

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

KUŞBURNU BİTKİSİNİN BİYOAKTİF KOMPOZİSYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimyager Sezgin AYDEMİR

**HAZİRAN 2012
TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

KUŞBURNU BİTKİSİNİN BİYOAKTİF KOMPOZİSYONU

Kimyager Sezgin AYDEMİR

**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 : 13.06.2012**

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Murat KÜÇÜK

Trabzon 2012

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalında

Sezgin AYDEMİR tarafından hazırlanan

KUŞBURNU BİTKİSİNİN BİYOAKTİF KOMPOZİSYONU

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 29 / 05 / 2012 gün ve 1458 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Eşref Edip KEHA

Üye : Prof. Dr. Murat KÜÇÜK

Üye : Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

‘Kuşburnu Bitkisinin Biyoaktif Kompozisyonu’ adlı bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır.

Öncelikle bu çalışmanın gerçekleştirilmesi için bana çalışma olanağı sağlayan, ve çalışmanın başından bitimine kadar her aşamasını takip edip, çalışma boyunca bilimsel düşünce ve araştırma zevki aşıl原因an, bilgi ve tecrübelerini paylaşarak çalışma esnasında karşılaştığım sorunları aşmamda yardımcı olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Murat KÜÇÜK’e teşekkürü borç bilirim.

Araştırmam esnasında enstrümanlarını kullanmama izin veren hocalarım, Sayın Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI ve Sayın Doç. Dr. Ahmet ALVER’e minnettar olduğumu belirtmek isterim.

Bunun yanında çalışma esnasında bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan ve yardımını esirgemeyen Arş.Gör.Nesibe ARSLAN BURNAZ’a teşekkür etmek isterim.

Ayrıca laboratuvar çalışmalarında bana yardımcı olan sevgili arkadaşlarım Ozan Emre EYÜPOĞLU, Semra ALKAN ve Ayça AKTAŞ’a teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatım boyunca desteklerini esirgemeyen canım aileme ve çalışmalarım esnasında bana yardımcı olan ve anlayış gösteren canım eşim Müjde AYDEMİR’e teşekkür ederim.

Sezgin AYDEMİR

Trabzon, 2012

TEZ BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Kuşburnu Bitkisinin Biyoaktif Kompozisyonu” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Murat KÜÇÜK’ün sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuarlarda 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. 25/05/2012

Sezgin AYDEMİR

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET.....	VII
SUMMARY.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	XVII
SEMBOLLER DİZİNİ.....	XVIII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Kuşburnu Bitkisinin Genel Özellikleri ve Tarihçesi	2
1.2.1. Kuşburnu Bitkisi ile Biyoaktivite Çalışmaları.....	3
1.3. İnsanda Oluşan Oksidan Maddeler	4
1.4. Oksidanların Biyolojik Önemi ve Etkileri.....	6
1.5. Antioksidan Maddeler ve Sınıflandırılması.....	9
1.6. Biyoaktif Fenolik Bileşikler	14
1.7. Yüksek-Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	20
1.7.2. Online-HPLC-FRAP Yöntemi.....	23
1.8. Antioksidan Aktivite Belirleme Yöntemleri.....	24
1.8.1. Çalışmada Kullanılan Yöntemler.....	24
1.8.1.1. Demir (III) İndirgeme / Antioksidan Güç (FRAP) Yöntemi.....	24
1.8.1.2. DPPH• Radikali Temizleme Aktivitesi Yöntemi	25
1.8.1.3. Toplam Fenolik Madde Tayini Yöntemi	25
1.8.2. Diğer Antioksidan Aktivite Belirleme Yöntemleri.....	26
1.8.2.1. Trolox Eşdeğeri Antioksidan Kapasite (TEAC) Yöntemi	26
1.8.2.2. Tiyosiyanat Yöntemi	26
1.8.2.3. Toplam Antioksidan Cevap (TAR) Tayin Yöntemi.....	27
1.8.2.4. Floresans Sönme Zamanı Yöntemi	27
1.8.2.5. MDA Oluşumunun İnhibisyonu Yöntemi	27
1.8.2.6. Oksijen Radikali Absorbans Kapasitesi (ORAC) Yöntemi.....	27
1.8.2.7. Bakır (II) İndirgenme Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi.....	28
1.9. Antimikrobiyal Maddeler ve Genel Özellikleri	28

1.9.1.	Antimikrobiyal Tayin Yöntemleri.....	30
1.10.	Karbonik Anhidraz (CA) Enzimi	31
1.10.1.	Karbonik Anhidraz (CA) Enzimi İnhibitörleri ve Uygulama Alanları.....	32
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	34
2.1.	Kullanılan Cihazlar.....	34
2.2.	Kullanılan Kimyasallar.....	35
2.3.	Bitkilerin Toplanması ve Ekstraktların Hazırlanması.....	36
2.3.1.	Katı – Sıvı Ekstraksiyonu.....	37
2.3.2.	Çözücülerinin Uçurulması ve Konsantrasyonu Belli Stok Çözeltilerin Hazırlanması.....	38
2.4.	Antioksidan Aktivitelerin Belirlenmesi.....	41
2.4.1.	Demir (III) İndirgeme / Antioksidan Kuvvet (FRAP) Değerleri.....	41
2.4.2.	DPPH• Radikal Temizleme Aktivitesi.....	42
2.4.2.1.	SC ₅₀ Değerlerinin Hesaplanması.....	43
2.4.3.	Toplam Fenolik Madde İçeriğinin Bulunması.....	44
2.5.	Online-HPLC-FRAP Yöntemi ile Antioksidan Kompozisyonun Belirlenmesi.....	44
2.6.	Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi.....	46
2.7.	Karbonik Anhidraz (CA) Enzimi İnhibisyonunun İncelenmesi.....	47
3.	BULGULAR VE TARTIŞMA.....	48
3.1	Antioksidan Aktiviteler.....	48
3.1.1.	Toplam Fenolik Madde Miktarları.....	48
3.1.2.	DPPH• Radikal Temizleme Aktiviteleri.....	57
3.1.3	Demir (III) İndirgeme/ Antioksidan Kuvvet (FRAP).....	71
3.2	Online-HPLC-FRAP Analizleri.....	82
3.3.	Antimikrobiyal Aktivite.....	112
3.4.	Karbonik Anhidraz (CA) Enzimi İnhibisyonu.....	118
4.	SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	120
5.	KAYNAKLAR.....	122

ÖZGEÇMİŞ

Yüksek Lisans/Doktora Tezi

ÖZET

KUŞBURNU BİTKİSİNİN BİYOAKTİF KOMPOZİSYONU

Sezgin AYDEMİR

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Murat KÜÇÜK
2012, 125 Sayfa

Organizmada, yaşamsal fonksiyonlar gerçekleşirken serbest radikaller oluşur. Serbest radikaller önemli maddelerdir, ancak oldukça yüksek reaktiviteye sahip olduklarından dolayı biyomoleküllerle reaksiyona girerek onların yapıların bozulmasına ve hücrelere zarar veren toksik özellikli bileşiklerin oluşmasına neden olabilirler. Antioksidan maddeler serbest radikallerle reaksiyona girerek onların bu zararlı etkilerini giderebilirler.

Bu çalışmada Gümüşhane ve Zonguldak yöresinden toplanan kuşburnu bitkilerinin sulu, metanollü ve etil asetatlı ekstraktlarının antioksidan aktivitesi incelendi. Bunun yanında bitki özütlelerinin antimikrobiyal aktivite özellikleri ve karbonik anhidraz (CA) enzimine karşı inhibisyon etkileri de araştırıldı. Sulu ve metanollü ekstraktların toplam fenolik madde içerikleri gallik asit ve kateşin eşdeğeri olarak, metanollü, sulu ve etil asetatlı numunelerin demir (III) indirgeme/ antioksidan kuvveti (FRAP) Trolox® standardı ile, metanollü, sulu ve etil asetatlı numunelerin DPPH radikali temizleme aktivitesi BHT ve Trolox® standartları ile, sulu numunelerin karbonik anhidraz enzimi inhibisyonu aktivitesi asetazolamid standardı ile, antimikrobiyal aktivite özellikleri ampisilin, sefazolin ve nistatin standart ilaçları ile karşılaştırılarak incelendi.

Yaprak ve dal kısımlarının sulu ekstraktlarının CA enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösterdikleri bulundu. Etil asetatlı ve metanollü numunelerin antimikrobiyal özelliğe sahip oldukları tespit edildi. Yaprak, dal ve çekirdek kısımlarının metanollü ekstraktlarının yüksek antioksidan aktiviteye sahip oldukları görülmüştür. Online-HPLC-FRAP yöntemiyle antioksidan özelliği offline-FRAP yöntemiyle uyumlu çıkmıştır.

Çalışma sonucunda dal ve yaprak kısımlarının yüksek biyoaktivite gösterdiği görülmüş ve kuşburnu bitkisinin bu kısımlarında aktiviteden sorumlu bileşiklerin araştırılması faydalı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Kuşburnu, Antioksidan, Online-Antioksidan Aktivite, HPLC, Karbonik Anhidraz İnhibisyonu, Antimikrobiyal Aktivite

Master Thesis

SUMMARY
BIOACTIVE COMPOSITION OF ROSE HIP

Sezgin AYDEMİR

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Chemistry Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Murat KÜÇÜK
2012, 125 Pages

Free radicals are occurred as a result of the vital functions in organism. Free radicals are important substances, but because they are highly reactive, they can react with biomolecules, cause to deteriorate their structure and form toxic compounds to cells. Antioxidant substances might reduce or fix harmful effects of free radicals by reacting with them.

In this study, antioxidant activity of rose hips (from Gümüşhane and Zonguldak) extracts which obtained with methanol, water and ethyl acetate are investigated. In addition, plant extracts' antimicrobial activity and their enzyme inhibitory effects against carbonic anhydrase (CA) were investigated. Total phenolic content of aqueous and methanol extracts are examined as the equivalent of gallic acid and catechin; iron (III) reducing / antioxidant power (FRAP) of methanol, ethyl acetate and aqueous samples are examined by Trolox® standard; DPPH radical scavenging activity of methanol, ethyl acetate and aqueous samples are examined by the BHT and Trolox® standards; carbonic anhydrase activity of aqueous samples are examined by acetazolamide and sulfonyl amide standards; antimicrobial activity are examined and compared with standard drugs which are ampicillin, cefazolin, and nystatin.

Aqueous extracts of leaf and branch parts are found to have inhibitory effect on the CA enzyme. The extracts of ethyl acetate and methanol are found to have antimicrobial properties. Methanol extracts of leaf, branch and core parts are seen to have high antioxidant activity. Antioxidant properties are concordant with the online-HPLC-FRAP and offline-FRAP methods.

As a result of this study branch and leaf parts show high bioactivity and it will be useful to investigate the compounds in rose hip plant that are responsible for this activity.

Key Words: Rose Hip, Antioxidant, Online-Antioxidant Activity, HPLC, Carbonic Anhydrase Inhibition, Antimicrobial Activity

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Kuşburnu bitkisi.....	2
Şekil 2. Serbest radikallerin hücresel hedefleri.....	7
Şekil 3. Askorbik Asit (vitamin C).....	11
Şekil 4. BHT (2,6 di-tert-butil-4 metil fenol [butillenmiş hidroksitoluen])'nin peroksil radikali ile reaksiyonu.....	12
Şekil 5. Flavonoidlerin kimyasal yapısı.....	15
Şekil 6. Gallik asit.....	16
Şekil 7. Fenolik asitlerin genel yapısı a) benzoik asit türevleri b) sinamik asit ürevleri (Shahidi, F., ve Naczki, M., 1995).....	16
Şekil 8. Antosiyaninlerin genel yapısı.....	17
Şekil 9. Kuersetin (a) ve Kamferol (b).....	18
Şekil 10. Flavonollerin genel yapısı.....	18
Şekil 11. Flavon ve flavonollerin genel yapısı.....	18
Şekil 12. Diyot serili dedektörün (DAD) şematik diyagramı.....	22
Şekil 13. On-line HPLC ile antioksidan tayini yöntemi için akış.....	23
Şekil 14. Demir (III)'ün indirgenme reaksiyonu.....	24
Şekil 15. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikalinin formülü.....	25
Şekil 16. 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS ^{•+}) radikalinin formülü.....	26
Şekil 17. SC ₅₀ değerinin hesaplanması için kalibrasyon grafiği.....	43
Şekil 18. Toplam fenolik madde miktarı testinde gallik asitin (7 farklı konsantrasyonda) kalibrasyon grafiği	48
Şekil 19. Metanollü ekstraktların toplam fenolik madde miktarları (µg GAE/ mL numune çözeltisi; GAE: gallik asit eşdeğeri).....	48
Şekil 20. Metanollü ekstraktların toplam fenolik madde miktarları (µg KE/ mL numune çözeltisi; KE: kateşin eşdeğeri).....	49
Şekil 21. Meyve kısımlarının metanollü ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları (µg GAE/ mL numune çözeltisi; GAE: gallik asit eşdeğeri).....	49

Şekil 22.	Meyve kısımlarının metanollü ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları ($\mu\text{g KE/ mL}$ numune çözeltilisi; KE: kateşin eşdeğeri).....	50
Şekil 23.	Çekirdek kısımlarının metanollü ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları ($\mu\text{g GAE/ mL}$ numune çözeltilisi; GAE: gallik asit eşdeğeri).....	50
Şekil 24.	Çekirdek kısımlarının metanollü ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları ($\mu\text{g KE/ mL}$ numune çözeltilisi; KE: kateşin eşdeğeri).....	51
Şekil 25.	Dal kısımlarının metanollü ekstraktlarının galli toplam fenolik madde miktarları ($\mu\text{g GAE/ mL}$ numune çözeltilisi; GAE: gallik asit eşdeğeri).....	51
Şekil 26.	Dal kısımlarının metanollü ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları ($\mu\text{g KE/ mL}$ numune çözeltilisi; KE: kateşin eşdeğeri).....	52
Şekil 27.	Yaprak kısımlarının metanollü ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları ($\mu\text{g GAE/ mL}$ numune çözeltilisi; GAE: gallik asit eşdeğeri).....	52
Şekil 28.	Yaprak kısımlarının metanollü ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları ($\mu\text{g KE/ mL}$ numune çözeltilisi; KE: kateşin eşdeğeri).....	53
Şekil 29.	Meyve kısımlarının sulu ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları ($\mu\text{g GAE/ mL}$ numune çözeltilisi; GAE: gallik asit eşdeğeri).....	53
Şekil 30.	Meyve kısımlarının sulu ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları ($\mu\text{g KE/ mL}$ numune çözeltilisi; KE: kateşin eşdeğeri).....	53
Şekil 31.	Yaprak kısımlarının sulu ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları ($\mu\text{g GAE/ mL}$ numune çözeltilisi; GAE: gallik asit eşdeğeri).....	54
Şekil 32.	Yaprak kısımlarının sulu ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları ($\mu\text{g KE/ mL}$ numune çözeltilisi; KE: kateşin eşdeğeri).....	54
Şekil 33.	Çekirdek kısımlarının sulu ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları ($\mu\text{g GAE/ mL}$ numune çözeltilisi; GAE: gallik asit eşdeğeri).....	55
Şekil 34.	Çekirdek kısımlarının sulu ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları ($\mu\text{g KE/ mL}$ numune çözeltilisi; KE: kateşin eşdeğeri).....	55
Şekil 35.	Dal kısımlarının sulu ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları ($\mu\text{g GAE/ mL}$ numune çözeltilisi; GAE: gallik asit eşdeğeri).....	55
Şekil 36.	Dal kısımlarının sulu ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları ($\mu\text{g KE/ mL}$ numune çözeltilisi; KE: kateşin eşdeğeri).....	56

Şekil37.	Çekirdek ve Meyve kısımlarının metanollü ve sulu ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları ($\mu\text{g GAE/ mL}$ numune çözeltisi; GAE: gallik asit eşdeğeri).....	56
Şekil 38.	Dal ve yaprak kısımlarının metanollü ve sulu ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları ($\mu\text{g GAE/ mL}$ numune çözeltisi; GAE: gallik asit eşdeğeri).....	57
Şekil 39.	DPPH testinde standart trolox (5 farklı konsantrasyonda) için SC_{50} değerinin bulunması ($SC_{50}:0,0016 \text{ mg/mL}$ bulunmuştur).....	58
Şekil 40.	Meyve kısımlarının metanollü ekstraktlarının SC_{50} değerleri.....	58
Şekil 41.	Çekirdek kısımlarının metanollü ekstraktlarının SC_{50} değerleri.....	59
Şekil 42.	Dal kısımlarının metanollü ekstraktlarının SC_{50} değerleri.....	59
Şekil 43.	Yaprak kısımlarının metanollü ekstraktlarının SC_{50} değerleri.....	60
Şekil 44.	Meyve kısımlarının sulu ekstraktlarının SC_{50} değerleri.....	60
Şekil 45.	Çekirdek kısımlarının sulu ekstraktlarının SC_{50} değerleri.....	61
Şekil 46.	Dal kısımlarının sulu ekstraktlarının SC_{50} değerleri.....	61
Şekil 47.	Yaprak kısımlarının sulu ekstraktlarının SC_{50} değerleri.....	62
Şekil 48.	Meyve kısımlarının etil asetatlı ekstraktlarının SC_{50} değerleri.....	62
Şekil 49.	Yaprak kısımlarının etil asetatlı ekstraktlarının SC_{50} değerleri.....	63
Şekil 50.	Dal kısımlarının etil asetatlı ekstraktlarının SC_{50} değerleri.....	63
Şekil 51.	Çekirdek kısımlarının etil asetatlı ekstraktlarının SC_{50} değerleri.....	64
Şekil 52.	Meyve kısımlarının metanollü, sulu ve etil asetatlı ekstraktlarının DPPH temizleme aktivitesi testinde SC_{50} değerleri (mg/mL).....	65
Şekil 53.	Dal kısımlarının metanollü, sulu ve etil asetatlı ekstraktlarının DPPH temizleme aktivitesi testinde SC_{50} değerleri (mg/mL).....	67
Şekil 54.	Yaprak kısımlarının metanollü, sulu, etil asetatlı ekstraktlarının DPPH temizleme aktivitesi testinde SC_{50} değerleri (mg/mL).....	68
Şekil 55.	Çekirdek kısımlarının metanollü, sulu ve etil asetatlı ekstraktlarının DPPH temizleme testinde SC_{50} değerleri (mg/mL).....	70
Şekil 56.	FRAP testinde trolox (beş farklı konsantrasyon) için kalibrasyon grafiği.....	71
Şekil 57.	Dal kısımlarının metanol ekstraktlarının FRAP testinde TEAC değerleri (trolox eşdeğeri antioksidan kapasite; μM).....	71

Şekil 58.	Çekirdek kısımlarının metanollü ekstraktlarının FRAP testinde TEAC değerleri (trolox eşdeğeri antioksidan kapasite; μM).....	72
Şekil 59.	Yaprak kısımlarının metanol ekstraktlarının FRAP testinde TEAC değerleri (trolox eşdeğeri antioksidan kapasite; μM).....	72
Şekil 60.	Meyve kısımlarının metanol ekstraktlarının FRAP testinde TEAC değerleri (trolox eşdeğeri antioksidan kapasite; μM).....	73
Şekil 61.	Meyve kısımlarının sulu ekstraktlarının FRAP testinde TEAC değerleri (trolox eşdeğeri antioksidan kapasite; μM).....	73
Şekil 62.	Çekirdek kısımlarının sulu ekstraktlarının FRAP testinde TEAC değerleri (trolox eşdeğeri antioksidan kapasite; μM).....	74
Şekil 63.	Yaprak kısımlarının sulu ekstraktlarının FRAP testinde TEAC değerleri (trolox eşdeğeri antioksidan kapasite; μM).....	74
Şekil 64.	Dal kısımlarının sulu ekstraktlarının FRAP testinde TEAC değerleri (trolox eşdeğeri antioksidan kapasite; μM).....	75
Şekil 65.	Dal kısımlarının etil asetatlı ekstraktlarının FRAP testinde TEAC değerleri (trolox eşdeğeri antioksidan kapasite; μM).....	75
Şekil 66.	Çekirdek kısımlarının etil asetatlı ekstraktlarının FRAP testinde TEAC değerleri (trolox eşdeğeri antioksidan kapasite; μM).....	76
Şekil 67.	Yaprak kısımlarının etil asetatlı ekstraktlarının FRAP testinde TEAC değerleri (trolox eşdeğeri antioksidan kapasite; μM).....	76
Şekil 68.	Meyve kısımlarının etil asetatlı ekstraktlarının FRAP testinde TEAC değerleri (trolox eşdeğeri antioksidan kapasite; μM).....	77
Şekil 69.	Meyve kısımlarının metanollü, sulu ve etil asetatlı ekstraktlarının FRAP testinde TEAC değerleri (trolox eşdeğeri antioksidan kapasite; μM).....	78
Şekil 70.	Dal kısımlarının metanollü, sulu ve etil asetatlı ekstraktlarının FRAP testinde TEAC değerleri (trolox eşdeğeri antioksidan kapasite; μM).....	79
Şekil 71.	Yaprak kısımlarının metanollü, sulu ve etil asetatlı ekstraktlarının FRAP testinde TEAC değerleri (trolox eşdeğeri antioksidan kapasite; μM).....	80
Şekil 72.	Çekirdek kısımlarının metanollü, sulu ve etil asetatlı ekstraktlarının FRAP testinde TEAC değerleri (trolox eşdeğeri antioksidan kapasite; μM).....	81
Şekil 73.	Toplam fenolik madde miktarı tayini yöntemi ve FRAP yöntemi için korelasyon grafiği.....	82

Şekil 74.	Çekirdek kısımlarının metanollü ekstraktları için DAD-280 nm'deki piklerin karşılaştırılması (3-5 dk arası).....	83
Şekil 75.	Çekirdek kısımlarının metanollü ekstraktları için DAD-280 nm'deki piklerin karşılaştırılması (5-41 dk arası).....	83
Şekil 76.	Dal kısımlarının metanollü ekstraktları için DAD-280 nm'deki piklerin karşılaştırılması (3-5 dk arası).....	84
Şekil 77.	Dal kısımlarının metanollü ekstraktları için DAD-280 nm'deki piklerin karşılaştırılması (5-41 dk arası).....	84
Şekil 78.	Yaprak kısımlarının metanollü ekstraktları için DAD-280 nm'deki piklerin karşılaştırılması (3-5 dk arası).....	85
Şekil 79.	Yaprak kısımlarının metanollü ekstraktları için DAD-280 nm'deki piklerin karşılaştırılması (5-41 dk arası).....	85
Şekil 79.	Meyve kısımlarının metanollü ekstraktları için DAD-280 nm'deki piklerin karşılaştırılması.....	86
Şekil 80.	Meyve kısımlarının metanollü ekstraktlarının Online-HPLC-FRAP yönteminde UV-Vis 595 nm'deki spektrumları.....	87
Şekil 81.	Çekirdek kısımlarının metanollü ekstraktlarının Online-HPLC-FRAP yönteminde 595 nm'deki spektrumları.....	87
Şekil 82.	Dal kısımlarının metanollü ekstraktlarının Online-HPLC-FRAP yönteminde 595 nm'deki spektrumları.....	88
Şekil 83.	Yaprak kısımlarının metanollü ekstraktlarının Online-HPLC-FRAP yönteminde 595 nm'deki spektrumları.....	89
Şekil 84.	Farklı bitki kısımlarının Online-HPLC-FRAP yönteminde DAD-280 nm'deki absorpsanları (6MM, 6DM, 6YM ve 6ÇM numuneleri için).	89
Şekil 85.	Dal kısımlarının (6DM) Online-HPLC-FRAP yönteminde 280 nm ve 595 nm'deki spektrumlarının karşılaştırılması.....	90
Şekil 86.	Meyve kısımlarının (6MM) Online-HPLC-FRAP yönteminde 280 nm ve 595 nm'deki spektrumlarının karşılaştırılması.....	91
Şekil 87.	Yaprak kısımlarının (6YM) Online-HPLC-FRAP yönteminde 280 nm ve 595 nm'deki spektrumlarının karşılaştırılması.....	91
Şekil 88.	Çekirdek kısımlarının (6ÇM) Online-HPLC-FRAP yönteminde 280 nm ve 595 nm'deki spektrumlarının karşılaştırılması.....	92
Şekil 89.	Çekirdek kısımları (2ÇM) ile standart karışımın 280 nm'deki spektrumlarının karşılaştırılması.....	92

Şekil 90.	Çekirdek kısımlarında bulunan vanilik asitin ve standart karışımdaki vanilik asitin spektrumları.....	93
Şekil 91.	Çekirdek kısımlarında ve standart karışımda bulunan vanilik asit ve vanilik asitin spektrumları.....	93
Şekil .92	Meyve kısımları (2MM) ile standart karışımın 280 nm'deki spektrumlarının karşılaştırılması (numune spektrumunun absorbans skalası ile askorbik asit standardının absorbans skalası farklıdır).....	94
Şekil 93.	Meyve kısımlarında bulunan askorbik asitin spektrumu.....	94
Şekil 94.	2DM numunesi ile standart karışımın 280 nm'deki spektrumlarının karşılaştırılması.....	95
Şekil 95.	2YM numunesi ile standart karışımın 280 nm'deki spektrumlarının karşılaştırılması.....	95
Şekil 96.	Dal ve yaprak kısımlarında bulunan gallik asit ile standart karışımındaki gallik asitin spektrumu.....	96
Şekil 97.	Çekirdek kısımlarının HPLC analizlerinde 280 nm'deki spektrumu....	96
Şekil 98.	Şekil 97'de verilen çekirdek kısımları için 280 nm'de numaralandırılan 1, 2, 3 ve 4 nolu piklerin spektrumları.....	97
Şekil 99.	Şekil 97.'de verilen çekirdek kısımları için 280 nm'de numaralandırılan 5, 6, 7 ve 8 nolu piklerin spektrumları.....	97
Şekil 100.	Dal kısımlarının HPLC analizlerinde 280 nm'deki spektrumu.....	98
Şekil 101.	Şekil 100.'de verilen çekirdek kısımları için 280 nm'de numaralandırılan 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 nolu piklerin spektrumları.....	99
Şekil 102.	Meyve kısımlarının HPLC analizlerinde 280 nm'deki spektrumu.....	100
Şekil 103.	Şekil 102.'de verilen meyve kısımlarının 280 nm'deki 1 ve 2 nolu pikler için spektrumlar.....	100
Şekil 104.	Yaprak kısımlarının HPLC analizlerinde 280 nm'deki spektrumu.....	101
Şekil 105.	Şekil 104.'de verilen yaprak kısımlarının 280 nm'deki 1, 2, 3, 4, 5, 6 ve 7 nolu piklerin spektrumları.....	102
Şekil 106.	Çekirdek kısımlarının (6ÇM) online-HPLC-FRAP yönteminde DAD dedektörünün farklı dalga boylarındaki kromatogramlarının karşılaştırılması.....	103
Şekil 107.	Meyve kısımlarının (6MM) online-HPLC-FRAP yönteminde DAD dedektörünün farklı dalga boylarındaki kromatogramlarının karşılaştırılması.....	103

Şekil 108.	Dal kısımlarının (6DM) online-HPLC-FRAP yönteminde DAD dedektörünün farklı dalga boylarındaki kromatogramlarının çakıştırılması.....	104
Şekil 109.	Yaprak kısımlarının (6YM) online-HPLC-FRAP yönteminde DAD dedektörünün farklı dalga boylarındaki kromatogramlarının çakıştırılması.....	105
Şekil 110.	Çekirdek kısımlarının metanollü ekstraktlarının online-HPLC-FRAP yönteminde 595 nm'deki major pik alanları.....	105
Şekil 111.	Meyve kısımlarının metanollü ekstraktlarının online-HPLC-FRAP yönteminde 595 nm'deki major pik alanları.....	106
Şekil 112.	Dal kısımlarının metanollü ekstraktlarının online-HPLC-FRAP yönteminde 595 nm'deki major pik alanları.....	107
Şekil 113.	Yaprak kısımlarının metanollü ekstraktlarının online-HPLC-FRAP yönteminde 595 nm'deki major pik alanları.....	107
Şekil 114.	Meyve, çekirdek, dal ve yaprak kısımlarının metanollü ekstraktlarının online-HPLC-FRAP yönteminde 595 nm'deki toplam pik alanları....	108
Şekil 115.	Meyve, çekirdek, dal ve yaprak kısımlarının metanollü ekstraktlarının online-HPLC-FRAP yönteminde 595 nm'deki ortalama alanları (ortalama alan, toplam alanın ortalaması alınarak hesaplandı).....	109
Şekil 116.	Çekirdek kısımlarının HPLC analizlerinde vanilin ve vanilik asit için pik alanları (280 nm'de).....	109
Şekil 117.	Meyve kısımlarının HPLC analizlerinde askorbik asit için pik alanları (280 nm'de).....	110
Şekil 118.	Dal kısımlarının HPLC analizlerinde gallik asit için pik alanları (280 nm'de).....	110
Şekil 119.	Yaprak kısımlarının HPLC analizlerinde gallik asit için pik alanları (280 nm'de).....	111
Şekil 120.	online-HPLC-FRAP ve offline-FRAP korelasyon grafiği.....	111
Şekil 121.	online-HPLC-FRAP yöntemi ve offline toplam fenolik madde tayini yöntemi korelasyon grafiği.....	112
Şekil 122.	Meyve, yaprak, dal ve çekirdek kısımlarının etil asetatlı ekstraktlarının antimikrobiyal aktivite testinde toplam inhibisyon yarıçapları (mm).....	116
Şekil 123.	Yaprak, çekirdek, dal ve meyve kısımlarının metanollü ekstraktlarının antimikrobiyal aktivite testinde toplam inhibisyon yarıçapları (mm).....	117

Şekil 124.	Dal kısımlarının sulu ekstraktlarının karbonik anhidraz enzimi inhibisyon değerleri (% inhibisyon).....	118
Şekil 125.	Yaprak kısımlarının sulu ekstratlarının CA enzimi inhibisyon değerleri (% inhibisyon).....	118

TABLolar DİZİNİ

		<u>Sayfa No</u>
Tablo 1.	Antioksidanların sınıflandırılması.....	13
Tablo 2.	Karbonik anhidraz izoenzimleri.....	31
Tablo 3.	Çalışmalarda kullanılan cihazlar.....	34
Tablo 4.	Çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve satın alındıkları firmalar..	35
Tablo 5.	Çalışmalarda kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları.....	36
Tablo 6.	Numune kodları ve açıklamaları.....	38
Tablo 7.	DPPH yönteminde pipetleme prosedürü.....	43
Tablo 8.	HPLC gradient elüsyon programı.....	45
Tablo 9.	Çekirdek ve meyve kısımlarının HPLC analizlerinde major piklerin alıkonma zamanları.....	106
Tablo 10.	Dal ve yaprak kısımlarının HPLC analizlerinde major piklerin alıkonma zamanları.....	108
Tablo 11.	Meyve, dal, yaprak ve çekirdek kısımlarının metanollü, ve etil asetatlı ekstraktlarının antimikrobiyal aktivite testi sonuçları: İnhibisyon yarıçapları (mm).....	112
Tablo 12.	Standartların antimikrobiyal aktivite testi sonuçları: İnhibisyon yarıçapları (mm).....	115

SEMBOLLER DİZİNİ

C18	: Oktadesil
C8	: Oktil
DAD	: Diyot Serili Dedektör
DPPH	: 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
HCl	: Hidroklorik Asit
HPLC	: Yüksek-Performanslı Sıvı Kromatografisi
MDA	: Malondialdehit
NaOH	Sodyum Hidroksit
NP	: Normal faz
ROS	: Reaktif Oksijen Türü
RP	: Ters Faz
SC₅₀	: %50 İnhibisyon Konsantrasyonu
SIM	: Tek iyon izleyen (Single ion Monitorization)
SOD	: Süperoksit Dismutaz
UV	: Ultraviyole
UV-VIS	: Ultraviyole- Görünür Bölge
VIS	: Görünür

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Yaşamsal fonksiyonlarını yerine getirmek için vücudumuzun ihtiyaç duyduğu enerji üretilirken, her saniye milyonlarca serbest radikal dediğimiz oksidan bileşikler oluşur. Çevre kirliliği, kimyasal maddeler, petrokimya ürünleri, sanayi atıkları, tıbbi ilaçlar, güneşin UV ışınları, kozmik ışınlar, X-ışınları, virüsler, enfeksiyon, stres, sigara dumanı ve otomobil egzoz gazları gibi pek çok etken vücudumuzdaki serbest radikallerin sayısını sürekli olarak ve tahmin edemeyeceğimiz kadar artırır (Sies, 1991). Satın aldığımız gıdalar, yüksek şekerli diyet, yağ miktarı yüksek gıdalar, alkol ve yoğun egzersiz oksijen kullanımındaki artışa bağlı olarak vücudumuzda oluşan serbest radikal miktarında artışa neden olmaktadır. Serbest radikaller, vücuttaki hücrelere saldırarak onları oksidasyona maruz bırakarak hasara neden olan moleküllerdir. Bu oksidasyonların sonucu olarak vücutta erken yaşlanma, çeşitli hastalıklar ve somatik hücrelerde kalıcı hasarlar olabilmektedir. Antioksidan bileşikler ise vücutta oluşan bu serbest radikaller ile reaksiyona girerek onları etkisiz hale getiren ve kanser, kalp ve damar hastalıkları gibi birçok hastalığı engelleyen veya etkilerini azaltan moleküllerdir.

Antioksidanların serbest radikaller üzerine gösterdikleri etki sonucunda özellikle gıda endüstrisinde kullanılmak üzere sentetik antioksidanlar üretilmiştir. Ancak son yıllarda sentetik antioksidanların yan etkilerinin görülmeye başlanmasıyla birlikte insanoğlunun doğal antioksidanlara olan ilgisi artmıştır. Artan bu ilgi, tüm dünyada bitkisel tedavinin desteklenmesine de zemin oluşturmuştur (Rice-Evans vd., 1997). Doğal antioksidanların büyük bir kısmını flavonoidler başta olmak üzere sinamik asit türevleri, kumarinler, tokoferoller, organik asitler gibi bitkilerde ikincil metabolit olarak oluşan fenolik maddeler oluşturmaktadır (Harborne, 1994).

Bu çalışmada kuşburnu bitkisinin dokuz farklı ağaçtan toplanan meyve, çekirdek, dal ve yaprak kısımlarının metanollü, sulu ve etil asetatlı ekstraktları hazırlandı. Bu ekstraktların antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri araştırıldı. Online-HPLC-antioksidan aktivitesi ile offline aktivite karşılaştırıldı. Ayrıca sulu numunelerle karbonik anhidraz enzimi üzerine inhibisyon etkisi araştırıldı.

1.2. Kuşburnu Bitkisinin Genel Özellikleri ve Tarihçesi



Şekil 1. Kuşburnu bitkisi

Kuşburnu, Gülgiller (*Rosaceae*) familyasının *Rosa* Diease alt familyası kapsamına giren çok yıllık bir bitki türüdür. Halk arasında “yabangülü, itburnu, köpek gülü, gül elması” gibi farklı isimlerle de bilinmektedir. Avrupa, kuzeybatı Afrika ve Batı Asya’da yetişen ve genellikle ılıman iklim seven bir bitkidir (URL-1, 2012).

Olgun kuşburnu meyvesinin rengi genellikle kırmızı-turuncu olmakla birlikte bazı türlerde koyu mor ve siyah olarak değişiklik göstermektedir. Meyvesi çok tohumlu olup içi tüylüdür. İlkbaharda çiçek açan kuşburnunun olgunlaşma dönemi, bulunduğu iklime ve toprak şartlarına bağlı olarak, yaz sonu-sonbahar başlangıcı aralığında değişim göstermektedir (URL-2, 2012).

Kuşburnu bitkisinin tarihi çok eskilere dayanmaktadır. Eski Yunan, Roma ve Pers dönemlerinde gerek süs gerek meyvesinin tüketimi açısından kuşburnu yetiştirildiğine dair bilgiler bulunmaktadır. Bitkinin ömrü oldukça uzundur ve doğada 300 yıllık kuşburnu çalılarının olduğu biliniyor. Ancak ekonomik ömürleri 30 ile 40 yıl arasında değişmektedir (İlsulu, K., 1992).

Kuşburnu bitkisi türlere göre değişmekle beraber boyu 0.5–4.0 m kadar dik ve sarkık formu, gövde, dal, ve yaprakları az ya da çok dikenli olup, kış aylarında yaprağını döken, çalı formunda bir bitkidir (Türkben C., 2003).

Kuşburnu bitkisi deniz seviyesinden 2500 m yükseklikteki alanlara kadar geniş bir yetiştirme alanına sahiptir. Farklı iklim şartlarına adapte olabilmesi nedeniyle ülkemizde hemen her yerde değişik kuşburnu türleri yetişmektedir (Nilson O., 1972). Doğada 100 kadar kuşburnu türü olduğu ve ülkemizde 27 türünün yetiştiği bilinmektedir. Bunlardan en yaygın olanı “*Rosa Canina*” olmakla birlikte; “*rosa nitida, rosa xanthina, rosa setigera, rosa helenae, rosa moschata hermm*” türleri de ülkemizde yetişen kuşburnu türlerine örnek verilebilir (Ercişli, S. ve Güteryüz, M., 2005).

Kuşburnu bitkisinin çeşitli şekillerde tüketimi mevcuttur. Bitkisel çay olarak, marmelatı yapılarak ve meyve suyu olarak olduğu gibi direk meyvesi de tüketilebilmektedir. Bu açıdan bakıldığında aynı zamanda ticari yönü olan bir meyvedir.

1.2.1. Kuşburnu Bitkisi ile Biyoaktivite Çalışmaları

Son yıllarda yapılan çalışmalar sağlıklı yaşam ve beslenmeye karşı olan ilginin artmasıyla birlikte bitkisel tıbbi preparatlar giderek artan bir şekilde kullanılmaya başlamıştır. Kuşburnu da tıbbi önemi olan bir bitkidir.

Kuşburnu ekstraktları kapsül, tablet ve şurup şeklinde doğal vitamin preparatlarının hazırlanmasında, bebek gıdaları, poşet çay, diğer meyve ve sebze sularının vitamince zenginleştirilmesinde kullanılmaktadır (Özdemir, F. vd., 1998).

Kuşburnu bitkisi C, B1, B2, E, K vitaminleri ve K, Na, Mg, P, Fe, Mn, Cu, Zn gibi elementlerce zengin bir bitki olmasının yanı sıra; flavanoidler, likopen, β -karoten bakımından da zengin bir bitkidir (Kazaz, S. vd., 2009). Kuşburnu bitkisi fenolik bileşikler ve flavanoidlerce zengin bir bitki olup, klinik çalışmalar kuşburnu bitkisinin ve ekstraktlarının antioksidan ve anti-inflamatuar etki gösterdiğini (Kharazmi, 2008) ve ayrıca son zamanlarda osteoartrit hastalığının ağrılarını azaltıcı etki gösterdiğini ortaya koymaktadır (Rein vd., 2004).

Kuşburnu bitkisinin gastrik mukoza, gastrik ülser ve sindirim problemleri gibi gastrointestinal sistem hastalıklarında da rahatlatıcı etkisinin olduğu (Gürbüz, vd., 2003) literatürde bildirilen faydalı özellikleri arasındadır.

Kuşburnu marmelatının yüksek miktarda kuru madde içerdiği, askorbik asit, şeker fenolik içerik olarak zengin olduğu tespit edilmiştir (Yıldız, O. ve Alpaslan, M., 2012).

Halk arasında C vitamini bakımından limon gibi meyveler zengin olarak bilinse de kuşburnu da C vitamini (askorbik asit) bakımından zengindir (Nojavan, vd., 2008). Bu

bakımdan kuşburnunun soğuk algınlığı ve grip gibi sağlık sorunlarının önlenmesi, benzer rahatsızlıkların oluşumunu, yorgunluk hissini ve boğaz ağrılarını azaltması, bağışıklık sistemini güçlendirmesi bildirilen faydalı etkileri arasındadır (Orhan vd., 2007).

Kuşburnunun aynı zamanda menstrual döngünün düzenlenmesinde ve ağır dönemlerdeki ağrıların hafifletilmesinde olumlu yardımcı etkiler gösterdiği, yüzdeki akneleri azalttığı, anti-inflamatuar özellik gösterdiği (Nojavan vd., 2008) bildirilmiştir.

1.3. İnsanda Oluşan Oksidan Maddeler

Biyolojik bir varlık olarak uzun yaşamak, kanser gibi ölümcül hastalıklardan korunmak için vücudumuzda oluşan oksidan maddelerden korunmamız gerekir. Ortaklanmamış elektron içeren atom, molekül ya da iyonlar oksidan maddelerdir ve serbest radikal olarak adlandırılırlar.

Bilindiği üzere Kuantum kimyasına göre bir bağın yapısında ancak iki elektron bulunabilir ve bu iki elektron ters spinli olmak zorundadır. Bunun anlamı elektronlardan biri saat yönünde dönerken diğeri tersi yönde dönme yapmaktadır. Bu şekilde düzenlenen elektron çiftlerinin kararlılıkları oldukça yüksektir ve insan vücudunda hemen hemen bütün elektronlar elektron çifti halinde bulunur.

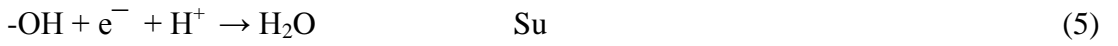
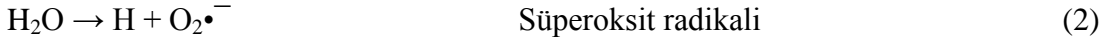
Bir bağ koptuğunda iki durum ortaya çıkar; birinci durumda elektronlar birlikte aynı atoma katılırlar, ikinci durumda ise elektronlar birbirinden ayrılarak biri bir atoma diğeri öteki atoma katılır. Birinci durumun gerçekleşmesi halinde bir iyon oluşur, ikinci durumdaki gibi elektronların ayrılması söz konusu olduğunda ise serbest radikaller oluşur. Serbest radikallerdeki bu eşleşmemiş elektronlar oldukça yüksek enerjilidir ve kendileri eşleyerek düşük enerji düzeyine gelmek için başka eşleşmiş elektronlara saldırarak işlerine engel olurlar. Bu işlem serbest radikalleri hem tehlikeli hem de kullanışlı yapar (URL-3, 2012).

Serbest radikaller bir kere oluştuğunda zincir reaksiyonları başlatabilir. Bir serbest radikal, çift halde bulunan elektronların çoğunu birbirinden ayırarak reaksiyonu durdurur. Ama sonuçta serbest radikal kendine bir elektron alarak elektron çifti haline geçer, diğer elektronsa yeni bir serbest radikal oluşturur (URL-4, 2012)

Oksijen kaynaklı olan serbest radikaller biyolojik sistemlerde önemli bir yere sahiptir. Bu radikaller, oksijenin suya indirgenmesi sırasında tek elektron aktarması

sonucunda oluşan; oksijenin kendisi (singlet oksijen), süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metallere iyonları ve hidroksil radikalidir (Akkuş, 1995).

Moleküler haldeki oksijenin bir elektron alması ile süperoksit ($O_2\bullet$) radikali, iki elektron alması ile hidrojen peroksit (H_2O_2), üç elektron alması ile hidroksil ($OH\bullet$) radikali, ve dört elektron alması ile su molekülü (H_2O) oluşmaktadır. Bu reaksiyonları aşağıdaki basamaklarla gösterebiliriz;



Moleküler oksijen (O_2), ortaklanmamış elektronu bulunmamasından dolayı radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana geldiği gibi, bu reaksiyonların başlamasına da sebep olur. Serbest oksijen radikallerinin etkisi sonucu karbon merkezli radikaller ($R\bullet$), peroksil radikalleri ($ROO\bullet$), alkoksil radikalleri ($RO\bullet$), tiyol radikalleri ($RS\bullet$) gibi önemli serbest radikaller meydana gelir. Süperoksit radikalinin oluşumu, oksijen molekülünün bir elektron alması ile gerçekleşir.



Süperoksit, yalnız başınayken herhangi bir zararı olmayan serbest radikaldir. Biyolojik sistemdeki önemi hidrojen peroksit kaynağı olmasıdır ve geçiş metalleri iyonlarının indirgenmesinden sorumludur. Süperoksit radikali ile nitrik oksit verdiği reaksiyon sonucunda ise reaktif bir oksijen türevidir olan peroksinitrit oluşur.



Peroksinitrit proteinlere doğrudan zarar vererek, azot dioksit ($NO_2\bullet$), hidroksil radikali ($OH\bullet$) ve nitronyum iyonu (NO_2^+) gibi farklı toksik ürünlerin oluşmasına neden olmaktadır.

Süperoksit radikalinin kuvvetli indirgeyici özelliği olması sebebiyle, özellikle hem grupları, Fe-S grupları ile ve prostetik grup olarak geçiş metalleri (Fe, Cu gibi) içeren gruplarla etkileşim göstermektedir.

Süperoksit radikalinin hidrojen peroksiti oluşturması, süperoksit dismutaz (SOD) ile mutasyona uğraması ile gerçekleşmektedir.

Süperoksitin bir elektron alması sonucu peroksit radikali oluşur ve peroksitin iki hidrojen atomu alması sonucunda hidrojen peroksit (H_2O_2) meydana gelir. Yine moleküler oksijenin iki elektron ve iki hidrojen atomu alması sonucunda hidrojen peroksit oluşur.

Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksitin asıl üretimi süperoksitin dismutasyonu ile olur.

Hidrojen peroksit, süperoksit ile reaksiyona girerek en aktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturur. Bu reaksiyona “Haber-Weiss” reaksiyonu adı verilir.

Metallerin varlığında ise aynı reaksiyon geçiş metalleriyle “Fenton reaksiyonu” sonucu oluşur.

Hidroksil radikali (OH^*), bütün oksijen radikalleri içinde en aktif ve toksik etkili olanıdır. Proteinler, karbohidrat, lipid ve nükleik asitleri okside etme yeteneği fazladır, oluştuğu yerde büyük hasara sebep olur. Hidroksil radikali (OH^*) hidrojen peroksidin geçiş metalleri varlığında indirgenmesiyle (Fenton reaksiyonu) ya da suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda oluşur.

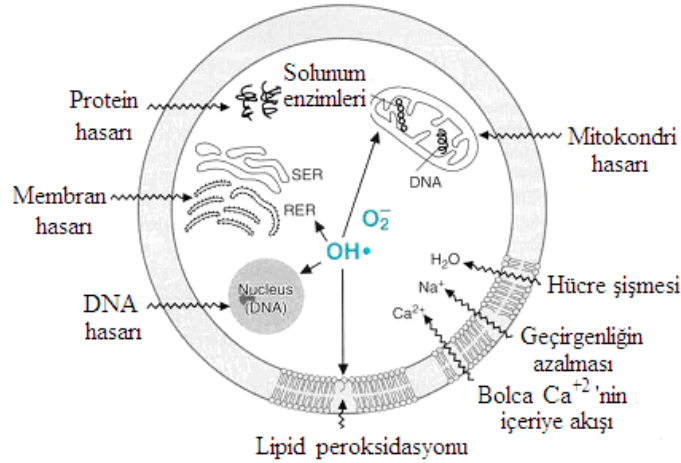
Hidroksil radikali, tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak yeni radikallerin oluşumuna sebep olur.

1.4. Oksidanların Biyolojik Önemi ve Etkileri

Yaşamın devamlılığı açısından serbest radikaller son derece önemlidir. Enerji üretimi, elektron transferi gibi metabolik işlevlerde rol oynamaktadır. Ayrıca bağışıklık sistemi, vücuda giren yabancı saldırganları ve zarar görmüş dokuları işaretlemek için serbest radikalleri kullanmaktadır. Serbest radikaller vücutta kontrol altında tutulmadığı takdirde biyomoleküllerle reaksiyona girerek hem onların yapısını bozmakta hem de oluşan ürünler toksik özellik taşımaktadır (URL-4, 2012).

Oldukça reaktif olan serbest radikaller nötralize edilmezlerse vücutta ciddi hasara neden olabilirler. Protein, lipid, DNA ve nükleotid koenzimler gibi birçok biyolojik materyali

zarara uğratabilmektedirler. Bu zararın sonucu olarak yaşlanma, kalp-damar hastalıkları, çeşitli kanser türleri, bağışıklık sisteminin zayıflaması gibi birçok hastalığa neden olduğuna dair bilgiler bulunmaktadır (Diplock, 1998).



Şekil 2. Serbest radikallerin hüresel hedefleri

Serbest radikaller tarafından membranda bulunan poliansatüre yağ asitlerinin oksidasyona uğratılması sonucu lipid peroksidasyonu meydana gelir. Lipid peroksil radikalleri (süperoksit radikali, hidroksil radikali, peroksil radikali ve alkoksil radikali) lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonlarının başlatıcılarıdır (URL-3, 2012). Lipid peroksidasyonun en önemli ürünü malondialdehid (MDA) dir. Üç ya da daha fazla çifte bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucunda MDA oluşur. Oluşan MDA, hücre membranlarından iyon alışverişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur.

Lipid oksidasyonu; başlangıç, ilerleme ve sonuç basamaklarından oluşmaktadır. Oksidasyonun başlangıç basamağında, bir radikal ($X\cdot$) ile yağ asidinin (LH) reaksiyonu sonucu bir lipid radikali ($L\cdot$) meydana gelmektedir. İlerleme aşamasında, oluşan $L\cdot$ radikali oksijen eklenmesiyle peroksi radikali ($LOO\cdot$) oluşmakta ve bu peroksi radikali diğer bir yağ asidi (LH) molekülünden ayrılan bir hidrojen atomu ile birleşerek tekrar hidroperoksitlere ve yeni lipid radikallerine dönüşmektedir. Sonuç aşamasında ise oluşan radikaller birbiriyle reaksiyona girerek radikal olmayan, aldehit, keton, ester, eter ve alkol gibi kararlı bozunma ürünlerine dönüşmektedir (Porter, 1985).

Serbest radikal saldırısının devamı etmesi durumunda, hücre zarının yapısındaki lipitlerin parçalanması, bitki zarının yırtılması ve hücre bileşenlerinin dağılması durumları ortaya çıkmaktadır. Hücre içi bileşenlerin hücre dışına akması etraftaki dokuların da zarara uğramasına neden olmaktadır. Serbest radikal saldırısı ve hücre zarının tahribatı "Oksidatif Zarar" olarak adlandırılır.

Serbest radikallerin proteinler üzerindeki etkileri proteinin amino asit kompozisyonu, amino asitlerin yapısal dizilişleri gibi faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Çift bağ ve kükürt içeren metiyonin, tirozin, histidin, fenilalanin, triptofan, sistein gibi amino asitleri içeren proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Sonuç olarak özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikaller meydana gelir. Serbest radikallerin etkileri sonunda, yapılarında fazla sayıda disülfid bağı bulunan immünoglobülin G (IgG) ve albümin gibi proteinlerin tersiyer yapıları bozulur, normal fonksiyonlarını yerine getiremezler.

Metabolik fonksiyonlar esnasında veya radyasyon etkisiyle vücutta oluşan serbest radikaller DNA ile etkileşmeleri sonucunda hücre mutasyonu ve hücre ölümüne neden olabilmektedir. Özellikle hidroksil radikali deoksiriboz ve bazlarla kolayca etkileşerek değişikliğe yol açar. Hidrojen peroksit molekülünün hücre çekirdeğine ulaşması sonucunda DNA hasarı sonucu hücre fonksiyonlarında bozukluk oluşmaktadır. Serbest radikallerin etkisi sonucunda DNA'da meydana gelen mutasyonlar kansere, erken yaşlanmaya, Parkinson hastalığı, Alzhemier gibi pek çok hastalığa neden olmaktadır (URL-5, 2012)

Serbest radikallerin karbohidratlarla olan etkileşmeler sonucunda çeşitli ürünler oluşur ve bunlar çeşitli patolojik süreçlerde önem teşkil ederler.

Diyabet ve diyabet komplikasyonlarının gelişimi, koroner kalp hastalığı, hipertansiyon, behçet hastalığı, çeşitli deri ve göz hastalıkları, kanser gibi birçok hastalıkta ve yaşlılıkta serbest radikal üretiminin arttığı, antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz olduğu gösterilmiştir.

Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehidler meydana gelir. Bunlar diabet ve sigara içimi ile ilişkili kronik hastalıklar gibi patolojik olaylarda önemli rol oynarlar (Kayalı ve Çakatay, 2004). Okzoaldehidler DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturabilme özelliklerinden dolayı antimikotik etki gösterirler. Böylece, kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar (Yılmaz ve Ozan, 2003).

Serbest radikallerin etkileri ile birçok hastalığın ortaya çıktığı düşünülmektedir. Vücudumuz kendi yaşam fonksiyonlarını yerine getirirken ve çevresel (UV, egzoz gazı, sigara vb.) etkenlerle oluşan serbest radikallerin etkilerinin azaltılması ve onların temizlenmesinden sorumlu bir sisteme sahiptir ve bu “antioksidan savunma sistemi” olarak tanımlanmaktadır.

1.5. Antioksidan Maddeler ve Sınıflandırılması

Antioksidanlar hücrelerde oluşan serbest radikaller ile reaksiyona girerek onların diğer molekülleri oksidasyona uğratmalarına engel olan ve bu şekilde kanser dahil pek çok hastalığı ve erken yaşlanmayı önleyen veya etkilerini minimize eden moleküllerdir.

Antioksidanlar doğal antioksidanlar ve yapay antioksidanlar olarak iki sınıfa ayrılabilir. Doğal antioksidanlar kaynağına göre; endojen ve eksojen antioksidanlar şeklinde iki grupta ele alınabilir. Vücudun kendi ürettiği endojen antioksidanlar, enzimatik ve enzimatik olmayanlardır. Katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), hidroperoksidaz, glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon S transferazlar, glutatyon redüktaz, sitokrom oksidaz enzimatik antioksidanlardır. askorbik asit, flavonidler, metiyonin, albumin gibi maddeleri enzimatik olmayan antioksidanlara örnek verilebilir. Endojen antioksidanlar hücrede buldukları ve etki gösterdikleri yere göre de sınıflandırılabilir; hücre içi (intraselüler), membrabal ve hücre dışı (ekstraselüler) antioksidanlar.

Eksojen antioksidanlar, vitaminler, ilaçlar ve gıdalardaki yapay antioksidanlardır. askorbik asit (C vitamini) Folik asit, α -tokoferol (E vitamini), β -karoten vitamin olan antioksidanlardır. ksantin oksidaz inhibitörleri, Trolox ve NADPH oksidaz inhibitörleri ilaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlara örnek verilebilir. Gıda katkı maddesi olarak kullanılan eksojen antioksidanlara ise bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), bütillenmiş hidroksianisol (BHA), sodyum benzoat, propilgalat, ve etosikuin örnek verilebilir.

Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi substrat olarak serbest radikal kullanan tek enzimdir ve süperoksit radikalının hidrojen peroksit ve oksijene dönüşümünü katalizler.

Katalaz (CAT) hayvansal organizmaların aerobik hücrelerinde; özellikle karaciğer ve eritrositlerde yoğun olarak bulunur. Yüksek konsantrasyonda oluşan hidrojen peroksidin dismutasyonunu katalizler. Peroksizomlerde yer alan tetramerik bir proteindir.

Tiyol grupları, enzimatik reaksiyonlar aracılığıyla ve serbest radikalleri yakalamak suretiyle görev yapan hücresel antioksidanlardır. Suda çözünebilen bir tiyol olan ve birçok

hücrede çok yüksek konsantrasyonlarda bulunan glutatyon, biyolojik membranları lipid peroksidasyonuna karşı korumaktadır. Bu koruma, enzimatik olarak gerçekleşmektedir (Di Mascio, P., vd.,1991). Glutatyon peroksidaz GSHPx enzimi, glutatyon'un indirgenmiş formunu (GSH), oksitlenmiş hale (GSSG) dönüştürmektedir.

Glutatyon aynı zamanda hücre içinde tekli oksijen (1O_2), süperoksit anyonu ($\cdot O_2^-$), hidroksi ($\cdot OH$) radikalleri gibi birçok zararlı oksidanla enzim katalizi olmaksızın da reaksiyona girmektedir (Larson, 1988)

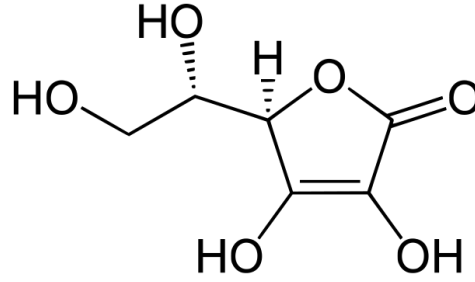
Glutatyon redüktaz (GSH-R), yükseltgenmiş glutatyonun (GSSG), indirgenmiş glutatyon (GSH) dönüşümünü katalizler. Glutatyon-S-transferazlar (GST), başta araşidonik asit ve lineloat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksitlerine karşı, selenyum-bağımsız GSH-Px aktivitesi göstererek bir antioksidan savunma mekanizması oluştururlar.

Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi ise solunum zincirinin son enzimidir ve süperoksidi ($O_2\cdot^-$) detoksifiye eder (Akkuş, 1995).

Enzimatik olmasayan endojen antioksidan olan glutatyon (GSH), vücutta direk olarak sistein, glisin ve glutamattan sentezlenmektedir. GSH redoks döngüsünün bir substratı olarak, hidroksil radikalleri ile singlet oksijenin temizlenmesinde yararlıdır. Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellenmesinde rol alır. Ayrıca proteinlerin yapısında bulunan sülfhidril (-SH) gruplarını indirgenmiş halde tutarak bu grupları oksidasyona karşı korur. Melatonin (MLT) en zararlı serbest radikal olan hidroksil serbest radikalinin (OH^\bullet) temizlenmesinde etkili olan güçlü bir antioksidandır. Ürat; hidroksil, süperoksit, peroksit radikalleri ve singlet oksijenin temizlenmesinde görev yapar ve C vitamininin oksidasyonunu engelleyici etkisi bulunur. Bilirubin, süperoksit ve hidroksil radikallerinin temizlenmesinde etkilidir. Albümin LOOH ve HOCl toplayıcısıdır ve plazma osmotik basıncını düzenlemeden de sorumludur.

Ürik asit endojen olarak serbest radikal temizleyicisi ve antioksidan olarak davranır. Vücut sıvılarında yaklaşık olarak 0.5 mmol/L kadar bulunur ve pürin metabolizmasının son ürünü olarak sentezlenir. Ürik asit güçlü şekilde singlet oksijen, peroksil radikali ($ROO\cdot$) ve OH temizleyicisidir (Sinha vd., 2009)

Askorbik asit suda çözünebilen ve turunçgiller, patates, domates ile yeşil yapraklı sebzelerde bulunan antioksidandır. İnsanlar L-glukanolakton oksidaz enziminin eksikliği nedeniyle D-glikozdan L-askorbik asidi sentezleyemezler ve bu nedenle askorbik asidi gıdaları ile almak zorundadırlar (Baskin ve Salem, 1997).



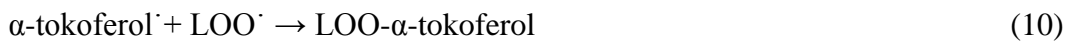
Şekil 3. Askorbik Asit (C vitamini)

Suda çözünebilir - zincir kırıcı bir antioksidan olmasından dolayı özellikle detoksifikasyon metabolizması esnasında oluşan serbest radikalleri ve ROS'ları etkisiz hale getirir (Carr vd., 2000). Bir elektronun verilmesi sonucu askorbat, semidehidroaskorbat (DHA) radikaline çevrilir. Askorbat, süperoksit ve hidroksil radikalleri ile kolayca reaksiyona girerek DHA oluşturur. DHA, vitamin C kaynağı olarak kullanılır (Baskin, ve Salem, 1997).

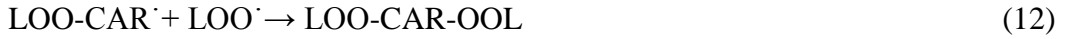


Vitamin C membrana bağlı vitamin E'nin rejenerasyonunu da sağlar. α -tokoferoksil radikali ile reaksiyona girerek, tokoferol meydana getirirken kendisi de dehidroaskorbik aside dönüşür. Ayrıca, askorbik asit tek başına pro-oksidan etkilidir ve bakır ile demir tuzları için indirgeyici olarak davranmaktadır. Askorbik asit Fe^{+3} , Fe^{+2} 'e dönüştürür. Fe^{+2} böylece hidrojen peroksidin hidroksil radikaline çevrilmesine neden olmaktadır (Proteggente, A.R., vd., 2000).

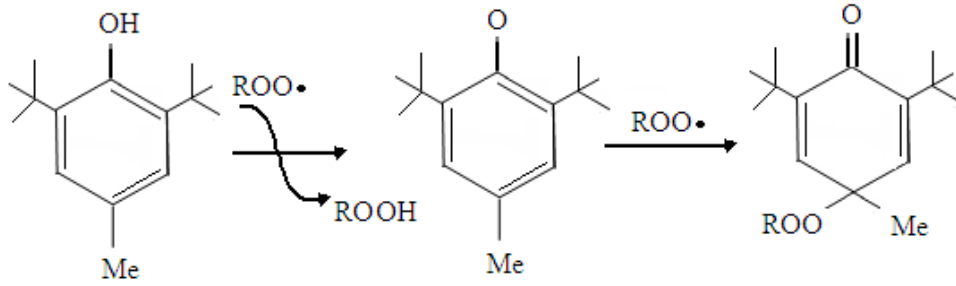
Alfa tokoferol hücrelerde bulunan yağda çözünen ana antioksidandır. Doğada yan zincirlerinin doyurulması ve metilasyon bakımından birbirinden farklı α , β , γ ve δ -tokoferol ile α , β , γ ve δ -tokotrienol isminde 8 tip vitamin E bulunmaktadır. Plazmada baskın olarak bulunan ve en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olan α -tokoferoldür. Temel fonksiyonu membran fosfolipitlerinin peroksidasyonunun ve hücre membranlarının hasar görmesinin önlenmesidir.



β -karoten singlet oksijenin yakalaması, serbest radikalleri temizlemesi ve hücre membranı lipitlerini oksidatif dejenerasyona karşı korumada önemli bir antioksidandır (Baskin ve Salem, 1997).



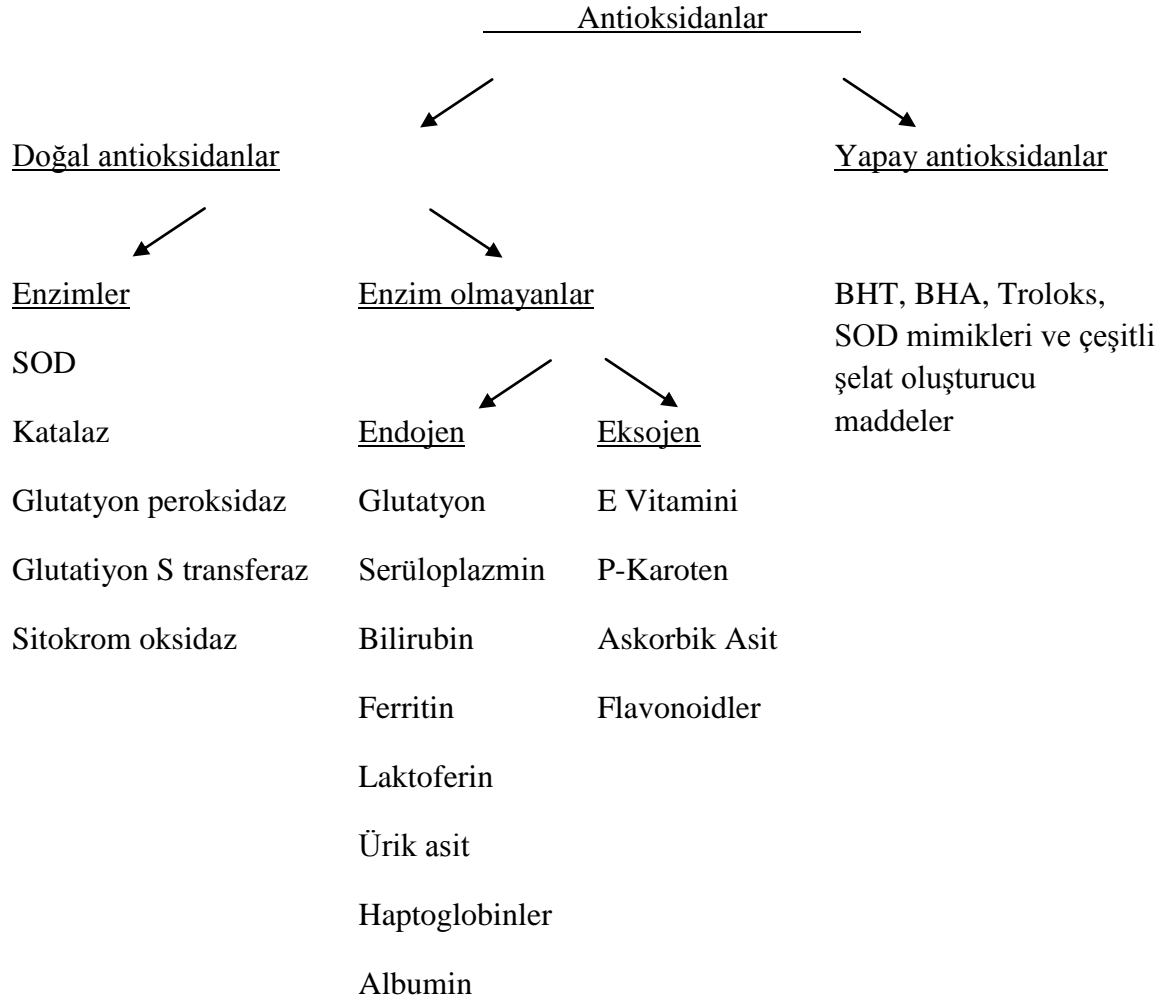
Sentetik olarak üretilen Trolox, rutin, butillenmiş hidroksi toluen (BHT), butillenmiş hidroksi anisol (BHA) gibi antioksidanlar genellikle antioksidan aktivite tayinlerinde standart olarak kullanılırlar. Butillenmiş hidroksi toluen (BHT), peroksi radikaliyle iki aşamada reaksiyona girerek onu çok daha az reaktif ürünlere dönüştürmesi sebebiyle önemli bir sentetik antioksidandır.



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

Süper antioksidan haplar, Japon eriği, kokusuz sarımsak, mavi-yeşil alg (yosun), havuç, portakal ve badem konsantreleri ilave edilmiş ‘Activin’ üzüm çekirdeği ekstresinden oluşan bir bitkisel karışım olup A, C, E vitaminleri, selenyum, çinko ve kalsiyum mineralleri de içermektedir. Ayrıca ürünü oluşturan doğal bitki özleri, vitaminler ve mineraller antioksidan etkileri bilinen ve bu amaç için kullanılan özel maddelerdir (Dündar ve Aslan, 2000). Bir başka karışım ise ABD’den ithal edilmekte olan ve nar kapsülü olarak adlandırılan, ticari adı ‘PomGT’ olan ürün şeker, gluten, yapay aromalar, renklendirici ve koruyucu katkı maddeleri içermeyip 1 kapsülünde 8 fincan yeşil çay ve 2 bardak nar suyu bulunduran antioksidan haptır. Son yıllarda üretilen bu tür haplar yapay antioksidanlara birer örnektir.

Tablo 1. Antioksidanların sınıflandırılması



Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki ederler:

1) Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha zayıf yeni moleküle çevirme toplayıcı etkidir. Antioksidan enzimler, trakeobronşiyal mukus ve küçük moleküller bu tip etki gösterirler.

2) Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme bastırıcı etkidir. Vitaminler, flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler.

3) Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki zincir kırıcı etkidir. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler.

4) Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması onarıcı etkidir (URL-6).

1.6. Biyoaktif Fenolik Bileşikler

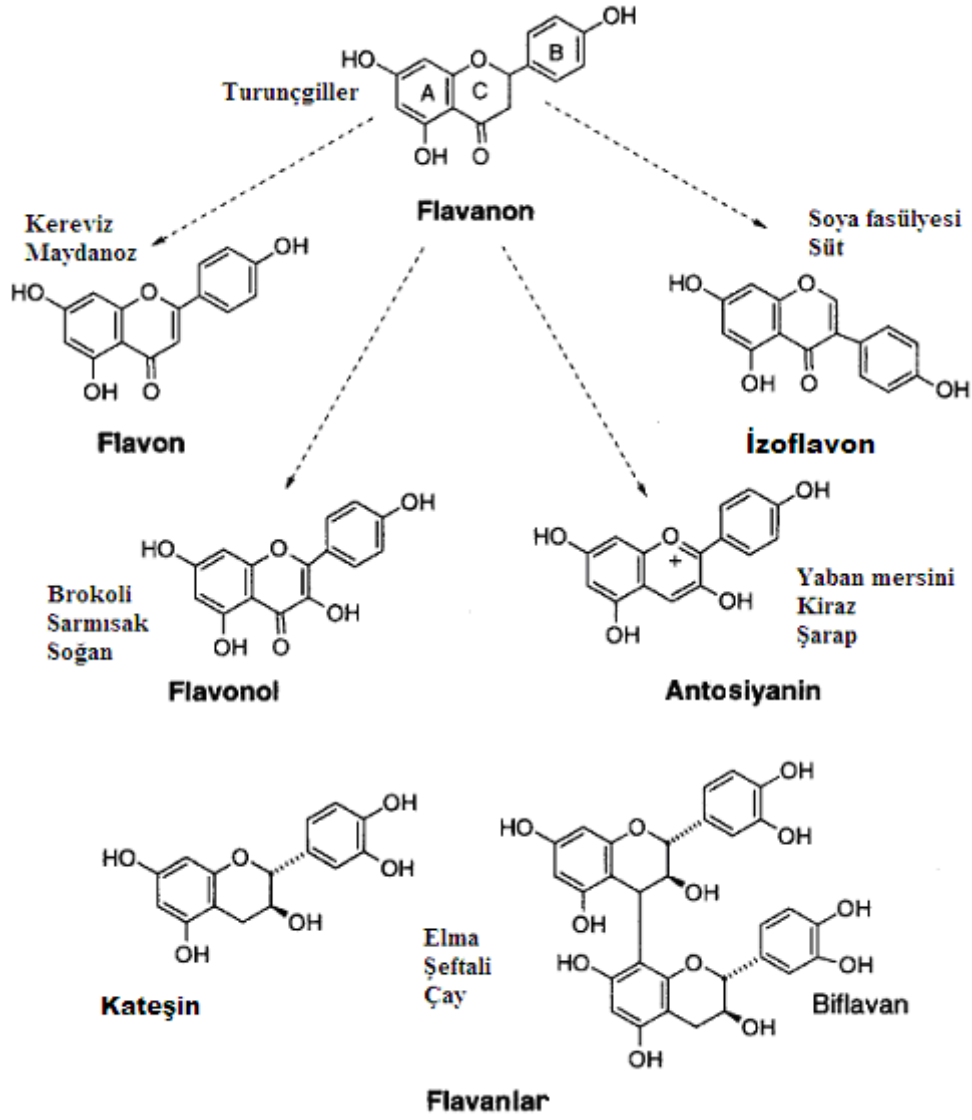
Bitkiler, yüzyıllardan beri tüm dünyada gıdaların tad ve aromasının artırılmasında (Shelef, 1983), gıdalardaki istenmeyen kokuların giderilmesinde (Giese, 1994) ve hepsinden önemlisi de tedavi amaçlı olarak kullanılmıştır. Uzun yıllar geleneksel olarak devam eden bu kullanım şekilleri, 20. yüzyılın başından itibaren tedavi amaçlı kullanılan bitkilerin çeşitli özellikleri laboratuvarlarda incelenmeye başlanmıştır (Dığrak vd., 1998). Tıbbi bitkiler ile ilgili bilimsel araştırmaların sayısının artması sonucunda bitki türlerine ve bileşenlerine ilgi de bir hayli artmıştır.

Bütün bitkiler metabolizmalarında sekonder metabolit olarak çok sayıda fenolik madde oluşturmaktadırlar. Bu nedenle, bitkisel kökenli bütün gıdalarda daima farklı nitelikte ve miktarda çeşitli fenolik bileşikler bulunmaktadır.

Gıda bileşeni olarak fenolik bileşikler; insan sağlığı açısından işlevleri, tat ve koku oluşumundaki etkileri, antimikrobiyal ve antioksidatif etki göstermeleri, enzim inhibisyonuna neden olmaları, değişik gıdalarda saflık kontrol kriteri olmaları gibi birçok açıdan önem taşımaktadırlar. Fenolik bileşikler insan vücudunda çeşitli sebeplerle oluşan oksidan maddelerin temizlenmesinde etkili oldukları için antioksidan özellik gösterirler (URL-7).

Fenolik bileşikler beslenme fizyolojisi açısından olumlu etkilere sahip olmasından dolayı “biyoflavonoid”olarak da tanımlanmaktadırlar. Ayrıca kılcal dolaşım sisteminde geğirgenliği düzenleyici ve kan basıncını düşürücü etkisi göz önüne alınarak bazı kaynaklarda P faktörü (permeabilite faktörü) veya P vitamini olarak da adlandırılmaktadırlar.

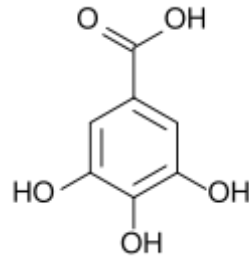
Fenolik bileşikler altı karbonlu aromatik halkaya doğrudan bağlı bir veya daha fazla hidroksil grubu (-OH) içeren ve bu hidroksil grubundan bir hidrojen kaybetmeye meyilli, zayıf asidik, aromatik bileşiklerdir. Bitkiler içerisinde en yaygın olarak bulunan bileşik grubu olan fenolik bileşikler 6000’in üzerinde çeşitli bileşik yapısına sahiptir (Bravo, 1998).



Şekil 5. Flavonoidlerin kimyasal yapısı

Fenolik bileşikler, fenolik asitler ve flavonoidler olmak üzere iki gruba ayrılırlar (Cemeroğlu, B., 2004). Flavonoidler, bitkisel çayların, meyve ve sebzelerin doğal yapılarında bulunan polifenolik antioksidanlardır. Fenolik asitler genellikle bitkilerin taç kısmında bulunan ve antioksidan özelliğe sahip bileşiklerdir.

Fenolik asitler hidroksibenzoik asitler ve hidroksisinamik asitler olmak üzere iki gruba ayrılırlar (benzoik asit ve sinamik asit türevleri). Hidroksibenzoik asitlerin genel kimyasal yapısı C_6-C_1 fenilmetan'dan oluşmaktadır ve bunlar bitkisel gıdalarda genel olarak eser miktarda bulunurlar. Hidroksibenzoik asitlere örnek olarak salisilik asit, vanilik asit, gallik asit ve m-hidroksibenzoik asit bileşikleri verebilir.



Şekil 6. Gallik asit

Hidroksisinnamik asitler C_6-C_3 fenilpropan yapısındadırlar. Fenilpropan halkasına bağlanan OH grubunun konumu ve yapısına göre farklı özellik gösterirler. Kafeik asit, ferulik asit, *p*-kumarik asit ve *o*-kumarik asit bileşikleri yaygın olarak bulunan hidroksisinnamik asit türevi bileşiklerdir.

Asit	R1	R2	R3	Asit	R1	R2	R3
<i>p</i> -Hidroksibenzoik	H	OH	H	<i>p</i> -Kumarik	H	OH	H
Pirokate şük	H	OH	OH	Kafeik	H	OH	OH
Vanilik	CH ₃ O	OH	H	Ferulik	CH ₃ O	OH	H
Siringik	CH ₃ O	OH	CH ₃ O	Sinapik	CH ₃ O	OH	CH ₃ O
Gallik	OH	OH	OH				

Şekil 7. Fenolik asitlerin genel yapısı a) benzoik asit türevleri b) sinamik asit türevleri (Shahidi, F., ve Naczki, M., 1995)

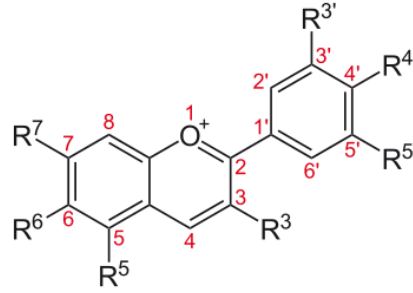
Fenolik asitlerin karboksil grupları karbohidratlar, aminoasitler veya glikozitler ile reaksiyona girebilirler ve alkollerle fenol esterleri, amino bileşikleri ile de amidleri oluştururlar. Ayrıca fenol halkasındaki hidroksil gruplarının aktifliğinden dolayı şekerler ile birleşmesi sonucu glikozitleri oluştururlar.

Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı $C_6-C_3-C_3$ şeklindedir ve hidroksil grubunun molekül üzerindeki dağılımı ve sayısı çeşitlilik göstermektedirler.

Flavonoidler fenolik bileşikler içerisinde en önemli grubu oluştururlar ve flavan (2-fenolbenzodihidropiran) türevi bileşiklerdir. Flavonoidler bağlanan substitüe grupların türlerine göre altı alt gruba ayrılırlar; antosiyanidinler, flavonoller, flavonlar, flavanonlar, flavanoller ve izoflavonoidler.

Antosiyanidinler doğada genellikle şekerlerle oluşturdukları glikozit formunda bulunurlar ve “antosiyanin” adını alırlar. Antosiyaninler meyve ve sebzelerde pembe, kırmızı ve mor tondaki çeşitli renklerin oluşumundan sorumludurlar ve suda çözünebilir olan renk pigmentleridir (Cemeroğlu, B., 2004).

Antosiyaninlerin rengi fenolik bileşiklerin yapısında bulunan hidroksil (-OH) ve metoksil (-OCH₃) grubu sayısına bağlı olarak değişim gösterir; -OH grubu sayısı arttıkça mavilik, -OCH₃ grubu sayısı arttıkça kırmızılık artmaktadır.

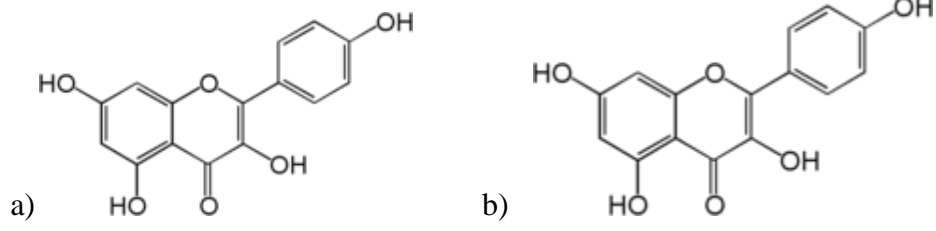


Şekil 8. Antosiyaninlerin genel yapısı

Antosiyaninler, yenilebilir tahıllarda, köklerde ve yeşil sebzelerde bulunmasına rağmen özellikle meyvelerde bulunurlar. Elma, armut, ayva, kayısı, erik ve şeftali gibi çekirdekli meyvelerin kabuğunda; taneli-kabuksuz- yumuşak meyvelerin hem kabuğunda, hem de etli kısmında bulunur. İçecekler ve diğer besin maddelerinin renklendirilmesinde kullanılırlar. Bunun yanında farmasötik ürünlerin boyanmasında da kullanılırlar.

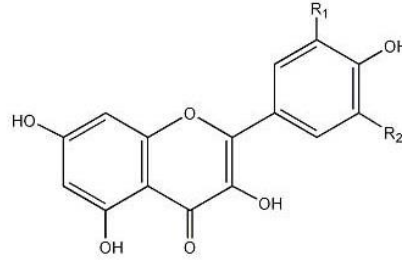
Flavonol grubu bileşikler gıdalarda genellikle glikozid formunda bulunmaktadır. Başlıca flavonol bileşikleri kamferol, kuersetin, mirisetin ve izoramnetin'dir.

Kuersetin, birçok meyve, sebze ve içerde bulunur. Kamferol, genellikle meyve ve lifli sebzelerde bulunur. Ayrıca bazı taneli-kabuksuz- yumuşak meyvelerde (çilek, kiraz vb.), baharatlarda, baklagillerde ve köklü sebzelerde bulunur.



Şekil 9. Kuersetin (a) ve Kamferol (b)

İzoramnetin, soğan ve şeftalide bulunur. Miresetin ise özellikle taneli-kabuksuz-yumuşak meyvelerde, mısır ve çayda bulunur.



R ₁ = H;	R ₂ = H:	Kaempferol
R ₁ = OH;	R ₂ = H:	Quercetin
R ₁ = OH;	R ₂ = OH:	Myricetin
R ₁ = OCH ₃ ;	R ₂ = H:	Isorhamnetin

Şekil 10. Flavonollerin genel yapısı

Flavon ve flavon glikozidleri hemen her bitkide bulunan açık sarı renkli bileşiklerdir. Flavonlarda flavan halkası C4 pozisyonundan okside olmuş durumdadır ve çift bağ (C2=C3) içermektedir.

	Flavonollar (X = OH)			Flavonlar (X = H)		
	R1	R2		R1	R2	
	H	H		H	H	
	OH	H		OH	H	
	OH	OH		OCH ₃	H	
	OCH ₃	H		OCH ₃	OCH ₃	

Şekil 11. Flavon ve flavonollerin genel yapısı

Flavononlar genellikle tahıl gıdalarında bulunurlar (buğday, mısır vb.). Sebzelerde ve sebze yapraklarında genellikle luteolin glikozitleri ve apigenin mevcuttur. Flavanonlar renksiz ve çoğunlukla turuncgil meyvelerinde bulunan flavonoid türü bileşiklerdir. En yaygın olarak bulunan flavanon türleri, naringin, hesperitin ve naringenin' dir.

Flavanoller gıdalarda yaygın olarak bulunan flavonoid türü bileşiklerdir ve flavonoid biyosentezinde ara ürün olarak oluşurlar. Flavanoller kimyasal veya enzimatik yollarla havadaki oksijen ile reaksiyona girerek proantosiyenin bileşiklerini oluştururlar. Burada iki veya daha fazla flavanol bileşiğinin polimerleşmesi gerçekleşmektedir.

İzoflavonoidler bazı meyve ve sebzelerde, başta soya fasulyesi olmak üzere yaygın olarak çeşitli baklagillerde bulunan bileşiklerdir. Son yıllarda yapılan klinik çalışmalar izoflavonoidlerin biyoaktif bileşikler olduklarını ve soya proteinleri ile birlikte kandaki kolesterol düzeyinin düşürülmesinde önemli rolleri olduğunu ortaya koymuştur. Yaygın olarak bilinen izoflavonoidler daidzein, glisitein ve genistein' dir.

Flavonoidler ve fenolik asitler baharatlarda bulunan antioksidan etkili başlıca bileşiklerdir. Sumak ile yapılan bir çalışmada yüksek antioksidan aktivite gözlemlenmiş ve antioksidan aktivitenin antosiyaninler ve proantosiyanidinlerden kaynaklandığı ortaya konmuştur.

Antosiyanin ekstraktlarının gıdalarda sadece renk düzenleyici olarak değil, aynı zamanda sağlık açısından faydalı bileşikler olduğu ve farmakolojik özellikleri nedeniyle çeşitli hastalıklarda tedavi etme amacıyla kullanıldığı bilinmektedir. Antosiyaninlerin arterioskleos, kanser riskini azaltma, kan dolaşımı bozukluklarında ve bazı göz hastalıklarında tedavi edici niteliği bulunduğu ortaya konulmuştur (Kurilich, A.C., vd., 2005).

Bazı araştırmalar sonucunda kateşinlerin antimitojenik ve antikarsinojenik aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir. Bu nedenle çay ekstraktları ve çay bileşenlerinin biyolojik aktivitelerinin incelenmesi için araştırmalar yürütülmektedir. Son yıllarda yürütülen flavonoid bileşiklerinin oksidatif DNA hasarını serbest radikal tutulması dışında mekanizmalarla önlediğini göstermektedir. Flavonoidlerin çoğu glutatyon-S transferazı (GST) aktive etme özelliği göstermektedir.

Genel olarak 'Flavonoidler' ve diğer bitki fenoliklerinin süperoksit, peroksil ve nitrik oksit gibi radikalleri temizleme, enzim aktivitelerini düzenleme, hücre çoğalmasını inhibe etme, demir ve bakır şelasyonu, μ -tokoferol rejenerasyonu foksiyonlarına ek olarak; vazodilatatör, antibiyotik, immünstimulan, antiallerjik, antidiyareik, antiülser, östrojenik,

antiviral ve daha birçok etkilerinin olduğu söylenebilir (Dillard, C.J. ve German, J.B., 2000; Rice-Evans, C.A., vd., 1996).

Flavonoidler serbest radikalleri temizleme, güçlü antioksidan olma özelliklerinin yanı sıra hidrolitik ve oksidatif enzimler olan fosfolipaz-A2, siklooksijenaz, lipooksijenazın inhibisyonu ile antiinflamatuvar özellik gösterirler. Ayrıca, ksantin oksidaz, glutatyon redüktaz, NADH-oksidad ve protein kinaz enzimlerini inhibe ettiklerine dair veriler mevcuttur (Çimen, Y. ve Burak, M., 1999).

Dünyada tedavi amaçlı olarak kullanılan bitki sayısının 20.000 civarında olduğu Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından rapor edilmiştir (Kalaycıoğlu ve Öner, 1994). Son zamanlarda bitkilerin maya, mantar ve bakterileri inhibe ettiği doğrulanmıştır (Shelef, 1983).

1.7. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) karışım içerisindeki bileşenlerin ayrılması, tanımlanması ve miktarlarının belirlenmesi amacıyla uygulanan kromatografik bir tekniktir. Uygulama alanları çok geniştir ve kimya, biyoloji, farmakoloji, gıda, çevre, gıda, endüstri vb. alanlarında ki uygulamaları örnek olarak verilebilir. (URL-8). HPLC tekniğinde enjektör portu, sıvı hareketli faz, katı sabit faz, pompa, dedektör ve bilgisayar bileşenleri bulunmaktadır. Enjektör portu, analiz edilecek karışımın sisteme yüklenmesini; sıvı hareketli faz, analizi yapılacak olan bileşenlerin taşınmasını; sabit faz, bileşenlerle etkileşme veya onları tutma özelliğine göre ayrılmalarını; pompa, sıvı hareketli fazın ve bileşenlerin kolona ve oradan dedektöre taşınmalarını; dedektör, bileşenlerin verdiği sinyalin ölçülmesini ve bilgisayar ise dedektörde ölçülen sinyalin kaydedilmesini sağlar. HPLC analizleri, sıvı hareketli fazla kolona taşınmaları ve kolonda farklı tutunma veya alıkonma zamanlarına göre ayrılmaları esasına dayanır.

Tipik bir HPLC çalışmasında lineer bir değişim kullanarak karıştırılan iki çözücü ve kolon boyunca belli bir akış hızı uygulanır. Çözücülerin değişikliği ve ilaveler ayırmanın seçiciliğini optimize etmek için kullanılır. Çözücülerin bulunduğu hareketli faz depoları kolonda ve dedektör sisteminde gaz oluşturarak bozucu etkilere sebep olan çözünmüş gazların (genellikle oksijen ve azot) giderilmesi için bir cihazla donatılmıştır (Skoog vd., 1998). Pompa yüksek basınçta sabit serbest-vuruş akışı sağlar ve ayırma esnasında çözücülerin çeşitli kompozisyonlarına programlanabilir. Akış hızı kolonun iç çapına

bağlıdır; kolonda küçük iç çapı küçük akış hızı gerektirir. Analitik HPLC için tipik olarak 0,5–5 mL/dk akış hızı 400 bar'a kadar çalışan pompalar tarafından üretilebilir. Sıvı hareketli faz iki tipte uygulanabilir; hareketli faz kompozisyonunun sabit tutulduğu izokritik akış ve değişken olduğu gradient elüsyon.

HPLC uygulamaları çalışma prensibine göre farklı türlere ayrılır. Bunlar dağılma kromatografisi, yer değiştirme kromatografisi, boyut-dışarlama kromatografisi, iyon değiştirici kromatografi ve biyoafinite kromatografisidir (URL-8). Dağılma kromatografisi hareketli ve sabit fazların bağıl polarlığına bağlı olarak iki temel forma ayrılabilir (Skoog, 1998). Normal faz (NP) kromatografisinde sabit faz polar, hareketli faz ise apolardır ve polarlığı yüksek olan analitler ilk elue edilirler. Ters faz kromatografisinde ise sabit faz apolar, hareketli faz ise polardır. Polaritesi yüksek olan analitler kolondan ilk önce ayrılırlar. HPLC uygulamalarının büyük bir kısmı ters faz tipinde çalışır. Ters faz kolonlar silikondan modifiye edilirler ve Oktıl (C8) ve Oktadesil (C18) en yaygın olarak kullanılan ters faz kolon tipleridir.

HPLC kolonlar (genelde 3-5 µm) dar bir boyut dağılımına sahip küçük partiküllerden oluşur ki bunlar apolar fonksiyonel grupların kullanımıyla modifiye edilirler. Kolon iç çapının küçük olması nedeniyle hareketli fazın pompa yardımıyla yüksek basınçta kolondan geçmesi gerekmektedir. Kolonlar laboratuarda hazırlanabilir ama genellikle ticari olarak hazır kolonlar satın alınarak kullanılır. Farklı boyutlarda analitik kolonlar kullanılabilir. Günümüzde 100–250 mm boyunda ve 3–5 mm iç çaplı 5 µm sabit faz materyaliyle kaplı kolonlar makul bir zamanda yeterli ayırım sağlamaktadır. Koruyucu kolon, HPLC sistemine analitik kolon öncesi takılı olarak, analitik kolonun tıkanıklık ve bozulmalardan korunması için kullanılmaktadır.

Son otuz yılı aşkındır pek çok LC detektörler çeşitli ilkelere dayandırılarak geliştirilmiştir. Fakat yine de yalnızca onlardan yaklaşık on iki tanesi LC analizleri için etkin bir şekilde kullanılır ve bunların da yalnızca dördü yaygın kullanımdadır. LC analizinde kullanılan baskın detektörler UV detektör (sabit ve değişebilen dalga boyu), refraktif indeks dedektörü, floresans dedektör ve kütle spektrometredir (URL-8).

