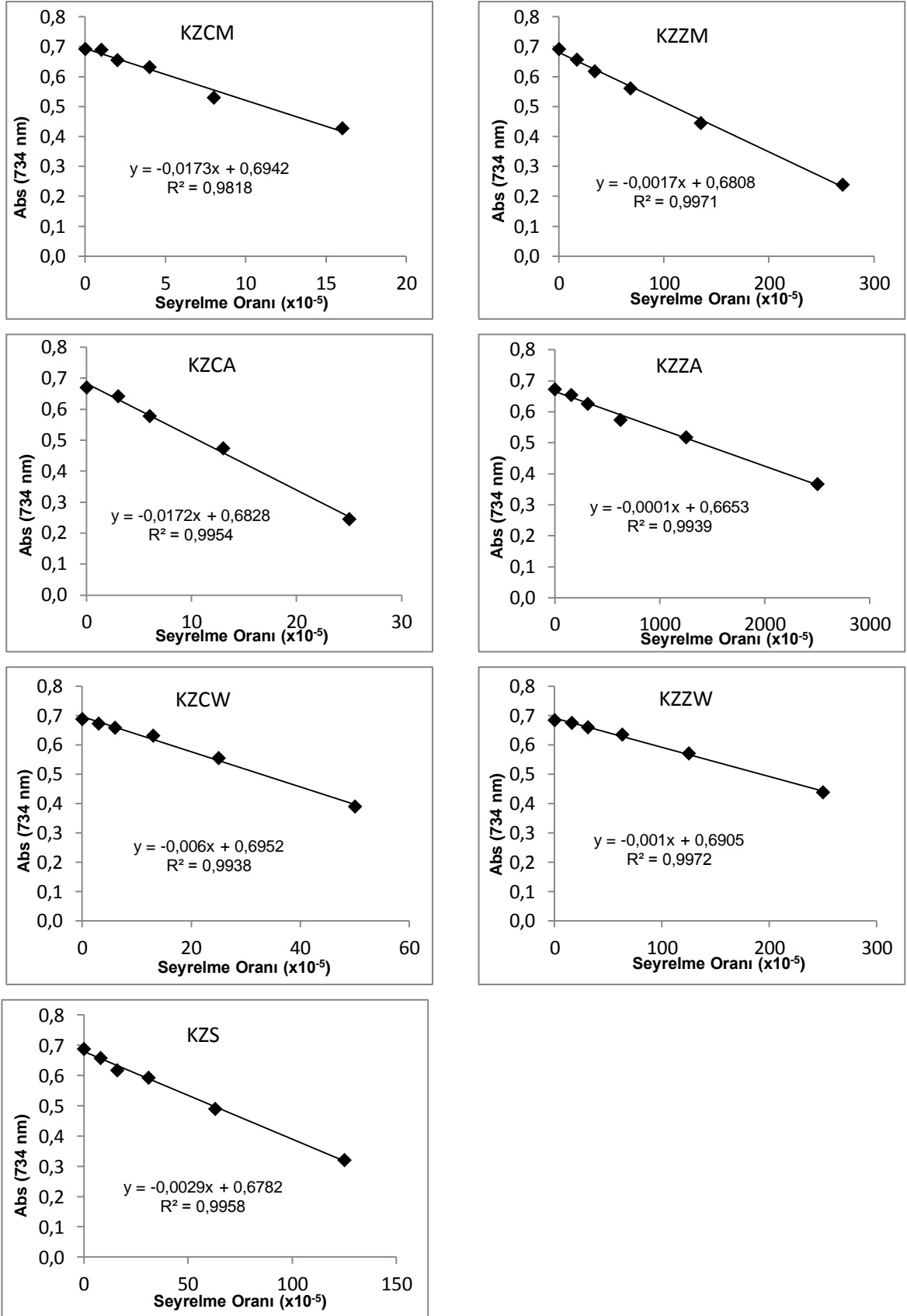
Şekil 74. ABTS yöntemine göre, gilaburu meyvesinin bütün ekstraktlarındaki seyrelme oranı-absorbans grafikleri

3.9.1.2. Kızılcık Meyvesinin Ekstraktlarındaki ABTS Radikal Temizleme Aktivitesi



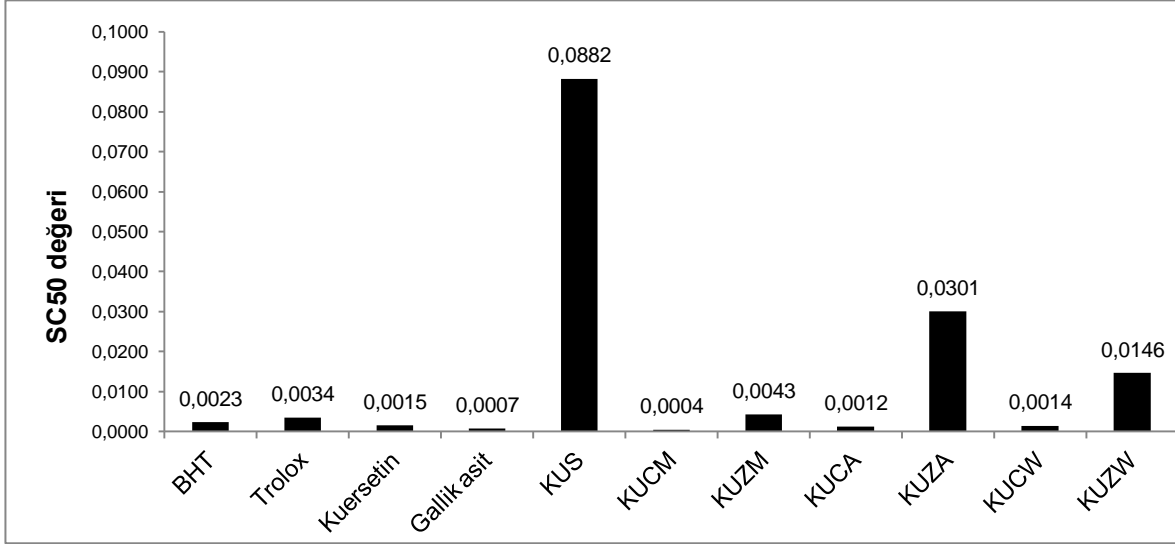
Şekil 75. Kızılcık meyvesinin bütün ekstraktlarının ve kullanılan standartların 734 nm'deki absorbansa dayalı ABTS radikali temizleme aktivitesi tayini sonucu elde edilen SC₅₀ değerleri (birim, standartlar için mg/mL, numuneler için seyrelme oranı)

Kızılcık meyvesinden elde edilen numunelerin ABTS radikali temizleme aktivitesi karşılaştırıldığında, çekirdek kısmının metanol ve asetonitril ile elde edilen ekstraktları (KZCM ve KZCA) daha yüksek aktiviteye sahip iken zar kısmının asetonitrilli ekstraktı (KZZA) daha düşük aktiviteye sahiptir (Şekil 75). Gilaburu meyvesinde olduğu gibi kızılcık meyvesinde de çekirdek kısımlarının zara göre daha aktif olduğu tespit edilmiştir. Kızılcık meyvesinin çekirdek kısmının farklı çözücüler ile elde edilen ekstraktlarının karşılaştırılmasında, yüksek aktiviteden düşük aktiviteye doğru sıralama asetonitril-metanol-su şeklindedir. Fakat zar kısmında ise bu sıralamanın metanol, su ve asetonitril olduğu belirlenmiştir. Şekil 76'da kızılcık meyvesinin bütün numunelerinin seyrelme oranı-absorbans grafikleri verilmiştir.



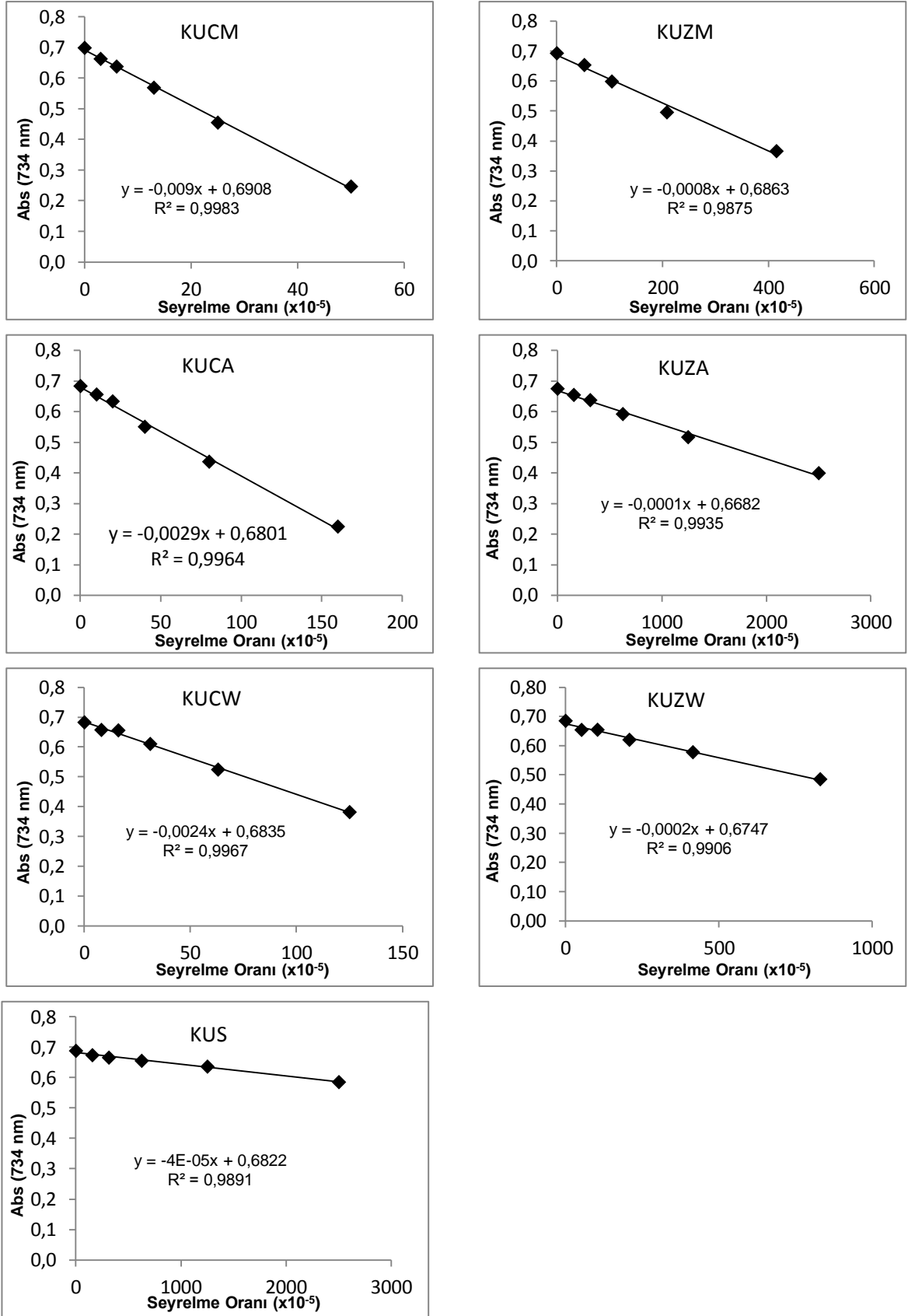
Şekil 76. ABTS yöntemine göre, kızılılık meyvesinin bütün ekstraktlarındaki seyrelme oranı-absorbans grafikleri