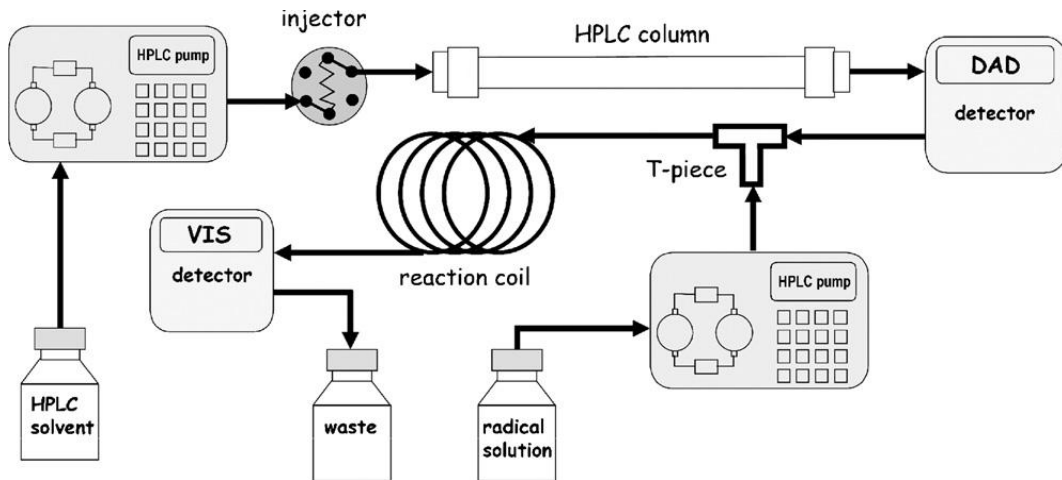
Ultraviole / Görünür Bölge Dedektörü (Ultraviole / Visible dedector - UV/Vis): Lambert-Beer yasası esasına göre çalışır. Spektrum taraması yapmak, farklı dalga boyunda çalışmak veya dalga boyunu zamana karşı programlamak mümkündür. Pek çok organik molekül ve fonksiyonel grup 190 nm'den 800 nm'ye kadar olan ultraviyole (UV) ve/veya görünür (Vis) alanda elektromagnetik enerji absorpsiyonu gerçekleştirir. Çözeltiden sürekli

1.7.1. On-line HPLC-FRAP Yöntemi

Antioksidan aktivite tayinlerinde son yıllarda kullanılmaya başlanan online antioksidan belirleme yöntemleri bilim adamları tarafından büyük ilgi görmektedir. On-line HPLC antioksidan aktivite yöntemi uygulamaların temelini HPLC ile ayrılan antioksidan bileşiklerin online-kemilüminesans ile aktivitelerinin ölçülmesi çalışması oluşturmaktadır. Bu yöntem daha sonraları Koleva ve arkadaşları tarafından geliştirilerek, farklı radikal çözeltileri kullanılmaya başlanmıştır (Koleva, I.I. vd., 2000; 2001).

Klasik HPLC uygulamalarında, HPLC cihazı için istenilen akış hızı ve hareketli faz bileşenleri için zamana bağlı değişim oranları programlanır ve numune çözeltisinin belli bir miktarı HPLC cihazına enjekte edilerek numune bileşenlerinin kolonda (sabit faz) alıkonma zamanlarına göre ayrılmaları gerçekleştirilerek, dedektörde sinyal ölçümü yapılır. Online-HPLC antioksidan tayini yöntemlerinde HPLC cihazına, kolon sonrası ikinci bir pompa (veya enjeksiyon pompası) bağlanarak sisteme radikal çözeltisi gönderilir ve numune ile karışması sağlanarak UV-Vis dedektörde istenilen dalga boyunda spektrum ölçülür ve kaydedilir.

Online HPLC-FRAP (FRAP: Demir (III) İndirgeme/ Antioksidan Kuvvet) yönteminde numune çözeltisinin HPLC cihazında ayrılmaları gerçekleştirilerek, kolon sonrasına bağlı enjeksiyon pompası ile sisteme FRAP çözeltisi gönderilir, numune ile karışması ve reaksiyon vermesi sağlanır. UV-Vis dedektörde 595 nm' de spektrum ölçülür ve kaydedilir (Arslan Burnaz, 2012).



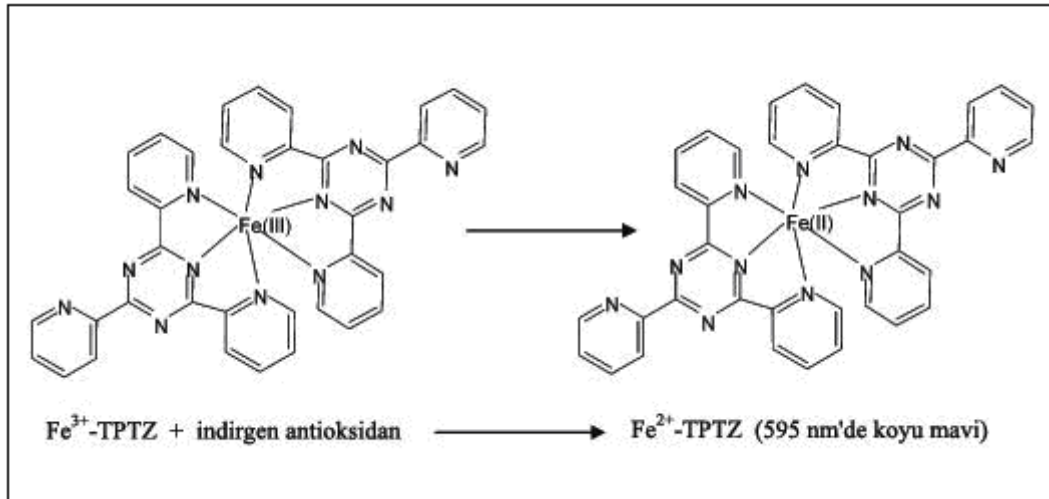
Şekil 13. On-line HPLC ile antioksidan tayini yöntemi için akış şeması.

1.8. Antioksidan Aktivite Belirleme Yöntemleri

1.8.1. Çalışmada Kullanılan Yöntemler

1.8.1.1. Demir (III) İndirgeme / Antioksidan Güç (FRAP) Yöntemi

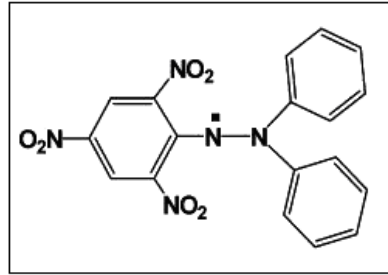
Oyaizu (1986) tarafından geliştirilen yönteme göre incelenen bileşen veya özütün toplam indirgeme potansiyelini göstermekte olup $Fe^{+3} \rightarrow Fe^{+2}$ indirgenmesi ile meydana gelen renk değişiminin 595 nm' de ölçülmesi ile belirlenir. Sonuçların yorumlanması için indirgeme potansiyeli yüksek ve aynı zamanda standart bir antioksidan madde olan askorbik asit ile karşılaştırılır. Fe(III) kaynağı olarak FRAP yönteminde genellikle 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ)'in Fe(III) tuzu kullanılmaktadır. Bu yöntemle redoks potansiyeli 0.7 V'tan daha düşük olan bileşiklerin antioksidan özelliği test edilebilmektedir. Bu yöntemde polifenolik antioksidanlarda hidroksilasyon ve konjugasyonun miktarı aktiviteyi etkilemektedir. FRAP yöntemi, elektron transferi esasına dayandığı için, H transferi ile radikal temizleyen özellikle tiyol ve proteinlerin antioksidan kapasitesini ölçmemektedir.



Şekil 14. Demir (III)'ün indirgenme reaksiyonu

1.8.1.2. DPPH• Radikali Temizleme Aktivitesi Yöntemi

DPPH• radikali (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ticari olarak satın alınabilen bir serbest radikaldir ve 517 nm'de maksimum absorbans vermektedir (Cuendet vd., 1997). Bu radikalin çözeltisi antioksidanlar içeren çözelti ile karıştırıldığı zaman DPPH•'dan kaynaklanan mor rengin şiddeti azalarak absorbans değerinde bir düşüşe neden olacaktır. Farklı numune konsantrasyonlarıyla muamele edilerek DPPH•'ın absorbansındaki bu değişimin ölçülmesi ile her bir numuneye karşılık gelen absorbansa karşı grafik çizilmektedir. Grafikten elde edilen $y=ax+b$ denkleminde DPPH• konsantrasyonunu yarıya düşüren numune miktarı $\mu\text{g/mL}$ cinsinden belirlenmektedir ve bu değer IC_{50} değeri olarak ifade edilmektedir. Bu yöntemin önemli bir dezavantajı, DPPH• radikalinin molekül yapısı nedeniyle molekül yapısı büyük olan antioksidanlar sterik engellenmeye maruz kalır ve bu nedenle inaktif olarak test edilmektedirler. Bu yöntem, radikal temizleme aktivite tayinlerinde kolaylığı ve kısa sürmesi nedeniyle sıklıkla kullanılmaktadır.



Şekil 15. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikalinin formülü

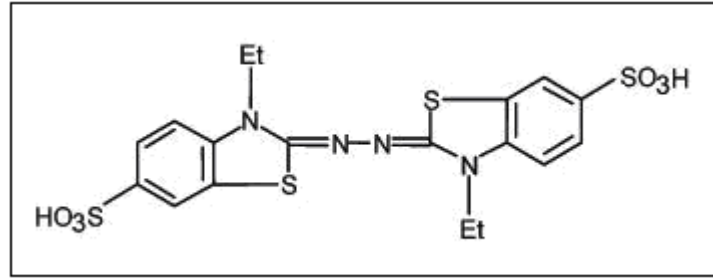
1.8.1.3. Toplam Fenolik Madde Tayini Yöntemi

Bu yöntem, suda ve diğer organik çözücülerde çözünmüş olan fenolik bileşiklerin Folin reaktifi ile alkali ortamda renkli kompleks oluşturması ve oluşan bu mor-menekşe renkli kompleksin 700 nm'de verdiği absorbansın ölçülmesi esasına dayanır (Slinkard ve Singleton, 1977). Sonuçların anlamlandırılması için fenolik bileşik olan kateşin ve gallik asit standart olarak kullanılır. Bu yöntem temelinde numunenin indirgeme kapasitesini ölçülmesi vardır. Yani, bir antioksidan tayin yöntemidir.

1.8.2. Diğer Antioksidan Aktivite Belirleme Yöntemleri

1.8.2.1. Trolox Eşdeğeri Antioksidan Kapasite (TEAC) Yöntem

Bu yöntem, ABTS^{•+}'nin kullanılarak çeşitli maddelerin antioksidan kapasitelerinin trolox eşdeğer kapasite cinsinden belirlenmesi esasına dayanır (Apak vd., 2004). Yöntemde, ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)) molekülünün H₂O₂ ve metmyoglobinle mavi-yeşil renkli ABTS^{•+} radikaline dönüşmesi ve bu dönüşümün 734 nm'de fotometrik olarak gözlenmesi esastır. Antioksidan bileşik olması durumunda bu dönüşüm olmamaktadır. Bu yöntem Özcan Erel (2004) tarafından geliştirilmiştir.



Şekil 16. 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS^{•+}) radikalinin formülü

1.8.2.2. Tiyosiyanat Yöntemi

Bu yöntem linolenik asit, Tween-20 ve fosfat tamponundan oluşan emülsiyon ortamında ki doymamış bir yağ asidi olan linolenik asidin 40 °C'de 140 saat oksijen ile inkübasyonunda oluşan lipid peroksidin miktarının ölçümü esasına dayanmaktadır. Absorbansın düşük çıkması yüksek antioksidan aktiviteyi, absorbansın yüksek çıkması ise düşük antioksidan aktiviteyi gösterir. Ortamda bir antioksidan madde olması halinde lipid peroksit ürünü oluşmaz ve konsantrasyonu, dolayısıyla absorbansı düşük çıkar.

1.8.2.3. Toplam Antioksidan Cevap (TAR) Tayin Yöntemi

Erel (2004) tarafından gerçekleştirilen bu yöntem, modifiye edilerek yapılmaktadır. Fe⁺²-o-dianisidin kompleksinin standardize çözeltisi, standardize H₂O₂ çözeltisi ile Fenton tipi bir reaksiyon vererek OH[•] radikalini oluşturur. Oluşan bu kuvvetli ROS (reactive

oxygen species = reaktif oksijen türleri) ler, kendi aralarında reaksiyona girerek büyük kompleksler oluşturur ve zincirleme oksidasyon reaksiyonları gerçekleşerek renk giderek koyulaşır. Fakat ortamda antioksidan özellik gösteren bir madde bu oksidasyon reaksiyonlarını durdurmaya çalışır ve dolayısıyla rengin de koyulaşmasını engeller. Bu reaksiyon spektrofotometri ile 444 nm’de gözlenir.

1.8.2.4. Floresans Sönme Zamanı Yöntemi

Chang vd. (2001) tarafından kullanılan yöntem modifiye edilmiştir. Silika jelden hazırlanmış ve flöresans özelliğe sahip aluminyum-silikajel tabakalar üzerine numune emdirilerek kurutulur. Sonra plaka linolenik asit emülsiyonuna daldırılarak tamamen kurutulur ve UV-lamba (254 nm) altında bekletilir. Bu sırada oksijenin de etkisi ile linolenik asit emülsiyonunda önce kararmalar ve sonra parlak lekeler oluşur. Oluşan bu parlak lekelerin kaybolma zamanı antioksidan maddenin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

1.8.2.5. MDA Oluşumunun İnhibisyonu Yöntemi

Yöntem, karaciğer doku homojenatı, Fe^{+2} ve C vitamini muamele edilerek oluşturulan Fenton reaksiyon karışımında ortaya çıkan ve bir lipid peroksit ürünü olan MDA'nın sıcak ve asidik ortamda tiyobarbiturik asit ile renkli kompleks oluşturması esasına dayanır. Oluşan bu renkli kompleks 532 nm'de maksimum absorban oluşturur. Tayinde antioksidan aktivite köre göre MDA oluşumunu %50 inhibe eden madde miktarları (IC_{50}) cinsinden verilir.

1.8.2.6. Oksijen Radikali Absorbans Kapasitesi (ORAC) Yöntemi

Bu yöntem β -fikoeritrin (β -phycoerythrin [β -PE]) adlı bir prob maddesinin floresansının, peroksil ve hidroksil radikalleri varlığında sönüme uğraması ve ortamdaki antioksidanların bu olayı geciktirmesi esasına dayanır. Peroksil radikalinin uğrattığı hasar arttıkça β -PE’ den kaynaklanan floresansta azalış gerçekleşir. Numunede bulunan

antioksidan madde floresanstaki bu düşüşü yavaşlatmakta ya da durdurmaktadır (Apak vd., 2004).

1.8.2.7. Bakır (II) İndirgeme Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi

Cu(II)-neokuproin reaktifinin numunede bulunan antioksidanları yükseltgemesi ve reaksiyon ürünü Cu(I)-neokuprin kelatının 450 nm'deki absorbansının ölçülmesi esasına dayanır. Yöntem, tiyol (-SH) tipi antioksidanlarla çabuk ve net sonuçlara ulaşır. CUPRAC, fizyolojik pH'lara yakın olan pH=7 ortamında yürütülür; dolayısıyla fizyolojik koşulları yansıtmaya şansı daha fazladır. Uygun çözücü seçimiyle hem hidrofilik, hem de lipofilik antioksidanların analizinde kullanılabilir (Apak vd., 2005).

1.9. Antimikrobiyal Maddeler ve Genel Özellikleri

20. yüzyılın başlarına kadar insan organizmasına zarar vermeden mikroorganizmaları etkilemenin imkansız olduğu düşünülüyordu. M.Ö 2500 yıllarında bilincinde olmadan antimikrobik tedavi yöntemleri kullanılmış ve bu devirde enfeksiyon hastalıkları tedavisinde kullanılan bitki kökleri, şarap ve küf gibi maddeler olumlu sonuçlar vermiştir.

1600'lü yıllarda Güney Amerika'da, insanlar cinchora bitkisinin kabuğunu yiyerek sıtımadan korunmuşlar, ipeka bitkisinin kök ekstresini kullanarak amipli dizanteri hastalığını tedavi etmişlerdir. Cinchora bitkisinin kabuğunda kinin, ipeka bitkisinin köklerinde ise emetin bulunduğu belirlenmiştir. 20. yüzyıldan itibaren patojen mikroorganizmalar hakkında bilgiler arttıkça enfeksiyon hastalıkları ile savaş da bilinçli olarak sürdürülmüştür.

1854-1915 yılları arasında Paul Ehrlich, bir arsenik bileşiği olan arsfenamin ile sifilizi, tripan kırmızısı boyası ile Afrika uyku hastalığını tedavi etmeyi başarmıştır. 1927 yıllarında Almanya'da kimya endüstrisi alanında çalışan Gerhard Domagk ve ekibi, çeşitli boyaların patojen bakterilere etkinliğini ve hayvanlardaki toksik etkisini araştırmaları sırasında, deri boyamada kullanılan prontosil kırmızısı adlı boyanın hayvanlara toksik olmadığını, stafilokok ve streptokoklara etkili olduğunu saptamışlardır ve bu bulgunun 1935 yılında yayınlanmasından bir yıl sonra prontosil kırmızısının vücutta sülfanilamide dönüştüğü ve antibakteriyel aktiviteyi bu maddenin sağladığı anlaşılmıştır.

1929 yılında S. Alexander Fleming tarafından bulunan ve bu yıllarda toksik etkileri nedeniyle kullanım alanına giremeyen penisilin 1940 yılında kullanılır hale Ernest Chain ve Howard Florey tarafından getirilmiştir. Penisilin 2. Dünya Savaşı'nda yara enfeksiyonlu birçok askerin hayatını kurtarmıştır. Son yıllarda antibakteriyel etki alanı daha genişlemiş ve toksik etkisi az olan, mikroorganizmaları öldürücü ya da mikroorganizmaların üremesini durdurucu etki gösteren birçok antibiyotik ve antibiyotiklerle benzer özelliklere sahip olup tümüyle sentetik olan (kimyasal yolla sentez edilen) kemoterapötik maddeler üretilmiştir.

Antimikrobiyal bir maddede olması gereken en önemli özellik seçici toksisitedir. Kemoterapide kullanılan antimikrobiyal madde düşük konsantrasyonlar da bile etkili olup çok az toksik olmalıdır. Böyle bir etkinin ortaya çıkabilmesi için antimikrobiyal maddenin hedef olarak memeli hücrelerinden çok mikroorganizmalar seçilmelidir. Bakteriler prokaryot, memeli hücreler ökaryottur. Prokaryot hücrede var olan, ancak ökaryot hücrede bulunmayan bir molekülü hedefleyen antimikrobiyal maddeler (örneğin; sefalosporinler, sülfonamidler) yüksek derecede seçici toksisiteye sahiptir. Virüsler konak hücreye integre olduklarından, konağa zarar vermeden virüsü etkilemek olanaksızdır. Virüslere etkili ilaçların seçici toksitesinden hiç söz edilemez. Mantarlarda ökaryot hücre yapısında ve memeli hücrelerine benzerler. Bu nedenle antimikrobiyal maddeler için seçici toksiteden söz edilemez.

Antimikrobiyal maddeler etkili olabildikleri mikroorganizma cins sayısının az yada çok oluşuna bağlı olarak, dar yada geniş spektrumlu şeklinde tanımlanır. En dar spekturumlu maddeler enfeksiyona neden olan mikroorganizma üzerine etkili ve tedavide ideal antimikrobiyal maddeler olarak kabul edilir. Geniş spektrumlu antimikrobiyal maddeler konağın doğal bağışıklığında önemli rol oynayan ve ekolojik dengeyi sağlayan normal mikroorganizma florasını bozar. Fakat birçok patojenin birlikte etken olduğu enfeksiyonlarda yada mikrobiyoloji laboratuvarı sonuçlarının beklenemeyeceği acil durumlarda geniş spektrumlu antimikrobiyal maddeler (karbapenemler, kinolonlar) kullanılır. Bazı bakteri ve mantar türleri tarafından oluşturulan, mikrobisid veya mikrobiyostatik etki gösteren maddelere antibiyotik denir. Mikrobisid maddeler mikroorganizmaları öldürücü, mikrobiyostatik maddeler ise mikroorganizmaların üremesini durdurucu etki gösterirler.

Antibakteriyel maddeler bakteriler üzerine beş farklı yoldan etki eder:

1-) Hücre duvarı sentezinin inhibisyonu

-Beta-laktam antibiyotikler, penisilinler, glikopeptid antibiyotikler

2-) Sitoplazma zarının fonksiyon ve yapısının bozulması

-Polimksinler

3-) Protein sentezinin inhibisyonu

-Amino glikozidler, tetrasiklinler, kloramfenikol, makrolid antibiyotikler

4-) Nükleik asit sentez ve fonksiyonlarının bozulması

-Kinonlar, rifamisin, nitrofurantoin

5-) Kimyasal yapıdaki benzerlik yolu ile metabolizmanın bozulması

-Sülfonamidler

1.9.1. Antimikrobiyal Tayin Yöntemleri

Günümüzde enfeksiyon hastalıkları, enfeksiyon etkeninin duyarlı bulunduğu en uygun antimikrobiyal madde ile tedavi edilir. Bunun için de, o hastalıkta etken mikroorganizmanın antibiyotiklere karşı gösterdiği duyarlılık deneyi sonuçlarından faydalanılır. Mikroorganizmaların antibiyotik duyarlılığı, temelde iki farklı tayin yöntemi ile belirlenebilir:

1. Dilüsyon Yöntemi

2. Difüzyon Yöntemi

Dilüsyon yöntemi; antibiyotiklerin sıvı veya katı besiyerlerinde (agarlarda) bir seri halinde seyreltilmesi ve her bir seyreltme ortamına, duyarlılığı belirlenecek bakterinin belirli sayıda hücre içeren süspansiyonundan eşit miktarda ilave edilmesidir. Deney serileri uygun sıcaklıkta (35-37 °C'de) ve bakterinin üremesi için uygun süre (16-20 saat) bekletildikten sonra sonuçlar ile bakterinin üremesini durduran en az antibiyotik miktarı (minimum inhibisyon konsantrasyonu, MIC) belirlenir.

Difüzyon yönteminin esası belirli konsantrasyondaki antibiyotiklerin katı besiyerine difüze olması yani yayılmasıdır. Antibiyotikler genellikle kağıt disklere belli konsantrasyonlarda emdirilir ve bunlar antibiyotik kaynağı olarak kullanılır. Bu yöntem disk-difüzyon yöntemi olarak adlandırılır. Dilüsyon yönteminden farkı antimikrobiyal maddelerin bir tek konsantrasyonunun etkinliği denir.

Disk-difüzyon yöntemine benzeyen, minimum inhibitör konsantrasyonu (MIC) belirlenmesini sağlayan E-testi (Dereceli antibiyotik şeridi yöntemi) kantitatif yöntem olarak kullanılır.

1.10. Karbonik Anhidraz (CA) Enzimi

Karbonik anhidraz enzimi (CA, EC 4.2.1.1) mikroorganizmalardan, yüksek yapılı canlılara kadar organizmalarda bulunan bir enzimdir. Organizmada; CO₂ taşınması, üre döngüsü, asit-baz dengesinin düzenlenmesi, elektrolit sekresyonu, sindirim, hücrelerdeki iyon değişimi gibi olaylarda rol alır. CA insan kanında CO₂'in iki yönlü ve iki basamaklı reaksiyon sonucunda HCO₃⁻ ve H⁺ oluşturmak üzere katalizini gerçekleştirir. Fizyolojik anyon değişimi sürecinde önemli bir rol oynar.

Karbonik anhidraz (II) safra kanalları, pankreatik kanallar, renal tübüler ve tükürük bezi kanallarının epitelyum hücrelerinde bol miktarlarda sentezlenir. Canlılarda α , β ve γ olmak üzere 3 farklı karbonik anhidraz karakterize edilmiştir. Memelilerde α bulunur. Doku dağılımları, hücre içi yerleşimleri ve kinetik özellikleri farklı olan 14 karbonik anhidraz izoenzimi mevcuttur. Çeşitli hastalıklarla doğrudan ilişkilidir. Karbonik anhidraz izoenzimleri Tablo 2.'de verilmiştir.

Tablo 2. Karbonik anhidraz izoenzimleri

İzoenzim	Hidrataz Aktivitesi	Hücre İçi Yerleşim
CA-I	Düşük	Sitozol
CA-II	Yüksek	Sitozol
CA-III	Çok Düşük	Sitozol
CA-IV	Yüksek	Plazma membranı
CA-V	Orta-Yüksek	Mitokondri
CA-VI	Orta	Tükürük
CA-VII	Yüksek	Sitozol
CARP-VIII	Yok	Sitozol
CA-IX	Yüksek	Plazma membranı
CARP-X	Yok	Sitozol
CA-XI	Yok	Sitozol
CA-XII	Düşük	Plazma membranı
CA-XIII	Düşük	Sitozol
CA-XIV	Yüksek	Plazma membranı

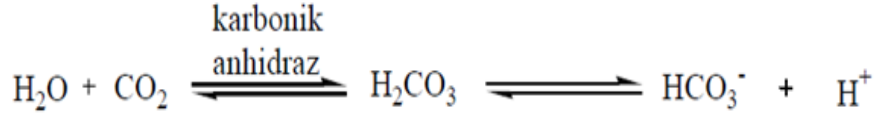
Karbonik anhidraz enziminin literatürde hidrataz ve esteraz olmak üzere iki aktivitesi bulunmaktadır. CA enzim aktiviteleri belirlenmesi amacıyla hidrataz ve esteraz aktivitesi ölçümleri yapılır. Hidrataz aktivitesi tayini yöntemi, ortamda substrat olarak bulunan CO₂'in hidrasyonu sonucu açığa çıkan H⁺ iyonunun ortamın pH' sını 10'dan 7,4'e düşürmesi için geçen sürenin ölçülmesi esasına dayanır.

$$E\ddot{U} = \frac{t_0 - t_n}{t_n}$$

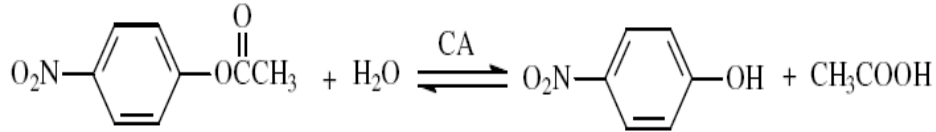
EÜ: Enzim ünitesi

t₀: Enzimsiz denemede ölçülen süre

t_n: Numune varlığında ölçülen süre



Esteraz aktivitesi tayini yöntemi; karbonik anhidraz, substratı olan *p*-nitrofenil asetatı hidroliz ederek oluşan *p*-nitrofenol ve *p*-nitrofenolat iyonunun 348 nm'de verdiği absorpsiyonun ölçülmesi ve buradan aktivitenin hesaplanması esasına dayanır.



1.10.1. Karbonik Anhidraz (CA) Enzimi İnhibitörleri ve Uygulama Alanları

Karbonik anhidraz inhibitörleri aromatik ve heterosiklik sülfonamidler, asetazolamidler, metazolamidler, dorzolamidler ve metal kompleks anyonlarıdır.

Asetazolamidler çoğunlukla glokom hastalığında, epilepsi, idiyopatik intrakranial hipertansiyon, rakıma bağlı rahatsızlıklarda kullanılmaktadır.

Karbonik anhidraz enzimi inhibitörleri tıpta anti-glakom, anti-tiroid, ve antikanser özellikleriyle kullanılmaktadır. Günümüzde glokom hastalığında göz tansiyonunun düşürülmesi amacıyla karbonik anhidraz inhibitörleri kullanılmaktadır. Bu bileşikler dorzolamid ve brinzolamiddir. Karbonik anhidraz inhibitörleri ayrıca epilepsi ve diğer bazı nörolojik hastalıklar, gastrit, yüksek seviyede idrar söktürücü özelliğiyle, osteoporozda ve tümör tedavisinde kullanılmaktadır.

Karbonik anhidraz inhibitörleri aynı zamanda PET ve MRI görüntüleme sistemlerinin gelişmesinde gelecek vadeden ve çalışma konusu olan bileşiklerdir. Sülfonamidler birçok bakterinin gelişmesini durdurmaktadır ve sıtma mikrobuunun karbonik anhidraz aktivitelerini inhibe ederek öldürülmesinde kullanılması amaçlanmaktadır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Cihazlar

Çalışmalarda kullanılan madde ve malzemeler KTÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü laboratuvarlarından temin edildi. Kullanılan cihazlar ve satın alındıkları firmaları gösteren bilgiler Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 3. Çalışmalarda kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Markası
Öğütücü (Blender)	Waring Commercial Blender /New hartford, conn. USA.
UV spetrofotometre	Unicam, UV-Vis
Rotary vakum evaporatör	Bibby RE100
Su banyosu	Bibby RE 100
Etüv	Binder, Germany
Magnetik karıştırıcı ısıtıcı	Heidolph MR 3001 K
Terazi	Mettler Toledo – MS204S
Kurutma makinesi	Fantom
Vakum pompası	BUCHI Vacuum Pump V-700
Derin dondurucu	Vestel
Vorteks (karıştırıcı)	IKA-Vortex (Genius 3)
Santrifüj	Universal 320 R Hettich/Zentrifugen
Soğutucu	Polyscience (temperature controller)
pH metre	Hanna pH211
HPLC Cihazı	Agilent 1100

2.2. Kullanılan Kimyasallar

Çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve satın alındıkları firmaların ticari adları Tablo 3.'de verilmiştir. Çalışmalarda kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları Tablo 4.'de verilmiştir.

Tablo 4. Çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve satın alındıkları firmalar

Madde Adı	Firması
Asetik asit	Carlo Erba
Metanol	Merck, Sigma- Aldrich
Etil Asetat	Sigma- Aldrich
Etanol	Sigma- Aldrich
DPPH	Calbiochem
HCl	Merck
Fe ₃ Cl ₃	Sigma- Aldrich
Fe ₃ Cl ₃ .6H ₂ O	Sigma- Aldrich
Folin-Ciocalteu Reaktifi	Fluka
Gallik asit	Sigma- Aldrich
Kateşin	Sigma- Aldrich
BHT	Merck
Na ₂ CO ₃	Merck
NaOH	Merck
TPTZ	Fluka
Trolox®	Sigma- Aldrich
Asetazolamid	Sigma- Aldrich
Sülfanilamid	Sigma- Aldrich
<i>p</i> -nitrofenil asetat	Sigma- Aldrich

Tablo 5. Çalışmalarda kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları

Çözelti	Hazırlanışı
0.2 N Folin-Ciocalteu Reaktifi	2N'lik hazır satın alınan çözeltilerden saf su ile 1:10 oranında seyreltilerek hazırlanır.
%7,5'lik Na ₂ CO ₃ çözeltisi	7,5g Na ₂ CO ₃ 100 mL saf suda çözülerek hazırlanır.
Stok Kateşin çözeltisi	10 mg kateşin 10 mL saf suda çözülür (1mg/ml).
Stok Gallik asit çözeltisi	10 mg gallik asit 10 mL metanolde çözülür (1mg/ml).
100 µM DPPH çözeltisi	0,0029 mg DPPH 100 mL metanolde çözülür.
Stok Troloks® çözeltisi	10 mg trolox 10 mL etanolde çözülür (1 mg/mL).
Stok Askorbik asit (C vitamini)	10mg askorbik asit 10 mL saf suda çözülür (1mg/mL).
3mM p-nitrofenolasetat	108 mg PNFA tartılıp, 4 mL asetonda çözülür. Manyetik karıştırıcıda hızla karışan 196 mL saf su üzerine yavaşça damlatılır.
10 mM asetazolamid çözeltisi	0,0045 g tartılıp 2 mL asetonitrilde çözülür. Daha sonra 40 µM'a asetonitril ile seyreltilir. (10 mM çözeltiden 100 µL → 1000 µL; bu çözeltiden 100 µL → 2500 µL)
0,1 M NaOH (A)	0,100 g NaOH 25 mL saf suda çözülür (0,1 M).
10 mM TPTZ (B)	0,0468 g TPTZ, 40 mM 25 mL HCl'de çözülür.
20 mM Fe ₃ Cl ₃ .6H ₂ O (C)	0,0811 g Fe ₃ Cl ₃ .6H ₂ O 6 mL saf su ve 9 mL metanolde çözülür.
FRAP reaktifi	A, B ve C çözeltileri sırasıyla; 10:1:1 oranında karıştırılır. (FRAP reaktifi taze hazırlanmalı ve kullanımdan önce 37 °C'ye ısıtılmalıdır.)

2.3. Bitkilerin Toplanması ve Ekstraktların Hazırlanması

Çalışmalarda kullanılmak üzere Eylül 2011'de Zonguldak ilinin Gökçebey ilçesinden tek bir ağaçtan ve Gümüşhane ili dağlık alanda 8 farklı ağaçtan kuşburnu bitkisinin meyve dal ve yaprak kısımları toplandı ve önce musluk suyu ile sonra birkaç defa saf su ile iyice yıkandı. Açık hava da kurumaya bırakıldı. Meyve kısımları bünyesinde bulunan çekirdekler çıkarılarak meyvenin iç kısmında ve çekirdekte bulunan tüyler giderildi. Dal kısımları sonradan blender ile parçalama işleminin daha kolay yapılabilmesi için ağaç

makası ile kesilebilecek en küçük parçalara ayrıldı (yaklaşık 0.5 cm boyunda). Bu işlemlerin ardından her bir ağaçtan elde edilen meyve, dal, yaprak ve çekirdek kısımları 40 °C’de etüvde kurumaya bırakıldı. Günlük ağırlıkta meydana gelen değişimler (24 saat ara ile) terazi ile ölçüldü. Kuru ağırlığa ulaşan meyve dal ve yaprak kısımları blender vasıtasıyla toz hale gelecek şekilde öğütüldü. Kuşburnu çekirdekleri çok sert olması nedeniyle önce iki metal plaka arasında ezildi ve sonrasında blender ile öğütüldü. Her numuneye kod verildi ve ekstraksiyon işlemi için paketlenerek oda şartlarında saklandı.

2.3.1. Katı-Sıvı Ekstraksiyonu

Katı-sıvı ekstraksiyon, başlıca doğal ve biyolojik örneklerle ilgili uygulamalarda kullanılır. Katı-sıvı ekstraksiyonunda katının içerdiği maddelerden biri veya bir bölümü uygun bir çözücüyle ekstrakte edilir. Maddenin katı içinden diffüzenmesi yavaş bir işlem olduğu için katı örnek ince toz haline dönüştürüldükten sonra ekstrakte edilmelidir. Böylece maddenin çözücü ile daha fazla teması sağlanır. Katı-sıvı ekstraksiyon işleminde katı numune istenen çözücü içerisinde ve istenen sıcaklıkta, karıştırıcılı geri soğutma düzeneği kullanılarak yapılabilir. Ekstraksiyon işlemi için 5 g toz halindeki numune alındı ve 50 mL ekstraksiyon çözücüsü ile 60 °C’de, 600 rpm karışma hızında ve geri soğutucu altında 2 saat süre ile ekstrakte edildi. Ekstraksiyon işlemleri için 3 farklı çözücü kullanılmıştır; su, metanol ve etil asetat. Bu şekilde 9 farklı ağaç, 4 farklı kısım ve 3 farklı çözücü ile toplam 108 tane ekstraksiyon işlemi yapıldı.

Ekstraksiyon sonrası önce adi süzgeç kağıdı yardımı ile katı kısımlar uzaklaştırıldı. Sonrasında önce mavi bant süzgeç kağıdı ve ardından 0.45 µm’lik filtreden geçirilerek bütün çözeltilerin berraklaştırılması sağlandı. Yaprak kısımlarının su ile ekstraksiyonu sonrasında filtreden geçirme işlemleri öncesinde santrifüj uygulandı ve daha sonra filtreden geçirilerek berrak çözeltiler elde edildi. Berrak çözeltiler daha sonra çözücüleri uçurularak numune konsantrasyonunun belirlenmesi işlemi yapılanaya kadar şişelere konularak derin dondurucuda saklandı.

2.3.2. Çözücülerinin Uçurulması ve Konsantrasyonu Belli Stok Çözeltilerin Hazırlanması

Analizlerde kullanılacak olan numunelerin konsantrasyonunun bilinmesi sonuçların değerlendirilmesi açısından önemlidir. Bu amaçla ekstraksiyon işlemi ile çözücü kısmına ne kadar maddenin alındığının tespit edilmesi için rotary (dönerli) evaporatör düzeneği kullanılmıştır. Belli bir miktar çözelti daha önceden darası alınmış balona alınarak balon su banyosu içerisinde olacak şekilde- dönerli evaporatör düzeneğine takıldı ve sistem vakum pompasına bağlı şekilde çözücüler kuruluğa kadar uçuruldu. Su banyosunun sıcaklığı ekstraksiyon işlemindeki sıcaklıkla aynı olacak şekilde 60 °C'ye ayarlanmıştır.

Çözücüsü uçurulduktan sonra balon tartıldı ve balonun darası bu ağırlıktan düşülerek Ekstraksiyon sonucu elde edilen kuru madde miktarı belirlendi. Daha sonra bu ağırlığa göre konsantrasyonu belli stok çözeltiler hazırlandı. Bu stok çözeltilerden de testlerde kullanılmak üzere 1 mg/mL konsantrasyona seyreltilerek (10'ar mL'lik) numuneler ependorflara konuldu ve derin dondurucuda saklandı.

Tablo 6. Numune kodları ve açıklamaları

Kodu	Yer	Açıklama	
1MS	Gümüşhane	1 Nolu ağacın meyve kısmının	sulu ekstraktı
1MM	"	"	metanollü ekstraktı
1ME	"	"	etil asetatlı ekstraktı
1DS	"	1 Nolu ağacın dal kısmının	sulu ekstraktı
1DM	"	"	metanollü ekstraktı
1DE	"	"	etil asetatlı ekstraktı
1YS	"	1 Nolu ağacın yaprak kısmının	sulu ekstraktı
1YM	"	"	metanollü ekstraktı
1YE	"	"	etil asetatlı ekstraktı
1ÇS	"	1 Nolu ağacın çekirdek kısmının	sulu ekstraktı
1ÇM	"	"	metanollü ekstraktı
1ÇE	"	"	etil asetatlı ekstraktı
2MS	"	2 Nolu ağacın meyve kısmının	sulu ekstraktı
2MM	"	"	metanollü ekstraktı
2ME	"	"	etil asetatlı ekstraktı
2DS	"	2 Nolu ağacın dal kısmının	sulu ekstraktı
2DM	"	"	metanollü ekstraktı
2DE	"	"	etil asetatlı ekstraktı
2YS	"	2 Nolu ağacın yaprak kısmının	sulu ekstraktı
2YM	"	"	metanollü ekstraktı

Tablo 6'nın devamı

2YE	"	"	etil asetatlı ekstraktı
2ÇS	"	2 Nolu ağacın çekirdek kısmının	sulu ekstraktı
2ÇM	"	"	metanollü ekstraktı
2ÇE	"	"	etil asetatlı ekstraktı
3MS	"	3 Nolu ağacın meyve kısmının	sulu ekstraktı
3MM	"	"	metanollü ekstraktı
3ME	"	"	etil asetatlı ekstraktı
3DS	"	3 Nolu ağacın dal kısmının	sulu ekstraktı
3DM	"	"	metanollü ekstraktı
3DE	"	"	etil asetatlı ekstraktı
3YS	"	3 Nolu ağacın yaprak kısmının	sulu ekstraktı
3YM	"	"	metanollü ekstraktı
3YE	"	"	etil asetatlı ekstraktı
3ÇS	"	3 Nolu ağacın çekirdek kısmının	sulu ekstraktı
3ÇM	"	"	metanollü ekstraktı
3ÇE	"	"	etil asetatlı ekstraktı
4MS	Gümüşhane	4 Nolu ağacın meyve kısmının	sulu ekstraktı
4MM	"	"	metanollü ekstraktı
4ME	"	"	etil asetatlı ekstraktı
4DS	"	4 Nolu ağacın dal kısmının	sulu ekstraktı
4DM	"	"	metanollü ekstraktı
4DE	"	"	etil asetatlı ekstraktı
4YS	"	4 Nolu ağacın yaprak kısmının	sulu ekstraktı
4YM	"	"	metanollü ekstraktı
4YE	"	"	etil asetatlı ekstraktı
4ÇS	"	4 Nolu ağacın çekirdek kısmının	sulu ekstraktı
4ÇM	"	"	metanollü ekstraktı
4ÇE	"	"	etil asetatlı ekstraktı
5MS	Gümüşhane	5 Nolu ağacın meyve kısmının	sulu ekstraktı
5MM	"	"	metanollü ekstraktı
5ME	"	"	etil asetatlı ekstraktı
5DS	"	5 Nolu ağacın dal kısmının	sulu ekstraktı
5DM	"	"	metanollü ekstraktı
5DE	"	"	etil asetatlı ekstraktı
5YS	"	5 Nolu ağacın yaprak kısmının	sulu ekstraktı
5YM	"	"	metanollü ekstraktı
5YE	"	"	etil asetatlı ekstraktı
5ÇS	"	5 Nolu ağacın çekirdek kısmının	sulu ekstraktı
5ÇM	"	"	metanollü ekstraktı
5ÇE	"	"	etil asetatlı ekstraktı
6MS	Gümüşhane	6 Nolu ağacın meyve kısmının	sulu ekstraktı
6MM	"	"	metanollü ekstraktı

Tablo 6.'nın devamı,

6ME	"	"	etil asetatlı ekstraktı
6DS	"	1 Nolu ağacın dal kısmının	sulu ekstraktı
6DM	"	"	metanollü ekstraktı
6DE	"	"	etil asetatlı ekstraktı
6YS	"	6 Nolu ağacın yaprak kısmının	sulu ekstraktı
6YM	"	"	metanollü ekstraktı
6YE	"	"	etil asetatlı ekstraktı
6ÇS	"	6 Nolu ağacın çekirdek kısmının	sulu ekstraktı
6ÇM	"	"	metanollü ekstraktı
6ÇE	"	"	etil asetatlı ekstraktı
7MS	Gümüşhane	7 Nolu ağacın meyve kısmının	sulu ekstraktı
7MM	"	"	metanollü ekstraktı
7ME	"	"	etil asetatlı ekstraktı
7DS	"	7 Nolu ağacın dal kısmının	sulu ekstraktı
7YM	"	"	metanollü ekstraktı
7DE	"	"	etil asetatlı ekstraktı
7YS	"	7 Nolu ağacın yaprak kısmının	sulu ekstraktı
7YM	"	"	metanollü ekstraktı
7YE	"	"	etil asetatlı ekstraktı
7ÇS	"	7 Nolu ağacın çekirdek kısmının	sulu ekstraktı
7ÇM	"	"	metanollü ekstraktı
7ÇE	"	"	etil asetatlı ekstraktı
8MS	Gümüşhane	8 Nolu ağacın meyve kısmının	sulu ekstraktı
8MM	"	"	metanollü ekstraktı
8ME	"	"	etil asetatlı ekstraktı
8DS	"	8 Nolu ağacın dal kısmının	sulu ekstraktı
8DM	"	"	metanollü ekstraktı
8DE	"	"	etil asetatlı ekstraktı
8YS	"	8 Nolu ağacın yaprak kısmının	sulu ekstraktı
8YM	"	"	metanollü ekstraktı
8YE	"	"	etil asetatlı ekstraktı
8ÇS	"	8 Nolu ağacın çekirdek kısmının	sulu ekstraktı
8ÇM	"	"	metanollü ekstraktı
8ÇE	"	"	etil asetatlı ekstraktı
ZMS	Zonguldak	Meyve kısmının	sulu ekstraktı
ZMM	"	"	metanollü ekstraktı
ZME	"	"	etil asetatlı ekstraktı
ZDS	"	Dal kısmının	sulu ekstraktı
ZDM	"	"	metanollü ekstraktı
ZDE	"	"	etil asetatlı ekstraktı
ZYS	"	Yaprak kısmının	sulu ekstraktı
ZYM	"	"	metanollü ekstraktı

Tablo 6.'nın devamı,

ZYE	"	"	etil asetatlı ekstraktı
ZÇS	"	Çekirdek kısmının	sulu ekstraktı
ZÇM	"	"	metanollü ekstraktı
ZÇE	"	"	etil asetatlı ekstraktı

2.4. Antioksidan Aktivitelerin Belirlenmesi

2.4.1. Demir (III) İndirgeme / Antioksidan Kuvvet (FRAP) Değerleri

Oyaizu (1986) tarafından geliştirilen yöntemle göre indirgeme kuvveti, numunelerin dolaylı olarak toplam indirgeme potansiyelini göstermekte olup $Fe^{+3} \rightarrow Fe^{+2}$ indirgenmesi ile meydana gelen Fe^{+2} , 595 nm'de absorbans veren Fe (II)-TPTZ mavi renkli kompleksini oluşturur. Bu yöntem (metanollü, sulu ve etil asetatlı) tüm numunelere uygulandı. Verilerin değerlendirilmesinde kullanılan trolox' un 5 farklı konsantrasyonda (1000 μ M, 500 μ M, 250 μ M, 125 μ M ve 62,5 μ M) çözeltileri hazırlandı.