3.9.1.3. Kokulu Üzüm Meyvesinin Ekstraktlarındaki ABTS Radikal Temizleme Aktivitesi



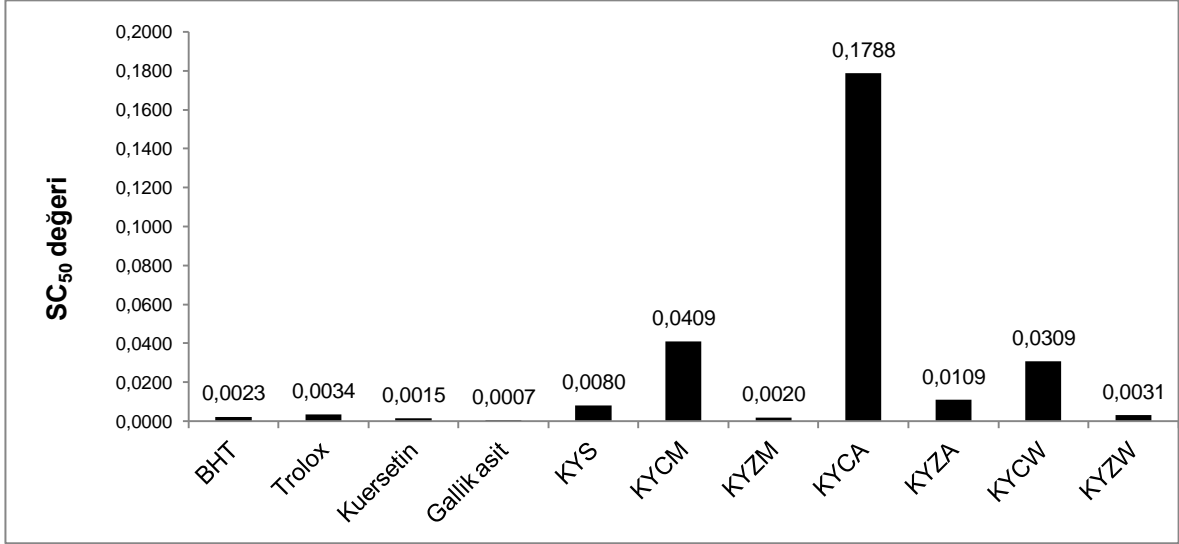
Şekil 77. Kokulu üzüm meyvesinin bütün ekstraktlarının ve kullanılan standartların 734 nm'deki absorbansa dayalı ABTS radikali temizleme aktivitesi tayini sonucu elde edilen SC₅₀ değerleri (birim, standartlar için mg/mL, numuneler için seyrelme oranı)

Kokulu üzüm meyvesinin bütün ekstraktlarından elde edilen ABTS radikali temizleme aktivitesi sonuçları Şekil 77'de gösterilmiştir. Kokulu üzüm numunelerinde, en düşük aktivite meyve suyunda (KUS), en yüksek aktivite ise kokulu üzüm çekirdeklerinin metanollü (KUCM) ekstraktında görülmüştür. Çekirdekten elde edilen ekstraktlar zara göre daha yüksek aktivite göstermiştir. Çekirdek ekstraktlarında çözücü karşılaştırılmasında aktivite sırası metanol, asetonitril ve su iken, zar ekstraktlarında metanol, su ve asetonitril olarak yüksek aktiviteden düşük aktiviteye doğru sıralanmaktadır. Kokulu üzüm numunelerine ait seyrelme oranı-absorbans grafikleri Şekil 78'de gösterilmiştir.



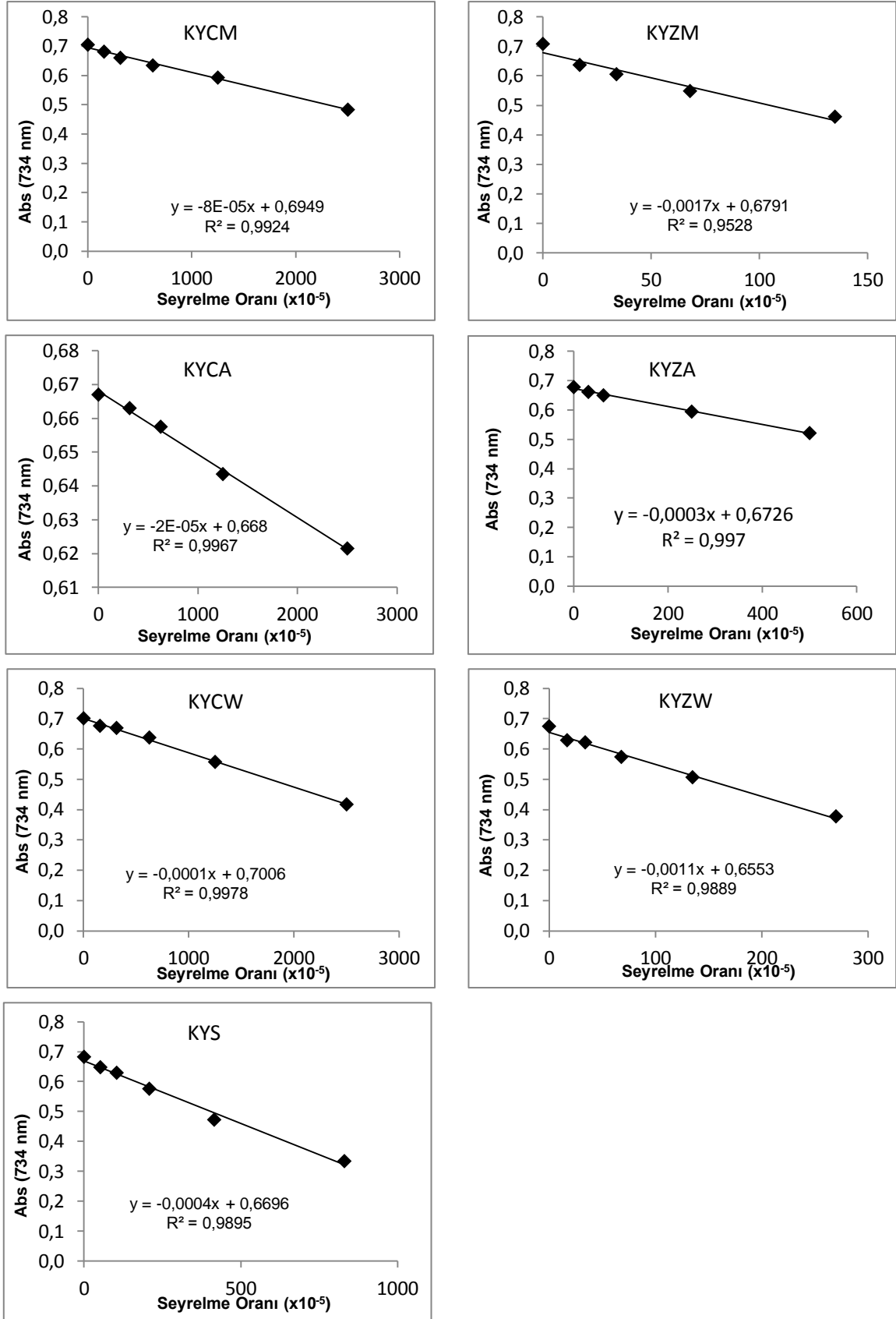
Şekil 78. ABTS yöntemine göre, kokulu üzüm meyvesinin bütün ekstraktlarındaki seyrelme oranı-absorbans grafikleri

3.9.1.4. Karayemiş Meyvesinin Ekstraktlarındaki ABTS Radikal Temizleme Aktivitesi



Şekil 79. Karayemiş meyvesinin bütün ekstraktlarının ve kullanılan standartların 734 nm'deki ABTS radikali temizleme aktivitesi analizi sonucu elde edilen SC₅₀ değerleri (mg/mL)

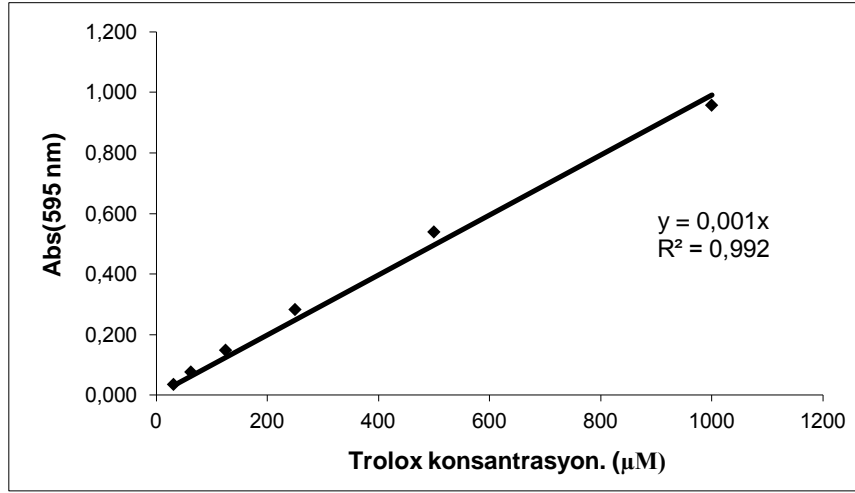
Karayemiş meyve ekstraktlarındaki ABTS radikali temizleme aktivite tayin sonuçlarına göre (Şekil 79), çekirdek ve zar kısımlarının karşılaştırılmasında diğer meyvelerin aksine en yüksek aktiviteye zar kısımlarının sahip olduğu görülmektedir. Numuneler arasında en yüksek aktivite meyvenin zar kısmının metanollü (KYZM) ekstraktında görülmüştür. Çekirdek kısımlarındaki farklı çözücüler ile elde edilen ekstraktların karşılaştırılmasındaki çözücü sıralaması su, metanol ve asetonitril şeklindedir. Zar kısımlarında ise bu sıralama metanol, su ve asetonitrildir. Karayemiş numunelerine ait seyrelme oranı-absorbans grafikleri Şekil 80'de verilmiştir.



Şekil 80. ABTS yöntemine göre, karayemiş meyvesinin bütün ekstraktlarındaki seyrelme oranı-absorbans grafikleri

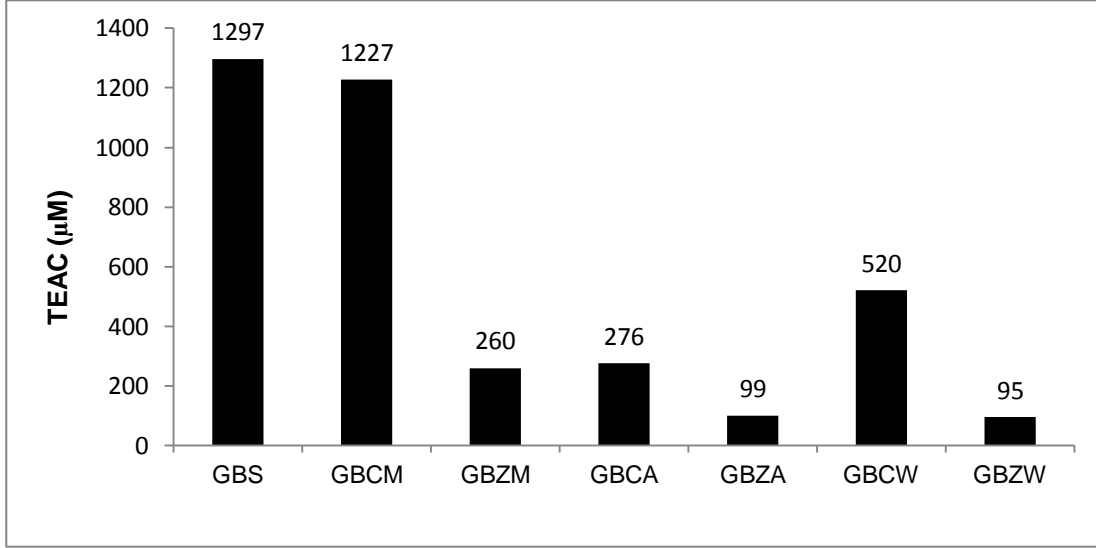
3.9.2. Demir (III) İndirgeme / Antioksidan Kuvvet (FRAP) Yöntemi

Gilaburu, kızılıık, kokulu üzüm ve karayemiş meyvelerinin meyve sularında ve çekirdek ve zar kısımlarının metanollü, asetonitrilli, ve sulu ekstraktlarında antioksidan aktivitenin belirlenmesinde demir (III) indirgeme / antioksidan kuvveti (FRAP) yöntemi kullanıldı. Yöntemde standart olarak kullanılan Trolox'un farklı konsantrasyonları kullanılarak, absorbans ölçümlerine dayalı kalibrasyon grafiği elde edildi (Şekil 81). Bu grafik kullanılarak antioksidan aktivite Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC, μM) olarak ifade edildi. FRAP yönteminde kullanılan bütün numuneler stoktan 1:10 oranında seyreltilerek analiz edildi.



Şekil 81. FRAP yöntemine göre, Trolox konsantrasyonu-absorbans grafiği

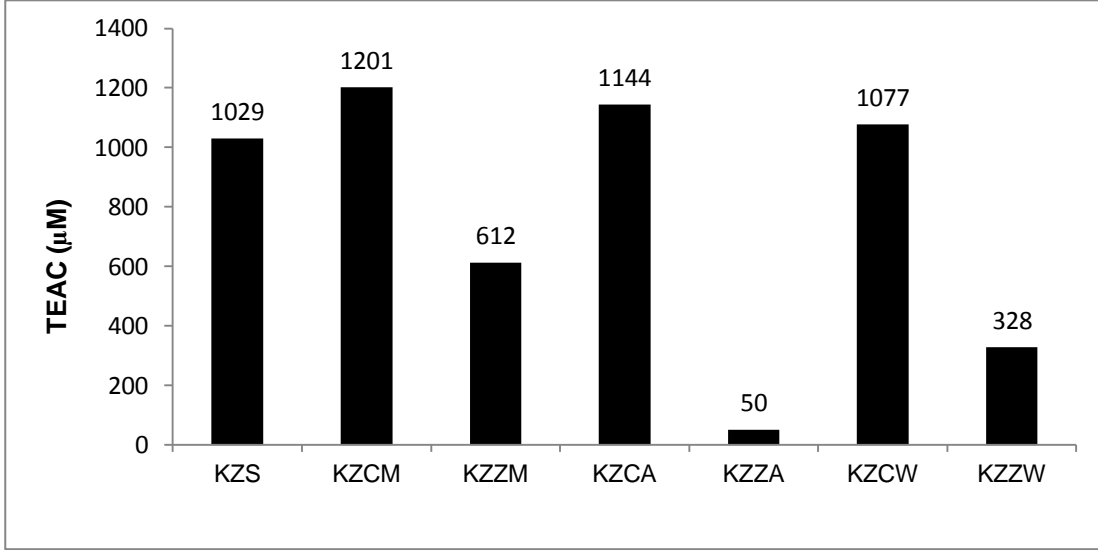
3.9.2.1. Gilaburu Meyvesinin Ekstraktlarındaki Demir (III) İndirgeme / Antioksidan Kuvveti



Şekil 82. Gilaburu meyvesinin bütün ekstraktlarının Fe (III) indirgeme / antioksidan kuvveti (FRAP) değerleri (µM TEAC; Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite)

Gilaburu ekstraktlarının demir (III) indirgeme / antioksidan kuvvetleri karşılaştırıldığında (Şekil 82), meyve suyunun (GBS) demiri indirgeme potansiyeli yani antioksidan kuvveti diğerlerinden daha yüksektir. ABTS radikal temizleme yönteminde olduğu gibi bu yöntemde de çekirdek ekstraktları zara göre daha yüksek aktiviteye sahiptir. Metanol çözücüsü ile elde edilen numunelerin (GBCM ve GBZM) FRAP değerleri diğerlerine göre daha yüksektir.

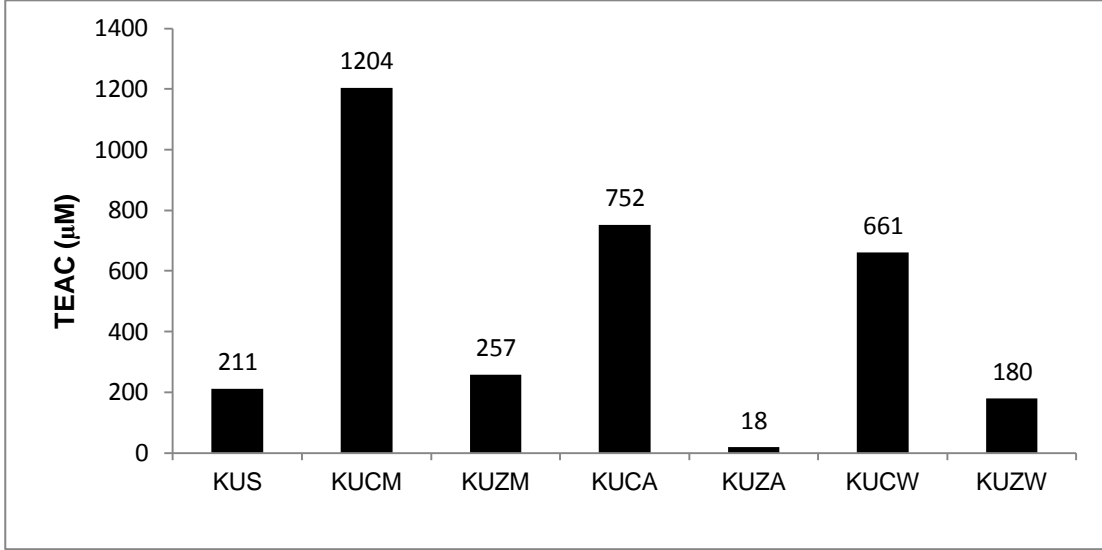
3.9.2.2. Kızılcık Meyvesinin Ekstraktlarındaki Demir (III) İndirgeme / Antioksidan Kuvveti



Şekil 83. Kızılcık meyvesinin bütün ekstraktlarının Fe (III) indirgeme / antioksidan kuvveti (FRAP) değerleri (µM TEAC; Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite)

Kızılcık numunelerinde en yüksek demir (III) indirgeme potansiyeli çekirdek kısımlarının metanollü (KZCM) ve asetonitrilli (KZCA) ekstraktlarında tespit edilmiştir. En düşük indirgeme potansiyeli ise zar kısmının asetonitrilli (KZZA) ekstraktında görülmüştür. Şekil 83’de görüldüğü gibi çekirdek ekstraktları zar ekstraktlarına göre daha yüksek indirgeme potansiyeline sahiptir. Çekirdek numunelerinde çözücü karşılaştırılmasında aktivite sırası metanol-asetonitril-su iken, zar numunelerinde ise bu sıralama su-metanol-asetonitril şeklinde yüksek aktiviteden düşük aktiviteye doğru sıralanmaktadır.

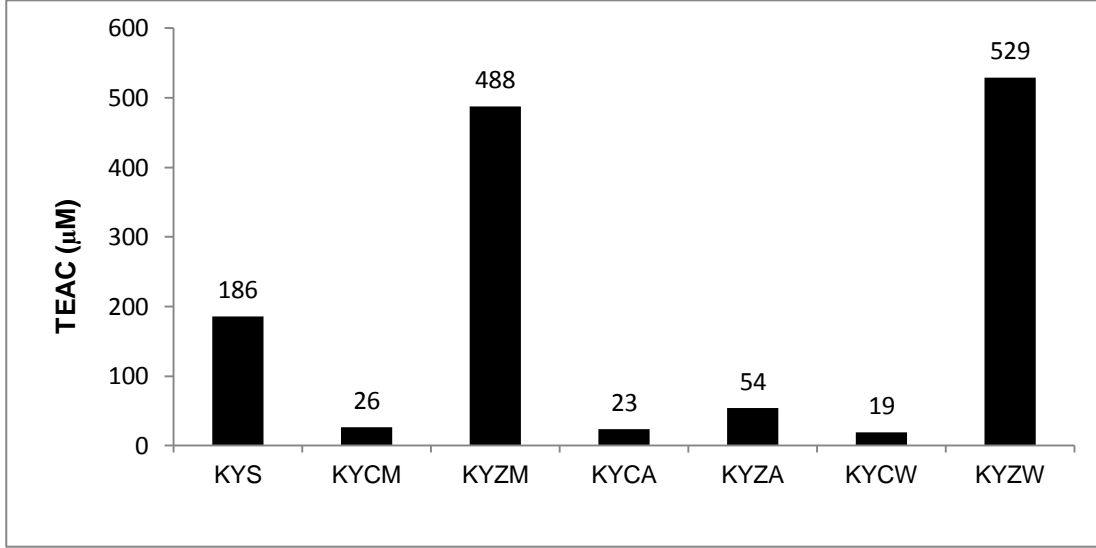
3.9.2.3. Kokulu Üzüm Meyvesinin Ekstraktlarındaki Demir (III) İndirgeme / Antioksidan Kuvveti



Şekil 84. Kokulu üzüm meyvesinin bütün ekstraktlarının Fe (III) indirgeme / antioksidan kuvveti (FRAP) değerleri (µM TEAC; Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite)

Kokulu üzüm numunelerinin demir (III) indirgeme kuvvetleri Şekil 84’de gösterilmiştir. KUCM numunesi ABTS testinde olduğu gibi en yüksek potansiyele sahiptir. En düşük potansiyele ise KUZA numunesi sahiptir. Çekirdek ekstraktları zar ekstraktlarına göre daha yüksek indirgeme potansiyeli göstermiştir. Çekirdek numunelerinde en yüksek potansiyel metanollü ekstraktlara ait iken en düşük potansiyel ise sulu ekstraktlara aittir. Zar numunelerinde ise en yüksek potansiyeli yine metanol ekstraktları gösterirken en düşük potansiyeli ise asetonitril ekstraktları göstermiştir.

3.9.2.4. Karayemiş Meyvesinin Ekstraktlarındaki Demir (III) İndirgeme / Antioksidan Kuvveti



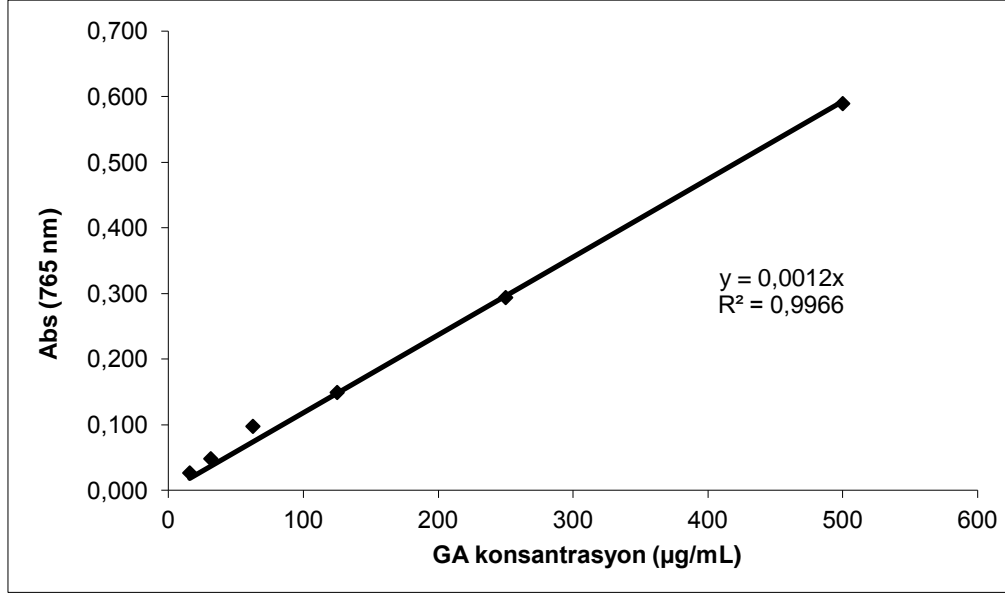
Şekil 85. Karayemiş meyvesinin bütün ekstraktlarının Fe (III) indirgeme / antioksidan kuvveti (FRAP) değerleri (µM TEAC; Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite)

Karayemiş meyvesinin FRAP değerleri karşılaştırıldığında (Şekil 85), diğer bütün meyvelerin aksine zar kısımlarının çekirdek kısımlarına göre daha yüksek demir (III) indirgeme kuvvetine sahip olduğu görülmektedir. En yüksek potansiyel zar kısmının sulu (KYZW) ekstraktında, en düşük potansiyel ise çekirdek kısmının sulu (KYCW) ekstraktında tespit edilmiştir. Zar numunelerindeki çözücü sıralaması su-metanol-asetonitril olarak yüksek indirgeme potansiyelinden düşük indirgeme potansiyeline doğru sıralanmaktadır. Çekirdek numunelerinde ise bu sıralama metanol-asetonitril-su şeklindedir.