Her bir numune ve standart konsantrasyonu için üç tane paralel, bir tane numune körü ve bir tane reaktif körü olmak üzere toplam 5 tüp kullanıldı. Üçlü paralellere ve numune körü tüpüne 50'şer μ L numune ve standart çözeltisi pipetlendi. Reaktif körü sırasına 50 μ L numune yerine çözücüsü (metanol, su, etil asetat) aynı şekilde standart içinde çözücüsü (etanol) konuldu. Bu şekilde tüplükler hazırlandıktan sonra FRAP reaktifi taze olarak hazırlandı. Spektrofotometre çalıştırıldı ve dalga boyu 595 nm' ye ayarlandı. Kronometre ayarlanarak 20 sn arayla üçlü numune paraleli ve reaktif körü sırasına 1.5 mL FRAP reaktifi pipetlendi. Numune körü tüplerine FRAP reaktifi yerine 1.5 mL çözücüsü (2:3 metanol-saf su). Her pipetleme sonrasında tüpler vortekslendi ve 20 dakika bekletildi. Bekleme süresinden sonra ilk pipetlenen tüpten başlanarak 20. dakikası dolan tüp alınıp, plastik küvete aktarıldı ve absorbans 595 nm'de 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.

$$\text{FRAP değeri} = (\text{Numune absorbansının karşılık geldiği [Troloks]}) \mu\text{M}$$

*FRAP reaktifinin hazırlanışı:*A: 150 mL 300 mM asetat tamponu (pH=3.6); 45 mmol asetik asit (derişik) alınır, hacim saf su ile 40 mL' ye tamamlanır ve üzerine 90 mL metanol ilave edilir. 0.5 M NaOH ile pH=3.6' ya ayarlanır ve son hacim 150 mL' ye saf su ile tamamlanır. B: 15 mL 10 mM [2,4,6-Tris(2-pridyl)-s-triazine (TPTZ, MA: 312.33 g/mol) nin 100 mM HCl' deki çözeltisi; 0.0468 g TPTZ tartılır, 6 mL 100 mM HCl ve 9 mL metanol ile çözülür. C: 15 mL 20 mM FeCl₃.6H₂O; 0.0811 g FeCl₃.6H₂O 6 mL saf suda çözülür ve üzerine 9 mL metanol ilave edilir. A, B ve C çözeltileri taze hazırlandıktan sonra, A çözeltisi karıştır haldeyken üzerine önce B çözeltisi sonra da yavaş yavaş C çözeltisi ilave edilir.

2.4.2. DPPH[•] Radikal Temizleme Aktivitesi

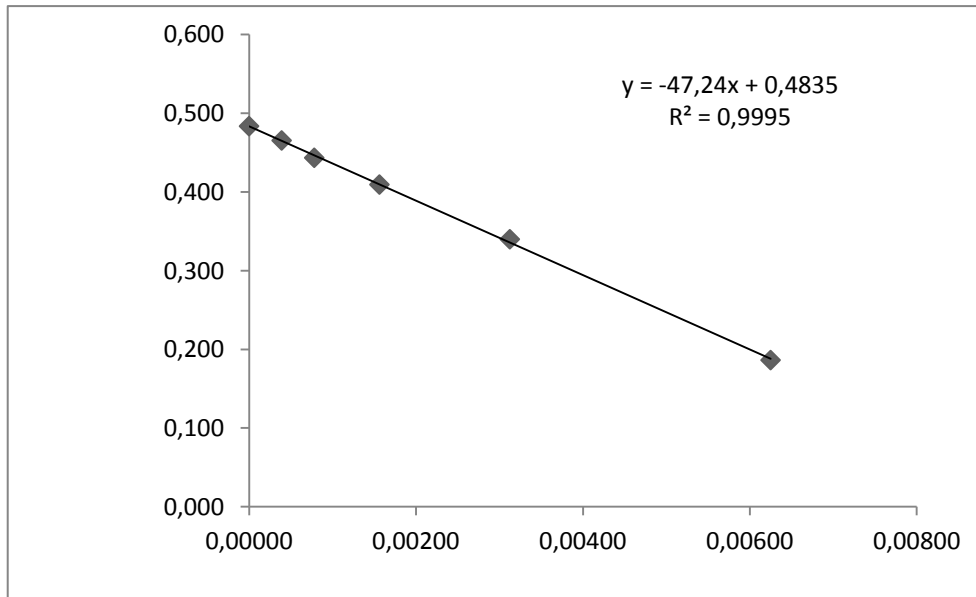
DPPH[•] radikali (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ticari olarak satın alınabilen bir radikaldir. Testlerde alınan bu radikalın 100 µM'lık metanolik çözeltisi hazırlandı ve metanollü, etil asetatlı ve sulu ekstraktlarda kullanıldı. Denemelerde Cuendet vd. (1997) yöntemi kullanıldı. Numune ve standartlar (BHT, Troloks) için testlerden önce, hangi konsantrasyonda çalışılacağıın belirlenmesi için 100 µM'lık DPPH[•] çözeltisi ile ön denemeler yapıldı. Ön denemelerden sonra belirlenen konsantrasyon testlerde kullanılacak olan en konsantre numune ve standart konsantrasyonudur. Bu değerden başlanarak numune ve standart çözeltilerinin 5 farklı konsantrasyonu hazırlandı ve tüplere pipetlendi (750 µL). Eşit hacimde (750 µL) DPPH[•] çözeltisi, numune çözeltileri üzerine eklenerek vortekslendi ve oda sıcaklığında 50 dakika inkübasyona bırakıldı. Her bir numune ve standart konsantrasyonu için iki paralel çalışıldı. Ayrıca numune ve standartın her bir konsantrasyonu için birer kör (numune/standart+DPPH[•] çözücüsü [metanol]) ve her bir çözücüsü (metanol/etil asetat/su) için de (kontrol tüpleri [DPPH[•] + numune/standart çözücüsü]) üç paralel çalışıldı. Süre sonunda DPPH[•]'ın maksimum absorbans verdiği 517 nm'de absorbanslar okundu. Hesaplamalarda iki paralelin ortalaması alınarak kör değerleri bu ortalamaadan çıkarıldı. Bulunan absorbanslara karşılık gelen konsantrasyonlar grafiğe geçirilerek SC₅₀ değerleri mg/mL cinsinden hesaplandı.

Tablo 7. DPPH yönteminde pipetleme prosedürü

	Kontrol	Kör	Standart	Test
Numune (değişik konsantrasyonlarda)	-	750 µL	-	750 µL
Standart (değişik konsantrasyonlarda)	-	-	750 µL	
Metanol	750 µL	750 µL	-	-
DPPH (100 µM)	750 µL	-	750 µL	750 µL

2.4.2.1. SC₅₀ Değerlerinin Hesaplanması

SC₅₀ ortamda bulunan radikal miktarını yarıya indiren numune konsantrasyonudur. SC₅₀ değerinin bulunması için farklı konsantrasyonlarda çalışmak gerekir. Bu nedenle çalışmalarda 5 farklı konsantrasyonda ölçüm yapıldı. Numunelerin 5 farklı konsantrasyonu hazırlanıp absorbans ölçümleri yapıldı ve absorbanslar konsantrasyona karşı grafiğe geçirildi. Maksimum absorbansın yarısına karşılık gelen, yani absorbansı yarıya düşüren konsantrasyon miktarı SC₅₀ değeri olarak belirlendi. SC₅₀ değeri mg/mL veya mM gibi birimlerle ifade edilmektedir.

Şekil 17. SC₅₀ değerinin hesaplanması için kalibrasyon grafiği

2.4.3. Toplam Fenolik Madde İçeriğinin Bulunması

Yöntem, suda ve organik çözücülerde çözülmüş olan fenolik bileşiklerin folin reaktifleri ile alkali ortamda renkli kompleks oluşturması esasına dayanır. Oluşan mor–menekşe renkli kompleks 765 nm’de maksimum absorbands oluşturur (Slinkart ve Singleton, 1977).

Metanollü ve sulu ekstraktlar içindeki toplam fenolik bileşik miktarları, bu yöntem kullanılarak kolorimetrik olarak tayin edildi. Öncelikle ekstraktlar ve standartlardan (gallik asit ve kateşin) 1 mg/mL konsantrasyonunda çözeltiler hazırlandı. Numunelerde tek konsantrasyonla, standartlarda 5 farklı konsantrasyonla (1,000- 0,5 – 0,250 – 0,125 – 0,0625 mg/mL) çalışıldı. 50 µL’lik her bir numune/ standart çözeltilisine sırasıyla; 2,5 mL saf su konuldu. Sonra 20 sn arayla 250 µL saf su ile seyreltilmiş Folin-Ciocaltaeu reaktifi (0.2N) eklendi, vortekslendi, oda sıcaklığında 3 dakika inkübasyona bırakıldı. Sonrasında 750 µL (%7,5’lik) Na₂CO₃ yine 20 sn. arayla pipetlenerek tekrar vortekslendi ve oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakıldı. Her bir numune ve standart konsantrasyonu için üç paralel çalışıldı. Ayrıca numune ve standartın her bir konsantrasyonu için birer kör (numune/standart + Folin-Ciocaltaeu reaktifi çözücüsü [saf su]) çalışıldı. Süre sonunda 765 nm’de absorbandslar spektrofotometrede okundu. Hesaplamalarda üç paralelin ortalaması alınarak kör değerleri bu ortalamadan çıkarıldı, elde edilen verilerle grafik çizildi. Toplam fenolik madde miktarı gram ya da mL numune başına µg olarak ifade edilir (Örneğin : µg Gallik asit eşdeğeri / gram kuru ekstrakt, µg GAE/g, veya µg kateşin eşdeğeri / 100 g orjinal kuru numune, µG CE/100 g kuru numune).

2.5. Online-HPLC-FRAP Yöntemi ile Antioksidan Kompozisyonun Belirlenmesi

HPLC-UV-DAD analizleri Agilent 1100 seri bir diyot serili dedektör ile donanımlı (DAD 1200) cihaz ile yapıldı. Enstrüman Agilent Chemstation programı ile kontrol edildi. Tüm analizler için bir C18 kolon (250 mm × 4.6 mm i.d., 5 µm partikül; waters spherisorp ODS2) kullanıldı. FRAP çözeltilisinin sisteme gönderilmesi için Goldman Syringe Pump Ar01 serisi şırınga pompası kullanıldı. Hareketli faz için 4 farklı çözücü kullanıldı.

Hareketli faz için kullanılan çözücüler;

A: Metanol (kromatografik analizler için gradient),

B: %0.5 Asetik asit çözeltilisi (%99.5 saf su-asetonilril(1:1)),

C: %2 Asetik asit çözeltisi (%98 saf su),

D: Asetonitril (kromatografik analizler için gradient).

Numunelerin enjeksiyon hacmi 20 µL olarak kullanıldı. Akış hızı 0,700 mL.dk⁻¹ olarak ayarlandı. DAD dedektör 240, 254, 260, 274, 280 nm'lerde ve UV dedektör 595 nm'de kaydedildi. Elüsyonda takip edilen gradient Tablo 'da verilmiştir.

FRAP reaktifinin hazırlanışı (48 mL için):

A: 40 mL 300 mM asetat tamponu (pH=3.6); 0,692 mL derişik asetik asit alınır, hacim saf su ile 10 mL' ye tamamlanır ve üzerine 24 mL metanol ilave edilir. 0.5 M NaOH ile pH=3.6'ya ayarlanır ve son hacim 40 mL'ye saf su ile tamamlanır.

B: 4 mL 10 mM [2,4,6*Tris(2-pridyl)-s-triazine (TPTZ, MA: 312.33 g/mol) nin 100 mM HCl' deki çözeltisi; 0.0124 g TPTZ tartılır, 1,6 mL 100 mM HCl ve 2,4 mL metanol ile çözülür.

C: 4 mL 20 mM FeCl₃.6H₂O; 0.0216 g FeCl₃.6H₂O 1,6 mL saf suda çözülür ve üzerine 2,4 mL metanol ilave edilir.

A, B ve C çözeltileri taze hazırlandıktan sonra, A çözeltisi karıştır haldeyken üzerine önce B çözeltisi sonra da yavaş yavaş C çözeltisi ilave edilir.

Tablo 8. HPLC gradient elüsyon programı

Zaman (dk)	B (%)	C (%)	D (%)	Akış Hızı (mL/dk)	Max. Basınç
0.00	10.0	90.0	0.0	0,700	275
28.00	50.0	50.0	0.0	0,700	275
32.00	90.0	10.0	0.0	0,700	275
35.00	20.0	0.0	80.0	0,700	275
42.00	20.0	0.0	80.0	0,700	275
44.00	10.0	90.0	0.0	0,700	275
45.00	10.0	90.0	0.0	0,700	275

B: %0.5 Asetik Asit; Asetonitril / su (50/50)

C: %2 Asetik Asit (suda)

D: %100 Asetonitril

HPLC cihazı açılıp, Agilent Chemstation (on-line) programı çalıştırıldı. FRAP reaktifi analiz için taze olarak hazırlandı ve şırıngaya alınarak pompaya takıldı. Şırınga pompasının akış hızı 0.300 mL/dk hıza ayarlandı. Cihaz numune enjeksiyonu için hazır hale geldiğinde FRAP çözeltisinin bulunduğu şırınga pompası çalıştırıldı ve 595 nm (UV-dedektör)'de verdiği absorbans için baseline doğrusal olana kadar beklendi. Baseline istenen düzeye geldiğinde 20 µL numune HPLC cihazına enjekte edildi ve yürütme programı çalıştırıldı. UV spektrumu 595 nm'de ölçülerek kaydedildi.

2.6. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

Numunelerin antibakteriyal ve antifungal kapasitelerini belirlemek amacıyla 'Disk Difüzyon' yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemle, metanollü, sulu ve etil asetatlı ekstraktların antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir.

Bütün test mikroorganizmaları ATC (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland)'den temin edildi. Kuşburnu bitkisinin dokuz farklı ağaçtan ve meyve, dal, yaprak ve çekirdek kısımlarından elde edilen metanollü, sulu ve etil asetatlı ekstraktlarının antimikrobiyal aktiviteleri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC®27853, *Escherichia coli* ATCC®25922, *Salmonella typhimurium* ATCC®14028, *Staphylococcus aureus* ATCC®25923, , *Listeria monocytogenes* ATCC®7-77, *Shigella sonnei* ATCC®25931, *Aspergillus niger* ATCC®9-42 ,and *Candida albicans* ATCC®10231'e karşı analiz edilmiştir.

Bu testteki bakteri türleri Mueller Hilton Agar (Merck) ve Mueller Hilton Brot (Merck)'da yetişti. *C. albicans* ise Sabouraud Dextrose Broth (Difco) ve Sabouraud Dextrose Agar (Oxoid)'da yetişti. Mantar süspansiyonları 10^7 hücre/mL'ye ayarlanırken, bakteriyel süspansiyonlar 10^8 hücre/ mL'ye seyreltilmiştir.

Antibakteriyal ve antifungal aktiviteler agar (besiyeri)'da difüzyon disk plakaları yöntemi kullanılarak ölçüldü. Bakteriler için Mueller Hinton Agar medium (Merck) ve mantarlar için Sabouraud Dextrose Agar (Oxoid)' den 20'şer mL 15 cm çaplı petri kaplarına döküldü. Mueller Hinton Broth medium (Merck)'de yetiştirilen bakteri suşları 37°C'de 24 saat inkübasyona alınmış ve sonra inhibisyon zonları milimetrik olarak ölçülmüştür. Sabouraud Dextrose Broth (Difco)'de yetiştirilen *C. albicans* ise 27°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Büyüme 600 nm' de ayarlanmıştır. Her bir mililitresinde yaklaşık 10^8 bakteri veya mantar bulunan süspansiyonlar (100 µL) petri kaplarına

yerleştirilerek agar üzerine yaydırıldı. Sonra 6 mm çapında steril kağıt disklerle (Blank Discs oxoi 486715) her bir ekstraktan 15'er μL (2 mg/mL) emdirilerek kurutuldu ve sonrasında bu kağıt diskler bakteri kültürlerinin yaydırıldığı agar üzerine belli aralıklarla yerleştirilmişlerdir. Pozitif kontrol için yerel eczacılıkta kullanılan standart bakteriyel olarak Ampicillin ve Cephazolin, standart antifungal olarak Nystatin; negatif kontrol için ise etil asetat, su (destile) ve metanol kullanıldı. İnhibisyon bölgeleri 27 °C'de 48 saat inkübasyondan sonra belirlendi. Tüm testler üç kez tekrarlandı. Test sonuçları inkübasyondan sonra büyümenin görülmediği inhibisyon alanının çapı cinsinden ifade edilmiştir (Tablo 11).

2.7. Karbonik Anhidraz (CA) Enzimi İnhibisyonunun İncelenmesi

Sulu ekstraktların karbonik anhidraz enzimi inhibisyon etkisinin belirlenmesinde sığır eritrosit karbonik anhidraz enzimi, ve sonuçların değerlendirilmesi amacıyla standart inhibitör olan sülfanilamid ve asetazolamid kullanıldı. Testlerde esteraz aktivitesi tayin yöntemi uygulandı. Bu yöntemde 300 μL numune çözeltisi üzerine 200 μL enzim çözeltisi ilave edilip vortekslendi ve 10 dakika oda şartlarında inkübasyona bırakıldı. Daha sonra bu karışım üzerine 1000 μL tampon ilave edilerek vortekslendikten sonra 1500 μL 3 mM substrat (*p*-nitrofenil asetat) çözeltisi eklenip vortekslendi. Çözelti karışımının 348 nm'de absorbansı 25 dakika boyunca kaydedildi ve sonuçlar numune içermeyen kontrol ve enzim içermeyen kör testlerle karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Numune absorbanslarından körlerin absorbansı çıkarılarak elde edilen sonuçlar kontrol testine göre %inhibisyon olarak belirlenmiştir. %İnhibisyon hesabının formülü aşağıdaki gibidir:

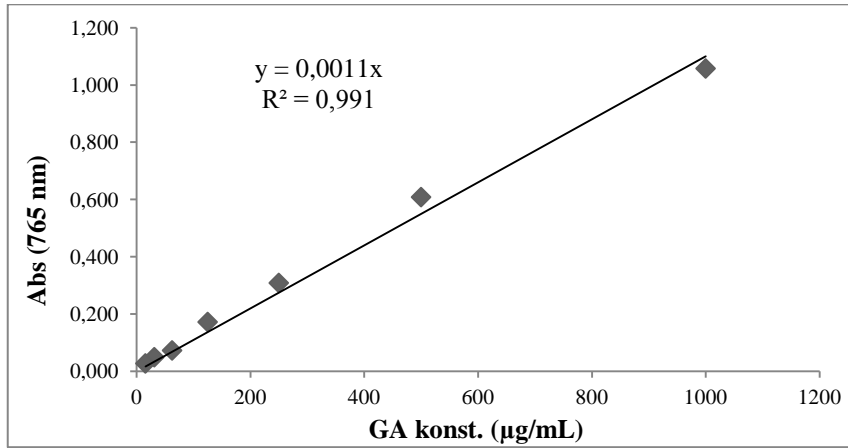
$$\% \text{İnhibisyon} = \frac{\text{Aktivite}_{\text{Kontrol}} - \text{Aktivite}_{\text{Numune}}}{\text{Aktivite}_{\text{Kontrol}}} \times 100$$

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

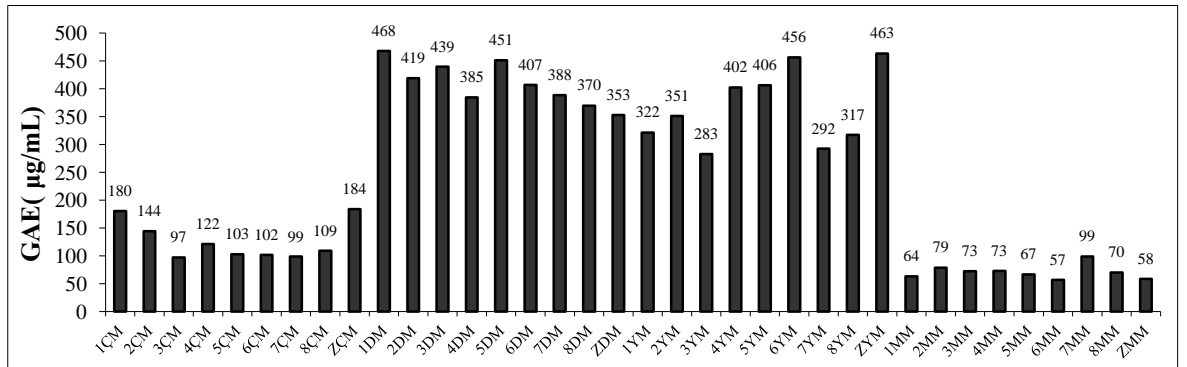
3.1. Antioksidan Aktiviteler

3.1.1. Toplam Fenolik Madde Miktarları

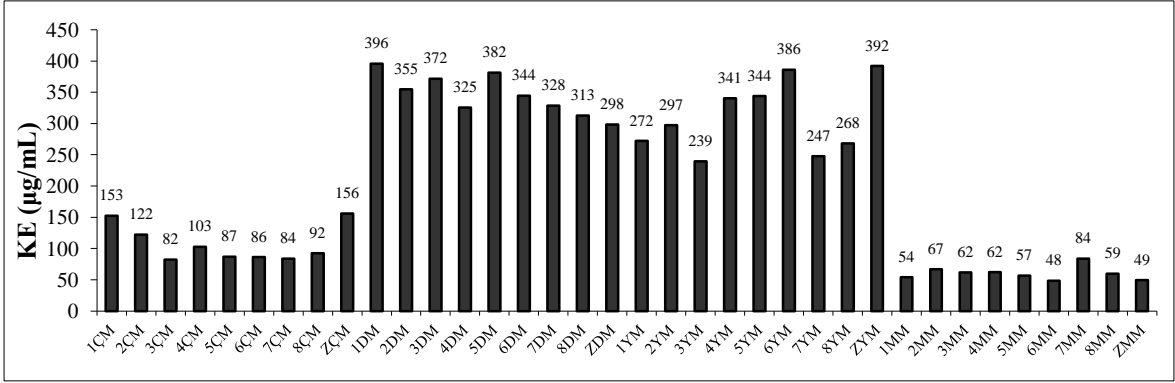
Meyve, dal, yaprak ve çekirdek kısımlarının sulu ve metanollü ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarı yönteminde içerdikleri toplam polifenol miktarları gallik asit ve/veya kateşin eşdeğeri olarak verildi (Şekil 18-38.). 765 nm'de, mL numune başına eşdeğer miktarda μg gallik asitin konsantrasyonuna karşılık gelen numunelerin fenolik madde içerikleri grafiğe geçirilerek belirlenmiştir.



Şekil 18. Toplam fenolik madde miktarı testinde gallik asitin (7 farklı konsantrasyonda) kalibrasyon grafiği

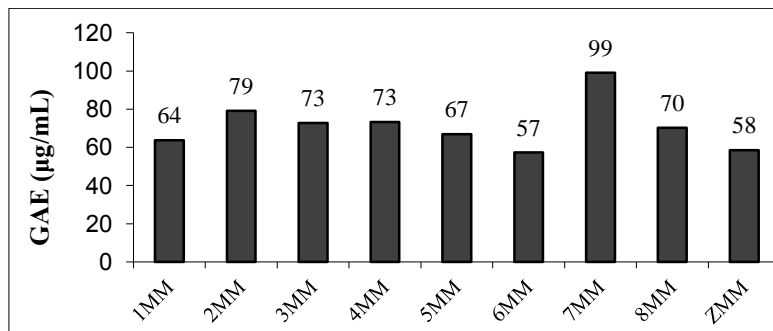


Şekil 19. Metanollü ekstraktların toplam fenolik madde miktarları (μg GAE/ mL numune çözeltisi; GAE: gallik asit eşdeğeri).



Şekil 20. Metanollü ekstraktların toplam fenolik madde miktarları (µg KE/ mL numune çözeltisi; KE: kateşin eşdeğeri).

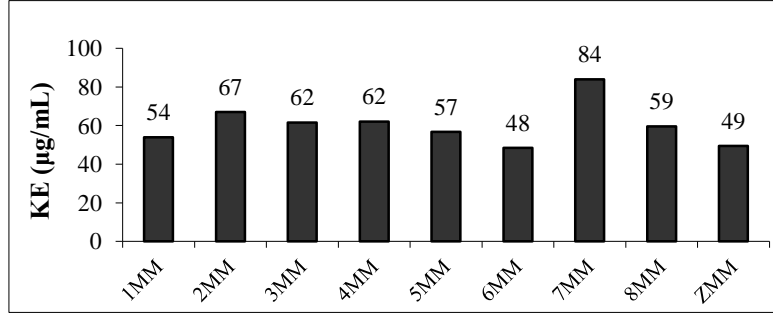
Kuşburnu bitkisinin kısımlarının metanol ile yapılan ekstraksiyonu sonrasında elde edilen özütlerle yapılan toplam fenolik madde miktarlarının belirlenmesi çalışmalarının sonuçları gallik asit eşdeğeri ve kateşin eşdeğeri cinsinden yukarıda verilmiştir. Elde edilen bu verilere dayanarak kuşburnu bitkisinin meyve, dal, yaprak ve çekirdek kısımlarının metanollü ekstraktlarını karşılaştırdığımızda en yüksek fenolik kompozisyon dal ve yaprak kısımlarında belirlenmiştir. Sonrasında ise çekirdek kısımları ve en düşük fenolik kompozisyon meyve kısmının metanollü ekstraktlarında görülmüştür. Bu değerler fenolik madde miktarını gallik asit ve kateşin eşdeğeri olarak verirken, her iki eşdeğer için verilerin karşılıklı olarak tutarlı olduğu tespit edildi (Şekil 21, 22).



Şekil 21. Meyve kısımlarının metanollü ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları (µg GAE/ mL numune çözeltisi; GAE: gallik asit eşdeğeri).

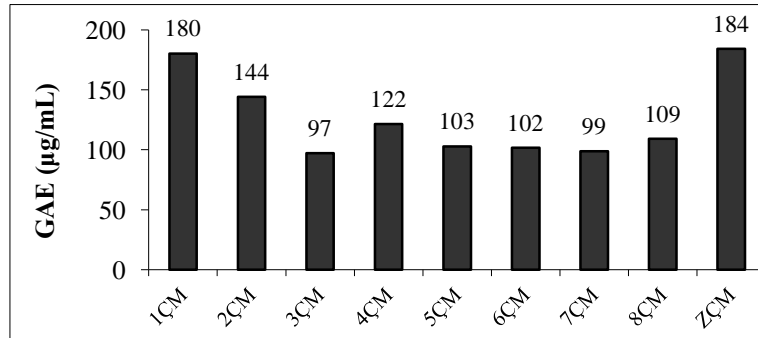
Şekil 21'de görüldüğü gibi meyve kısımlarının metanollü ekstraktlarının toplam fenolik miktarların gallik asit eşdeğerleri cinsinden birbirine yakın olduğu, en düşük

miktarın 6MM numunesinde olduğu belirlenmiştir. En yüksek miktar ise 7MM numunesindedir.



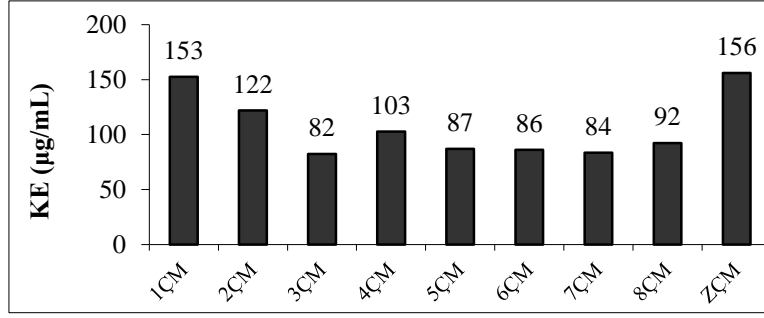
Şekil 22. Meyve kısımlarının metanollü ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları (µg KE/ mL numune çözeltisi; KE: kateşin eşdeğeri).

Şekil 22’de görüldüğü gibi meyve ekstraktlarının kateşin eşdeğerlerini karşılaştırdığımızda verilerin gallik asit eşdeğerleri ile uyumlu olduğu görülmektedir ve en yüksek fenolik kompozisyon 7MM numunesindedir.



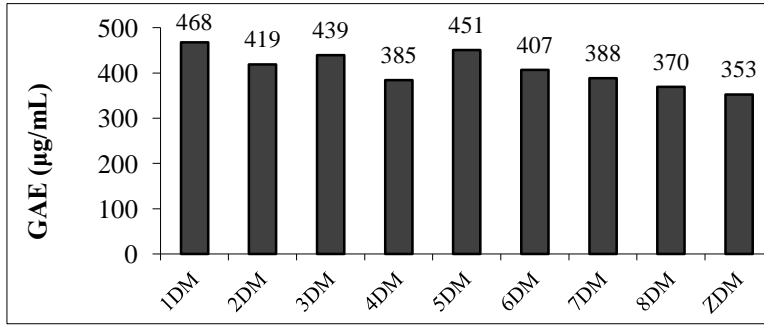
Şekil 23. Çekirdek kısımlarının metanollü ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları (µg GAE/ mL numune çözeltisi; GAE: gallik asit eşdeğeri).

Şekil 23’de kuşburnu bitkisinin çekirdek kısımlarında fenolik bileşik miktarları gallik asit türünden verilmiştir. En düşük fenolik madde miktarı 3ÇM numunesinde ve en yüksek miktarın da ZÇM numunesinde olduğu belirlenmiştir.



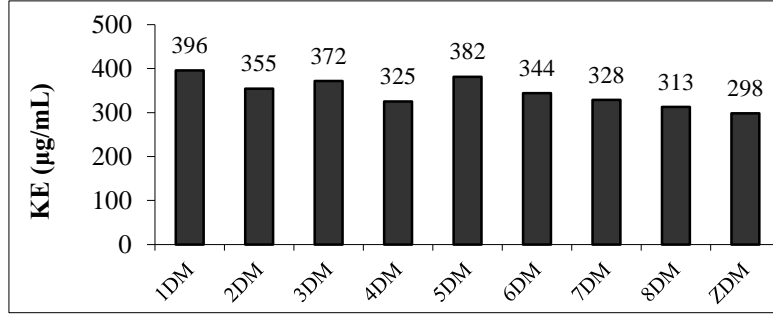
Şekil 24. Çekirdek kısımlarının metanollü ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları ($\mu\text{g KE/ mL}$ numune çözeltisi; KE: kateşin eşdeğeri).

Şekil 24’da çekirdek ekstraktlarının kateşin eşdeğeri olarak fenolik madde miktarları gallik asit eşdeğeri olarak bulunan miktarla uyumludur.



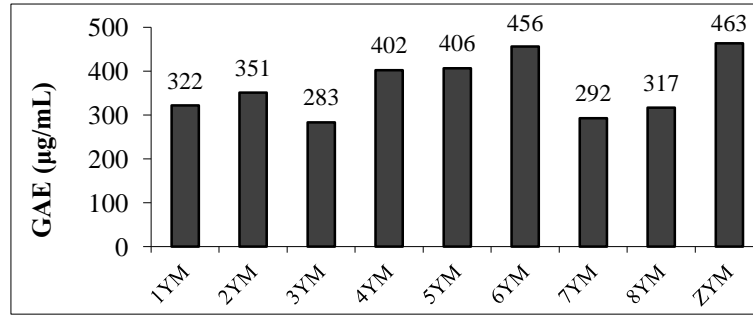
Şekil 25. Dal kısımlarının metanollü ekstraktlarının galli toplam fenolik madde miktarları ($\mu\text{g GAE/ mL}$ numune çözeltisi; GAE: gallik asit eşdeğeri).

Dal kısımlarının toplam fenolik madde içeriği değerlerine göre en yüksek miktar 1DM numunesi, en düşük ise ZDM numunesi için olduğu tespit edilmiştir (Şekil 25.).



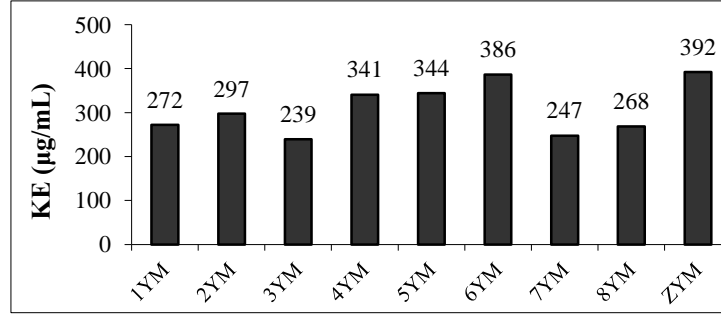
Şekil 26. Dal kısımlarının metanollü ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları ($\mu\text{g KE/ mL}$ numune çözeltisi; KE: kateşin eşdeğeri).

1DM numunesinin kateşin eşdeğeri cinsinden fenolik madde miktarı en yüksek olarak belirlenmiştir. Geneline bakıldığında ise miktarların galik asit eşdeğerleri ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir (Şekil 26.).



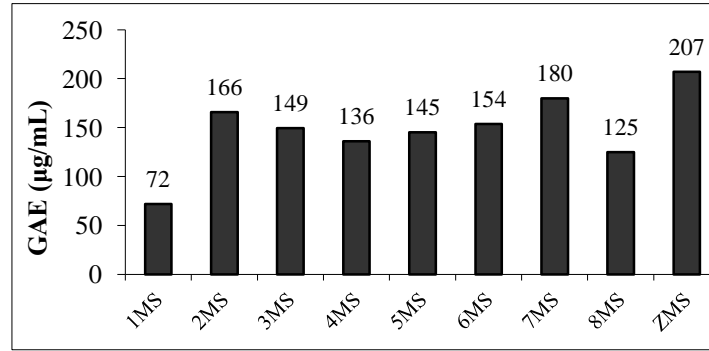
Şekil 27. Yaprak kısımlarının metanollü ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları ($\mu\text{g GAE/ mL}$ numune çözeltisi; GAE: galik asit eşdeğeri).

Yaprak ekstraktlarının galik asit eşdeğerleri karşılaştırıldığı zaman; ZYM numunesinde toplam fenolik içerik en yüksek miktarda belirlenmiştir. En düşük miktar ise 3YM numunesinde tespit edilmiştir (Şekil 27.).

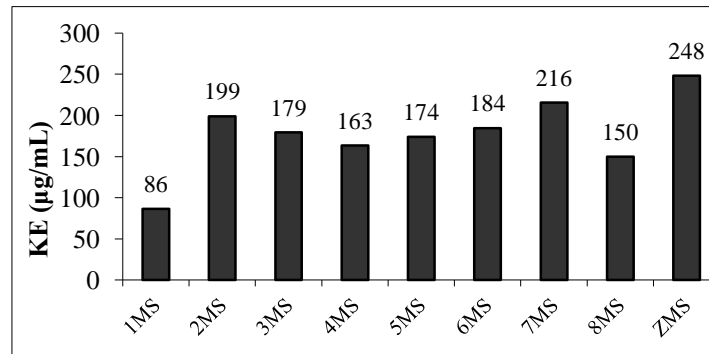


Şekil 28. Yaprak kısımlarının metanollü ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları ($\mu\text{g KE/ mL}$ numune çözeltisi; KE: kateşin eşdeğeri).

Yaprak kısımlarının kateşin eşdeğeri verileri incelendiğinde gallik asit eşdeğeri ile orantılı olduğu görülmektedir (Şekil 28.).

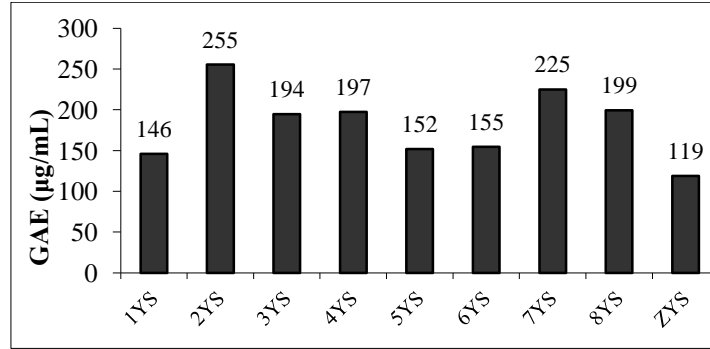


Şekil 29. Meyve kısımlarının sulu ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları ($\mu\text{g GAE/ mL}$ numune çözeltisi; GAE: gallik asit eşdeğeri).

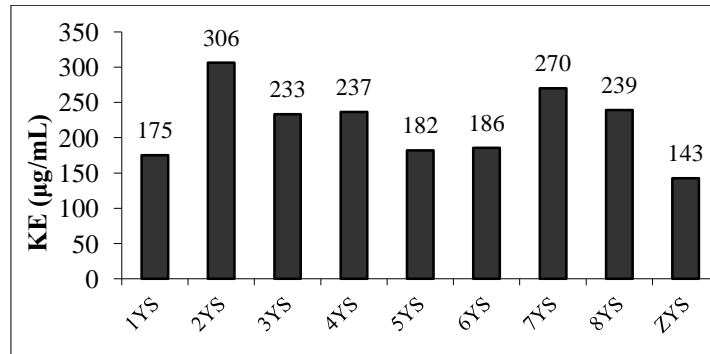


Şekil 30. Meyve kısımlarının sulu ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları ($\mu\text{g KE/ mL}$ numune çözeltisi; KE: kateşin eşdeğeri).

Kuşburnu bitkisinin farklı ağaçlardan elde edilen meyve kısımlarının sulu ekstraktlarının toplam fenolik kompozisyonu için gallik asit eşdeğeri verileri incelendiğinde en yüksek miktarın ZMS numunesinde, en düşük miktarın ise IMS numunesinde olduğu görülmüştür. Kateşin eşdeğeri türünden de meyve kısımlarındaki fenolik bileşim gallik asit eşdeğeri ile aynı sıralamada olduğu görülmektedir (Şekil 29, 30).

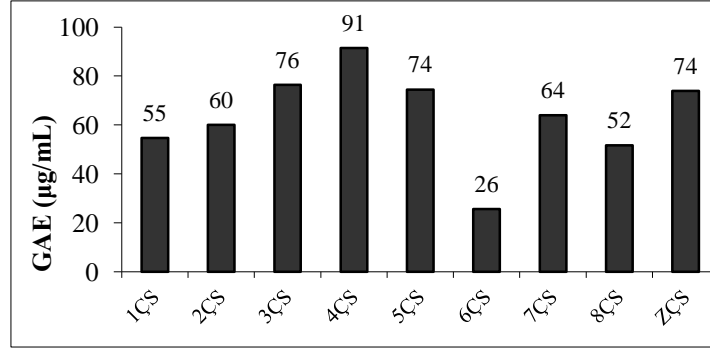


Şekil 31. Yaprak kısımlarının sulu ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları ($\mu\text{g GAE/ mL}$ numune çözeltisi; GAE: gallik asit eşdeğeri).

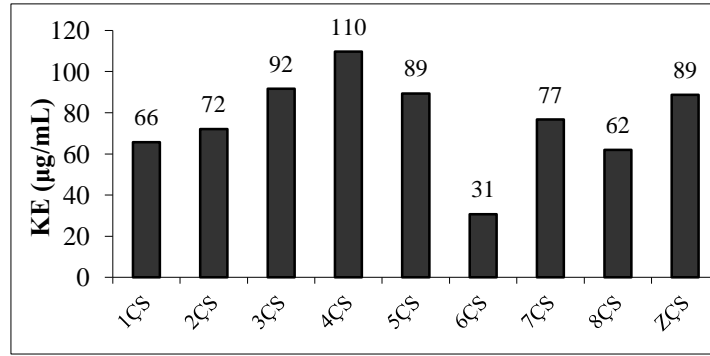


Şekil 32. Yaprak kısımlarının sulu ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları ($\mu\text{g KE/ mL}$ numune çözeltisi; KE: kateşin eşdeğeri).

Yaprak kısımlarının sulu ekstraktlarının fenolik madde miktarları gallik asit ve kateşin eşdeğerleri bakımından veriler birbirleriyle uyumludur. En yüksek miktarın 2YS ve en düşük miktarın ZYS numunesinde olduğu belirlenmiştir (Şekil 31, 32).

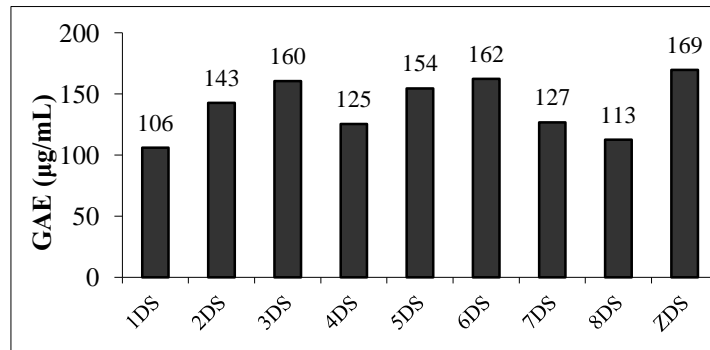


Şekil 33. Çekirdek kısımlarının sulu ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları ($\mu\text{g GAE/ mL}$ numune çözeltisi; GAE: gallik asit eşdeğeri).

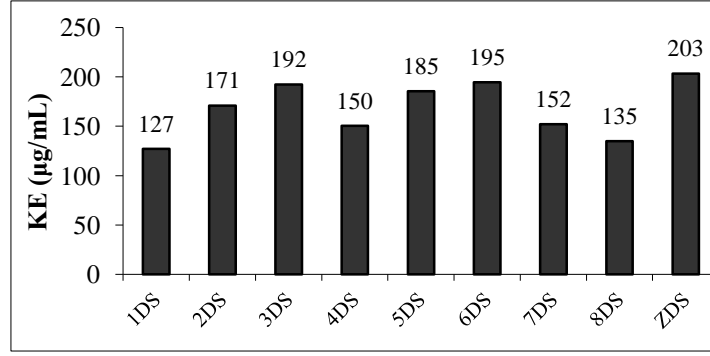


Şekil 34. Çekirdek kısımlarının sulu ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları ($\mu\text{g KE/ mL}$ numune çözeltisi; KE: kateşin eşdeğeri).

Çekirdek kısımları içerisinde sulu ekstraktlarda en yüksek fenolik madde içeriği 4ÇS numunesinde, en düşük miktarın ise 6ÇS numunesinde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 33, 34).

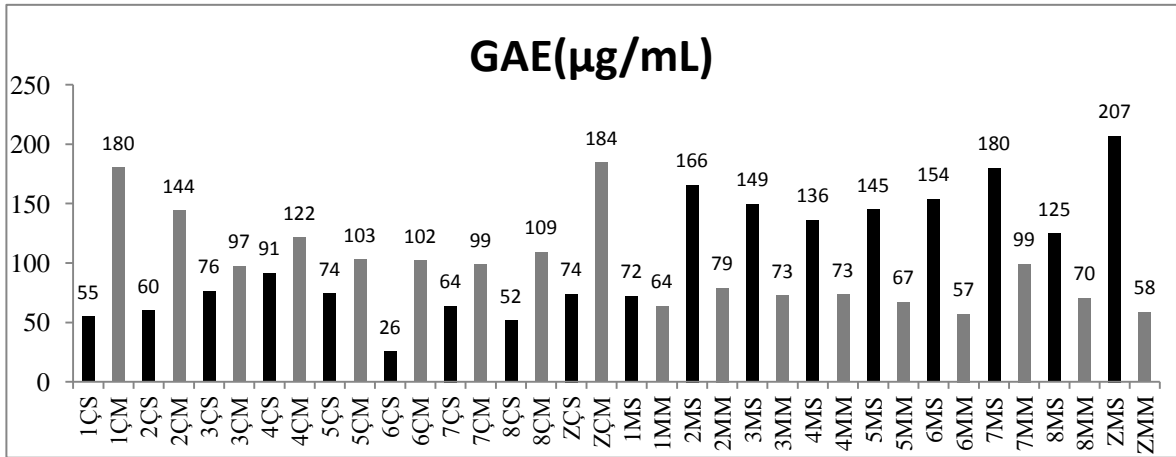


Şekil 35. Dal kısımlarının sulu ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları ($\mu\text{g GAE/ mL}$ numune çözeltisi; GAE: gallik asit eşdeğeri).



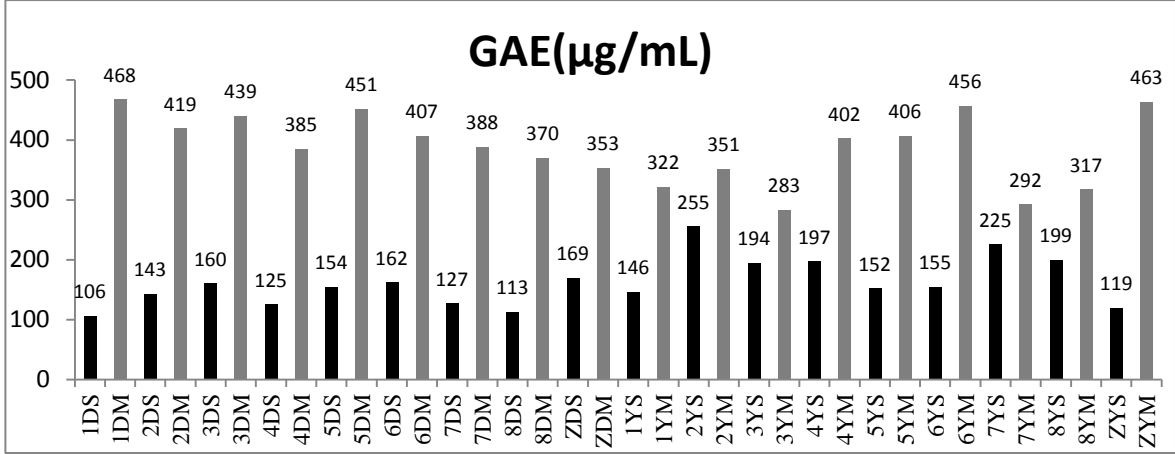
Şekil 36. Dal kısımlarının sulu ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları ($\mu\text{g KE/ mL}$ numune çözeltisi; KE: kateşin eşdeğeri).