3.9.3. Folin-Ciocalteu Yöntemi ile Toplam Fenolik Madde Tayini

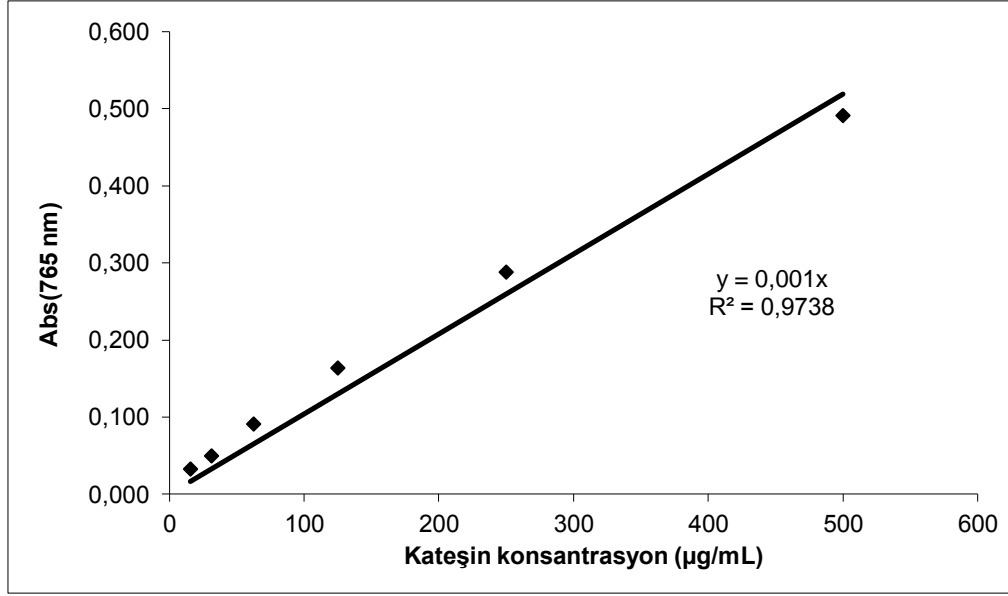
Bütün numunelerde antioksidan aktivitenin belirlenmesinde aynı zamanda Folin-Ciocalteu yöntemi ile toplam fenolik madde tayini yöntemi kullanıldı. Yöntemde standart olarak gallik asit ve kateşinin değişen konsantrasyonları kullanılarak absorban ölçümüne dayalı kalibrasyon grafikleri elde edildi (Şekil 86 ve 87).

Gallik asit standart grafiğinden elde edilen doğrunun fonksiyonu kullanılarak numunelerdeki fenolik bileşik miktarları gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak $\mu\text{g/mL}$ cinsinden ifade edildi (Şekil 86).



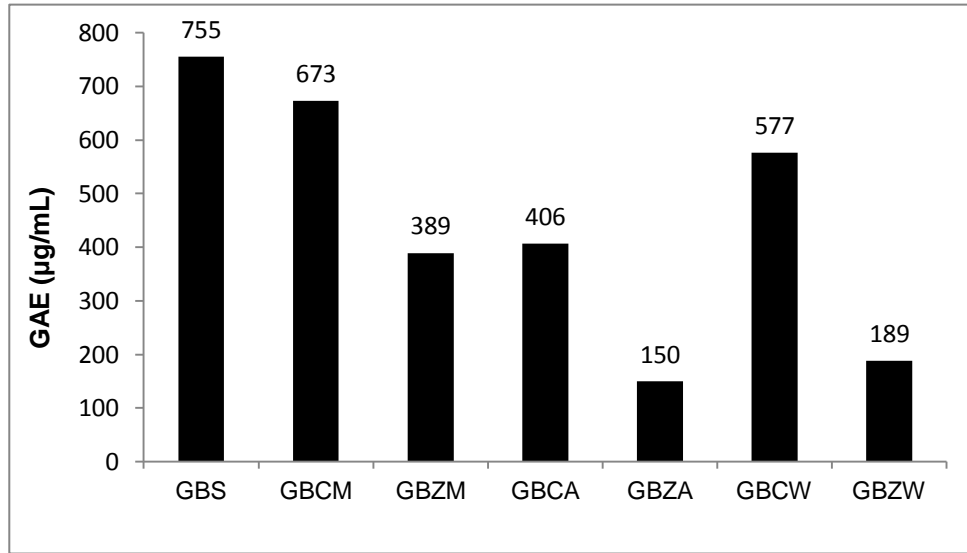
Şekil 86. Folin-Ciocalteu yöntemine göre gallik asit (GA) konsantrasyon-absorbans grafiğı

Fenolik asit tayininde ayrıca literatür verileriyle ve daha sonraki çalışmalarda kullanılabilmesi için, kateşin standart olarak kullanıldı ve numunelerdeki fenolik bileşik miktarları kateşin eşdeğeri (KE) olarak $\mu\text{g/mL}$ cinsinden ifade edildi (Şekil 87).



Şekil 87. Folin-Ciocalteu yöntemine göre kateşin konsantrasyon-absorbans grafiği

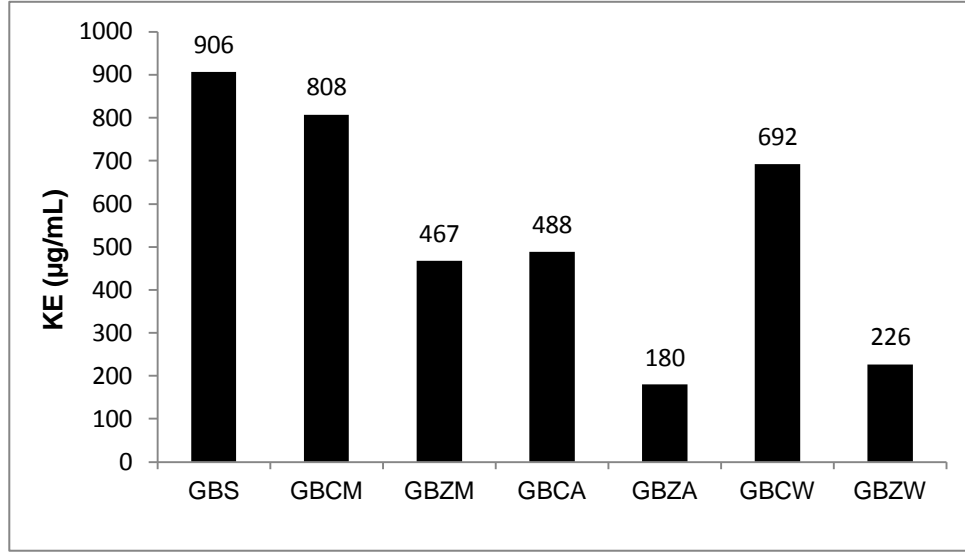
3.9.3.1. Gilaburu Meyvesinin Ekstraktlarındaki Toplam Fenolik Madde Miktarları



Şekil 88. Folin-Ciocalteu yöntemine göre gilaburu meyvesinin bütün ekstraktlarının gallik asit eşdeğeri (GAE, µg/mL) cinsinden toplam fenolik madde miktarları

Numunelerin fenolik içeriklerine GAE cinsinden bakıldığında, gilaburu meyve suyunun (GBS) toplam fenolik (TF) içeriğinin yüksek olduğu, zar kısmının asetonitrilli

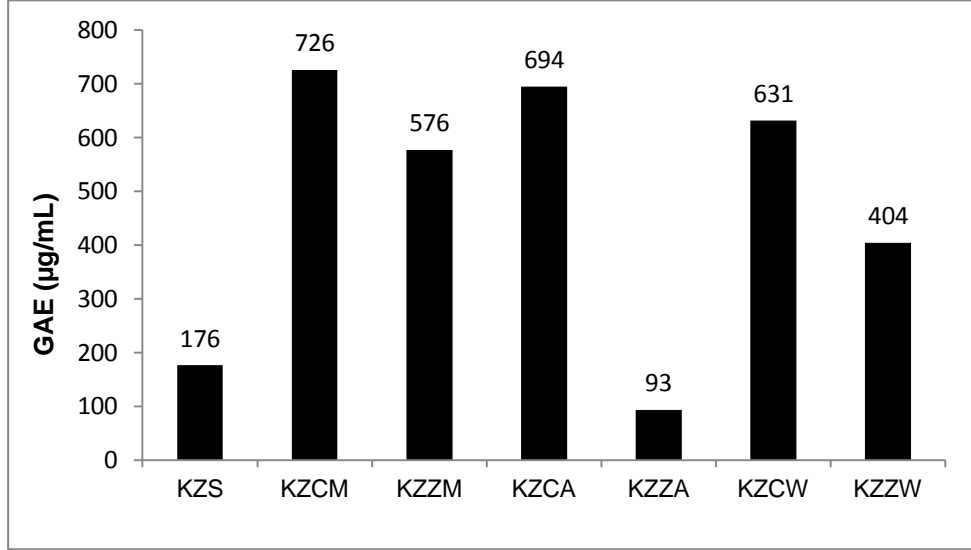
ekstraktının (GBZA) ise daha düşük fenolik içeriğe sahip olduğu görülmektedir (Şekil 88). FRAP ve ABTS testlerinde çekirdek numuneleri zar numunelerine göre daha yüksek aktivite gösterdiği gibi TF miktarlarında yüksek olduğu görülmüştür. Hem çekirdek hem de zar kısımlarında farklı çözücülerin etkisi karşılaştırıldığında en yüksek TF miktarı metanollü numunelerde daha sonra sulu ve asetonitrilli numunelerde görülmüştür.



Şekil 89. Folin-Ciocalteu yöntemine göre gilaburu meyvesinin bütün ekstraktlarının kateşin eşdeğeri (KE, µg/mL) cinsinden toplam fenolik madde miktarları

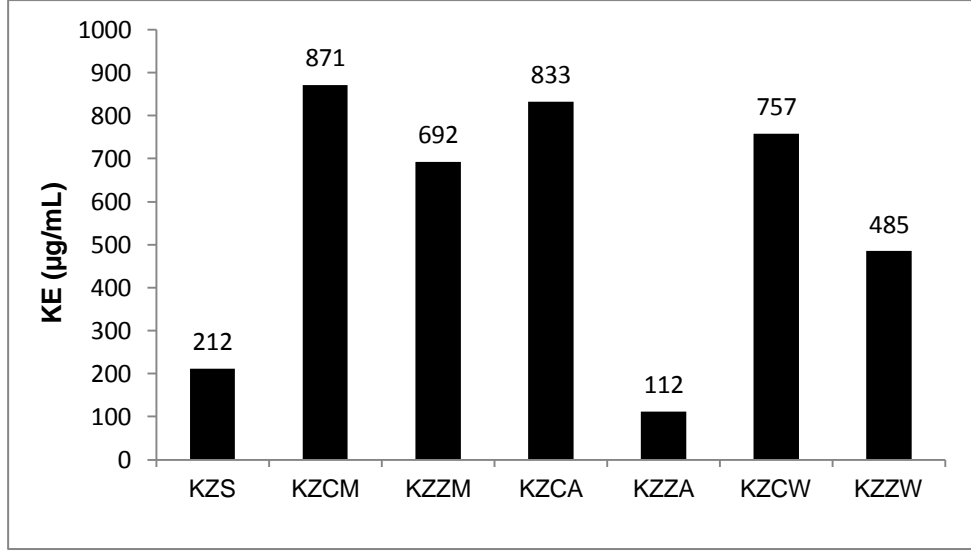
Kateşin standart grafiğine dayalı hazırlanan KE-numune grafikleri, gallik asit standart grafiği ile hazırlanan GAE-numune grafikleri ile benzer özellikler göstermektedir (Şekil 89).