Dal kısımları sulu ekstraktları için toplam fenolik kompozisyon en yüksek ZDS numunesinde ve en düşük 1DS numunesinde olduğu belirlenmiştir (Şekil 35, 36).



Şekil 37. Çekirdek ve Meyve kısımlarının metanollü ve sulu ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları ($\mu\text{g GAE/ mL}$ numune çözeltisi; GAE: gallik asit eşdeğeri).

Çekirdek kısımlarının metanol ve sulu ekstraktları toplam fenolik madde miktarı bakımından gallik asit eşdeğeri türünden karşılaştırıldığında metanollü numunelerin fenolik içeriğinin daha yüksek olduğunu görebiliriz. Yani çekirdek kısımlarının metanol ile yapılan ekstraksiyonu sonucunda daha fazla fenolik bileşik türlerinin çözücü fazına alındığı anlamına gelmektedir. Meyve kısımları için baktığımızda ise elde edilen veriler doğrultusunda, su ile yapılan ekstraksiyon, metanol ile yapılanına göre daha fazla fenolik bileşik türünü çözücü fazına almıştır (Şekil 37.).



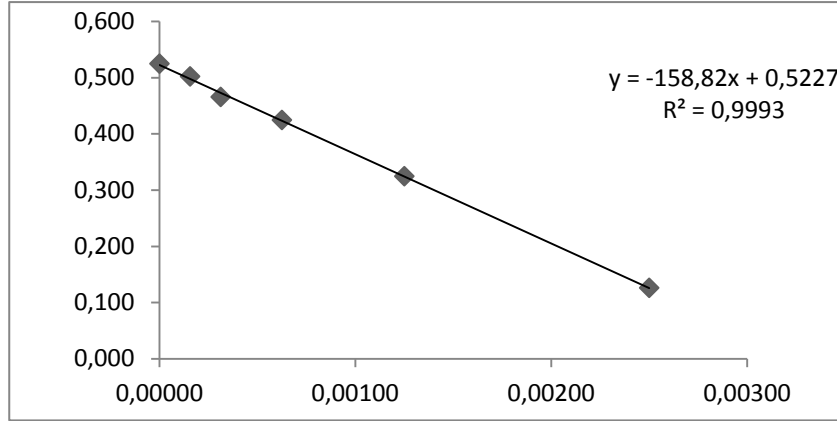
Şekil 38. Dal ve yaprak kısımlarının metanollü ve sulu ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları ($\mu\text{g GAE/ mL}$ numune çözeltilisi; GAE: gallik asit eşdeğeri).

Dal ve yaprak kısımlarının metanollü ve sulu ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları açısından çözücü türüne göre karşılaştırdığımızda hem dal hem de yaprak kısımlarının neredeyse hepsinin metanollü ekstraktlarında fenolik madde miktarı daha yüksektir (Şekil 38.).

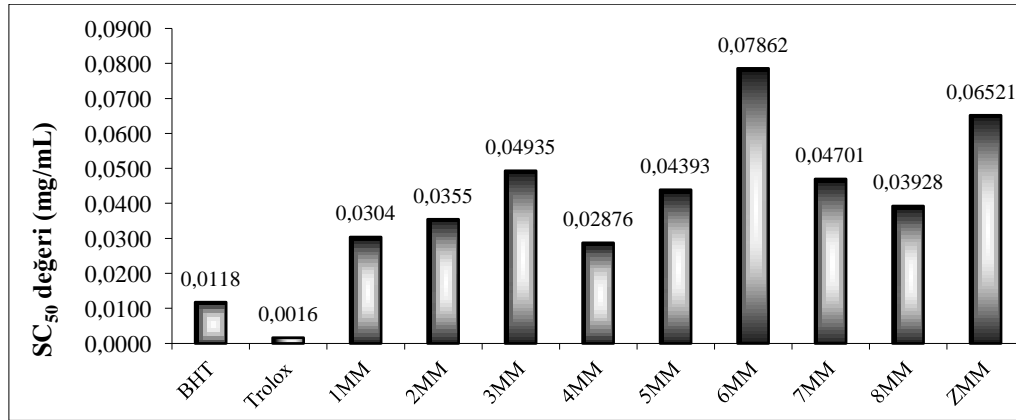
3.1.2. DPPH• Radikal Temizleme Aktiviteleri

Sulu, etil asetatlı ve metanollü ekstraktlarda DPPH radikali temizleme aktiviteleri SC_{50} değerleri ile ifade edilerek (Şekil 42-52.) verilmiştir. Artan numune konsantrasyonuna karşı 517 nm’deki absorbanslar grafiğe geçirilerek elde edilen grafiklerden antioksidan kapasiteler kantitatif olarak ifade edilmiştir. Antioksidan aktivite, numunelerin SC_{50} değerleri belirlenerek karşılaştırılmıştır. SC_{50} , başlangıç DPPH radikali konsantrasyonunu (kontrolün absorbansını) yarıya düşüren numune konsantrasyonu olarak tanımlanır ve genellikle mg/mL ya da mM olarak ifade edilir.

DPPH radikali temizleme aktivitesi testinde elde edilen SC_{50} değerlerinin anlamlandırılması amacıyla standart antioksidan olarak BHT ve Trolox testlerde kullanılmıştır.

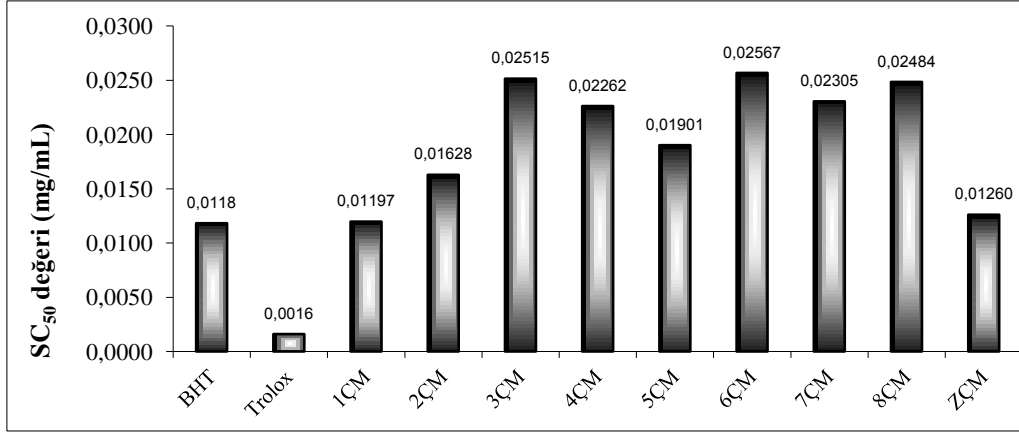


Şekil 39. DPPH testinde standart Trolox (5 farklı konsantrasyonda) için SC₅₀ değerinin bulunması (SC₅₀:0,0016 mg/mL bulunmuştur).



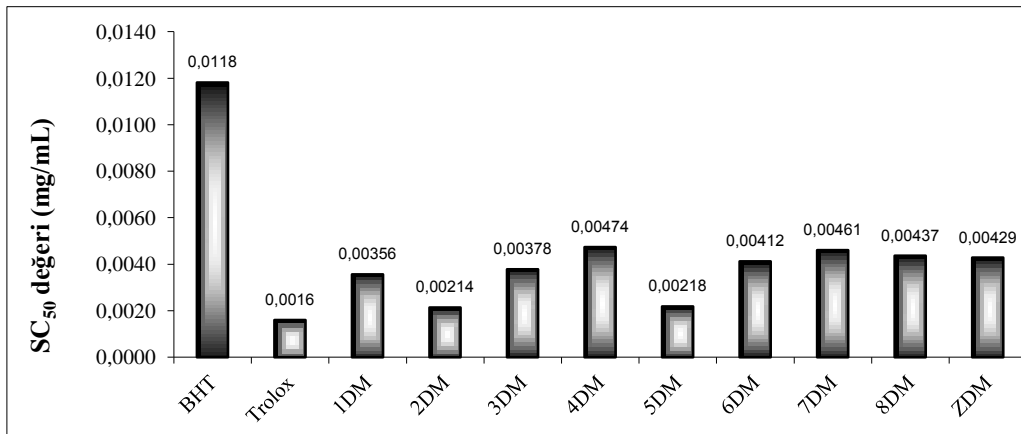
Şekil 40. Meyve kısımlarının metanollü ekstraktlarının SC₅₀ değerleri

Meyve kısımları için uygulanan DPPH radikal temizleme aktivitesi yöntemi sonuçlarına göre en düşük aktivite 0,07862 mg/mL olarak 6MM numunesi için elde edilmiştir. Onu sırasıyla aktivitesi en yüksek olana doğru ZMM, 3MM, 7MM, 5MM, 8MM, 2MM, 1MM ve 4MM numuneleri izlemektedir. Meyve kısımlarının DPPH radikali temizleme aktiviteleri standartlara (BHT, Trolox) göre düşük olduğu görülmektedir (Şekil 40).



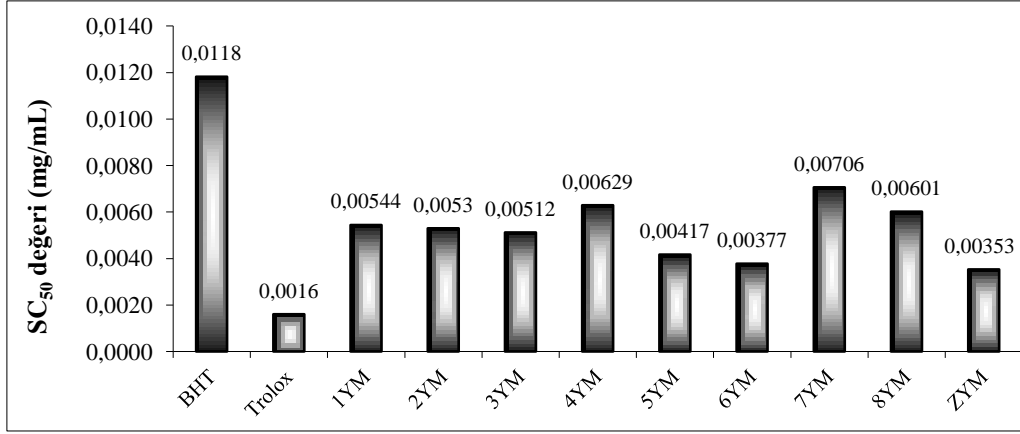
Şekil 41. Çekirdek kısımlarının metanollü ekstraktlarının SC₅₀ değerleri

Çekirdek kısımlarının metanollü ekstraktlarında en yüksek DPPH temizleme aktivitesi 0,01197 mg/mL SC₅₀ değeri ile 1DM numunesinde, en düşük aktivitenin ise 0,02567 mg/mL ile 6ÇM numunesinde olduğu belirlenmiştir. Elde edilen SC₅₀ değerlerinin standart BHT' ye yakın olduğu ancak Trolox'a göre büyük olduğu görülmektedir (Şekil 41).



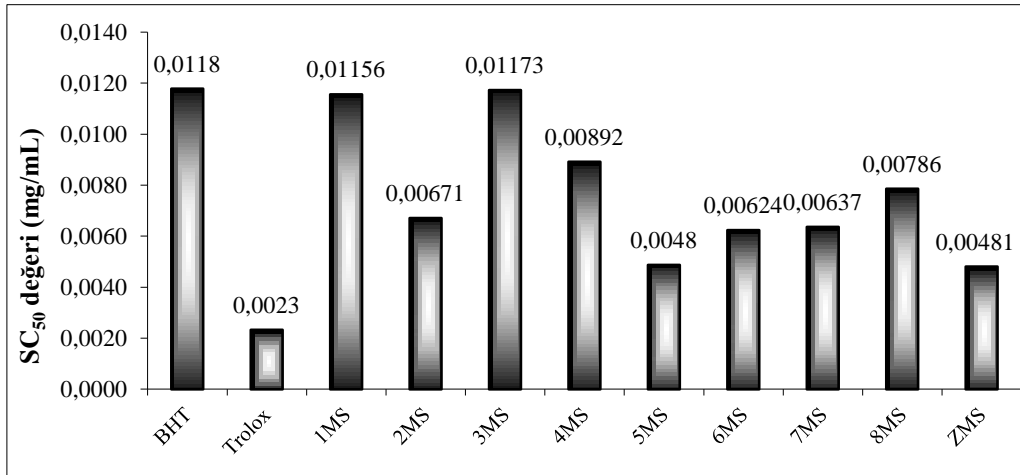
Şekil 42. Dal kısımlarının metanollü ekstraktlarının SC₅₀ değerleri

Dal kısımlarının metanollü ekstraktlarında DPPH radikal temizleme aktivitesinin BHT' ye göre yüksek Trolox'a göre ise düşük olduğu analizler sonucunda belirlenmiştir. Dal numuneleri arasında en yüksek aktivite 0,0214 mg/mL değeri ile 2DM numunesinde ve en düşük aktivitenin ise 4DM numunesinde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 42).



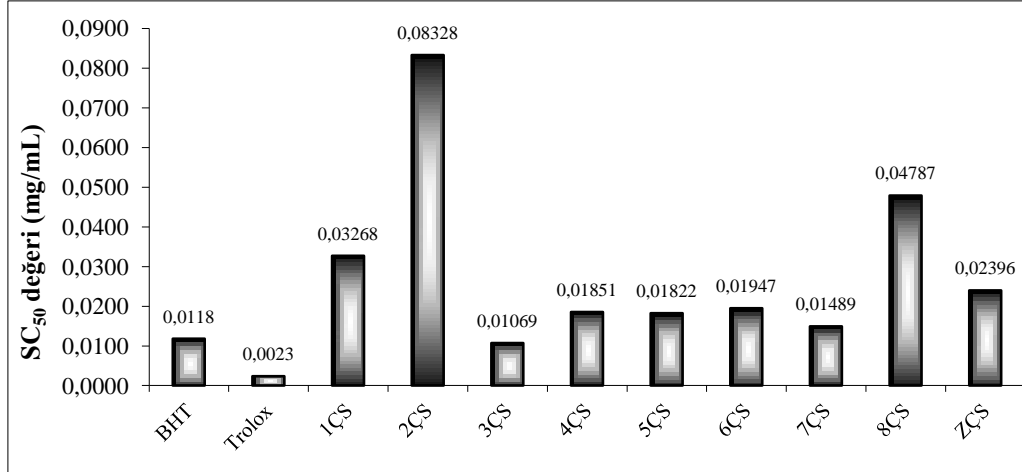
Şekil 43. Yaprak kısımlarının metanollü ekstraktlarının SC₅₀ değerleri

DPPH radikal temizleme aktivitesinin yaprak kısımlarının metanollü ekstraktlarında BHT'ye göre yüksek Trolox'a göre ise düşük olduğu görülmüştür. Elde edilen SC₅₀ değerleri karşılaştırıldığında yaprak numunelerinde en yüksek aktivitenin 0,00353 mg/mL değeri ile ZYM numunesi ve en düşük aktivitenin de 0,00706 mg/mL değeri ile 7YM numunesinde olduğu belirlenmiştir (Şekil 43.).



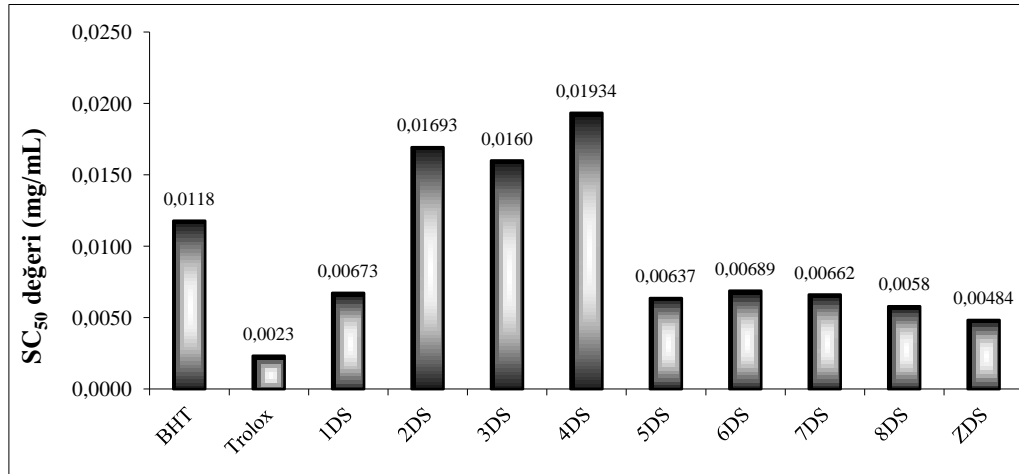
Şekil 44. Meyve kısımlarının sulu ekstraktlarının SC₅₀ değerleri

Meyve kısımlarının sulu ekstraktları karşılaştırıldığında 5MS numunesinin DPPH temizleme aktivitesinin daha yüksek olduğu ve 3MS numunesinin ise düşük olduğu görülmektedir. Numunelerin SC₅₀ değerleri BHT'ye göre daha küçük, yani daha yüksek aktiviteli, Trolox'a göre ise daha büyüktür, yani daha düşük aktivitelidir (Şekil 44.)



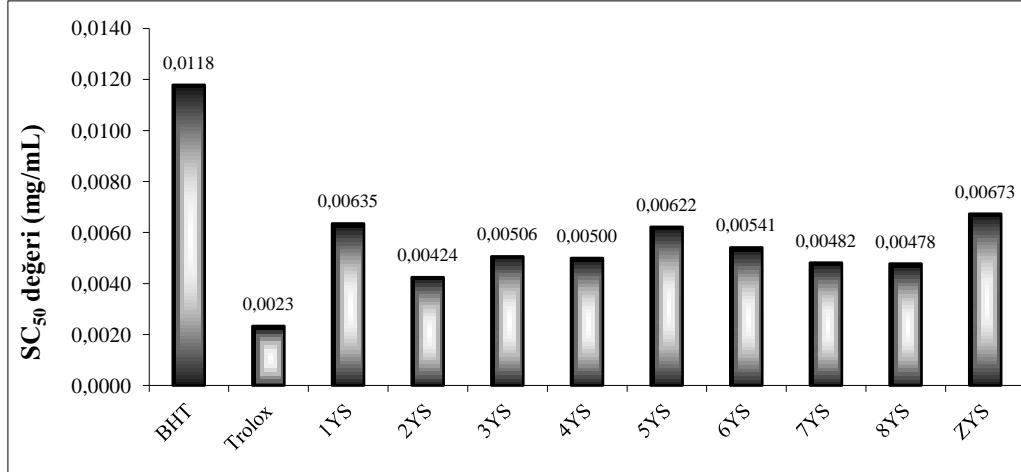
Şekil 45. Çekirdek kısımlarının sulu ekstraktlarının SC₅₀ değerleri

Şekil 45’de çekirdek kısımlarının sulu ekstraktlarının SC₅₀ değerleri verilmiştir. Bu değerlere bakıldığında yapılan analizler sonucunda sulu çekirdek özütleri standartlara göre daha düşük DPPH temizleme aktivitesi göstermiştir. En yüksek aktivite 3ÇS numunesinde ve en düşük aktivite ise 2ÇS numunesinde görülmüştür.



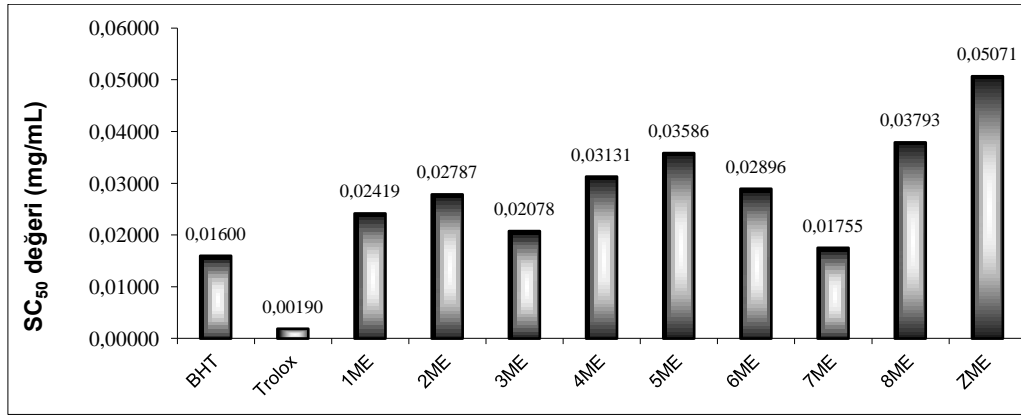
Şekil 46. Dal kısımlarının sulu ekstraktlarının SC₅₀ değerleri

2DS, 3DS ve 4DS numunelerinin SC₅₀ değerlerine bakıldığında DPPH temizleme aktiviteleri BHT ve Trolox’dan daha düşük çıkmıştır(Şekil .). Diğer numunelerde ise aktivitenin BHT’ ye göre yüksek Trolox’a göre ise düşük olduğu bulunmuştur. En yüksek aktiviteye 0,00484 mg/mL ile ZDS, en düşük aktiviteye ise 0,00689 mg/mL ile 6DS numunesi sahiptir (Şekil 46.).



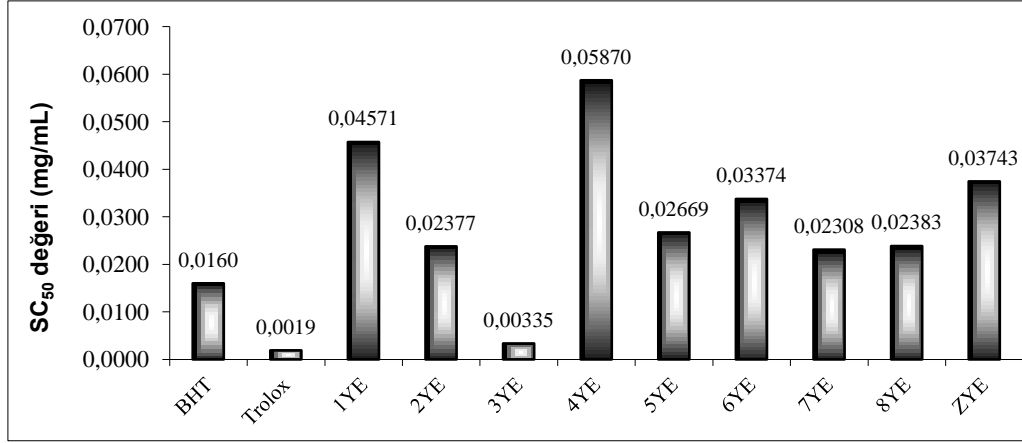
Şekil 47. Yaprak kısımlarının sulu ekstraktlarının SC₅₀ değerleri

Yaprak kısımlarının sulu ekstraktlarında DPPH radikali temizleme aktivitesi BHT'ye göre yüksek, Trolox'a göre ise düşüktür. En yüksek aktiviteye 2YS numunesi, en düşük aktiviteye ise ZYS numunesi sahiptir (Şekil 47.).



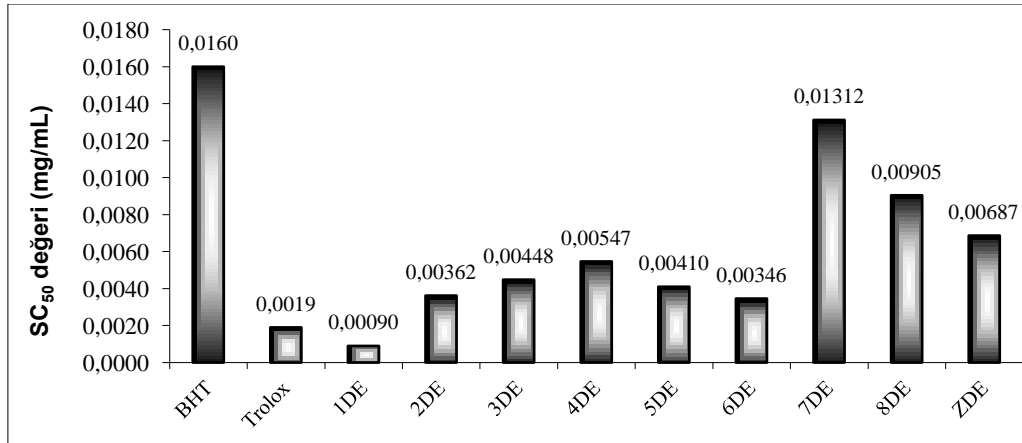
Şekil 48. Meyve kısımlarının etil asetatlı ekstraktlarının SC₅₀ değerleri

Meyve kısımlarının etil asetatlı ekstraktlarında DPPH radikali temizleme aktivitesi standartlara (BHT, Trolox) göre düşüktür. En yüksek aktiviteye 7ME, en düşük aktiviteye ZME numunesi sahiptir (Şekil 48.).



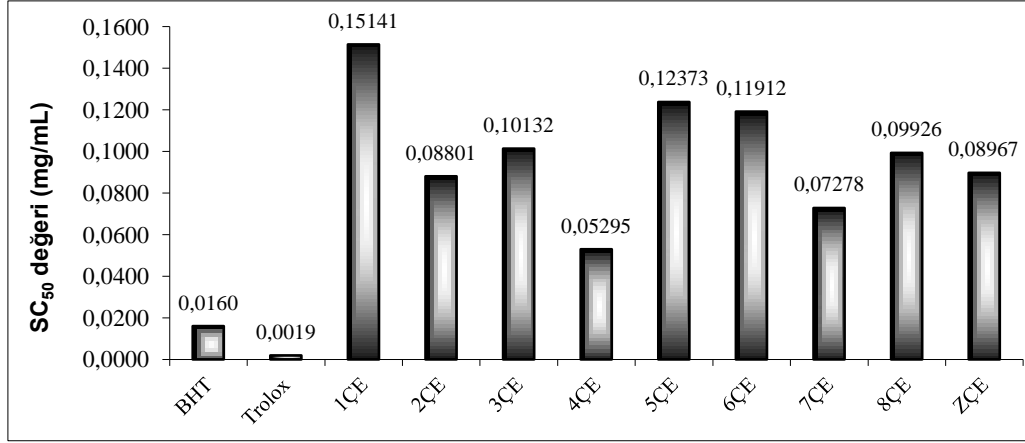
Şekil 49. Yaprak kısımlarının etil asetatlı ekstraktlarının SC₅₀ değerleri

Yaprak kısımlarının etil asetatlı ekstraktlarında en yüksek aktivite 3YE, en düşük aktivite ise 4YE numunesinde tespit edilmiştir (Şekil 49.).



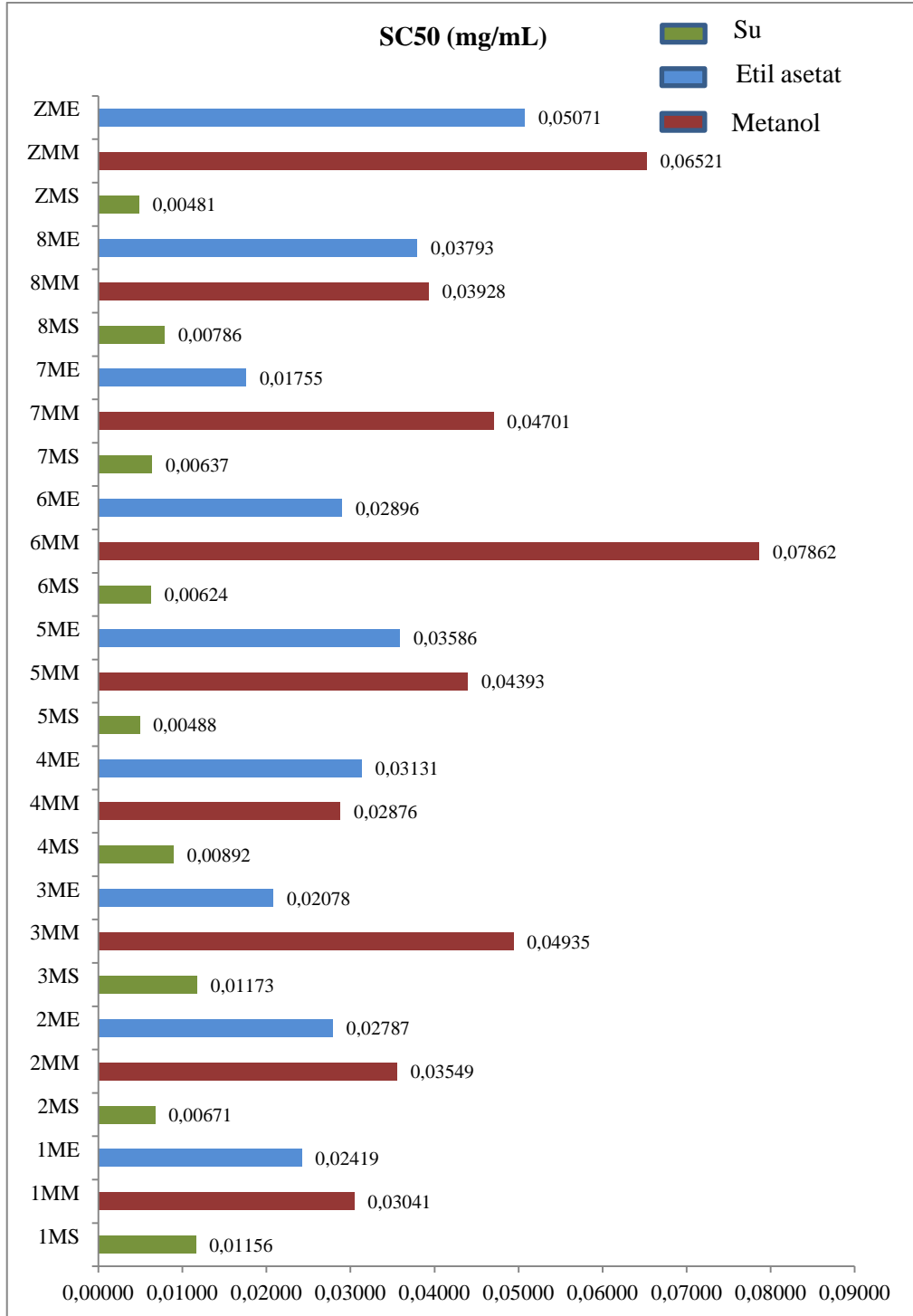
Şekil 50. Dal kısımlarının etil asetatlı ekstraktlarının SC₅₀ değerleri

Dal kısımlarının etil asetatlı ekstraktlarında en yüksek aktiviteye 1DE numunesi sahiptir ve 0,00090 mg/mL SC₅₀ değeri ile BHT ve Trolox'dan daha yüksek DPPH radikali temizleme aktivitesine sahiptir. Diğer numunelerin aktivitesi BHT'den yüksek, Trolox'dan ise düşüktür (Şekil 50.)



Şekil 51. Çekirdek kısımlarının etil asetatlı ekstraktlarının SC₅₀ değerleri

Çekirdek kısımlarının DPPH radikali temizleme aktiviteleri standart olarak kullanılan BHT ve Trolox'a göre düşük çıkmıştır. En yüksek aktiviteye 4ÇE ve en düşük aktiviteye de 1ÇE sahiptir (Şekil 51.).



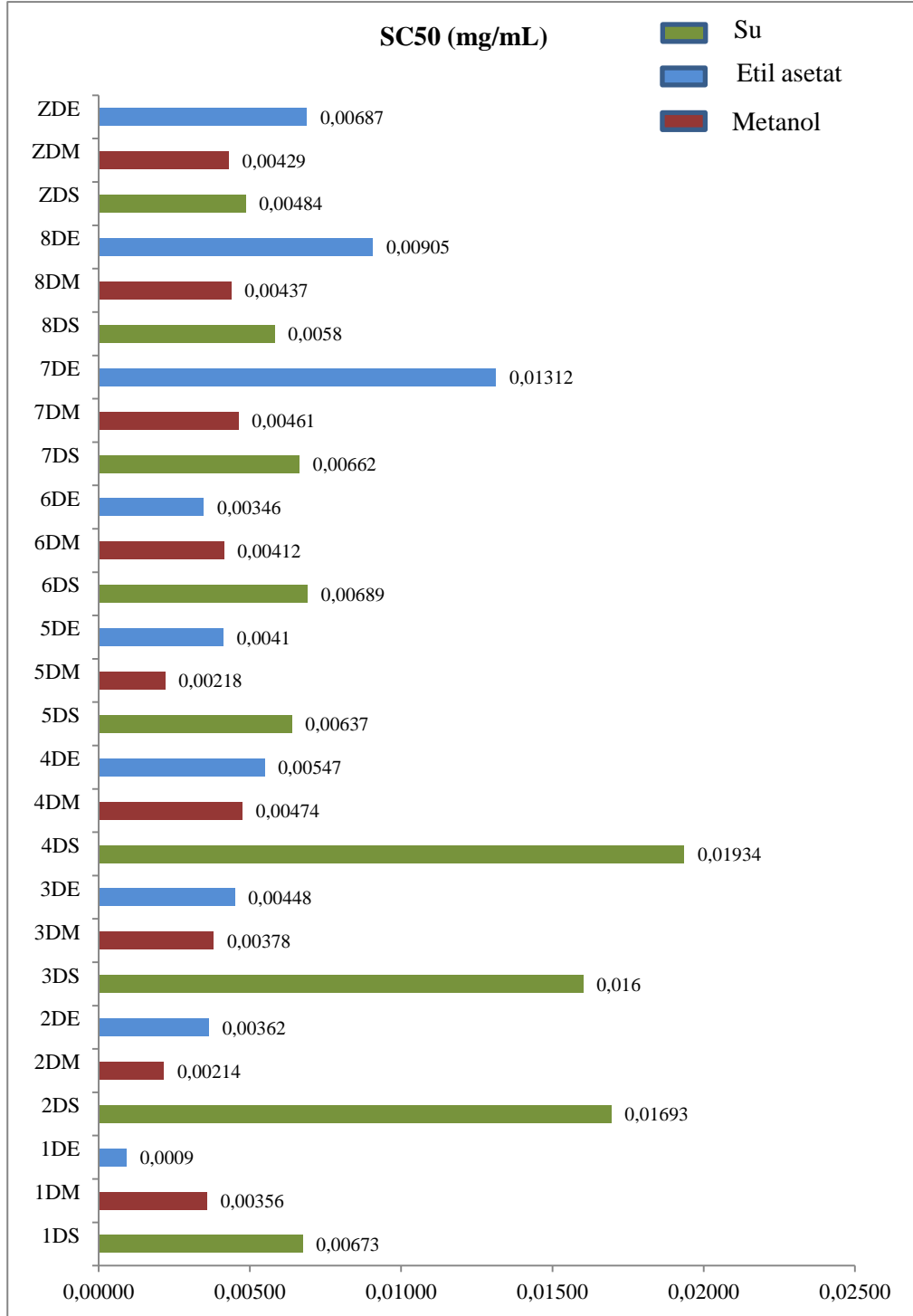
Şekil 52. Meyve kısımlarının metanollü, sulu ve etil asetatlı ekstraktlarının DPPH temizleme aktivitesi testinde SC₅₀ değerleri (mg/mL).

Meyve kısımlarının metanollü, etil asetatlı ve sulu ekstraktlarının DPPH temizleme aktiviteleri incelendiğinde sulu ekstraktların diğer iki çözücünükilere (metanol ve etil asetat) göre daha yüksektir (Şekil 52). Tüm meyve numunelerinin sulu ekstraktları için

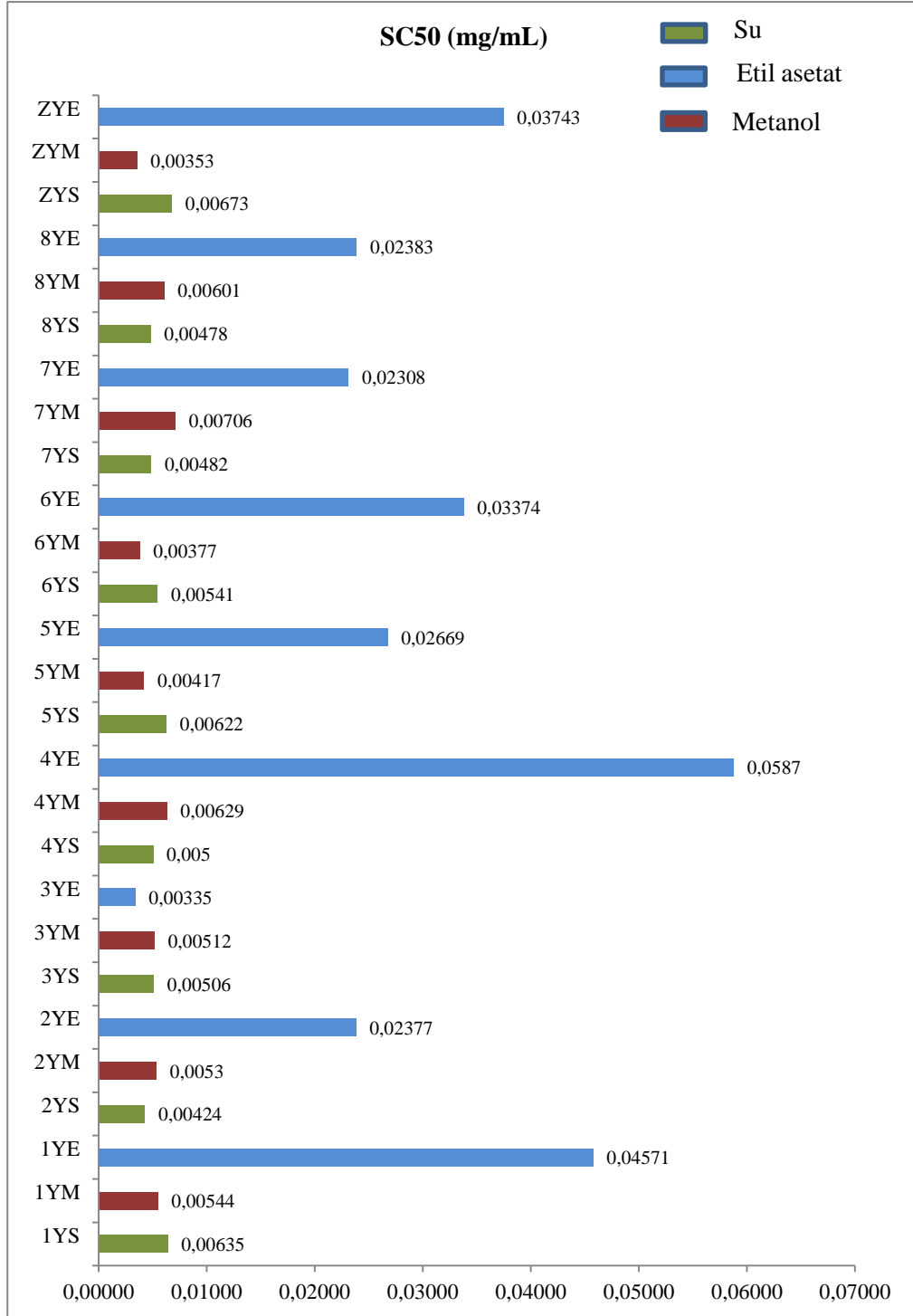
SC₅₀ değerleri metanollü ve etil asetatlılarınkilere göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Metanollü ve etil asetatlı ekstraktların SC₅₀ değerleri karşılaştırıldığında etil asetatlı numunelerin (4ME haricinde) metanollü numunelere göre daha küçük SC₅₀ değerli oldukları, dolayısıyla daha yüksek DPPH temizleme aktivitesine sahip oldukları görülmektedir. 4MM numunesi, 4ME numunesinden daha küçük SC₅₀ değerine sahip olduğu için daha yüksek DPPH temizleme aktivitesine sahiptir (SC₅₀ değerleri; 4MM: 0,02876 mg/mL, 4ME: 0,03131 mg/mL).

Şekil 53'de dal kısımlarının metanollü, etil asetatlı ve sulu ekstraktlarının DPPH temizleme aktivitesi testinde SC₅₀ değerleri verilmektedir. Bu şekildeki veriler göz önüne alındığında metanollü ekstraktların sulu olanlara göre daha küçük SC₅₀ değerleri vardır ve daha yüksek DPPH temizleme aktivitesine sahiptirler. Etil asetatlı ekstraktlar ile sulu ekstraktları karşılaştırdığımızda 7DE, 8DE ve ZDE numuneleri sırasıyla 7DS, 8DS ve ZDS numulerinden daha büyük SC₅₀ değerlerine sahiptirler ve DPPH temizleme aktiviteleri daha düşüktür (7DE<7DS, 8DE<8DS ve ZDE< ZDS). Diğer etil asetatlı dal numuneleri için SC₅₀ değerleri sulu dal numunelerine göre daha küçük olduğu için etil asetatlı numunelerin DPPH temizleme aktiviteleri sulu numunelerinkinden daha yüksektir.

Etil asetatlı dal numunelerinin SC₅₀ değerleri ile metanollü dal numunelerinin SC₅₀ değerleri karşılaştırıldığında; etil asetatlı ekstraktlar daha düşük DPPH temizleme aktivitesine sahiptir (1DE ve 6DE hariç). 1DE numunesi 1DM numunesinden, 6DE numunesi de 6DM numunesinden daha yüksek DPPH temizleme aktivitesine sahiptir (Şekil 53).



Şekil 53. Dal kısımlarının metanollü, sulu ve etil asetatlı ekstraktlarının DPPH temizleme aktivitesi testinde SC₅₀ değerleri (mg/mL).

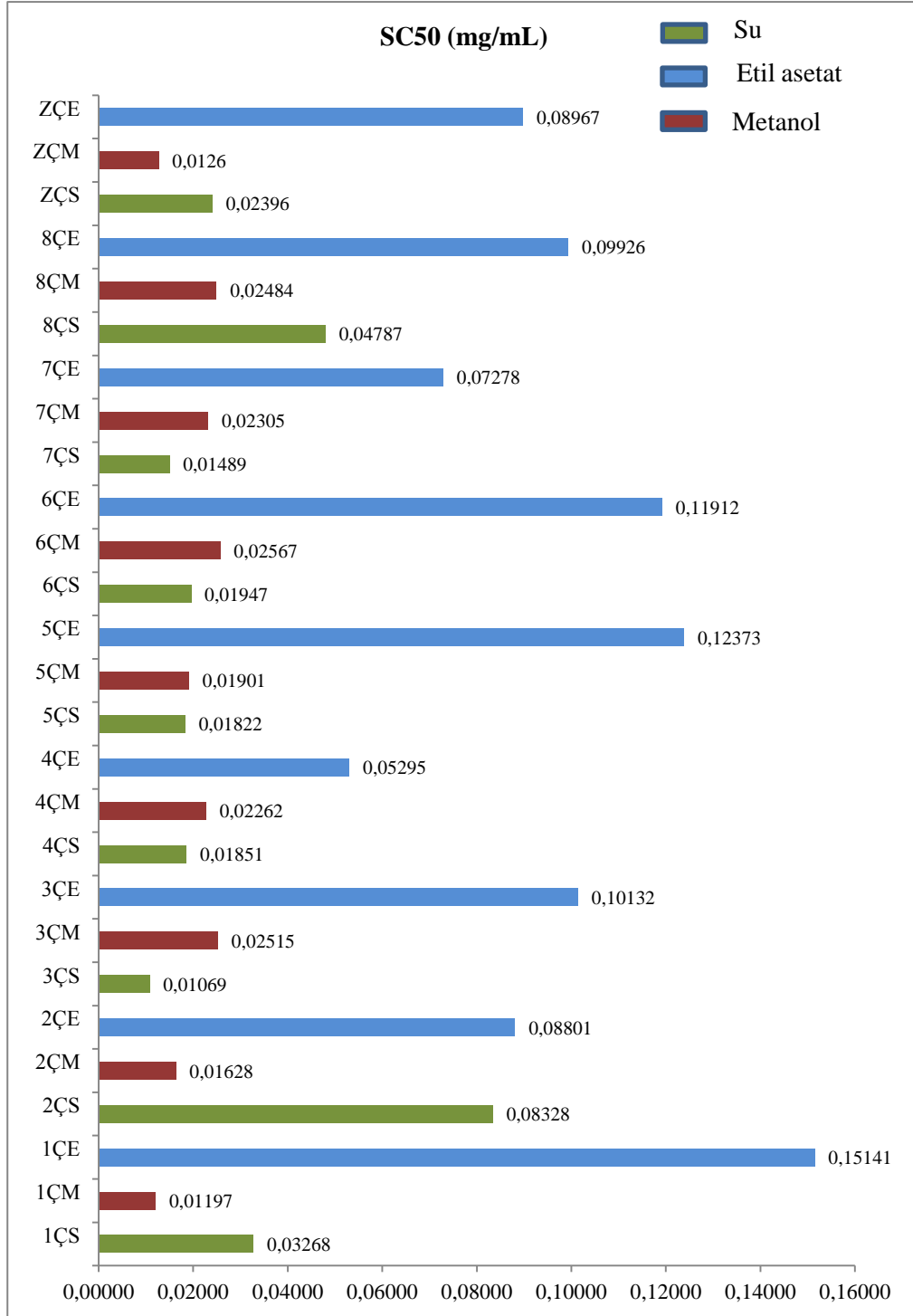


Şekil 54. Yaprak kısımlarının metanollü, sulu, etil asetatlı ekstraktlarının DPPH temizleme aktivitesi testinde SC₅₀ değerleri (mg/mL).

Yaprak kısımlarının etil asetatlı ekstraktları (3YE hariç), metanollü ve sulu ekstraktlarının SC₅₀ değerlerine göre daha büyük SC₅₀ değerlerine; dolayısıyla daha düşük DPPH temizleme aktivitesine sahiptirler. Sadece 3YE numunesinde bu durumun tersi

görülmektedir ve bu numunenin DPPH temizleme aktivitesi metanollü ve sulu numunelere (3YM ve 3YS) göre daha yüksektir (Şekil 54). ZYM, 6YM, 5YM ve 1YM numuneleri sırasıyla ZYS, 6YS, 5YS ve 1YS numunelerinden daha yüksek DPPH temizleme aktivitesine sahiptirler. Diğer metanollü yaprak numunelerinin SC_{50} değerleri sulu yaprak numunelerinin SC_{50} değerlerinden daha büyük olduğu için daha düşük DPPH temizleme aktivitesine sahiptirler.

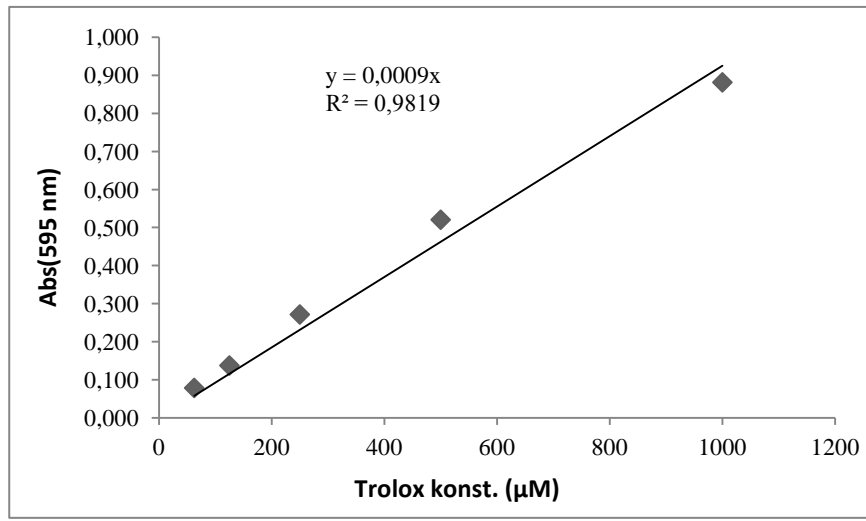
Çekirdek kısımlarının etil asetatlı ekstraktlarının DPPH radakali temizleme aktivitesi testinde elde edilen SC_{50} değerleri, metanollü ve sulu ekstraktların SC_{50} değerlerinden daha büyük olduğu için daha düşük DPPH temizleme aktivitesine sahiptirler (Şekil). ZÇM numunesi ZÇS numunesinden, 8ÇM numunesi 8ÇS numunesinden, 2ÇM numunesi 2ÇS numunesinden ve 1ÇM numunesi de 1ÇS numunesinden daha küçük SC_{50} değerine sahip olduğundan dolayı daha yüksek DPPH temizleme aktivitesine sahiptir. 3ÇM, 4ÇM, 5ÇM, 6ÇM ve 7ÇM numuneleri sırasıyla 3ÇS, 4ÇS, 5ÇS, 6ÇS ve 7ÇS numunelerinden daha büyük SC_{50} değerlerine sahip oldukları için daha düşük DPPH radikali temizleme aktivitesine sahiptirler (Şekil 55).



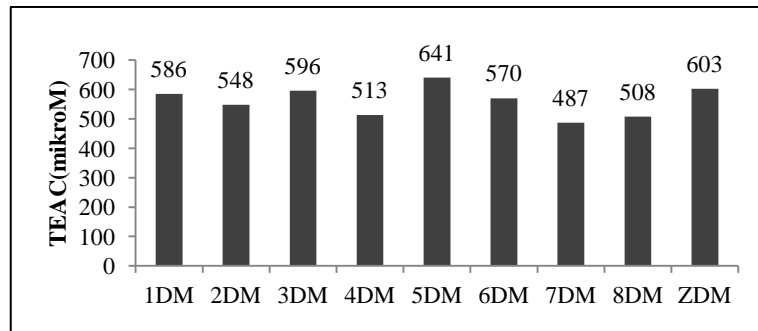
Şekil 55. Çekirdek kısımlarının metanollü, sulu ve etil asetatlı ekstraktlarının DPPH temizleme testinde SC₅₀ değerleri (mg/mL).

3.1.3. Demir (III) İndirgeme/ Antioksidan Kuvvet (FRAP)

Metanollü sulu ve etil asetatlı ekstraktların Demir (III) İndirgeme/Antioksidan Kuvveti (FRAP) yöntemiyle 595 nm’de numunelerin antioksidan kuvvetine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 57-72 ‘de verilmiştir. Trolox’un beş farklı konsantrasyonunun absorbansları ile çizilen kalibrasyon grafiğinde, numunelerin 595 nm’de verdikleri absorbanslar yerine konularak karşılık geldiği konsantrasyon Trolox eşdeğeri (mikromolar) olarak ifade edilmektedir ve numunelerin FRAP testindeki aktivitelerinin ölçüsüdür.

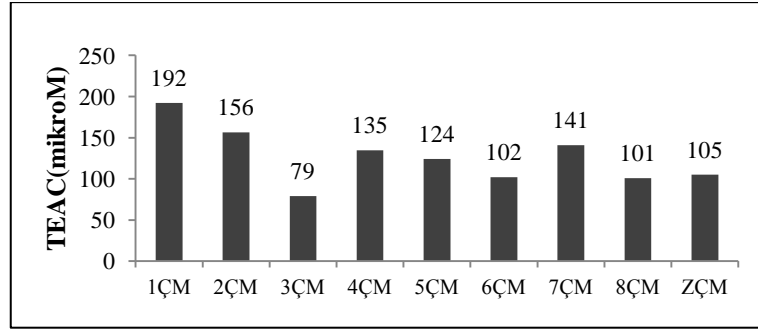


Şekil 56. FRAP testinde Trolox (beş farklı konsantrasyon) için kalibrasyon grafiği



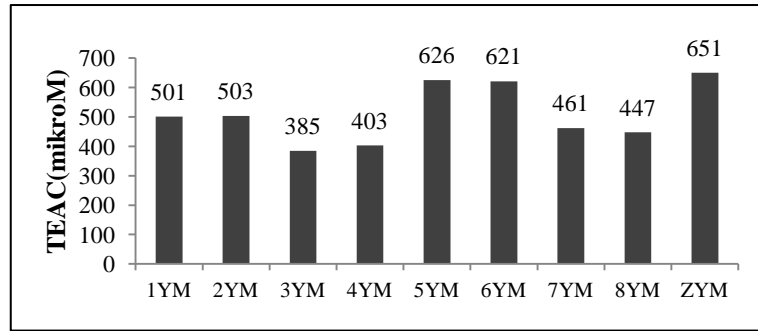
Şekil 57. Dal kısımlarının metanol ekstraktlarının FRAP testinde TEAC değerleri (Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite; µM).

Dal kısımlarının FRAP testinde TEAC değerleri Şekil .de verilmiştir. Bu verilere göre 641 μM TEAC değeri ile 5DM numunesi aktivitesi en yüksek, 7DM numunesi 487 μM TEAC değeri ile aktivitesi en düşük olan numunedir (Şekil 57.).



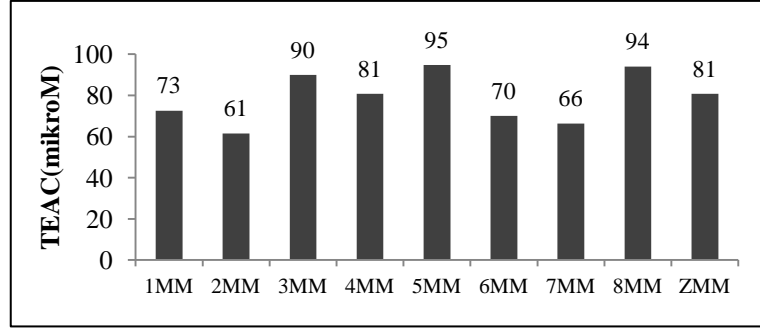
Şekil 58. Çekirdek kısımlarının metanollü ekstraktlarının FRAP testinde TEAC değerleri (Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite; μM).

Çekirdek kısımlarının metanollü ekstraktlarının FRAP testinde TEAC değeri 192 μM olan 1ÇM numunesi en yüksek aktiviteye, 79 μM olan 3ÇM numunesi ise en düşük aktiviteye sahiptir (Şekil 58.).



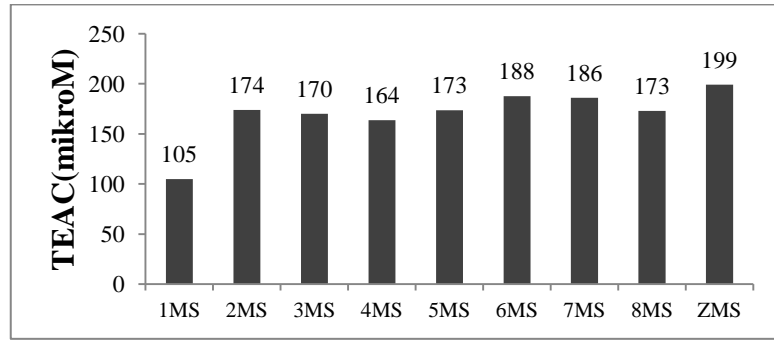
Şekil 59. Yaprak kısımlarının metanol ekstraktlarının FRAP testinde TEAC değerleri (Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite; μM).

Yaprak kısımlarının metanol ekstraktlarının FRAP testinde en yüksek aktiviteye ZYM numunesi en düşük aktiviteye ise 3YM numunesi sahiptir (Şekil 59.).



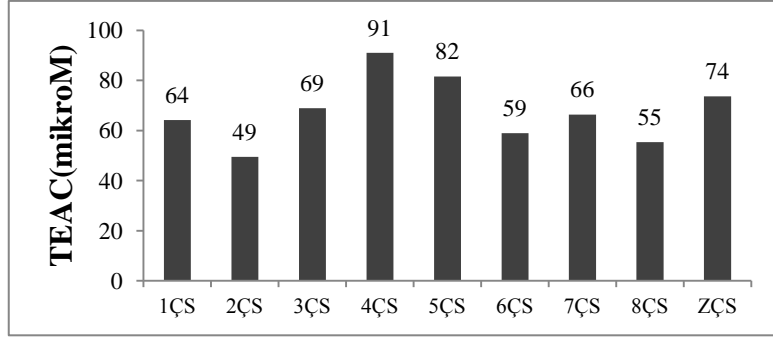
Şekil 60. Meyve kısımlarının metanol ekstraktlarının FRAP testinde TEAC değerleri (Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite; μM).

Meyve kısımlarının metanollü ekstraktlarının FRAP testinde TEAC değeri $95 \mu\text{M}$ olan 5MM numunesi en yüksek aktiviteye sahiptir. 6MM numunesi ise en düşük aktiviteye sahiptir (Şekil 60.).



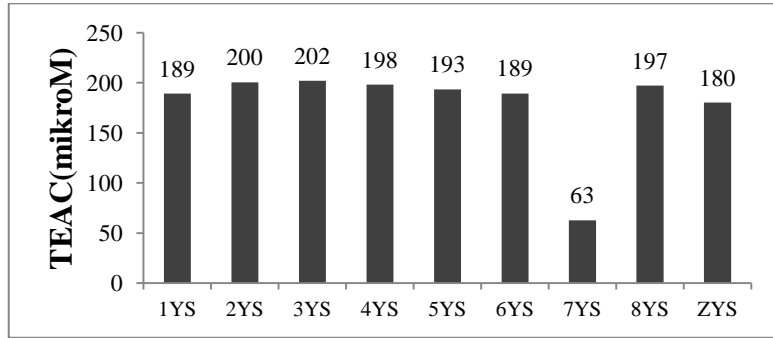
Şekil 61. Meyve kısımlarının sulu ekstraktlarının FRAP testinde TEAC değerleri (Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite; μM).

Meyve kısımlarının sulu ekstraktlarının FRAP testinde $199 \mu\text{M}$ TEAC değeri ile ZMS numunesinin en yüksek aktiviteye sahip olduğu, $105 \mu\text{M}$ TEAC değeri ile 1MS numunesinin sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 61.).



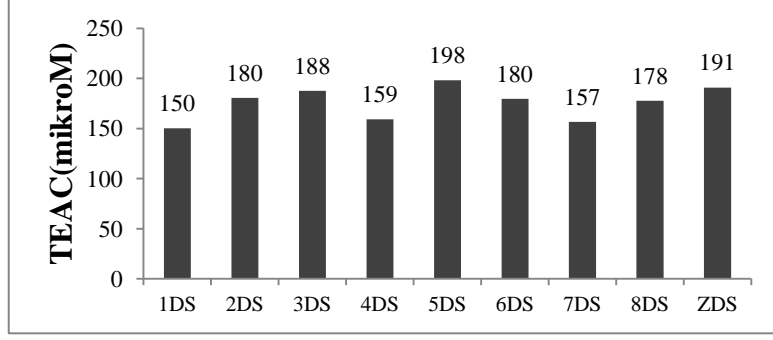
Şekil 62. Çekirdek kısımlarının sulu ekstraktlarının FRAP testinde TEAC değerleri (Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite; μM).

Çekirdek kısımlarının sulu ekstraktlarının TEAC değerleri karşılaştırıldığında 4ÇS numunesinin en yüksek, 2ÇS numunesinin ise en düşük aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 62.).



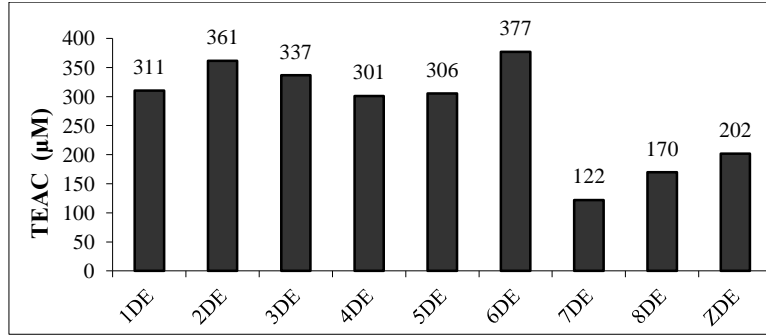
Şekil 63. Yaprak kısımlarının sulu ekstraktlarının FRAP testinde TEAC değerleri (Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite; μM).

Şekil 63’de yaprak kısımlarının sulu ekstraktlarının FRAP testinde TEAC değerleri görülmektedir. 63 μM değeri ile 7YS numunesi en düşük aktiviteye sahiptir. Diğer numunelerin TEAC değerleri birbirlerine yakın ve en yüksek aktiviteye sahip olan 202 μM değeri ile 3YS numunesidir.



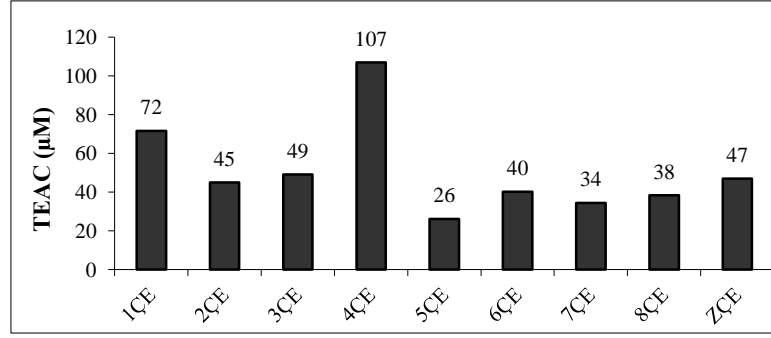
Şekil 64. Dal kısımlarının sulu ekstraktlarının FRAP testinde TEAC değerleri (Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite; μM).

Dal kısımlarının metanollü ekstraktlarının FRAP testinde 5DS numunesi en yüksek aktiviteye, 1DS numunesi ise en düşük aktiviteye sahiptir (Şekil 64.).



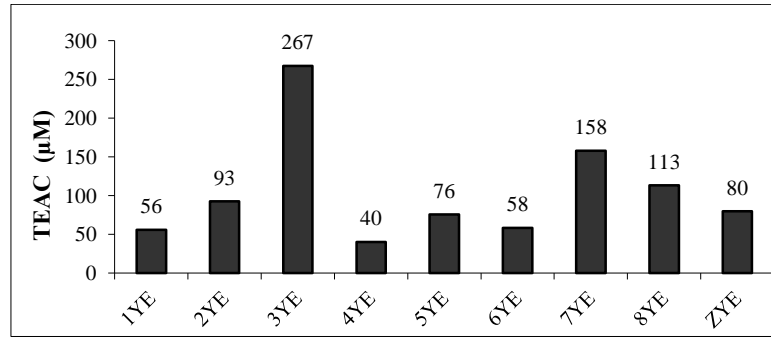
Şekil 65. Dal kısımlarının etil asetatlı ekstraktlarının FRAP testinde TEAC değerleri (Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite; μM).

Dal kısımlarının etil asetatlı ekstraktlarının FRAP testinde TEAC değerleri Şekil 65.'de verilmiştir. 6DE numunesi en yüksek aktiviteye, 7DE numunesi ise en düşük aktiviteye sahiptir.



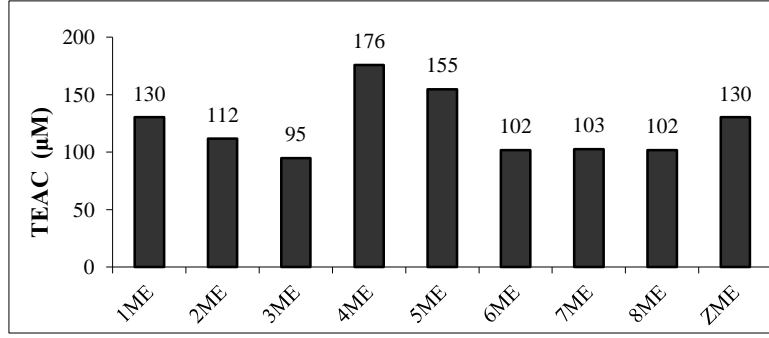
Şekil 66. Çekirdek kısımlarının etil asetatlı ekstraktlarının FRAP testinde TEAC değerleri (Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite; µM).

Çekirdek kısımlarının etil asetatlı ekstraktlarının FRAP testinde 4ÇE numunesi 107 µM TEAC değeri ile en yüksek aktiviteye, 5ÇE numunesi 26 µM TEAC değeri ile en düşük aktiviteye sahiptir (Şekil 66.).



Şekil 67. Yaprak kısımlarının etil asetatlı ekstraktlarının FRAP testinde TEAC değerleri (Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite; µM).

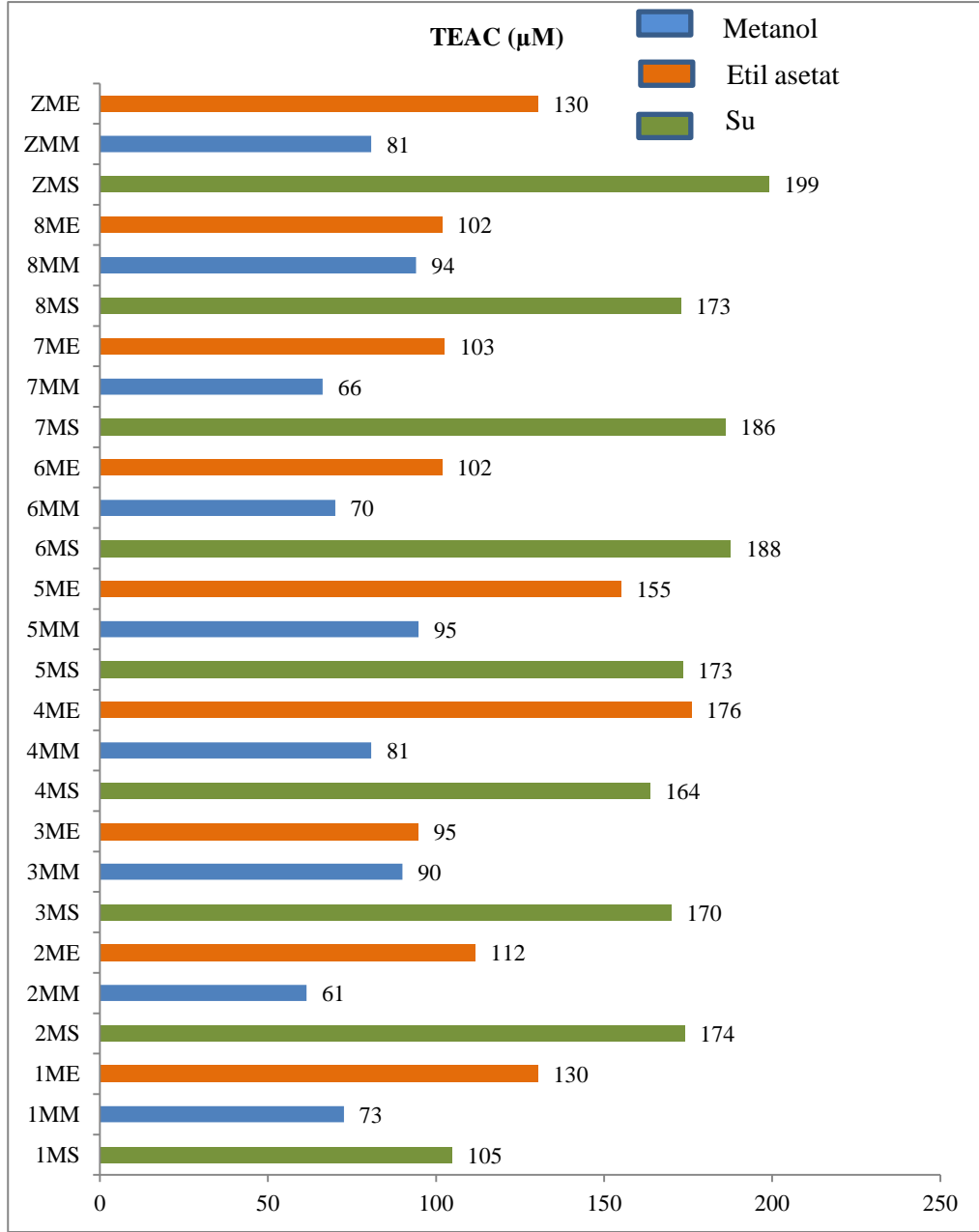
Yaprak kısımlarının etil asetatlı ekstraktlarının FRAP testi TEAC değerleri karşılaştırıldığında 3YE numunesi 267 µM değeri ile en yüksek aktiviteye, 4YE numunesi 40 µM değeri ile en düşük aktiviteye sahiptir (Şekil 67.).



Şekil 68. Meyve kısımlarının etil asetatlı ekstraktlarının FRAP testinde TEAC değerleri (Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite; µM).

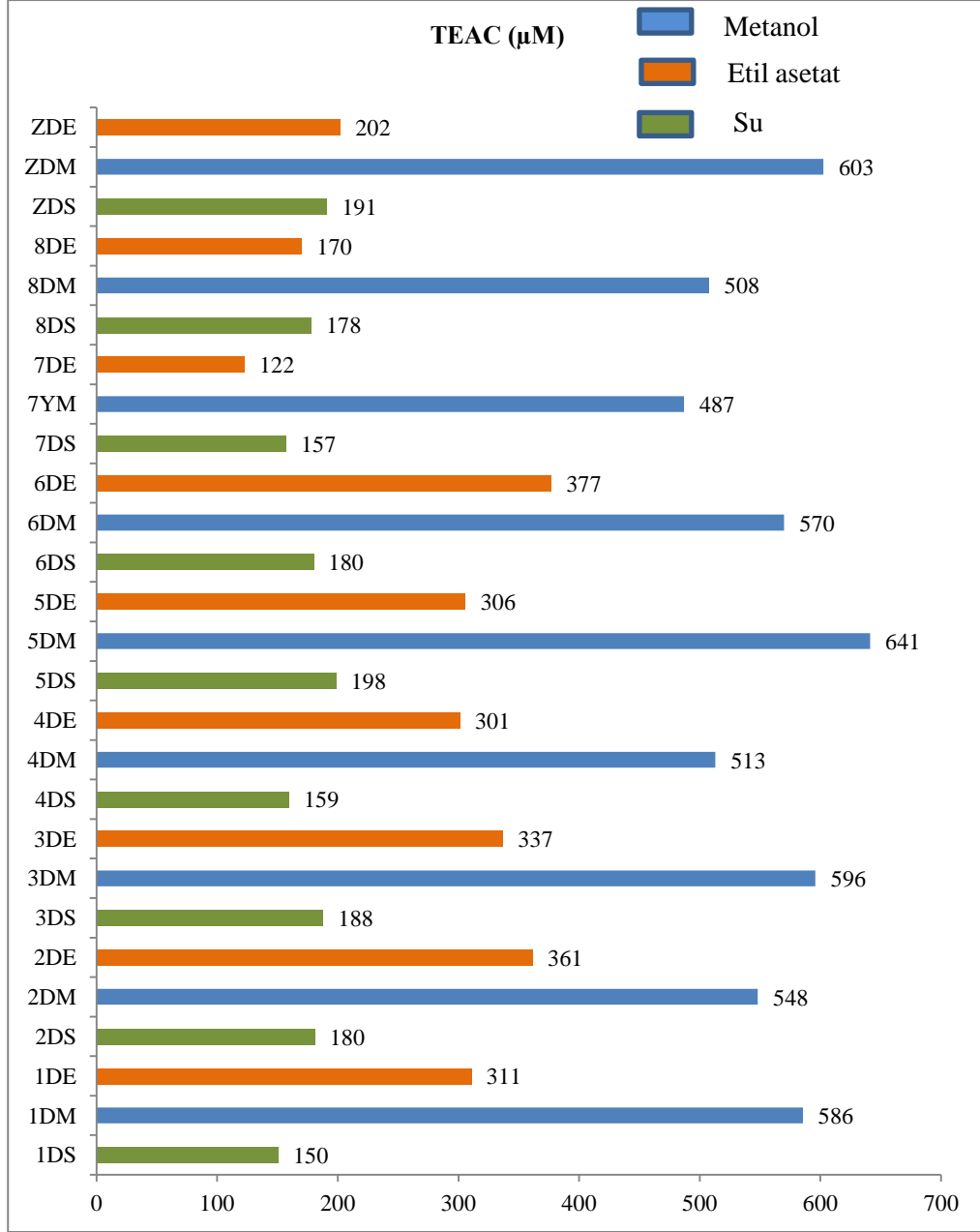
Meyve kısımlarının etil asetatlı ekstraktlarının FRAP testinde gösterdikleri aktiviteler TEAC değerleri olarak Şekil 70’de verilmiştir. 4ME numunesi 176 µM değeri ile en yüksek aktiviteye, 3ME numunesi 95 µM değeri ile en düşük aktiviteye sahiptir (Şekil 68.).

Meyve kısımlarının metanollü, sulu ve etil asetatlı ekstraktlarının FRAP testinde TEAC değerleri Şekil 69.’ de verilmiştir. Sulu numuneler (1MS ve 4MS hariç), metanollü ve etil asetatlı numunelerden daha yüksek TEAC değerine sahip olduklarından dolayı FRAP testinde en yüksek aktiviteye sahiptirler. 1MS, 1ME ve 1MM numunelerinin aktiviteleri karşılaştırıldığında 1ME > 1MS > 1MM sıralaması vardır. 4MS, 4ME ve 4MM numunelerinin aktiviteleri arasında ise 4ME > 4MS > 4MM sıralaması vardır. Metanollü, sulu ve etil asetatlı meyve ekstraktlarının FRAP testinde diğer ikisine göre düşük TEAC değerlerine sahip metanollü ekstraktlar en düşük aktiviteye sahiptir (Şekil 69).

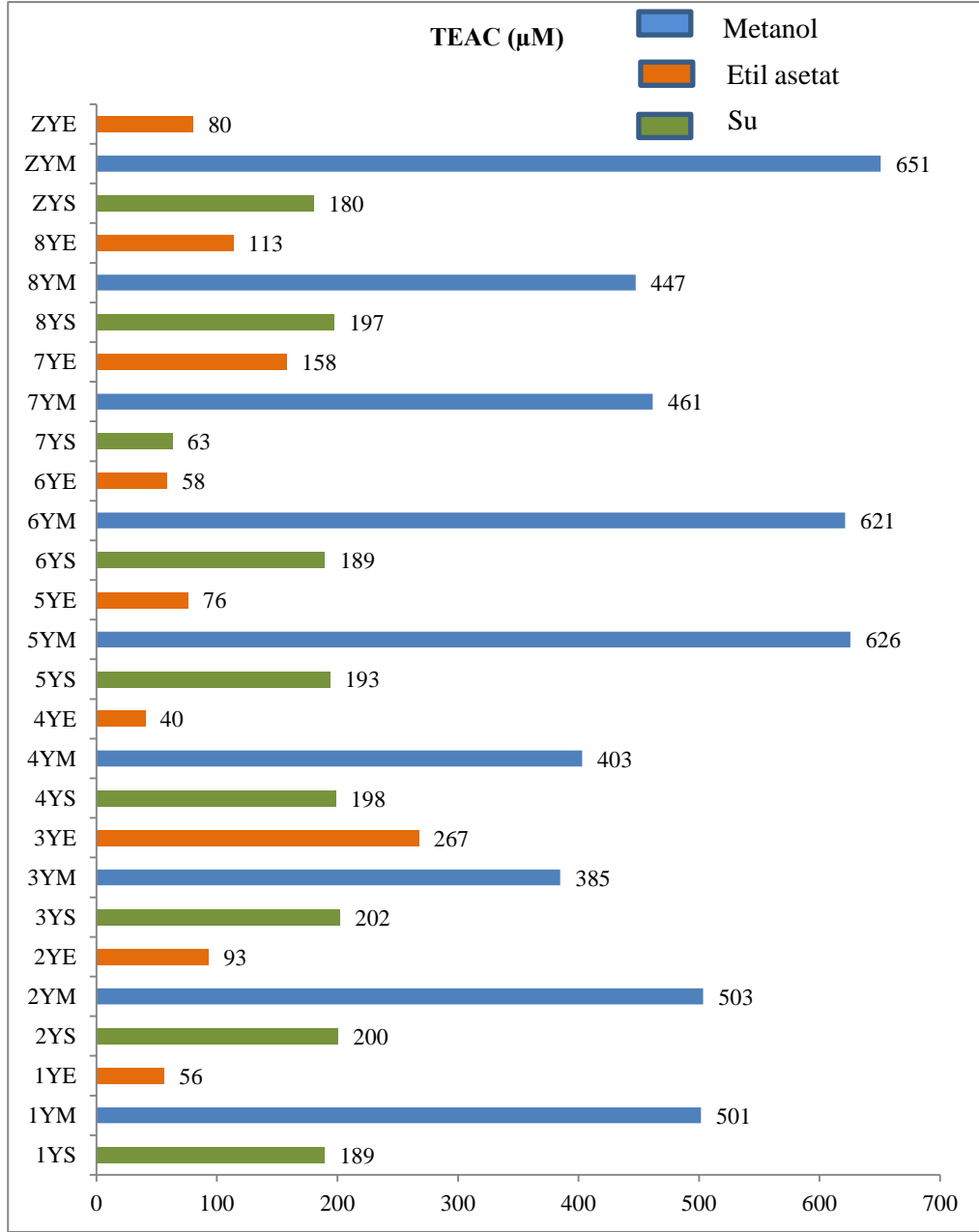


Şekil 69. Meyve kısımlarının metanollü, sulu ve etil asetatlı ekstraktlarının FRAP testinde TEAC değerleri (Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite; μM).

Dal kısımlarının metanollü, sulu ve etil asetatlı ekstraktlarının FRAP testinde metanollü ekstraktların TEAC değerleri sulu ve etil asetatlı ekstraktlarından daha büyüktür en yüksek aktiviteye sahiptirler (Şekil 70). FRAP testinde, etil asetatlı dal ekstraktları (7DE ve 8DE hariç) sulu dal ekstraktlarından daha yüksek aktiviteye sahiptir. FRAP testinde 7DE numunesi, 7DS numunesinden ve 8DE numunesi de 8DS numunesinden daha düşük aktiviteye sahiptir (Şekil 70).

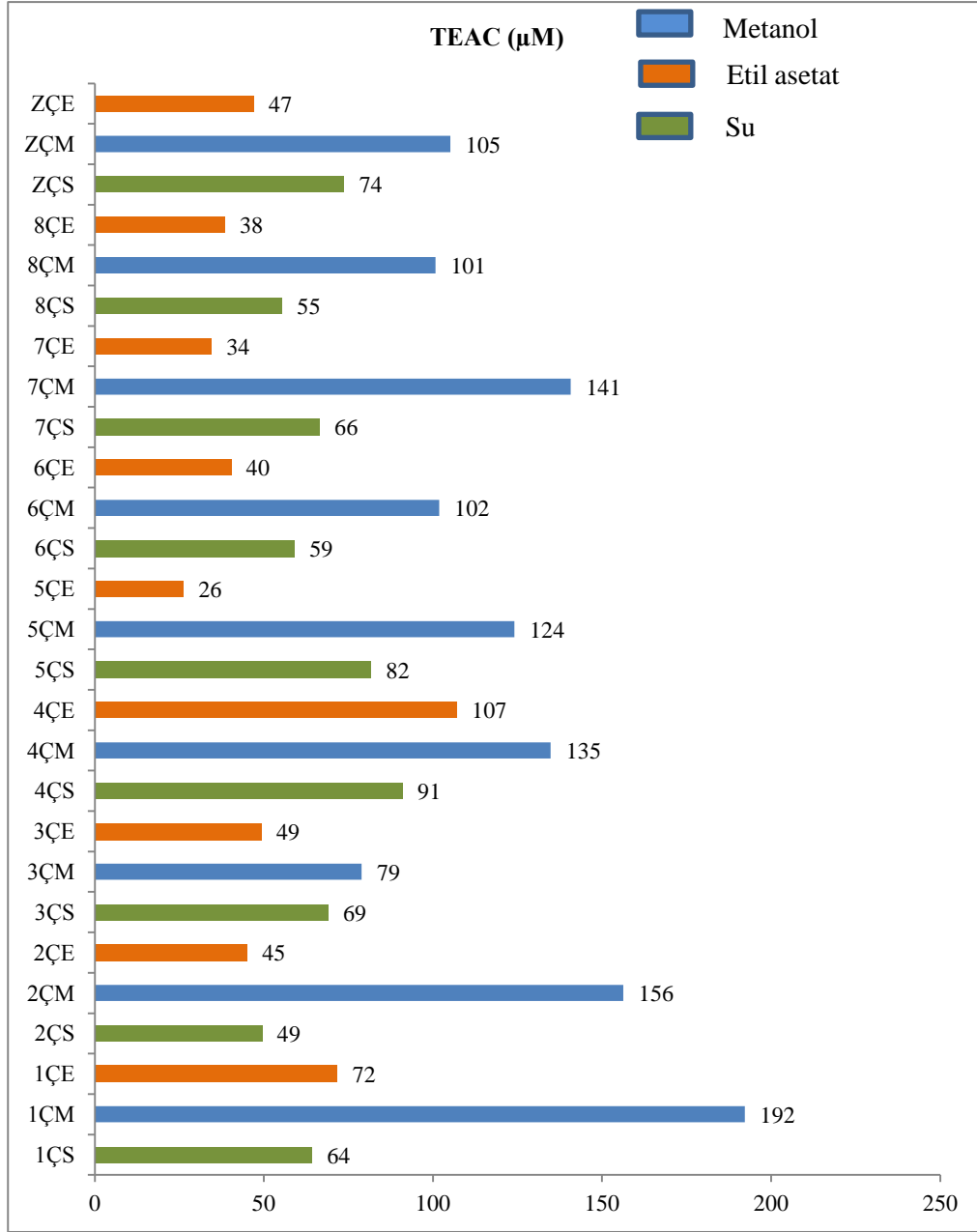


Şekil 70. Dal kısımlarının metanollü, sulu ve etil asetatlı ekstraktlarının FRAP testinde TEAC değerleri (Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite; μM).



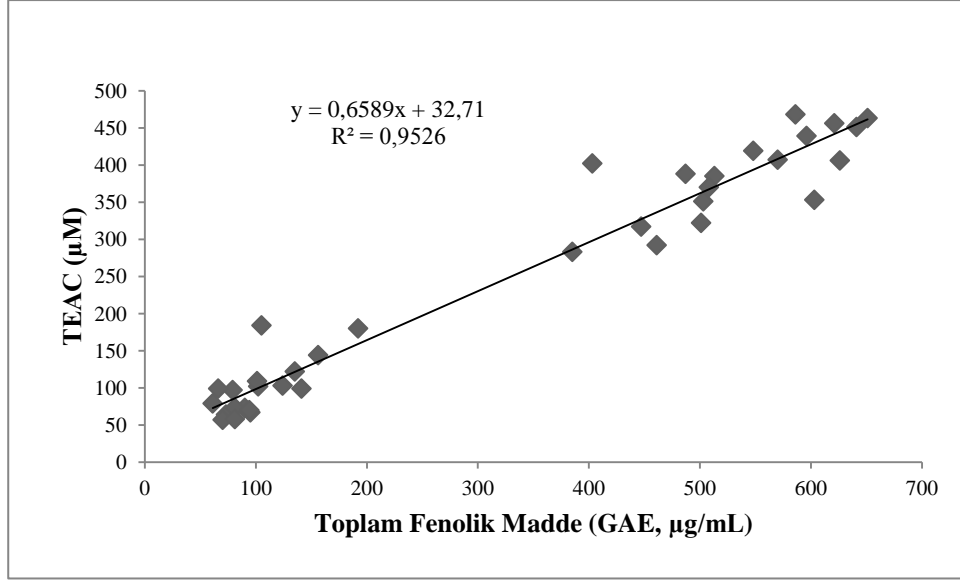
Şekil 71. Yaprak kısımlarının metanollü, sulu ve etil asetatlı ekstraktlarının FRAP testinde TEAC değerleri (Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite; μM).

Yaprak kısımlarının metanollü, sulu ve etil asetatlı ekstraktlarının FRAP testi sonuçlarına göre metanollü numuneler, sulu ve etil asetatlı numunelere göre daha yüksek TEAC değerleri ile daha yüksek aktiviteye sahiptirler. 1YS, 1YE'den; 2YS, 2YE'den; 4YS, 4YE'den; 5YS, 5YE'den; 6YS, 6YE'den, 8YS, 8YE'den ve ZYS numunesi de ZYE numunesinden daha yüksek aktiviteye sahiptir. Etil asetatlı numunelerden 3YE ve 7YE, sırasıyla sulu numunelerden 3YS ve 7YS'den daha düşük aktiviteye sahiptirler (Şekil 71.).



Şekil 72. Çekirdek kısımlarının metanollü, sulu ve etil asetatlı ekstraktlarının FRAP testinde TEAC değerleri (Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite; μM).

Çekirdek kısımlarının metanollü, sulu ve etil asetatlı ekstraktlarının FRAP testinde, metanollü ekstraktlar en yüksek aktiviteye sahiptir. Etil asetatlı ve sulu numunelerin TEAC değerleri karşılaştırıldığında, sulu numuneler (1ÇS ve 4ÇS hariç) etil asetatlı numunelerden daha yüksek aktiviteye sahiptirler. 1ÇS ($64 \mu\text{M}$) ve 4ÇS ($91 \mu\text{M}$) numuneleri sırasıyla 1ÇE ($72 \mu\text{M}$) ve 4ÇE ($107 \mu\text{M}$) numunelerinden daha düşük aktiviteye sahiptirler (Şekil 72.).



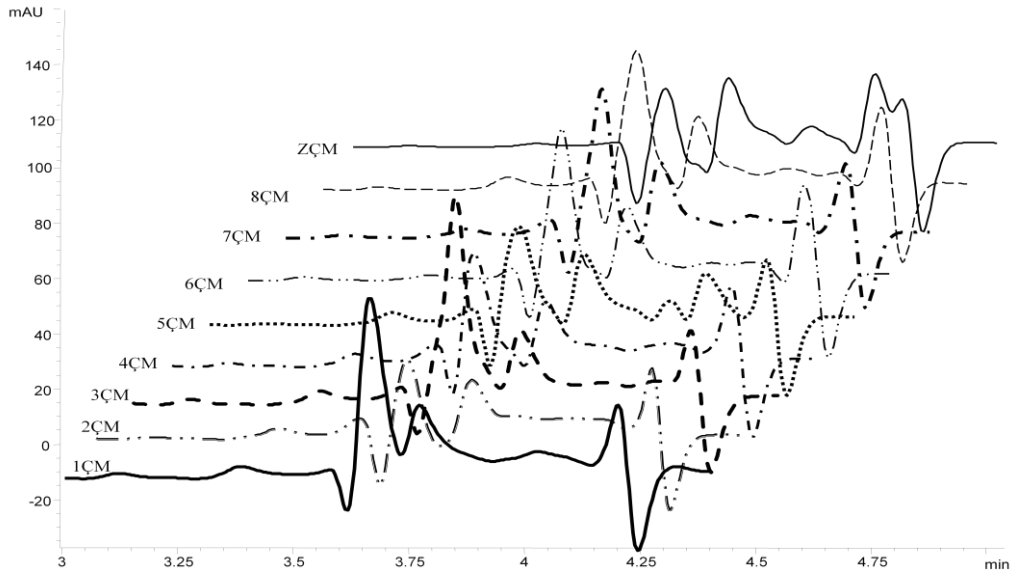
Şekil 73. Metanollü ekstraktların, toplam fenolik madde miktarı tayini yöntemi ve FRAP yöntemi için korelasyon grafiği.

Toplam fenolik madde miktarı tayini yöntemi ve FRAP yöntemi için elde edilen korelasyon grafiğine göre iki yöntem arasında uyum olduğu belirlendi (Şekil 73.).

3.2. Online-HPLC-FRAP Analizleri

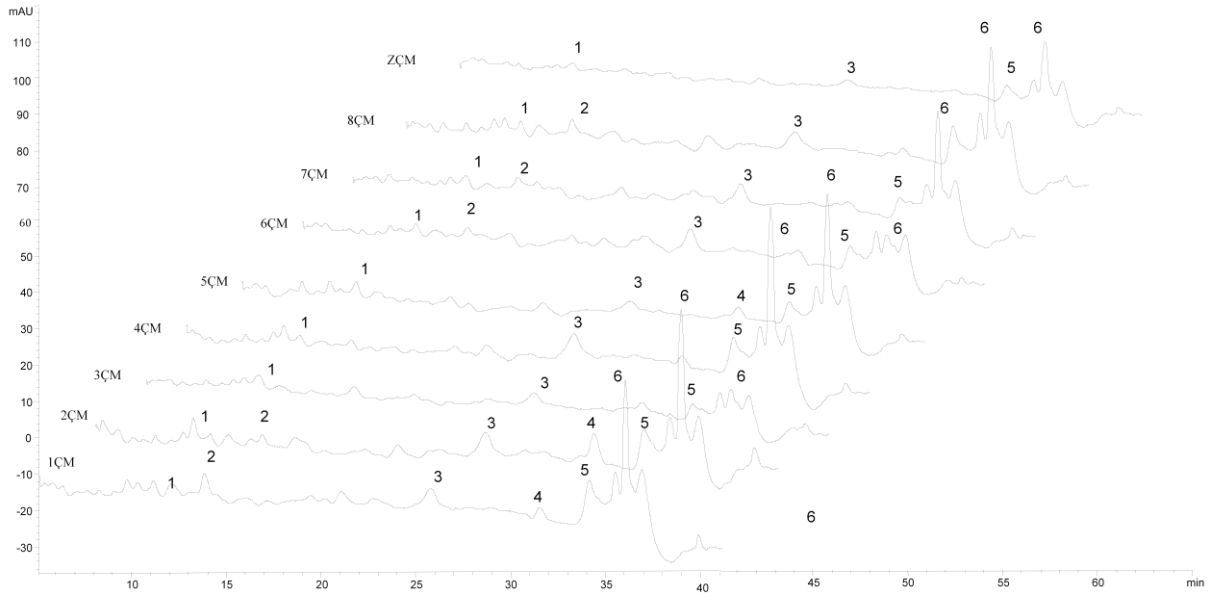
Kuşburnu bitkisinin meyve, çekirdek, dal ve yaprak kısımlarının metanollü ekstraktlarına online-HPLC-FRAP yöntemi uygulandı. Çalışılan numunelerin konsantrasyonları 5 mg/mL'dir.

Analizlerde kullanılan standartlar (125µM standart karışım); gallik asit, protokatekuik asit, protokatekulaldehit, benzoik asit, p-hidroksi benzoik asit, rosmarinik asit, sinapik asit, klorogenik asit, syringik asit, syringaldehit, ferrulik asit, kaffeik asit, p-kumarik asit, vanilin, vanilik asit, gentsik asit.