3.9.3.2. Kızılcık Meyvesinin Ekstraktlarındaki Toplam Fenolik Madde Miktarları



Şekil 90. Folin-Ciocalteu yöntemine göre kıızılcık meyvesinin bütün ekstraktlarının gallik asit eşdeğeri (GAE, µg/mL) cinsinden toplam fenolik madde miktarları

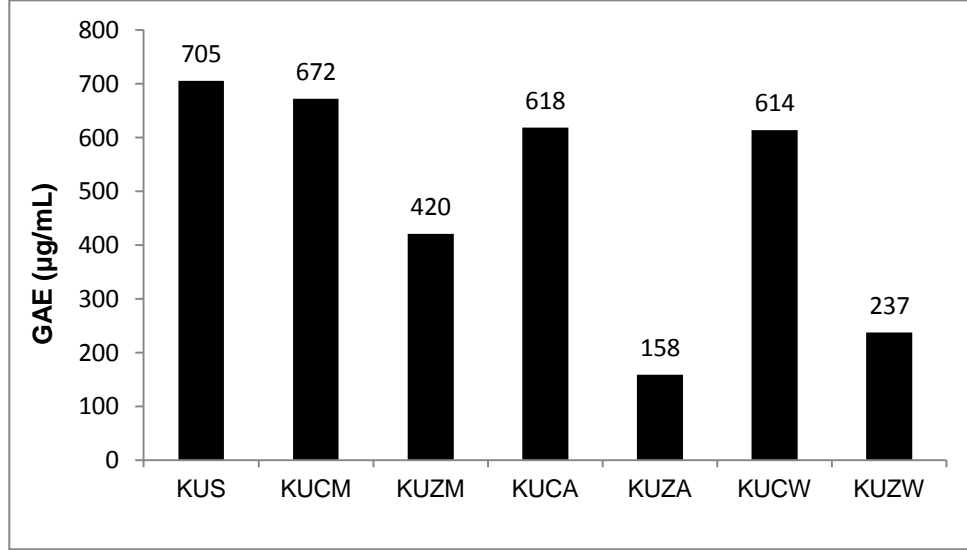
Kızılcık numunesindeki toplam fenolik madde miktarı karşılaştırılmasında, çekirdek kısmının metanollü (KZCM) ekstraktı diğer numunelere göre daha fazla fenolik bileşen içermektedir. En az fenolik bileşeni ise zar kısmının asetonitrilli (KZZA) ekstraktı içermektedir. ABTS ve FRAP testlerinde çekirdek ekstraktları daha yüksek aktivite gösterdiği gibi toplam fenolik madde miktarlarında fazla olduğu tespit edilmiştir. Çekirdek numunelerinde farklı çözücü ekstraktlarının karşılaştırılmasında en yüksek fenolik bileşen metanollü ekstraktlarda, en düşük fenolik bileşen ise su ekstraktlarında görülmüştür. Zar numunelerinde ise en yüksek fenolik miktar metanollü ekstraktlarda iken en düşük fenolik miktar asetonitrilli numunelerde tespit edilmiştir (Şekil 90).



Şekil 91. Folin-Ciocalteu yöntemine göre kıızılcık meyvesinin bütün ekstraktlarının kateşin eşdeğeri (KE, µg/mL) cinsinden toplam fenolik madde miktarı

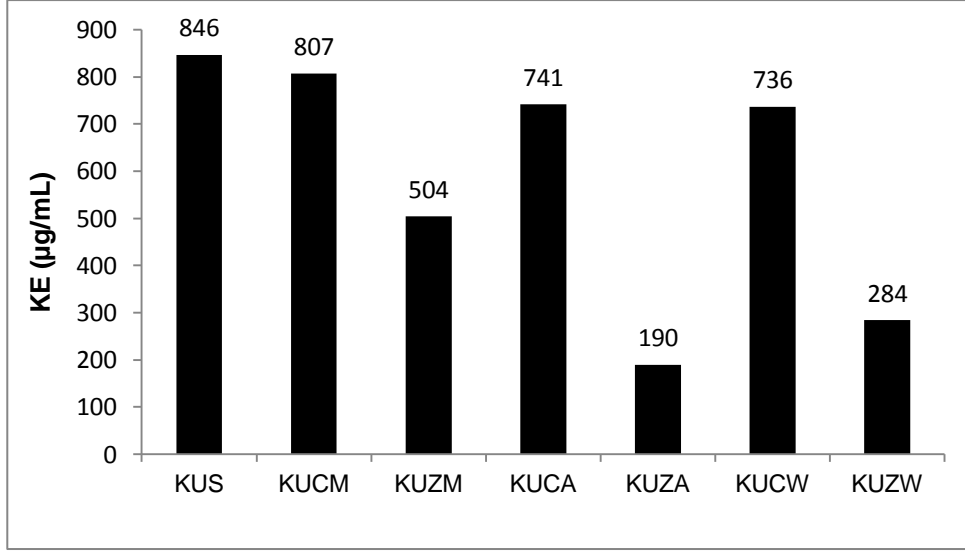
Kızılcık meyvesinin numunelerinde kateşin standart grafiğine dayalı hazırlanan KE-numune grafikleri, gallik asit standart grafiği ile hazırlanan GAE-numune grafikleri ile benzer özellikler göstermektedir (Şekil 91).

3.9.3.3. Kokulu Üzüm Meyvesinin Ekstraktlarındaki Toplam Fenolik Madde Miktarları



Şekil 92. Folin-Ciocalteu yöntemine göre kokulu üzüm meyvesinin bütün ekstraktlarının gallik asit eşdeğeri (GAE, µg/mL) cinsinden toplam fenolik madde miktarları

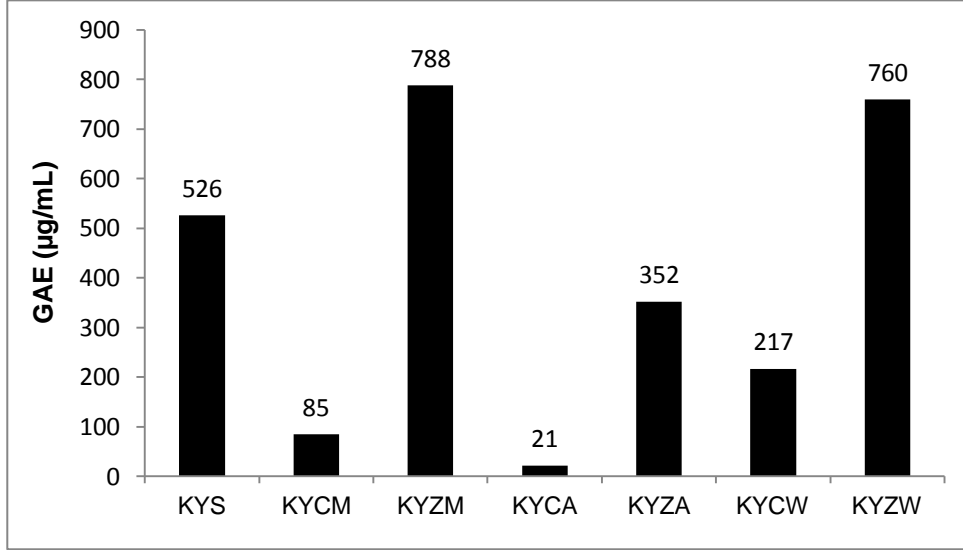
Kokulu üzüm meyvesinin ekstraktları toplam fenolik madde içeriğine göre karşılaştırıldığında, en fazla fenolik madde meyve suyunda (KUS) görülmüştür (Şekil 92). Zar kısmının asetonitrilli (KUZA) ekstraktı ise en az miktarda fenolik madde içermektedir. Çekirdek ekstraktlarındaki fenolik madde miktarının daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Çekirdek ekstraktları farklı çözücü etkisine göre karşılaştırıldığında metanollü numuneler en fazla miktarda toplam fenolik madde içerirken asetonitrilli ve sulu numuneler hemen hemen aynı miktarda fenolik madde içermektedir. Zar ekstraktlarında ise metanollü numuneler daha fazla fenolik madde içerirken asetonitrilli numuneler ise en az fenolik madde içermektedir.



Şekil 93. Folin-Ciocalteu yöntemine göre kokulu üzüm meyvesinin bütün ekstraktlarının kateşin eşdeğeri (KE, µg/mL) cinsinden toplam fenolik madde miktarları

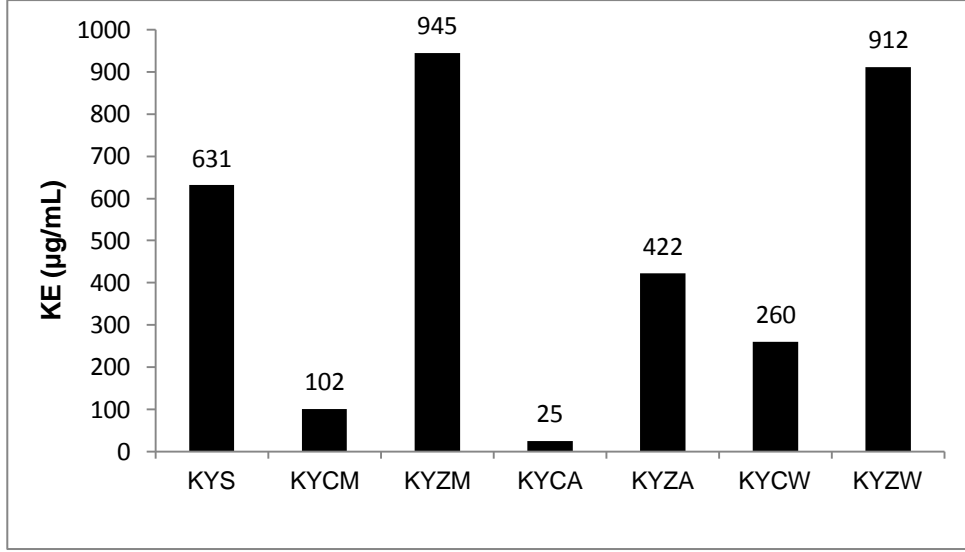
Kokulu üzüm ekstraktlarındaki kateşin standart grafiğine dayalı hazırlanan KE-numune grafikleri, gallik asit standart grafiği ile hazırlanan GAE-numune grafikleri ile benzer özellikler göstermektedir (Şekil 93).