Şekil 74. Çekirdek kısımlarının metanollü ekstraktları için DAD-280 nm'deki piklerin karşılaştırılması (3-5 dk arası).

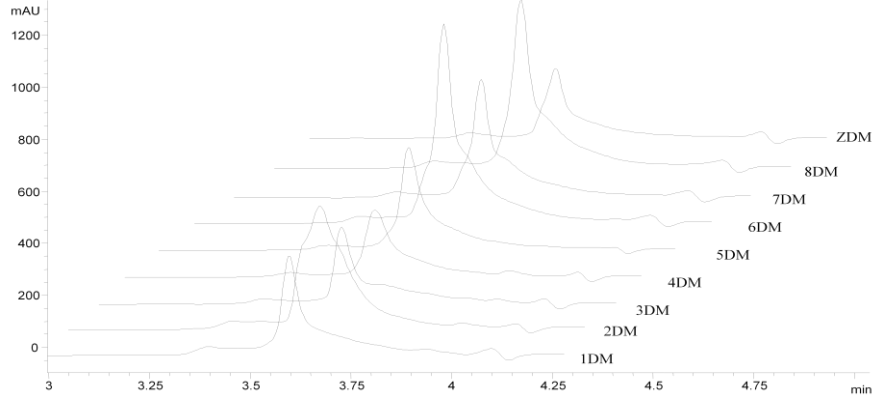
Çekirdek numunelerinin 3. ve 5.dk arasında 280 nm'deki pikleri karşılaştırıldığında Rt değeri 3.6 olan pik tüm numunelerde ortak olarak bulunmaktadır (Şekil 74.).



Şekil 75. Çekirdek kısımlarının metanollü ekstraktları için DAD-280 nm'deki piklerin karşılaştırılması (5-41 dk arası).

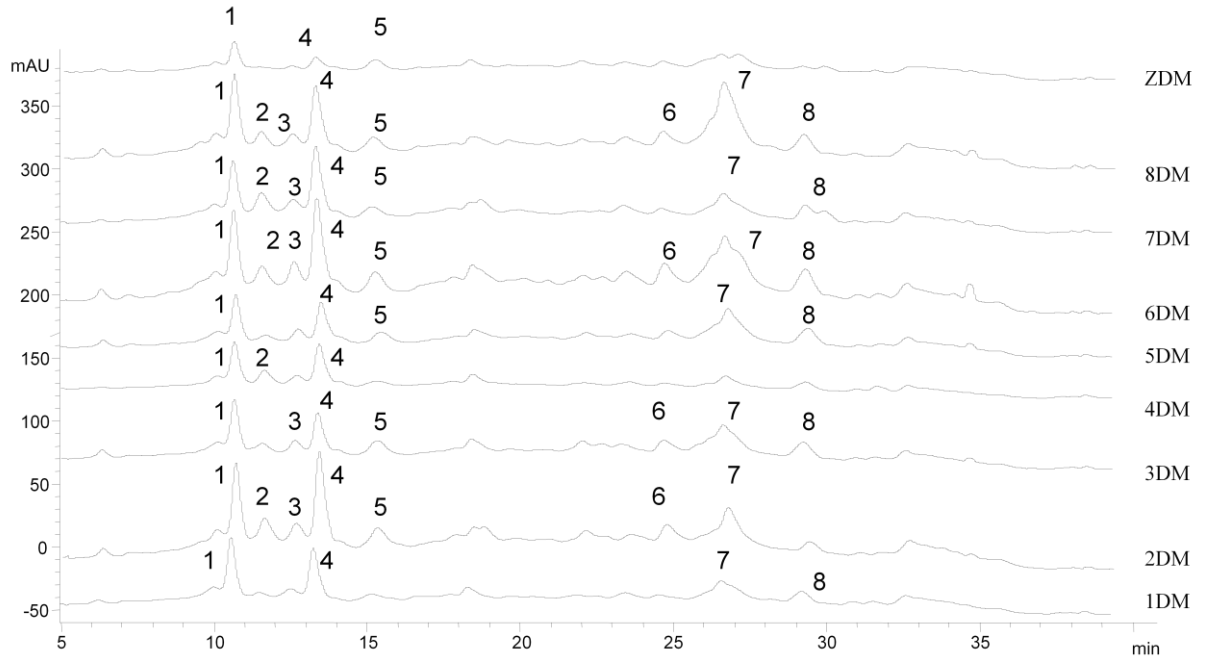
Çekirdek kısımlarının metanollü ekstraktlarının HPLC analizlerinde 280 nm'deki spektrumları karşılaştırıldığında 1, 3 ve 5 nolu pikler tüm numunelerde ortaktır. 2, 4 ve 5 nolu

pikler numunelerin bazılarında görülmektedir. 6 nolu pik yine tüm numunelerde bulunmakla beraber 3ÇM numunesinde pik yüksekliği daha düşük çıkmıştır (Şekil 75.).



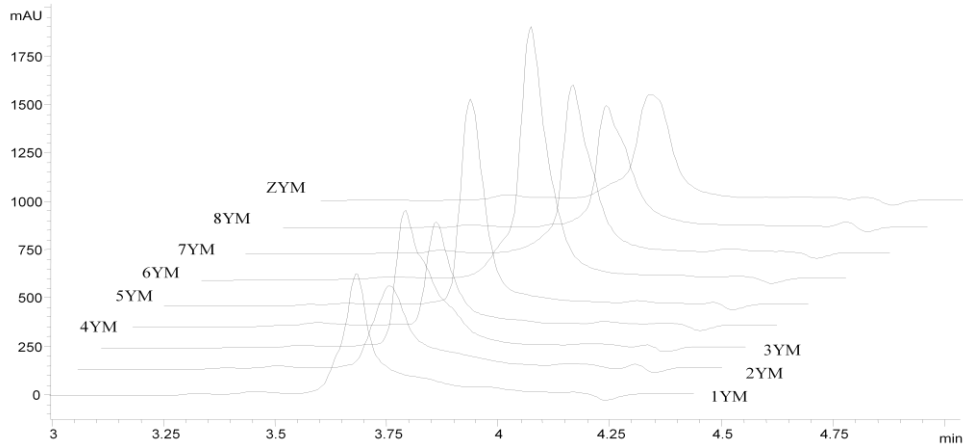
Şekil 76. Dal kısımlarının metanollü ekstraktları için DAD-280 nm'deki piklerin karşılaştırılması (3-5 dk arası).

Dal kısımlarının metanollü ekstraktlarının HPLC analizlerinde 280 nm'deki spektrumları karşılaştırılarak Rt değeri 3.6 olan pik tüm numunelerde ortak olarak belirlenmiştir (Şekil 76.).

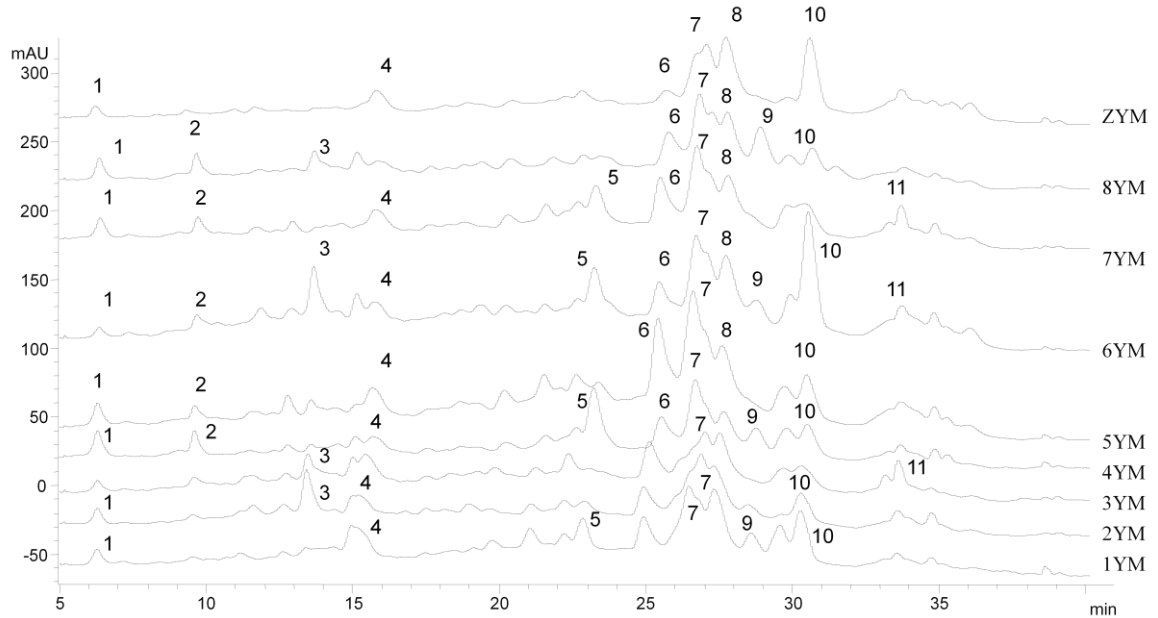


Şekil 77. Dal kısımlarının metanollü ekstraktları için DAD-280 nm'deki piklerin karşılaştırılması (5-41 dk arası).

Dal numunelerinin HPLC analizlerinde 280 nm'deki spektrumları karşılaştırıldığında (5-41dk arası) 1 ve 4 nolu pikler ortak olarak tüm numunelerde bulunmaktadır. Numaralandırılan diğer piklerin numunelerde bulunma durumu farklılık göstermektedir. Örneğin 6 nolu pik sadece 8DM, 6DM, 3DM ve 2DM numunelerinde bulunurken diğerlerinde belirgin olarak gözlemlenmemiştir (Şekil 77.).



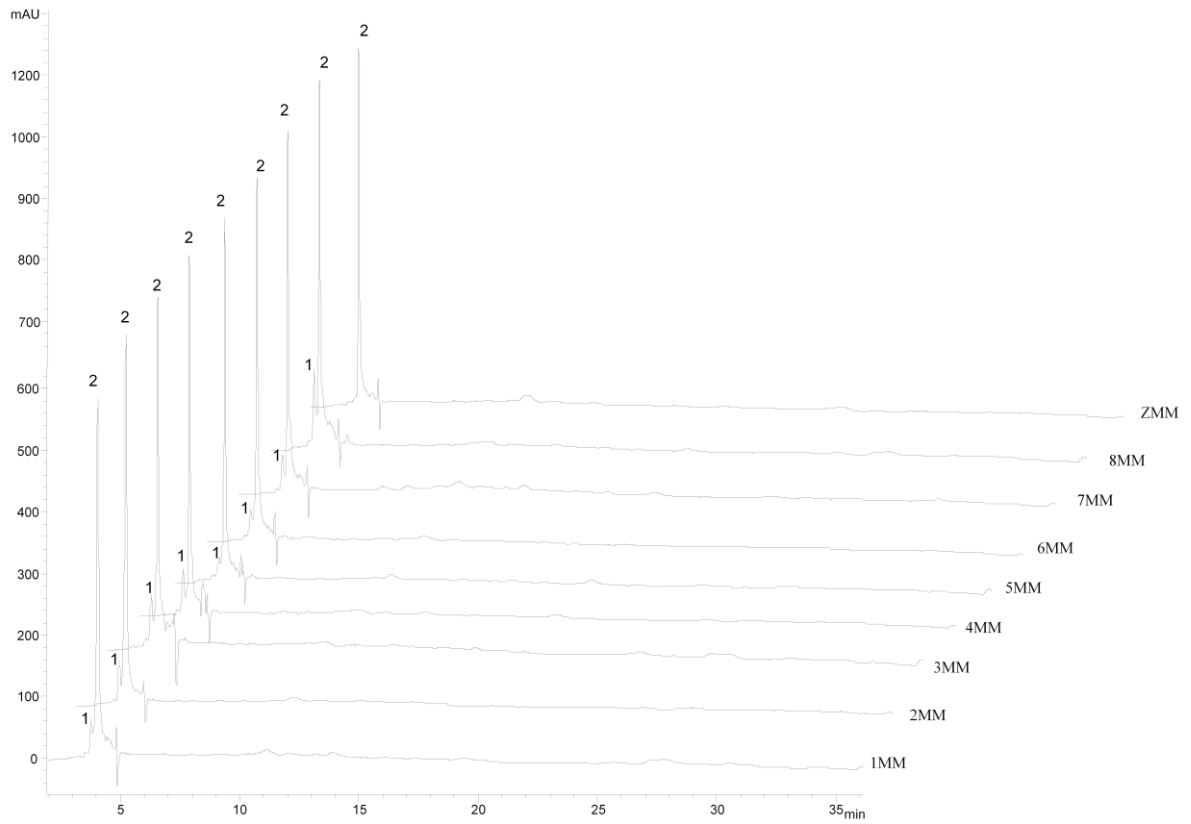
Şekil 78. Yaprak kısımlarının metanollü ekstraktları için DAD-280 nm'deki piklerin karşılaştırılması (3-5 dk arası).



Şekil 79. Yaprak kısımlarının metanollü ekstraktları için DAD-280 nm'deki piklerin karşılaştırılması (5-41 dk arası).

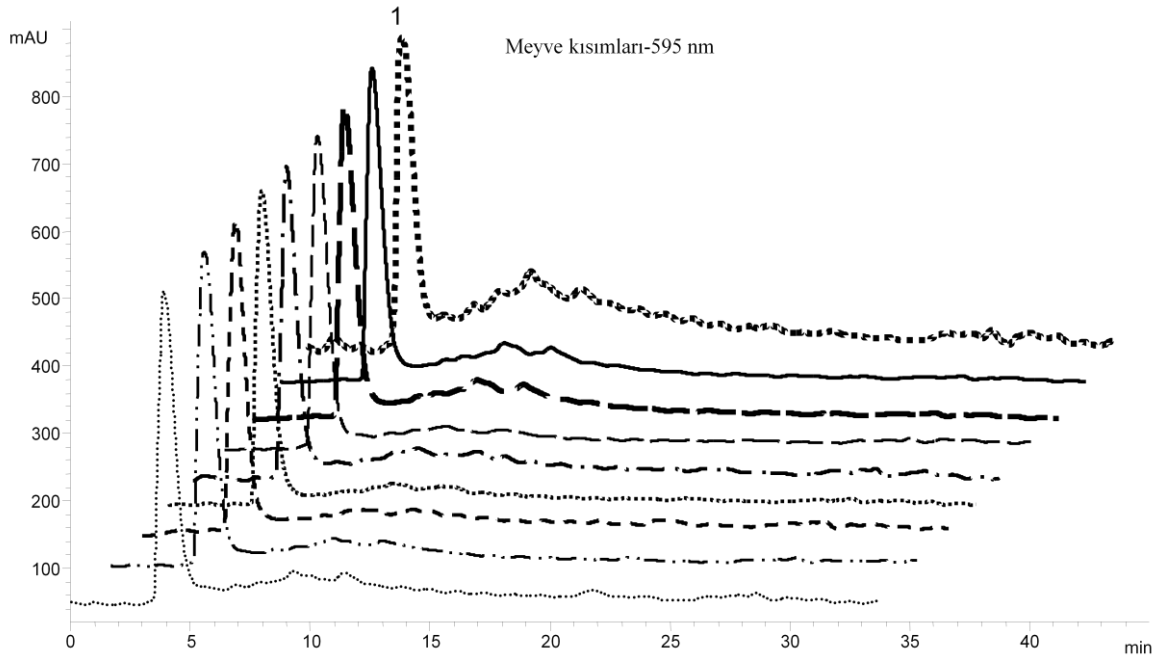
Yaprak kısımlarının metanollü ekstraktları ile yapılan HPLC analizlerinde 280 nm'deki spektrumlar karşılaştırıldığında (3-5. dk arası) Rt değeri 3.6 olan pik tüm numunelerde bulunmaktadır (Şekil 78.).

Yaprak kısımları ile yapılan HPLC analizleri sonucunda 1, 4 ve 7 nolu piklerin tüm numunelerde ortak olduğu tespit edildi. Numuneler arasında bulunma durumu farklılık gösteren pikler 2, 3, 5, 6, 8, 9, 10 ve 11 nolu piklerdir. Bu piklerden 2 nolu pik 4YM, 5YM, 6YM, 7YM ve 8YM numunelerinde bulunurken diğer numunelerde gözlemlenmemiştir (Şekil 79.).



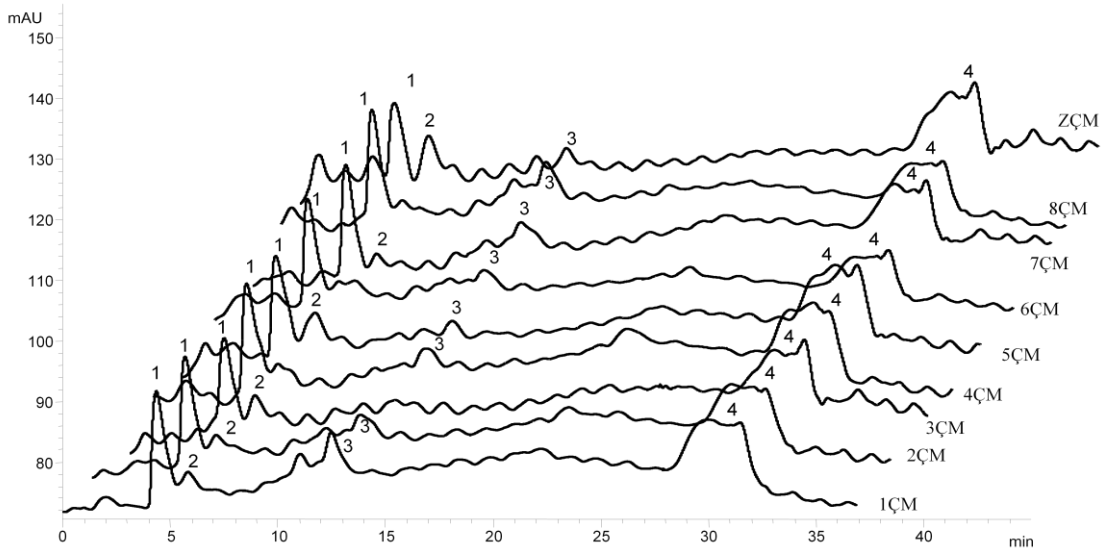
Şekil 79. Meyve kısımlarının metanollü ekstraktları için DAD-280 nm'deki piklerin karşılaştırılması.

Metanollü meyve ekstraktları ile yapılan HPLC analizlerinde 280 nm'de 2 nolu tüm numunelerde ortak olarak, 1 nolu pik de ZMM numunesi hariç diğer meyve numunelerinde ortak pik olarak belirlendi (Şekil 79.).



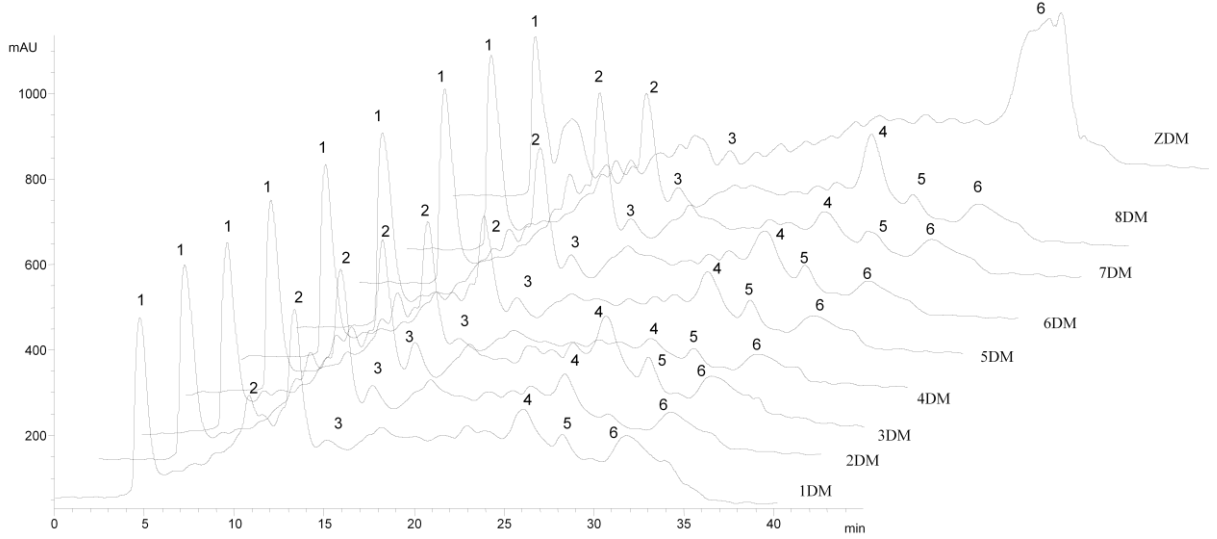
Şekil 80. Meyve kısımlarının metanollü ekstraktlarının online-HPLC-FRAP yönteminde UV-Vis 595 nm'deki spektrumları.

Meyve kısımlarının metanollü ekstraktlarının HPLC analizlerinde 1 nolu pik (595 nm'de) tüm numunelerde ortak major pik olarak belirlendi (Şekil 80.).



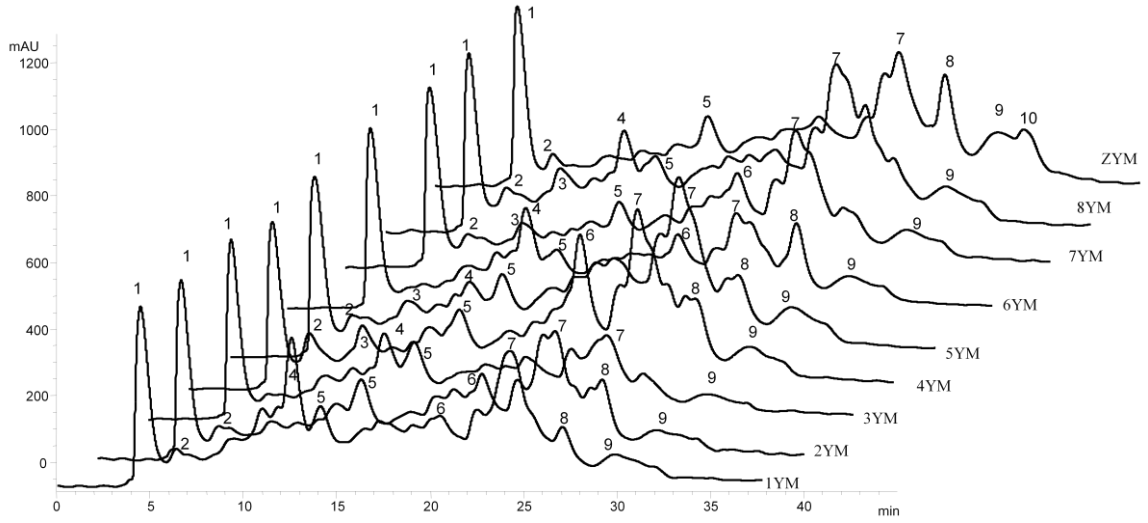
Şekil 81. Çekirdek kısımlarının metanollü ekstraktlarının online-HPLC-FRAP yönteminde 595 nm'deki spektrumları.

Çekirdek kısımlarının metanollü ekstraktları ile yapılan online-HPLC-FRAP yönteminde elde edilen UV-Vis 595 nm'deki absorbansları Şekil 81.'de bir arada verilmiştir. 1 ve 4 nolu pikler tüm numunelerde bulunmaktadır. 2 nolu pikin sadece 1ÇM, 2ÇM, 3ÇM, 5ÇM, 7ÇM ve ZÇM numunelerinde olduğu belirlenmiştir (Şekil 81.).



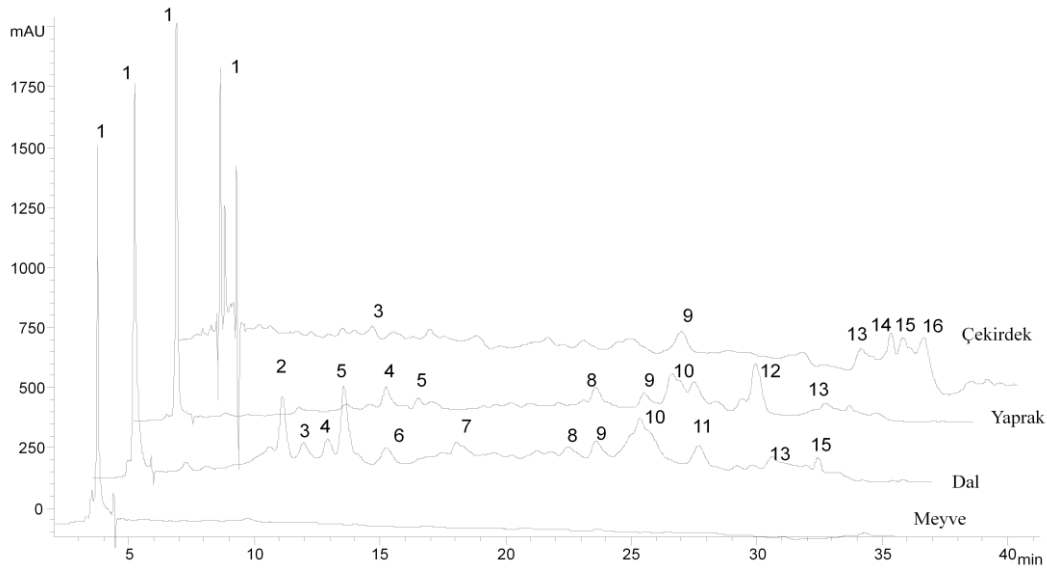
Şekil 82. Dal kısımlarının metanollü ekstraktlarının online-HPLC-FRAP yönteminde 595 nm'deki spektrumları.

Dal kısımlarının metanollü ekstraktlarının online-HPLC-FRAP yönteminde 595 nm'deki spektrumlarında, 1, 3 ve 6 nolu pikler tüm dal numunelerinde ortak olarak tespit edildi. 2 nolu pik ZDM numunesi haricinde diğer numunelerde belirlendi. 6 nolu pik ZDM numunesinde diğerlerinden daha büyük pik yüksekliğine sahiptir (Şekil 82.).



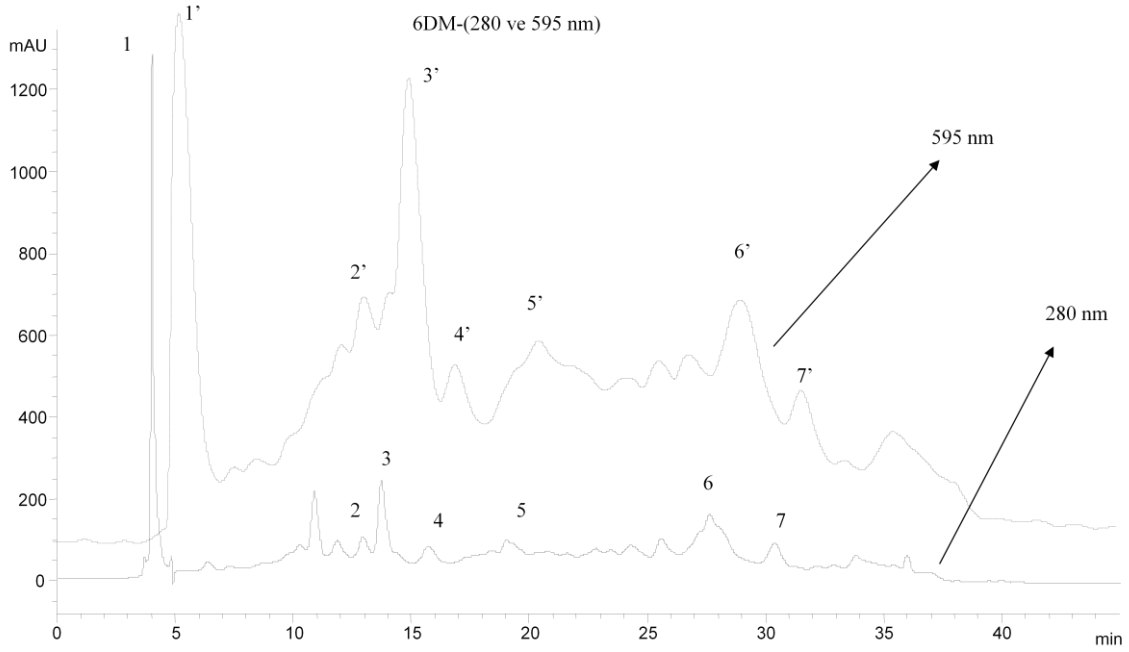
Şekil 83. Yaprak kısımlarının metanollü ekstraktlarının online-HPLC-FRAP yönteminde 595 nm'deki spektrumları.

Yaprak kısımlarının metanollü ekstraktlarına uygulanan online-HPLC-FRAP yönteminde 595 nm'deki absorbans değerleri Şekil 83.'de verilmiştir. 1, 5 ve 9 nolu pikler tüm metanollü yaprak numunelerinde ortak olarak belirlendi. 8 nolu pik 3YM, 7YM ve 8YM numuneleri haricinde diğer numunelerde ortak olarak belirlendi ve en fazla ZYM ve 6YM numunelerinde olduğu tespit edildi (Şekil 83.).



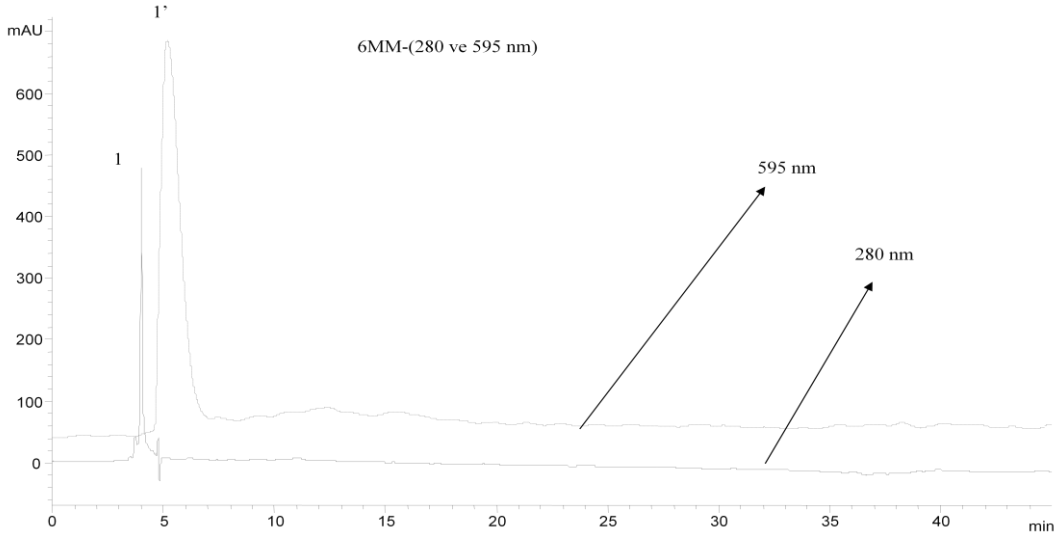
Şekil 84. Farklı bitki kısımlarının online-HPLC-FRAP yönteminde DAD-280 nm'deki absorbansları (6MM, 6DM, 6YM ve 6ÇM numuneleri için).

Aynı numune için meyve, yaprak, çekirdek ve dal kısımlarının HPLC analizlerinde 280 nm'deki absorbans değerleri Şekil 84.'de verilmiştir. 1 nolu pikin tüm kısımlarda bulunduğu belirlendi. 2 nolu pik sadece dal kısımlarında bulunduğu tespit edildi. 4, 5, 8, 10 nolu pikler ise yaprak ve dal kısımları için ortak piklerdir. Bunun yanında 9 ve 13 nolu pikler çekirdek, yaprak ve dal kısımları için ortak piklerdir. 14 ve 16 nolu pikler ise sadece çekirdek kısımlarında tespit edildi (Şekil 84.).



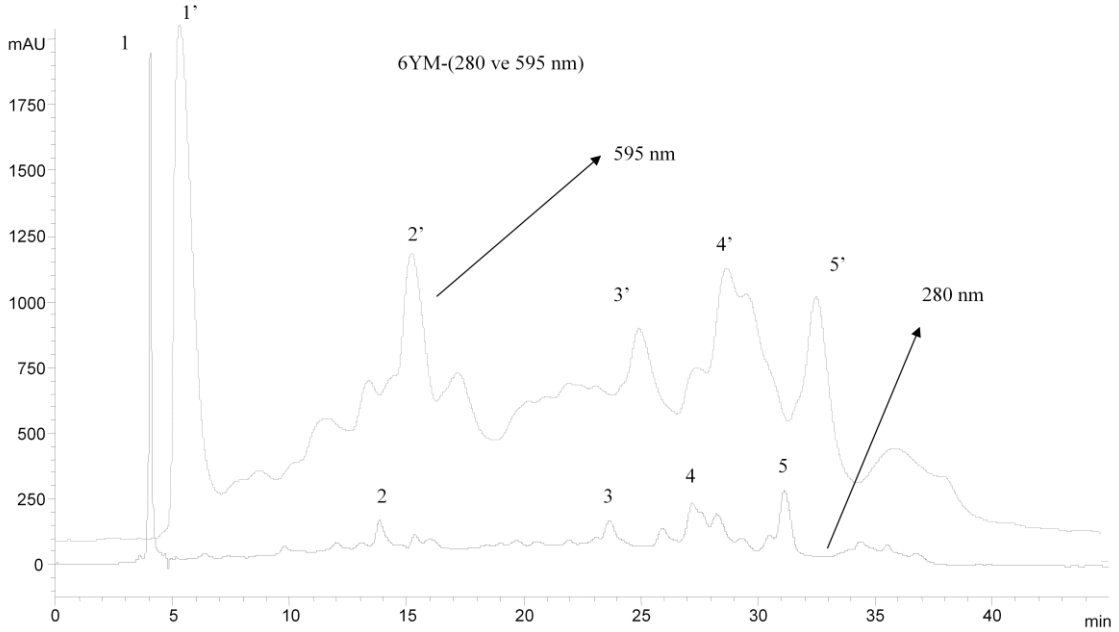
Şekil 85. Dal kısımlarının (6DM) online-HPLC-FRAP yönteminde 280 nm ve 595 nm'deki spektrumlarının çakıştırılması.

Dal kısımlarının metanollü ekstraktları ile yapılan online-HPLC-FRAP yönteminde 280 ve 595 nm spektrumları Şekil 85.'de gösterilmektedir. 280 nm'deki 1, 2, 3, 4, 5, 6 ve 7 nolu piklerin 595 nm'deki karşılıkları sırasıyla 1', 2', 3', 4', 5', 6' ve 7' pikleri olduğu belirlendi.



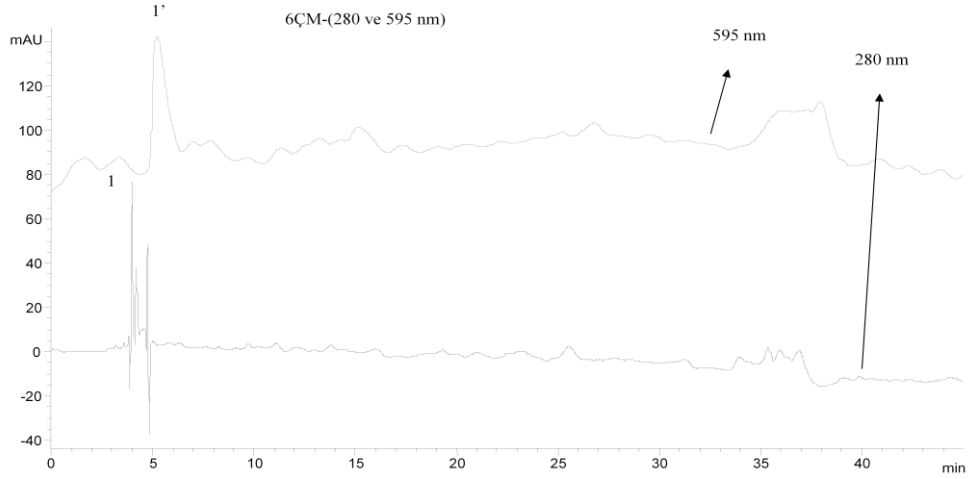
Şekil 86. Meyve kısımlarının (6MM) online-HPLC-FRAP yönteminde 280 nm ve 595 nm'deki spektrumlarının karşılaştırılması.

Meyve kısımlarının metanollü ekstraktları ile yapılan online-HPLC-FRAP yönteminde 280 ve 595 nm spektrumları Şekil 86.'de gösterilmektedir. 280 nm'deki 1nolu pikin 595 nm'deki karşılığı 1' piki olduğu belirlendi.



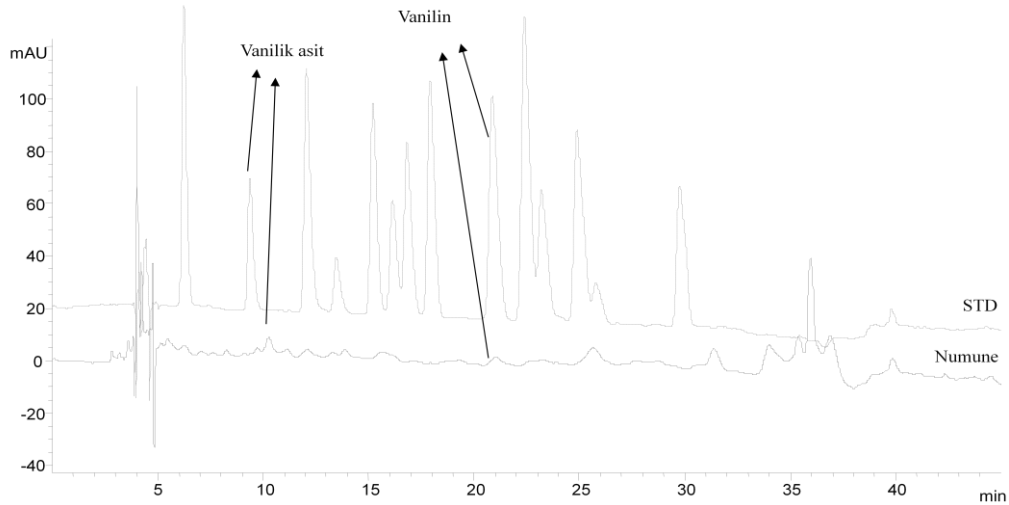
Şekil 87. Yaprak kısımlarının (6YM) online-HPLC-FRAP yönteminde 280 nm ve 595 nm'deki spektrumlarının karşılaştırılması.

Yaprak kısımlarının metanollü ekstraktları ile yapılan online-HPLC-FRAP yönteminde 280 ve 595 nm spektrumları Şekil .87’de gösterilmektedir. 280 nm’deki 1, 2, 3, 4 ve 5 nolu piklerin 595 nm’deki karşılıkları sırasıyla 1’, 2’, 3’, 4’ ve 5’ pikleri olduğu belirlendi.

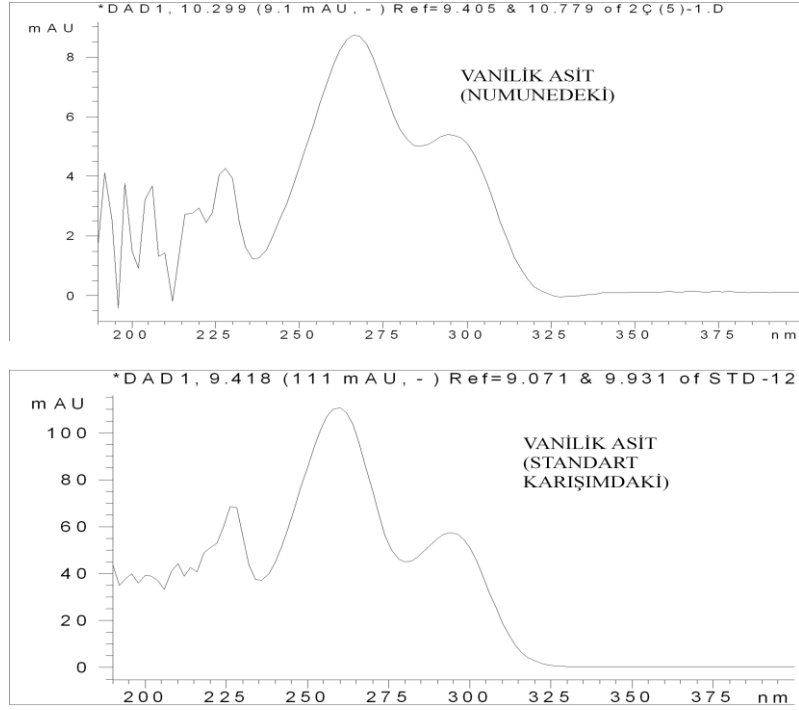


Şekil 88. Çekirdek kısımlarının (6ÇM) online-HPLC-FRAP yönteminde 280 nm ve 595 nm’deki spektrumlarının karşılaştırılması.

Çekirdek kısımlarının metanollü ekstraktları ile yapılan online-HPLC-FRAP yönteminde 280 ve 595 nm spektrumları Şekil 88.’de gösterilmektedir. 280 nm’deki 1 nolu pikin 595 nm’deki karşılığı 1’ piki olduğu belirlendi.

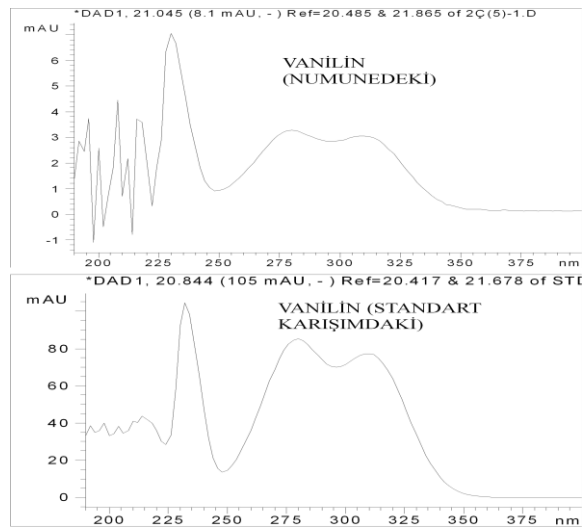


Şekil 89. Çekirdek kısımları (2ÇM) ile standart karışımın 280 nm’deki spektrumlarının karşılaştırılması.

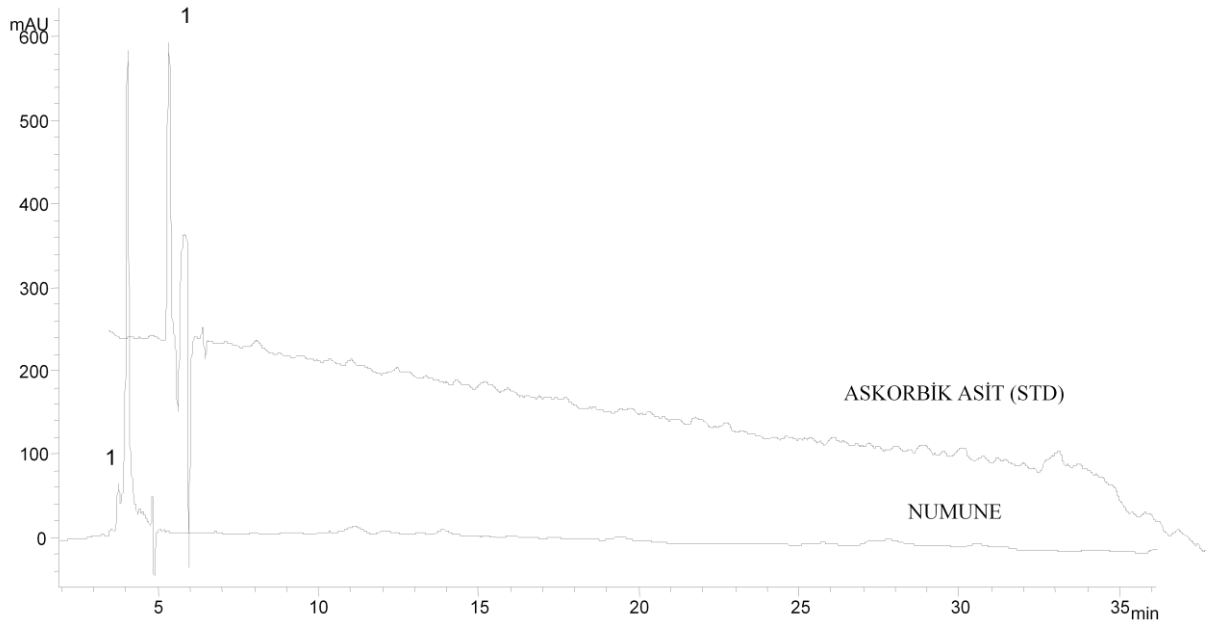


Şekil 90. Çekirdek kısımlarında bulunan vanilik asitin ve standart karışımındaki vanilik asitin spektrumları.

Çekirdek kısımlarının metanollü ekstraktlarının HPLC analizleri sonucunda alıkonma zamanı ve spektrumlarına bakılarak numunelerde vanilik asit ve vanilin olduğu tespit edilmiştir (Şekil 90-91.).