3.9.3.4. Karayemiş Meyvesinin Ekstraktlarındaki Toplam Fenolik Madde Miktarları



Şekil 94. Folin-Ciocalteu yöntemine göre karayemiş meyvesinin bütün ekstraktlarının gallik asit eşdeğeri (GAE, µg/mL) cinsinden toplam fenolik madde miktarları

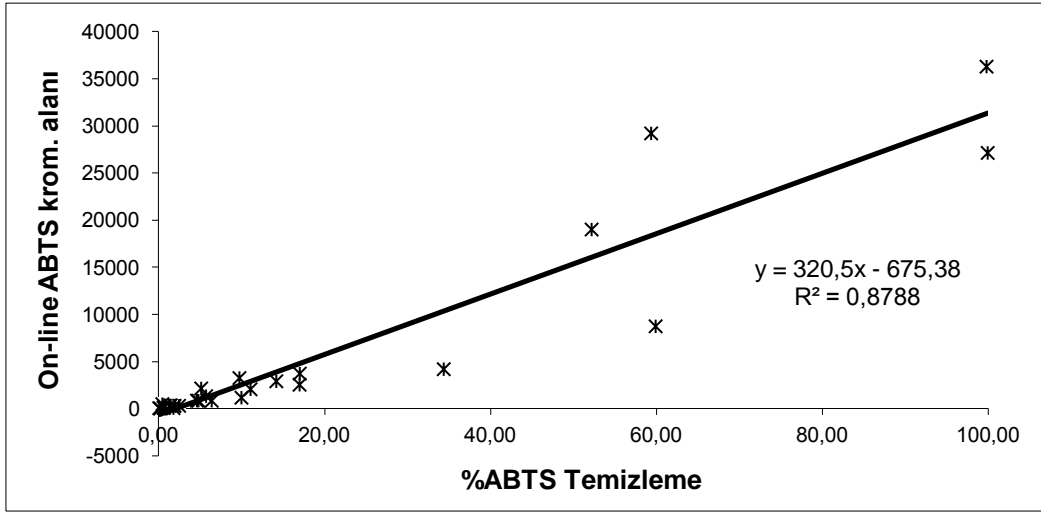
Toplam fenolik madde miktarı tayin metoduna göre, karayemiş meyvesinin zar kısmının metanollü (KYZM) ekstraktı yüksek miktarda fenolik madde içerirken çekirdek kısmının asetonitrilli (KYCA) ekstraktı düşük miktarda fenolik madde içermektedir (Şekil 94). Karayemiş meyvesinin zar kısımları çekirdek kısımlarına göre daha fazla miktarda TF miktarı içermektedir. Zar ekstraktlarındaki farklı çözücü karşılaştırılmasında, metanollü numunelerin fazla miktarda TF içerdiği, asetonitrilli numunelerin ise daha az miktarda fenolik madde içerdiği tespit edilmiştir. Çekirdek ekstraktlarında ise sulu numunelerin daha fazla miktarda fenolik madde içerdiği yine asetonitrilli numunelerin daha az miktarda fenolik madde içerdiği görülmektedir.



Şekil 95. Folin-Ciocalteu yöntemine göre karayemiş meyvesinin bütün ekstraktlarının kateşin eşdeğeri (KE, µg/mL) cinsinden toplam fenolik madde miktarları

Karayemiş ekstraktlarındaki kateşin standart grafiğine dayalı hazırlanan KE-numune grafikleri, gallik asit standart grafiği ile hazırlanan GAE-numune grafikleri ile benzer özellikler göstermektedir (Şekil 95).

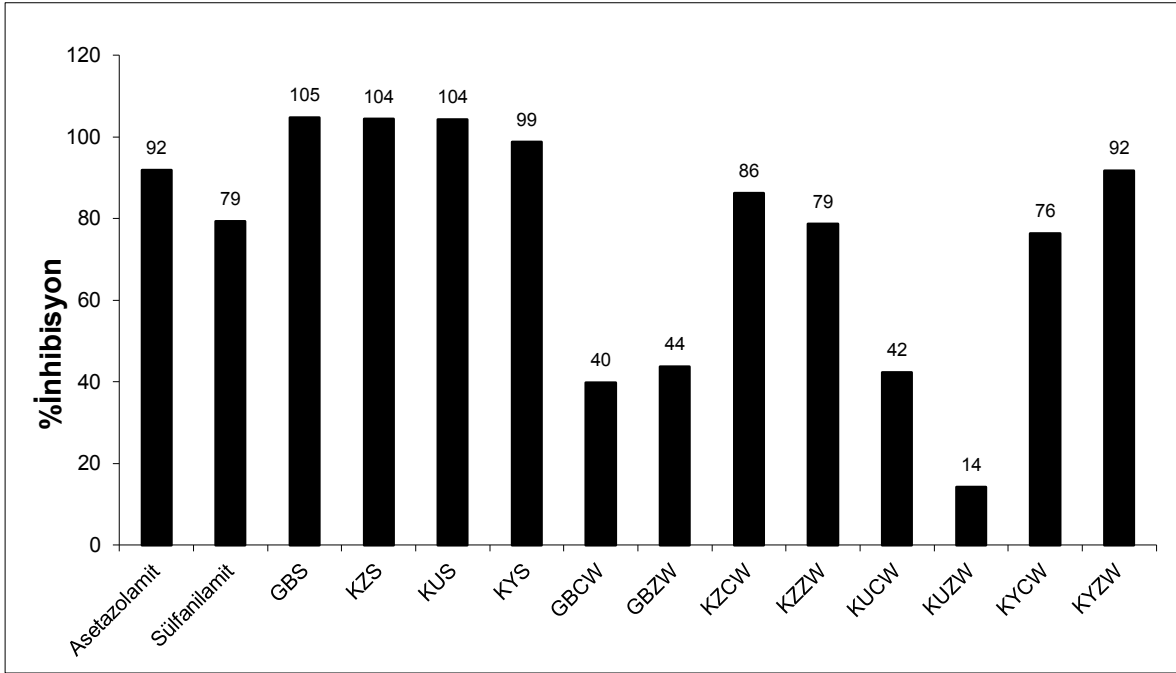
3.10. On-line HPLC-ABTS ve Off-line ABTS Radikal Temizleme Aktivite Yöntemlerin Karşılaştırılması



Şekil 96. Bütün numunelerin on-line HPLC-ABTS kromatogram alanı ile off-line %ABTS temizleme tayin sonuçlarının karşılaştırma grafiği

On-line HPLC-ABTS çalışmalarında elde edilen kromatogramdaki negatif piklerin toplam alanları ile her bir numune için yapılan %ABTS radikali temizleme analiz sonuçları karşılatırılarak Şekil 96 elde edilmiştir. %ABTS radikali temizleme aktivite tayin metodunda her bir numunenin 0,0004 mg/mL konsantrasyondaki %temizlemesi hesaplanmıştır. Bu karşılaştırma on-line çalışmalar ile off-line çalışmalar arasında doğrusal bir korelasyon olduğunu ortaya koymuştur.

3.11. Karbonik Anhidraz İnhibisyon Etkileri



Şekil 97. Bütün meyvelerin meyve suları ve çekirdek ve zar kısımlarının sulu ekstraktlarının sığır karbonik anhidraz enzimi %inhibisyonları

Bu çalışmada sığır eritrosit karbonik anhidraz (BCA) enzimi ve standart inhibitör olarak asetazolamit ve sülfanilamit kullanılmıştır. Testte bütün meyvelerden elde edilen sulu ekstraktlar ve meyve suları çalışılmıştır.

%İnhibisyon değerlerine bakıldığında (Şekil 97), her bir meyvenin meyve sularındaki (GBS, KZS, KUS, KYS) %inhibisyonun sulu ekstraktlardakine kıyasla daha yüksek olduğu görülmektedir. En düşük %inhibisyon kokulu üzümün zar kısmının sulu (KUZW) ekstraktında görülmüştür. Çekirdek ve zar kısımlarının karşılaştırılmasında; gilaburuda zar kısmının, kızılcıkta çekirdek kısmının, kokulu üzümde çekirdek kısmının ve karayemişte ise zar kısmının daha fazla %inhibisyon gösterdiği görülmektedir. Meyveleri karşılaştıracak olursak, kızılcık ve karayemişteki %inhibisyon değerlerinin diğer meyvelere göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu çalışmada karşılaştırma amaçlı kullanılan standart inhibitörler olan asetazolamit ve sülfanilamitin test konsantrasyonları 10 mM'dır.

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yaklaşık on yıldır kompleks bitki ekstraktlarındaki antioksidanların belirlenmesinde on-line HPLC radikal temizleme yöntemleri araştırmacılar tarafından kullanılmaktadır. Bu çalışmalarda genellikle ABTS ve DPPH radikalleri kullanılmaktadır. Fakat DPPH yöntemi ABTS yöntemine göre bileşiklere karşı daha az duyarlılık göstermektedir. Aynı zamanda ABTS radikali DPPH radikaline göre daha kararlı, suda çözünür ve daha az toksik etkiye sahip olması nedeniyle daha çok tercih edilmektedir (Koleva, vd., 2001). Bu çalışmada da on-line HPLC-ABTS antioksidan aktivite belirleme yöntemi tercih edildi.

Meyvelerde ve bitkilerde bulunan fenolik bileşikler yüksek antioksidan özelliğe sahiptir. Antioksidanlar kanser, Alzheimer ve yaşlanma gibi birçok hastalığı önleyici olarak bilinmektedir. Bu çalışmada fenolik standartlar kullanılarak LC-UV metodunun optimizasyonunun ardından Türkiye’de tıbbi bitki olarak kullanılan ve Doğu Karadeniz Bölgesinde yetişen gilaburu, kıvılcık, kokulu üzüm ve karayemiş meyvelerinin meyve sularında ve çekirdek ve zar kısımlarının metanollü, asetonitrilli ve sulu ekstraktlarında on-line HPLC-ABTS yöntemiyle antioksidan aktivite belirlenmiştir. Her bir ekstrakt için farklı kromatogram profilleri elde edilmiştir.

Kullanılan ABTS radikal çözeltisinin ve antioksidan bileşiklerin reaksiyona girdiği yer olan, reaksiyon boru kısmının örülü zincir yapıda olması, reaksiyon karışımı için daha etkin bir karışma sağlamıştır.

Yapılan on-line antioksidan aktivite testinde gilaburu, kıvılcık ve kokulu üzüm meyvelerinin çekirdek kısımlarının zar kısımlarına göre daha fazla antioksidan aktiviteye sahip olduğu, karayemiş meyvesinin ise zar kısımlarının daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Farklı çözücüler kullanılmasıyla elde edilen çekirdek ve zar kısımları ekstraktlarındaki antioksidan aktivitenin kullanılan çözücüye göre, yüksek antioksidan aktiviteden düşüğe doğru sıralaması Tablo 9’da verilmiştir. Yapılan testlerde genellikle metanol çözücüsü ile elde edilen ekstraktların antioksidan aktivitesinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Fakat bu çalışmada numunelerde konsantrasyon belirlenmemiş olup antioksidan aktivite toplam aktivite olarak bildirilmiştir. Daha önce zencefil ile yapılan Taguchi metoduna göre ekstraksiyonun optimizasyonu ile ilgili çalışmada (Baysal, vd., 2009), gram ekstrakt başına antioksidan aktiviteye bakıldığında aslında asetonitril ekstraktları metanollülere göre daha aktif olarak

bulunmuştur. Bu açıdan çözücünün ekstrakte edilebilen antioksidan bileşenler amaçlı değerlendirilmesinde hem toplam hem de gram ekstrakt başına aktivite verilerinin karşılaştırılması daha anlamlı olacaktır.

Gilaburu meyve suyunda ve çekirdek kısmının metanollü ekstraktındaki fenolik bileşikler HPLC-ESI-MS ile aydınlatıldı. Temsili olarak alınan bu numunelerde şeker bağlı flavonoller (kuersetin-deoksiheksoz, kuersetin-heksoz+pentoz, kuersetin-heksoz) tespit edildi (Tablo 6). Ayrıca bu numunelerde tespit edilen kateşin, epikateşin, prosiyanidin B2, prosiyanidin trimer, kuersetin-deoksiheksoz, klorogenik asit ve proantosiyanidin dimer monoglikozit bileşikleri her iki numunede bulunduğu için spesifik olmayıp, rutin, kuersetin-heksoz+pentoz, pelargonidin-3-glikozit-vinilguaiacol varyantları ve peonidin-3-glikozit (Pigment A varyant)'leri iki numune için de ayırt edici olarak kullanılabilir. Her iki numunede de klorogenik asit fazla miktarda tespit edilmiş olup özellikle meyve suyu (GBS) numunesinde 19,26 dk alıkonma zamanına sahip olan büyük pikin klorogenik asit olduğu normal gradient ile tespit edildi. Ayrıca aynı numuneye uygulanan uzun gradient elüsyonu ile bu büyük pikin ayrılması sağlanarak kateşin elde edildi (Tablo 7, Şekil 70). Kateşin, epikateşin, klorogenik asit ve rutin fenolik bileşikleri standartlarının alıkonma zamanı ve kütle spektrumları ile literatürde rapor edilen verilerle karşılaştırılarak tanımlandı.

Bütün ekstraktların klasik yöntemlerle antioksidan aktivite tayini için, off-line ABTS radikal temizleme aktivitesi, demir (III) indirgeme / antioksidan aktivite kuvveti (FRAP, μM TEAC) ve toplam fenolik madde miktarı metotları kullanıldı. ABTS radikal temizleme aktivitesi yönteminde sonuçlar SC_{50} değeri (radikali yarıya indiren numune konsantrasyonu) olarak verildi. SC_{50} değerinin düşük olması, TEAC değerinin yüksek olması ve TF madde miktarının yüksek olması antioksidan aktivitenin yüksek olduğunu göstermektedir.

ABTS radikal temizleme aktivite yönteminde, gilaburunun meyve suyunun ve çekirdek kısmının metanollü ekstraktının SC_{50} değeri BHT, Trolox, kuersetin ve gallik asite göre yaklaşık 2-10 kat düşük çıkmıştır. En büyük SC_{50} değeri ise zar kısmının asetonitrilli ekstraktlarında tespit edildi. Kızılcık meyvesinde ise çekirdek kısmının metanollü ve asetonitrilli ekstraktlarının SC_{50} değerleri standartlara göre yaklaşık 3,45-17 kat düşükken, en yüksek SC_{50} değeri zar kısmının asetonitrilli ekstraktlarında tespit edildi. Kokulu üzümde çekirdek kısmının metanollü ekstraktının SC_{50} değeri standartlara göre yaklaşık 1,75-8,5 kat düşük olarak tespit edildi, en yüksek SC_{50} değeri ise meyve suyunda

belirlendi. Karayemiş meyvesinin zar kısmının metanollü ekstraktı BHT ile hemen hemen aynı SC_{50} değerine sahip olup, diğer ekstraktların SC_{50} değerleri standartların değerinden daha yüksektir.

Tablo 9. Bütün numunelerin çalışmada kullanılan yöntemlerdeki çözücüye göre aktivite sıralaması

	On-line ABTS kromatogram alanı	Off-line %ABTS radikal temizleme	TEAC (μ M) değerleri	TF (GAE, μ g/mL)
Meyve suları	GB-KZ-KY-KU	GB-KZ-KY-KU	GB-KZ-KU-KY	GB-KU-KY-KZ
GB çekirdek ekstraktı	M - S - A	M - S - A	M - S - A	M - S - A
GB zar ekstraktı	M - A - S	M - S - A	M - A - S	M - S - A
KZ çekirdek ekstraktı	M - A - S	A - M - S	M - A - S	M - A - S
KZ zar ekstraktı	M - S - A	M - S - A	M - S - A	M - S - A
KU çekirdek ekstraktı	M - A - S	M - A - S	M - A - S	M - A - S
KU zar ekstraktı	M - S - A	M - S - A	M - S - A	M - S - A
KY çekirdek ekstraktı	M - S - A	M - S - A	M - A - S	S - M - A
KY zar ekstraktı	M - S - A	M - S - A	S - M - A	M - S - A

GB: gilaburu, KZ: kızılılık, KU: kokulu üzüm, KY: karayemiş, M: metanol, A: asetonitril, S: su

ABTS^{•+} radikal temizleme aktivitesi yöntemine göre meyveler arasında gilaburu meyve suyunun, kızılılık meyvesinin çekirdek kısmının metanollü ekstraktının, kokulu üzüm çekirdek kısmının metanollü ekstraktının ve karayemiş zar kısmının sulu ekstraktının daha yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. En düşük aktivite ise gilaburuda zar kısmının sulu ekstraktında, kızılılıkta zar kısmının asetonitrilli ekstraktında, kokulu üzümde zar kısmının asetonitrilli ekstraktında ve karayemiş çekirdek kısmının sulu ekstraktında tespit edildi.

Toplam fenolik madde miktarı tayin yönteminde; en yüksek antioksidan aktivite gilaburuda meyve suyunda, kızılılıkta çekirdek kısmının metanollü ekstraktında, kokulu üzümde meyve suyunda ve karayemiş zar kısmının metanollü ekstraktında belirlendi. En düşük antioksidan aktivite ise gilaburuda zar kısmının, kızılılıkta zar kısmının, kokulu

üzümde zar kısmının ve karayemişte çekirdek kısmının asetonitrilli ekstraktlarında belirlendi.

Demir (III) indirgeme / antioksidan aktivite kuvveti (FRAP, μM TEAC) yöntemine göre, en yüksek antioksidan aktivite diğer klasik yöntemlerde olduğu gibi gilaburuda meyve suyunda ve kızılıcıkta çekirdek kısmının metanollü ekstraktında belirlendi. Kokulu üzümde çekirdek kısmının metanollü ekstraktında ve karayemişte zar kısmının sulu ekstraktında tespit edildi. En düşük antioksidan aktivite ise gilaburu, kızılıcık ve kokulu üzümde zar kısmının asetonitrilli ekstraktlarında, karayemişte ise zar çekirdek kısmının sulu ekstraktında belirlendi.

On-line HPLC-ABTS çalışmalarında elde edilen kromatogramlardaki negatif piklerin toplam alanları ile her bir numune için yapılan %ABTS radikali temizleme analiz sonuçlarına göre on-line çalışmalar ile off-line çalışmalar arasında pozitif doğrusal bir korelasyon (R^2 : 0,8788) olduğu belirlenmiştir.

Çalışmada ayrıca meyve suyu ve sulu ekstraktların literatürde pek çalışılmamış olan sığır eritrosit karbonik anhidraz %inhibisyon değerleri belirlenmiştir. Karbonik anhidrazın çalışılan bütün ekstraktlar tarafından inhibe edildiği görülmüştür. Bu enzimin inhibitörlerinin glakom, kanser, epilepsi dahil birçok hastalıkta kullanım potansiyelinin olması, bu meyvelerin bileşenlerinin ve BCA inhibisyonundan sorumlu olanlarının belirlenmesi çalışmalarını değerli yapmaktadır.

Günümüzde yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) özellikle besinsel, çevresel ve endüstriyel alanda karmaşık numunelerde organik bileşiklerin ayrılmasında ve on-line HPLC ile biyoaktivitesinin belirlenmesinde uygulanan bir tekniktir. Özellikle yüksek antioksidan özelliğe sahip olan fenolik bileşikler için güçlü bir analiz yöntemidir. Bu çalışma ile de gilaburu, kızılıcık, kokulu üzüm ve karayemiş meyvelerinin yapısında bulunan yüksek antioksidan özelliğe sahip bileşikler analitik ayrılma ile eş zamanlı olan on-line HPLC-ABTS yöntemiyle belirlenmiştir.

5. KAYNAKLAR

- Alasalvar, C., Al-Farsi, M. ve Shahidi, F., 2005. Compositional characteristics and antioxidant components of cherry laurel varieties and pekmez, Journal of Food Science, 70, 1, 47-52.
- Alcalde-Eon, C., Escribano-Bailon, M. T., Santos-Buelga, C. ve Rivas-Gonzalo, J. C., 2006. Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing - A comprehensive study, Analytica Chimica Acta, 563, 1-2, 238-254.
- Alonso-Salces, R. M., Ndjoko, K., Queiroz, E.F., Ioset, J.R., Hostettmann, K., Berrueta, L.A., Gallo, B. ve Vicente, F., 2004. On-line characterisation of apple polyphenols by liquid chromatography coupled with mass spectrometry and ultraviolet absorbance detection, Journal of Chromatography A 1046, 1-2, 89-100.
- Amarowicz, R., Estrella, I., Hernandez, T., Duenas, M., Troszynska, A., Kosinska, A. ve Pegg, R.B., 2009. Antioxidant Activity of a Red Lentil Extract and Its Fractions, International Journal of Molecular Sciences, 10, 12, 5513-5527.
- Amarowicz, R., Estrella, I., Hernandez, T., Robredo, S., Troszynska, A., Kosinska, A. ve Pegg, R.B., 2010. Free radical-scavenging capacity, antioxidant activity, and phenolic composition of green lentil (*Lens culinaris*), Food Chemistry, 121, 3, 705-711.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M. ve Karademir, S.E., 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 26, 7970-7981.
- Appeldoorn, M. M., Sanders, M., Vincken, J-P., Cheynier, V., Le Guerneve, C., Hollman, P. C. H. ve Gruppen, H., 2009. Efficient isolation of major procyanidin A-type dimers from peanut skins and B-type dimers from grape seeds, Food Chemistry 117, 4, 713-720.
- Aruoma, O. I., 1998. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease, Journal of the American Oil Chemists Society, 75, 2, 199-212.
- Bandoniene, D. ve Murkovic, M., 2002. On-line HPLC-DPPH screening method for evaluation of radical scavenging phenols extracted from apples (*Malus domestica* L.), Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 9, 2482-2487.
- Baysal, M., Aydemir, S. ve Aktaş, A., 2009. Taguchi Optimizasyon Yöntemiyle Zencefil Bitkisinin Ekstraksiyonu ve Biyoaktivite Çalışmaları, Lisans Bitirme Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Baytop T., 1999. Therapy with Medicinal Plants in Turkey, 2nd ed. Istanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, p. 210.

- Benzie, I. F. F. ve Strain, J. J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': The FRAP assay, Analytical Biochemistry, 239, 70-76.
- Benzie, I. F. F. ve Szeto, Y. T., 1999. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay, J. Agric. Food Chem, 47, 633-636.
- Bonilla, F., Mayen, M., Merida, J. ve Menida, M., 1999. Extraction of phenolic compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidants, Food Chemistry, 66, 2, 209-215.
- Bravo, M. N., Silva, S., Coelho, A. V., Vilas Boas, L. ve Bronze, M. R., 2006. Analysis of phenolic compounds in Muscatel wines produced in Portugal, Analytica Chimica Acta 563, 1-2, 84-92.
- Bravo, L., Goya, L. ve Lecumberri, E., 2007. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages, Food Research International, 40, 3, 393-405.
- Cao, G., Alessio H. M. ve Cutler, R. G., 1993. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants, Free Radical Biology and Medicine, 14, 303-11.
- Carini, M., Aldini, G., Furlanetto, S., Stefani, R. ve Facino, R. M., 2001. LC coupled to ion-trap MS for the rapid screening and detection of polyphenol antioxidants from *Helichrysum stoechas*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 24, 3, 517-526.
- Dapkevicius, A., van Beek, T. A., Niederländer, H. A. ve de Groot, A., 1999. On-line detection of antioxidative activity in high-performance liquid chromatography eluates by chemiluminescence, Anal Chem, 71, 736-40.
- Dapkevicius, A., van Beek, T. A. ve Niederlander, H. A. G., 2001. Evaluation and comparison of two improved techniques for the on-line detection of antioxidants in liquid chromatography eluates, Journal of Chromatography A, 912,1 ,73-82.
- Dekkers, J. C., van Doornen, L. J. P. ve Kemper, H. C. G., 1996. The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage, Sports Medicine 21, 3, 213-238.
- Duthie, G. G., Duthie, S. J ve Kyle, J. A. M., 2000. Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants, Nutrition Research Reviews, 13,1, 79-106.
- Dündar Y. ve Aslan R., 2000. Hekimlikte oksidatif stres ve antioksidanlar, I. Basım, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Afyon.

- Falleh, H., Oueslati, S., Guyot, S., Ben Dali, A., Magne, C., Abdelly, C. ve Ksouri, R., 2011. LC/ESI-MS/MS characterisation of procyanidins and propelargonidins responsible for the strong antioxidant activity of the edible halophyte *Mesembryanthemum edule* L., Food Chemistry, 127, 4, 1732-1738.
- Faostat. Agriculture Data. Available at: <http://faostat.fao.org/default.aspx>, 2004.
- Garcia-Lafuente, A., Guillamon, E., Villares, A., Rostagno, M. A. ve Martinez, J. A., 2009. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease, Inflammation Research, 58, 9, 537-552
- Hakkinen, S. ve Auriola, S., 1998. High-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry and diode array ultraviolet detection in the identification of flavonol aglycones and glycosides in berries, Journal of Chromatography A, 829, 1-2, 91-100.
- Halliwell, B., 1996. Antioxidants in human health and disease, Annual Review of Nutrition 16, 33-50.
- Halliwell, B., 1999. Antioxidant defence mechanisms: From the beginning to the end (of the beginning, Free Radical Research, 31, 4, 261-272.
- Harborne J. B., 1993. The flavonoids: advances in research since 1996, London, Chapman and Hall.
- Hayasaka, Y. ve Asenstorfer R. E., 2002. Screening for potential pigments derived from anthocyanins in red wine using nanoelectrospray tandem mass spectrometry, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 4, 756-761.
- Hokkanen, J., Mattila, S., Jaakola, L., Pirttila, A. M., ve Tolonen, A., 2009. Identification of phenolic compounds from lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.), bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and hybrid bilberry (*Vaccinium × intermedium* Ruthe L.) leaves, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57, 9437-9447.
- Kaczmarek, M., Wojcicki, J., Samochowiec, L., Dutkiewicz, T. ve Sych, Z., 1999. The influence of exogenous antioxidants and physical exercise on some parameters associated with production and removal of free radicals, Pharmazie, 54, 4, 303-306.
- Kim, M-Y., Iwai, K. ve Matsue, H., 2005. Phenolic compositions of *Viburnum dilatatum* Thunb. Fruits and their antiradical properties, Journal of Food Composition and Analysis 18, 789-802
- Koleva, I. I., Niederlander, H. A. G. ve van Beek, T. A., 2000. An on-line HPLC method for detection of radical scavenging compounds in complex mixtures, Analytical Chemistry, 72, 10, 2323-2328.

- Koleva, I. I., Niederlander, H. A. G. ve van Beek, T. A., 2001. Application of ABTS radical cation for selective on-line detection of radical scavengers in HPLC eluates, Analytical Chemistry, 73, 14, 3373-3381.
- Kuhlmann en K., 1997. Crocheted ETFE-reactor for on-line post-column photoderivatization of diclofenac in high-performance liquid chromatography, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 16, 553-559.
- Lindsay S., 1987. High Performance Liquid Chromatography (Analytical Chemistry by Open Learning), Wiley, New York.
- Liu, P., Yang, B. ve Kallio, H., 2010. Characterization of phenolic compounds in Chinese hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major*) fruit by high performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry, Food Chemistry, 121, 1188-1197.
- Lopes-Lutz, D., Dettmann, J, Nimalaratne, C. ve Schieber, A., 2010. Characterization and Quantification of Polyphenols in Amazon Grape (*Pourouma cecropiifolia* Martius), Molecules, 15, 12, 8543-8552.
- Maren, T.H., 1960. A simplifield micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 130, 26.
- Miller, N.J., Diplock, A.T., Rice-evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V., ve Milner, A., 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates, Clin. Sci., 84, 407-412.
- Miller, N.J. ve Rice-evans, C., 1994. Total antioxidant status in plasma and body fluids, Methods in Enzymology, 234, 279-293.
- Miller, N. J. ve Rice-Evans C. A., 1996. Spectrophotometric determination of antioxidant activity, Redox Report 2, 3, 161-171.
- Miller, H. E., Rigelhof, F., Marquart, L., Prakash, A. ve Kanter, M., 2000. Antioxidant content of whole grain breakfast cereals, fruits and vegetables, Journal of the American College of Nutrition, 19, 3, 312-319.
- Niederlander, H. A. G., van Beek, T. A., Bartasiute, A. ve Koleva, I. I., 2008,. Antioxidant activity assays on-line with liquid chromatography, Journal of Chromatography A, 1210, 2, 121-134.
- Parkkila, A.K., Scarim, A.L., Parkkila, S., Waheed, A., Corbett, J.A. ve Sly, W.S., 1998. Expression of carbonic anhydrase V in pancreatic beta cells suggests role for mitochondrial carbonic anhydrase in insulin secretion, Journal of Biological Chemistry, 273, 24620-24623.

- Pop-Schwerin, M., Schewerin, C., Lupea, A.X., Gharibeh-Branic, A. ve Chis-Pana, A.M., 2010. Evaluation of Antioxidant Activity of Some *Vaccinium* Extracts and Their Application for the Inhibition of Oxidation Process in Vegetable Oil, Oxidation Communications, 33, 1, 175-184.
- Pukalskas, A., van Beek, T. A., Venskutonis, R. P., Linsen, J. P. H., van Veldhuizen, A. ve de Groot Ae, 2002. Identification of radical scavengers in sweet grass (*Hierochloe odorata*), Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 10, 2914-2919.
- Pukalskas, A., van Beek, T. A. ve de Waard, P., 2005. Development of a triple hyphenated HPLC-radical scavenging detection-DAD-SPE-NMR system for the rapid identification of antioxidants in complex plant extracts, Journal of Chromatography A, 1074, 1-2, 81-88
- Re, R., Pellegrini, N., Protrggente, A., Pannala, A., Yang, M. ve Rice-Evans, C, 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, Free Radical Biology and Madicine, 26, 1231-1237.
- Rivas-Gonzalo, J. C., Boido, E., Alcalde-Eon, C., Carrau, F. ve Dellacassa, E., 2006. Aging effect on the pigment composition and color of *Vitis vinifera* L. cv. tannat wines. Contribution of the main pigment families to wine color, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 18, 6692-6704.
- Robbins ve Cotran, 2010. Pathologic Basis of Disease, Saunders.
- Salminen, J. P., Karonen, M., Lempa, K., Liimatainen, J., Sinkkonen, J., Lukkarinen, M. ve Pihlaja, K., 2005. Characterisation of proanthocyanidin aglycones and glycosides from rose hips by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, and their rapid quantification together with Vitamin C, Journal of Chromatography A, 1077, 2, 170-180.
- Sandra P., 2004, Advanced Separation Science, Ghent University, Belgium.
- Schwenke, D. C., 1998. Antioxidants and atherogenesis, Journal of Nutritional Biochemistry, 9, 8, 424-445.
- Singleton, V. L., Orthofer, R. ve Lamuela-Raventos, R. M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-ciocalteu reagent, Methods in Enzymology, 299, 152-178.
- Smith, K.S.ve Ferry, J.G., 2000. Prokaryotic carbonic anhydrases FEMS, Microbiology Reviews, 24,335-366.
- Soong, Y. Y. ve Barlow, P. J., 2005. Isolation and structure elucidation of phenolic compounds from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry, Journal of Chromatography A, 1085, 2, 270-277.

- Storz G. ve Imlay J.A., 1999. Oxidative stress, Curr. Opin. Microbiol., 2, 188-194.
- Sudjaroen, Y., Haubner, R., Würtele, G., Hull, W. E., Erben, G., Spiegelhalder, B., Changbumrung, S., Bartsch, H. ve Owen, R. W, 2005. Isolation and structure elucidation of phenolic antioxidants from Tamarind (*Tamarindus indica* L.) seeds and pericarp, Food and Chemical Toxicology, 43, 11, 1673-1682.
- Supuran, C.T.ve Scozzafava, A., 2002. Applications of carbonic anhydrase inhibitors.
- Tomas-Barberan, F. A., Gil, M. I., Cremin, P., Waterhouse, A. L., Hess-Pierce, B. ve Kader, A. A., 2001. HPLC-DAD-ESI-MS analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches, and plums, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 4748-4760.
- Vinson, J. A., Su, X. H., Zubik, L. ve Bose, P., 2001. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Fruits, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 11, 5315-5321.
- Velioglu, Y. S., Ekici, L. ve Poyrazoglu, E. S., 2006. Phenolic composition of European cranberrybush (*Viburnum opulus* L.) berries and astringency removal of its commercial juice, International Journal of Food Science and Technology, 41, 9, 1011-1015.
- Verardo, V., Bonoli, M., Marconi, E., ve Caboni, M. F., 2008. Determination of free flavan-3-ol content in barley (*Hordeum vulgare* L.) air-classified flours: Comparative study of HPLC-DAD/MS and spectrophotometric determinations, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56, 6944-6948
- Verardo, V., Arraez-Roman, D., Segura-Carrtero, A., Marconi, E., Fernandez-Gutierrez, A. ve Caboni, M. F., 2010. Identification of buckwheat phenolic compounds by reverse phase high performance liquid chromatography-electrospray ionization-time of flight-mass spectrometry (RP-HPLC-ESI-TOF-MS), Journal of Cereal Science, 52, 2, 170-176.
- Villano, D., Fernandez-Pachon, M. S., Troncoso, A. M. ve Garcia-Parrilla, M. C., 2004. The antioxidant activity of wines determined by the ABTS(*+) method: influence of sample dilution and time, Talanta, 64, 2, 501-509.
- Visioli, F. ve Galli, C., 1995. Natural antioxidants and prevention of coronary heart disease: The potential role of olive oil and its minor constituents, Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases, 5, 4, 306-314.
- Vinson, J., Zubik, L., Bose, P., Sammon, N. ve Proch, J., 2005. Dried fruits:excellent in vitro and in vivo antioxidants, Journal of the American College of Nutrition, 24, 1, 44-50.

- Yao, L. H., Jiang, Y. M., Shi, J., Tomas-Barberan, F. A., Datta, N., Singanusong, R. ve Chen, S. S., 2004. Flavonoids in food and their health benefits, Plant Foods for Human Nutrition, 59, 3, 113-122.
- Wang, C. C., Chu, C. Y., Chu, K. O., Choy, K. W., Khaw, K. S., Rogers, M. S. ve Pang, C. P., 2004. Trolox-equivalent antioxidant capacity assay versus oxygen radical absorbance capacity assay in plasma, Clinical Chemistry, 50, 5, 952-4.
- Wayner, D. M., Burton, G. W., Ingold, K.U. ve Locke, S., 1985, Quantitative measurement of total, peroxy radical- trapping antioxidant capacity of human plasma by controlled peroxidation, FEBS Lett., 187, 33-37.
- Weisz, G. M., Kammerer, D. R. ve Carle, R., 2009. Identification and quantification of phenolic compounds from sunflower (*Helianthus annuus* L.) kernels and shells by HPLC-DAD/ESI-MSⁿ, Food Chemistry, 115, 2, 758-765.
- Williams, R. J., Spencer, J. P. E. ve Rice-Evans, C., 2004. Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules?, Free Radical Biology and Medicine, 36, 7, 838-849.
- URL-1, www.waters.com, 21.11.2010
- URL-2, <http://en.wikipedia.org>, 10.09.2010

ÖZGEÇMİŞ

09.10.1984 tarihinde Iğdır'da doğdu. 2001 yılında Iğdır Lisesi'nden mezun oldu. 2005 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde lisans öğrenimine başladı. 2007 yılında Anadolu Üniversitesi İşletme Fakültesi İşletme Bölümü'ne ikinci üniversite olarak kayıt yaptırdı ve 2012 yılında mezun olmayı planlamaktadır. 2008 yılında Ali Raif İlaç Sanayi ve Organik Kimya şirketlerinde toplamda 1,5 aylık stajını yaptı. 2009 yılında Kimya bölümünden Kimyager ünvanıyla onur öğrencisi olarak mezun oldu. Aynı yıl Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü Biyokimya Dalında Yüksek Lisans programına başladı. 2010-2011 yılında AB Socrates-Erasmus programı ile yüksek lisans tez aşamasını Belçika' da Gent Üniversitesi'nde geçirdi. İyi derecede İngilizce bilmektedir.