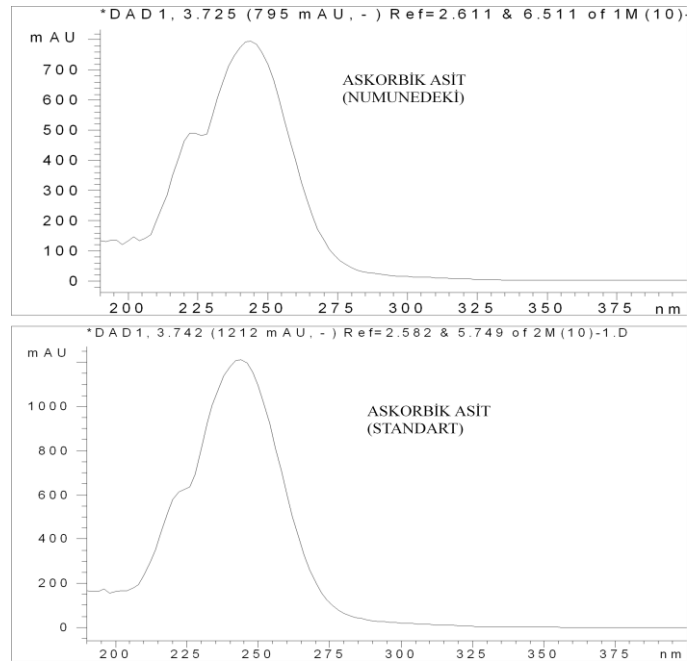


Şekil 91. Çekirdek kısımlarında ve standart karışımında bulunan vanilinin spektrumları.

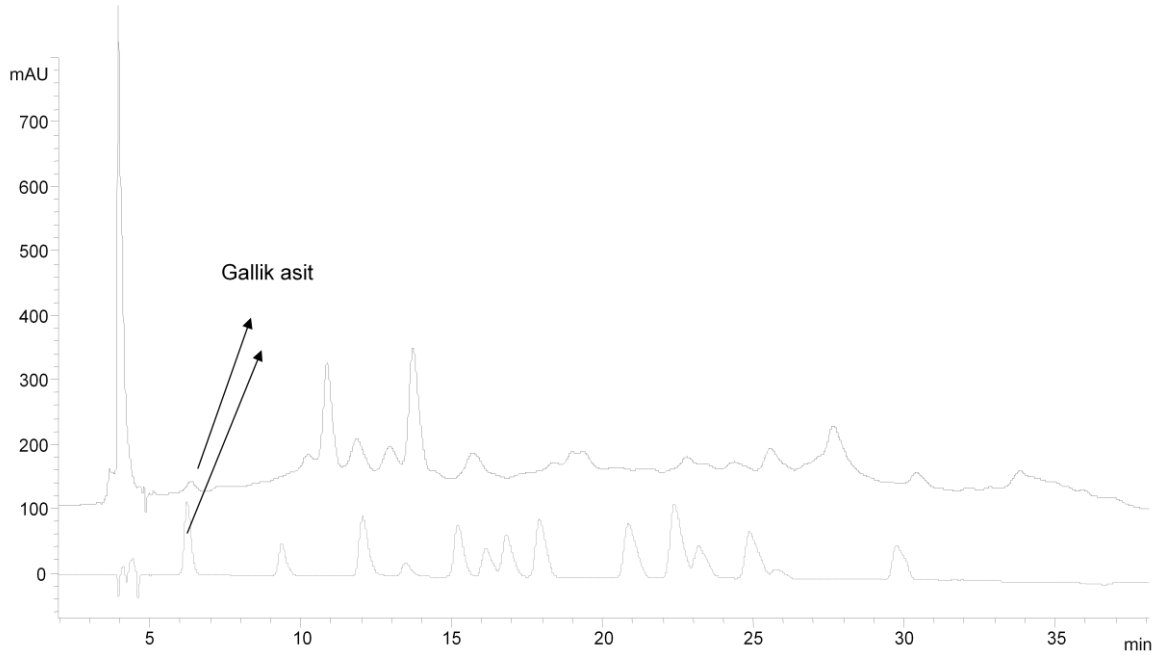


Şekil 92. Meyve kısımları (2MM) ile standart karışımın 280 nm'deki spektrumlarının karşılaştırılması (numune spektrumunun absorbands skalası ile askorbik asit standardının absorbands skalası farklıdır).

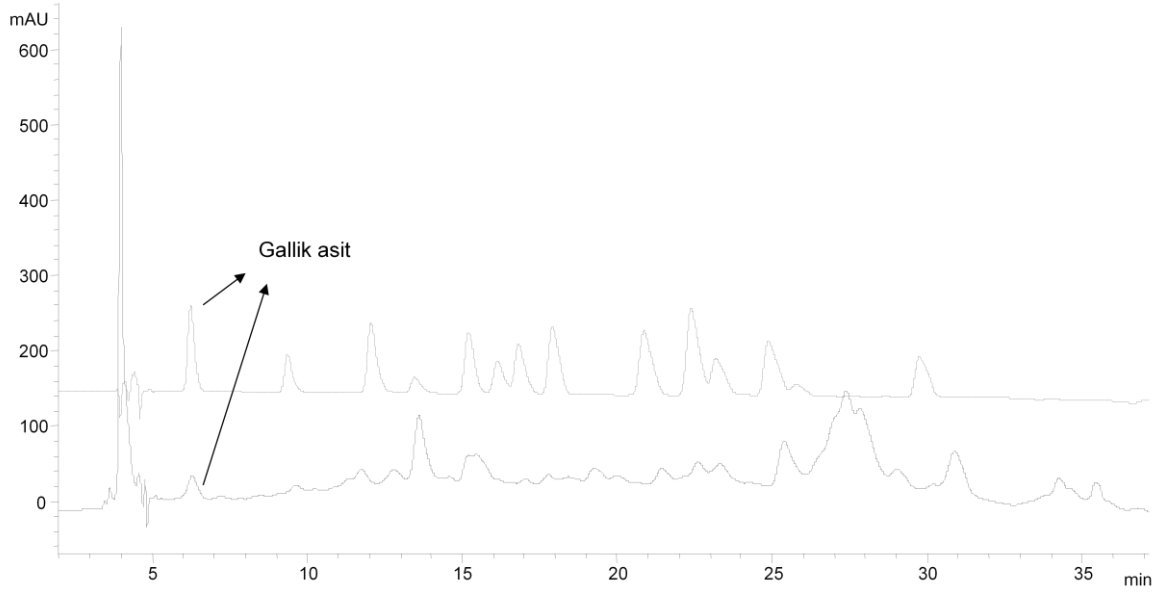
Meyve kısımlarının metanollü ekstraktlarının HPLC analizlerinde standart karışımın ve askorbik asitin spektrumları karşılaştırılarak numunelerde askorbik asit olduğu belirlendi (Şekil 92.).



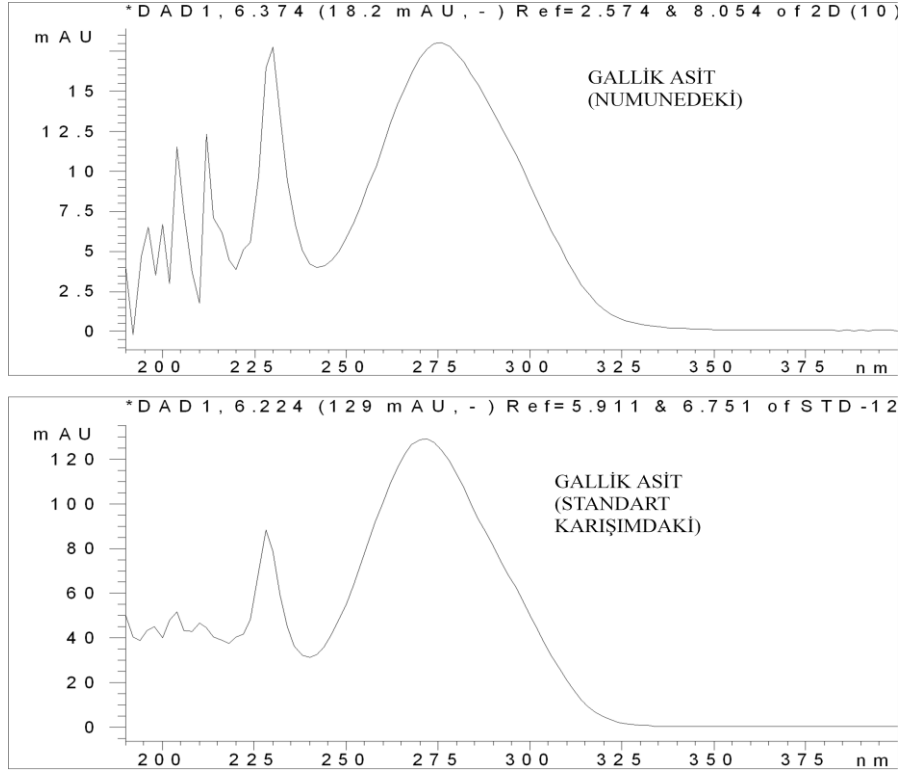
Şekil 93. Meyve kısımlarında bulunan askorbik asitin spektrumu.



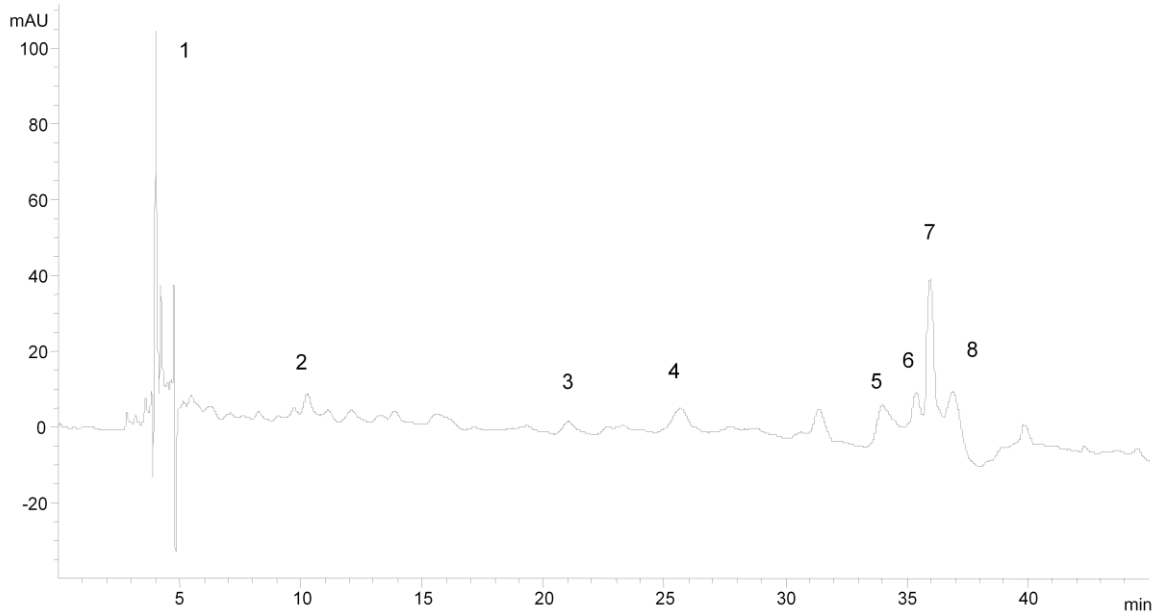
Şekil 94. 2DM numunesi ile standart karışımın 280 nm'deki spektrumalarının karşılaştırılması.



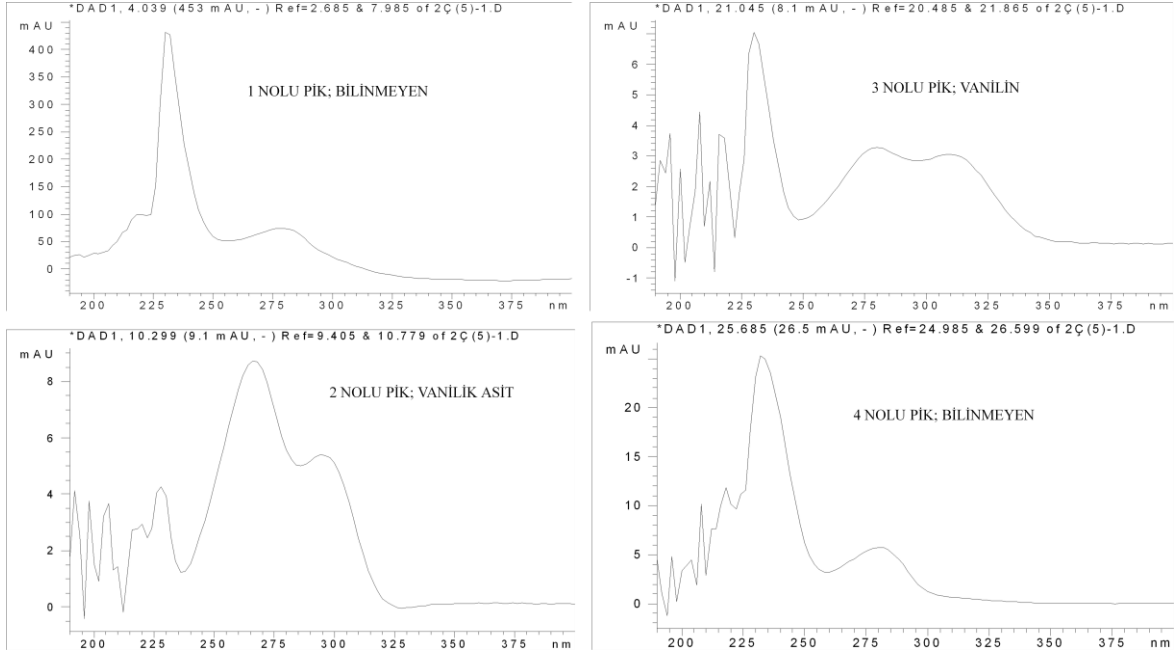
Şekil 95. 2YM numunesi ile standart karışımın 280 nm'deki spektrumalarının karşılaştırılması.



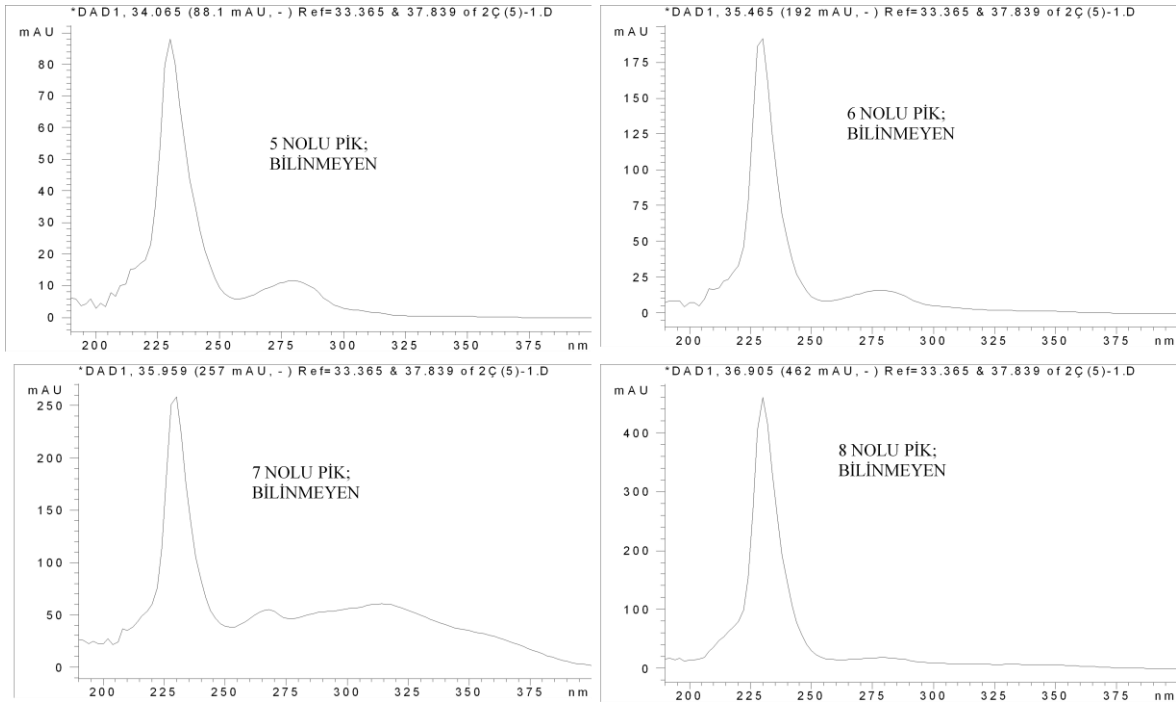
Şekil 96. Dal ve yaprak kısımlarında bulunan gallik asit ile standart karışımındaki gallik asitin spektrumu.



Şekil 97. Çekirdek kısımlarının HPLC analizlerinde 280 nm'deki spektrumu.



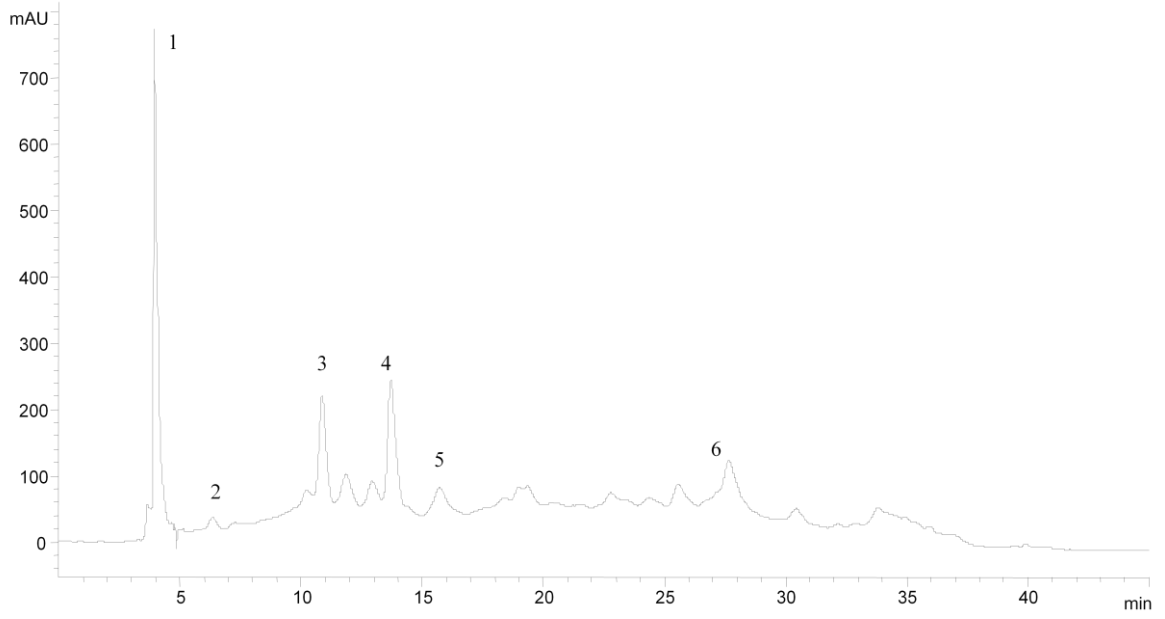
Şekil 98. Şekil 97’de verilen çekirdek kısımları için 280 nm’de numaralandırılan 1, 2, 3 ve 4 nolu piklerin spektrumları.



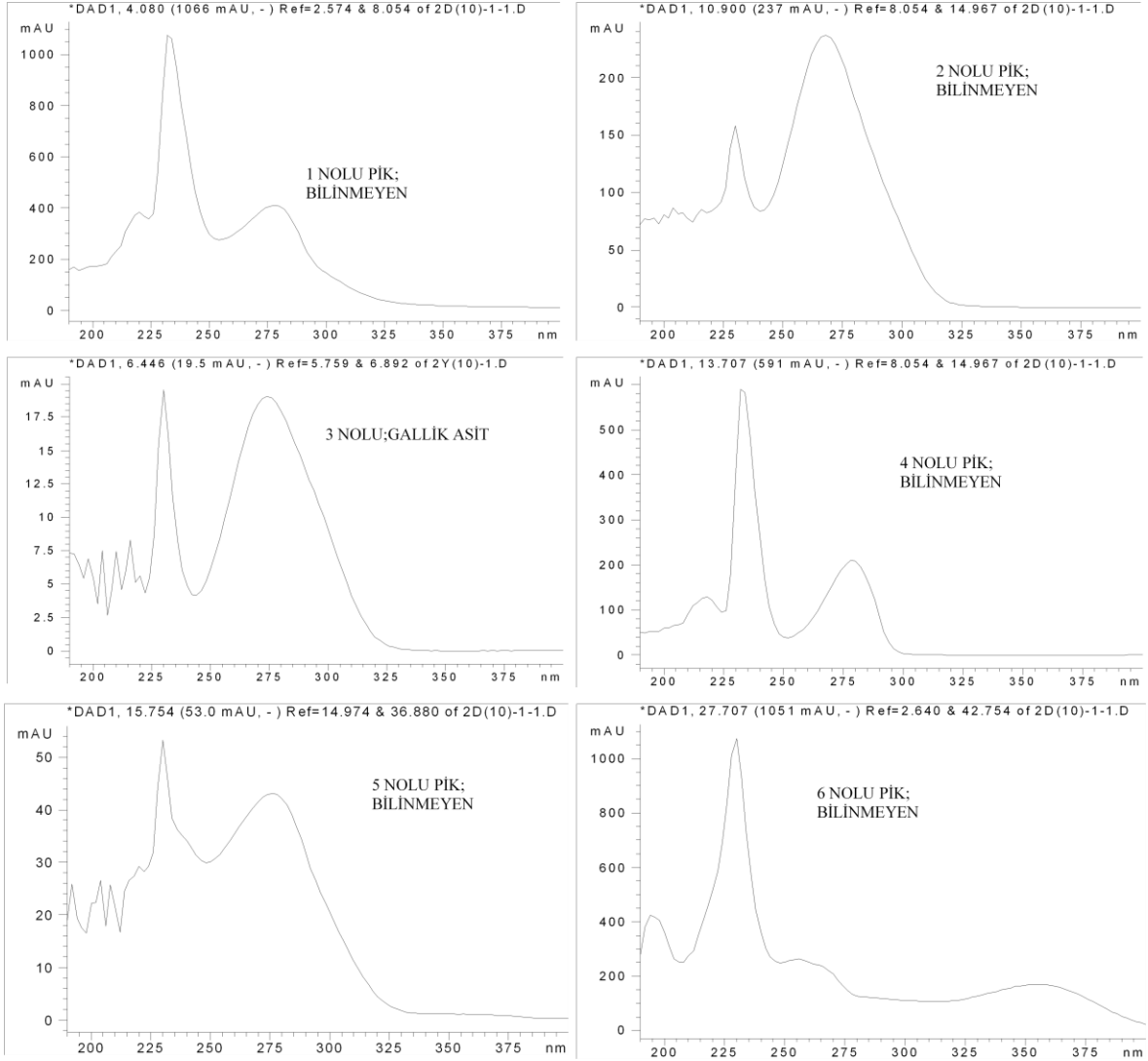
Şekil 99. Şekil 97.’de verilen çekirdek kısımları için 280 nm’de numaralandırılan 5, 6, 7 ve 8 nolu piklerin spektrumları.

Çekirdek kısımları için 280 nm'deki piklerin spektrumları standartlarla karşılaştırılarak 2 nolu pikin vanilik asit, 3 nolu pikin vanilin olduğu belirlendi. 1 ve 4 nolu pikler ise mevcut standartlarla çakışmadığı için bilinmeyen pikler olarak belirlendiler (Şekil 98).

Şekil 99'da verilen çekirdek kısımlarının 280 nm'deki 5, 6, 7 ve 8 nolu piklerin spektrumları mevcut standartlarla uyuşmadığı için bilinmeyen olarak belirlendiler.

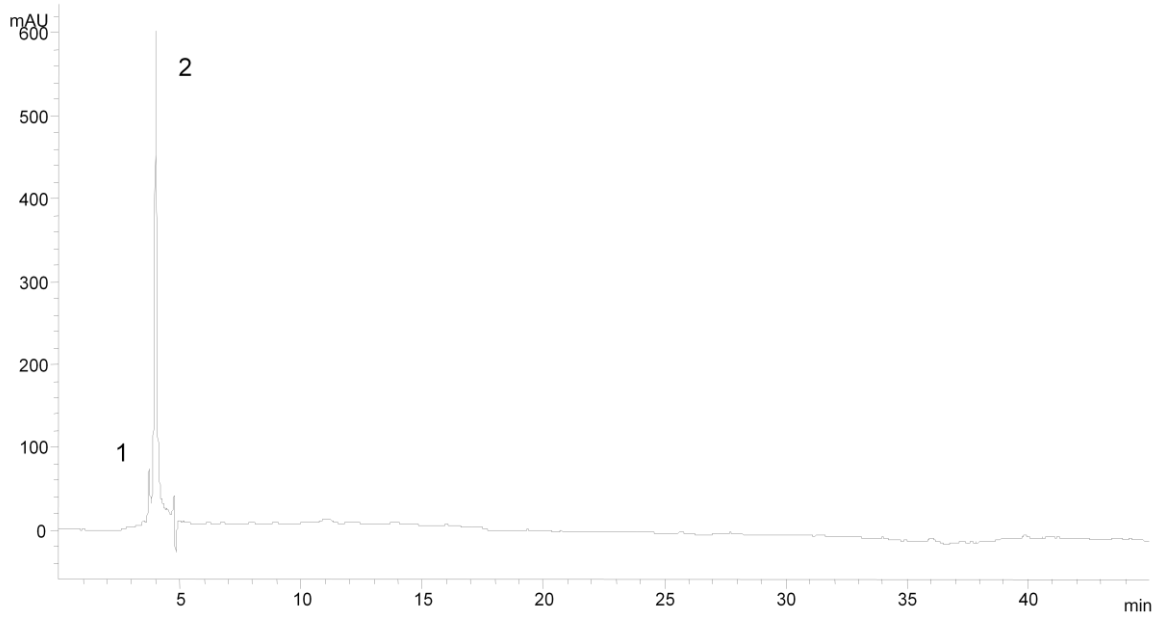


Şekil 100. Dal kısımlarının HPLC analizlerinde 280 nm'deki spektrumu.

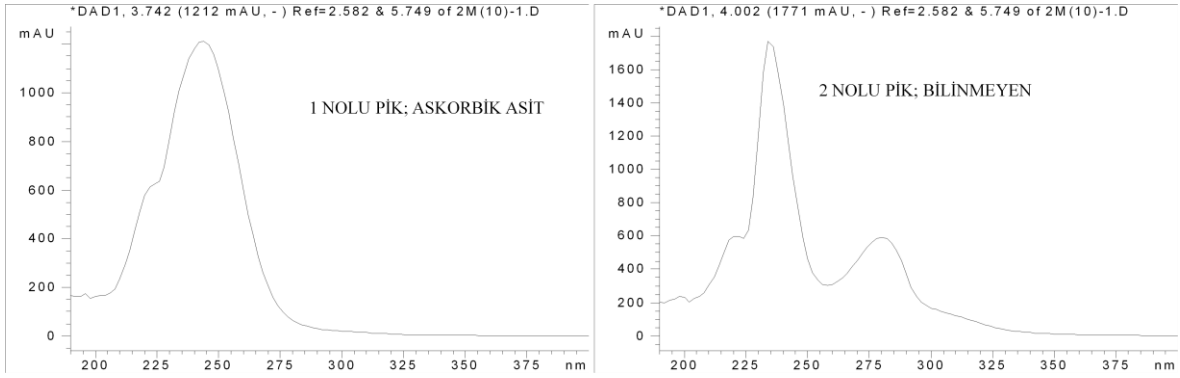


Şekil 101. Şekil 100.'de verilen çekirdek kısımları için 280 nm'de numaralandırılan 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 nolu piklerin spektrumları.

Dal kısımları için 280 nm'deki piklerin spektrumları standartlarla karşılaştırılarak 3 nolu pikin gallik asit olduğu belirlendi. 1, 2, 4, 5 ve 6 nolu pikler ise mevcut standartlarla çakışmadıkları için bilinmeyen pikler olarak belirlendiler (Şekil 101.).

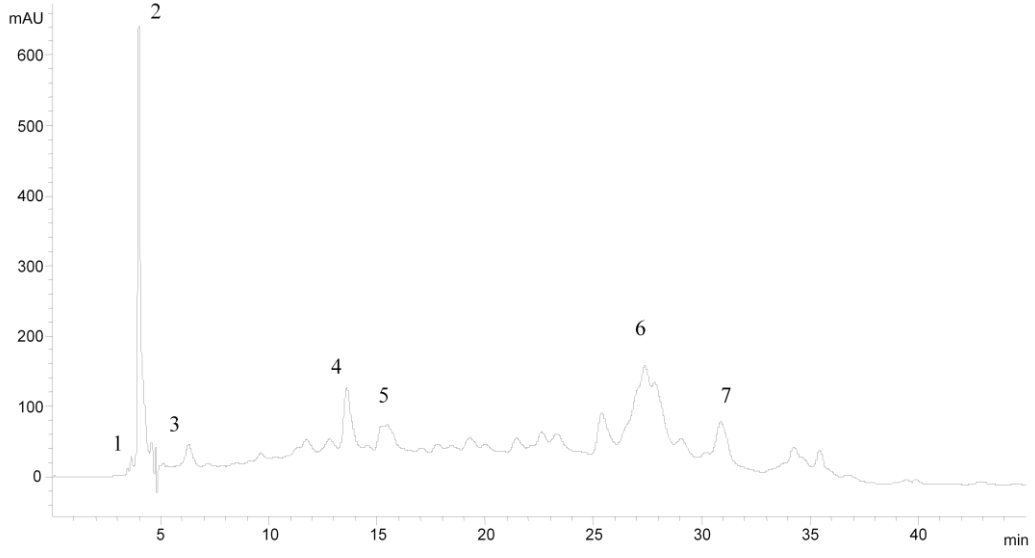


Şekil 102. Meyve kısımlarının HPLC analizlerinde 280 nm'deki spektrumu.



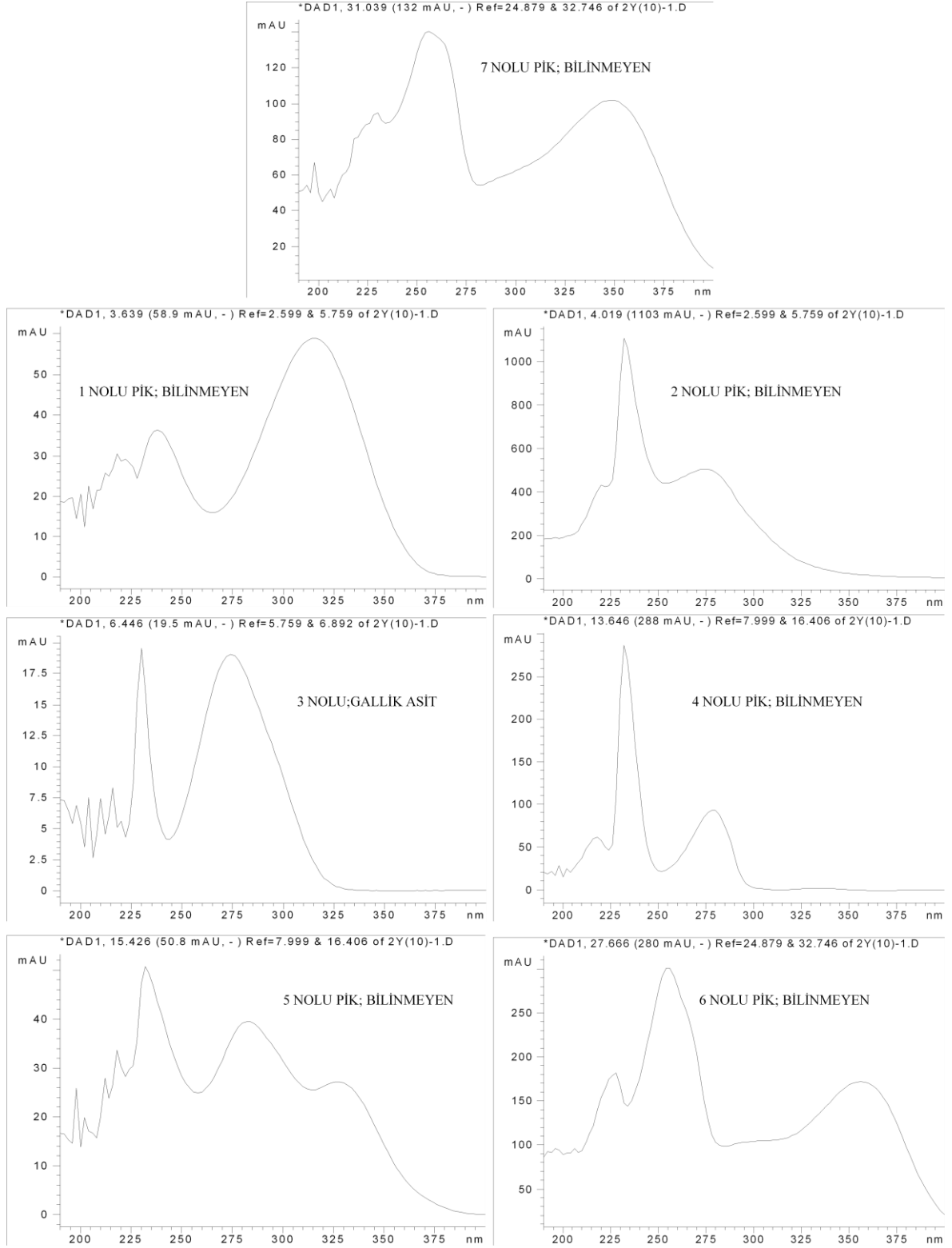
Şekil 103. Şekil 102.'de verilen meyve kısımlarının 280 nm'deki 1 ve 2 nolu pikler için spektrumlar.

Şekil 103.'de verilen spektrumlardan 1 nolu pik askorbik asit olarak belirlendi. 2 nolu pik ise bilinmeyen olarak belirlendi.

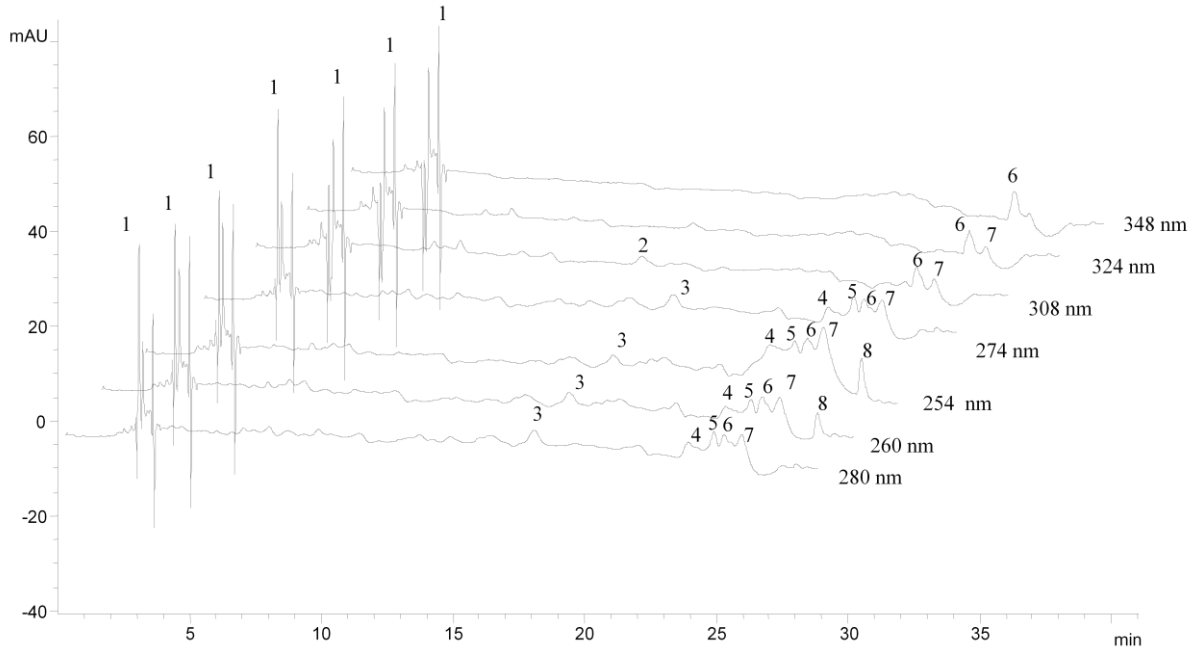


Şekil 104. Yaprak kısımlarının HPLC analizlerinde 280 nm'deki spektrumu.

Şekil 105.'de verilen spektrumlar içerisinde 3 nolu pik gallik asit olarak belirlendi. Diğer pikler ise mevcut standartların spektrumlarına uyum sağlamadıkları için bilinmeyen olarak belirlendi

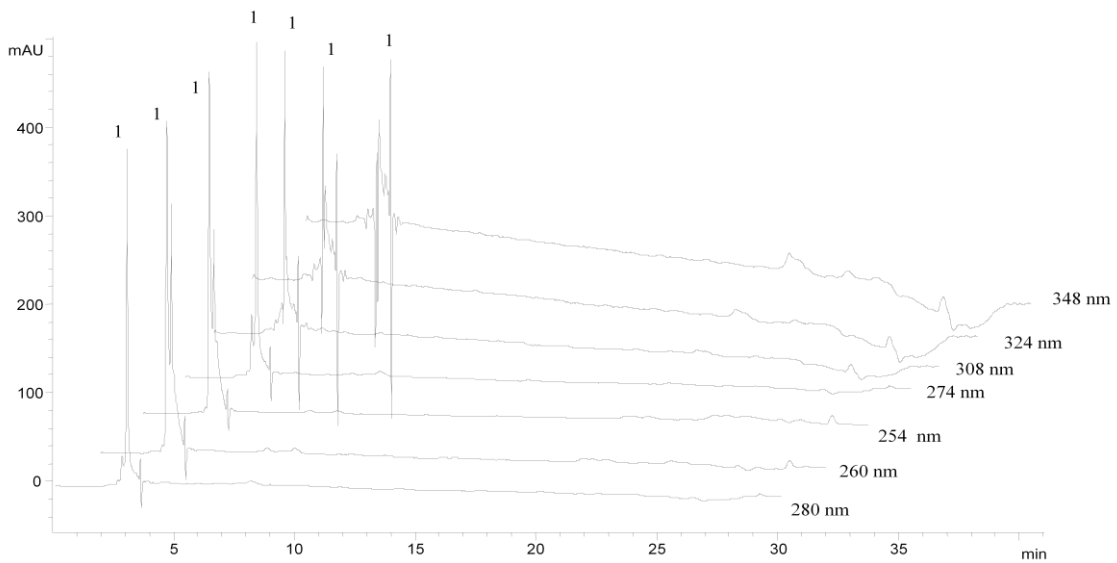


Şekil 105. Şekil 104.'de verilen yaprak kısımlarının 280 nm'deki 1, 2, 3, 4, 5, 6 ve 7 nolu piklerin spektrumları.



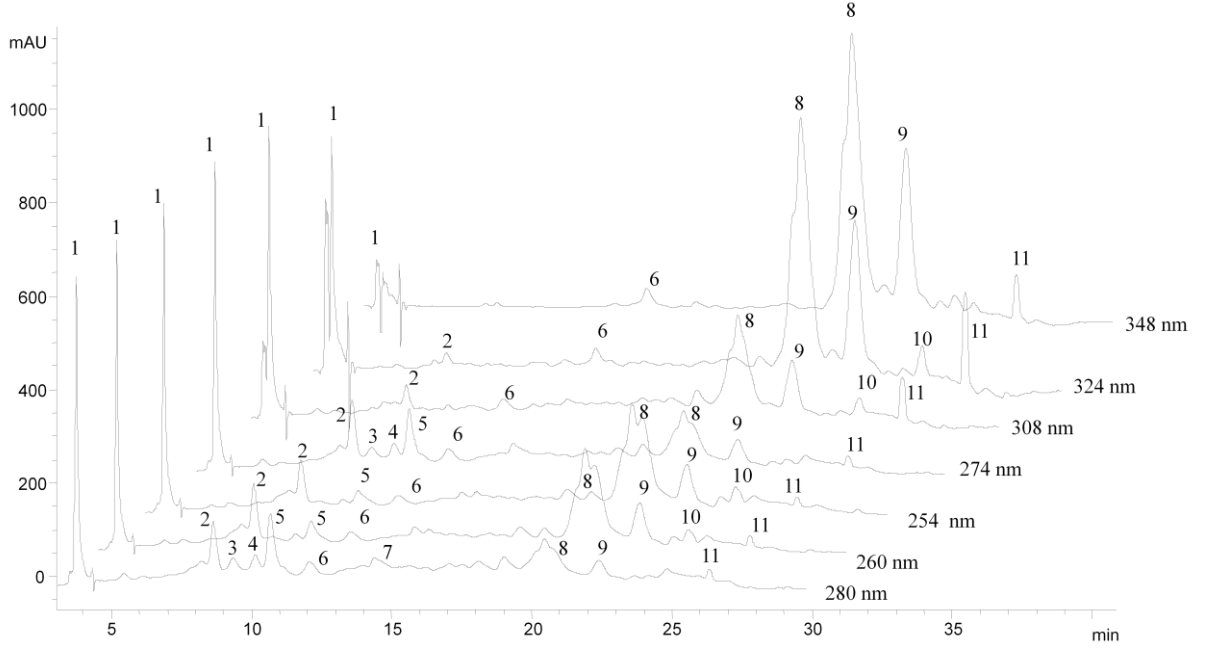
Şekil 106. Çekirdek kısımlarının (6ÇM) online-HPLC-FRAP yönteminde DAD dedektörünün farklı dalga boylarındaki kromatogramlarının karşılaştırılması.

Çekirdek kısımlarının farklı dalga boylarında 1 ve 6 nolu pikler tüm dalga boylarında ortak olarak vardır. 2 nolu pik sadece 308 nm’de, 3 nolu pik ise 280, 260, 254 ve 274 nm dalga boylarında vardır. 8 nolu pik 254 ve 260 nm’de vardır. 4 ve 5 nolu pikler 254, 260, 274 ve 280 nm’de belirlendi (Şekil 106.).



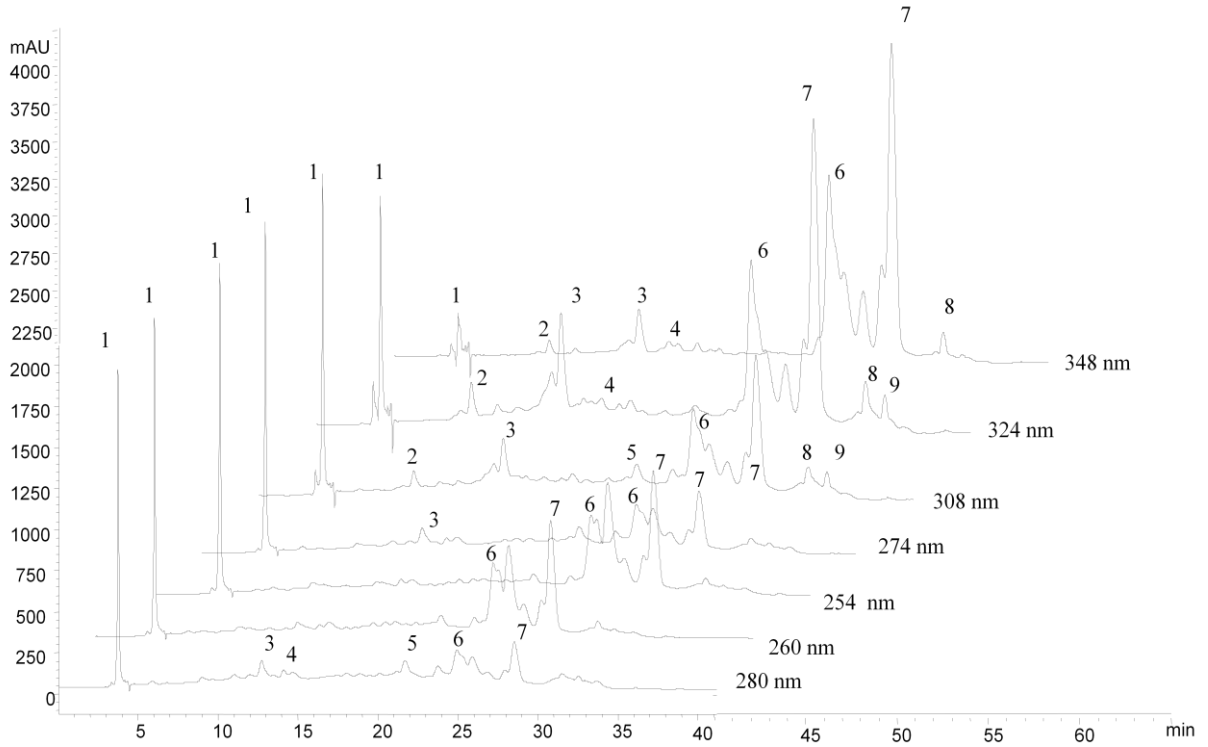
Şekil 107. Meyve kısımlarının (6MM) online-HPLC-FRAP yönteminde DAD dedektörünün farklı dalga boylarındaki kromatogramlarının karşılaştırılması.

Meyve kısımlarının HPLC analizlerinde 1 nolu pik 254, 260, 280, 274, 308, 324 ve 348 nm dalga boylarında ortak olarak bulundu (Şekil 107.).



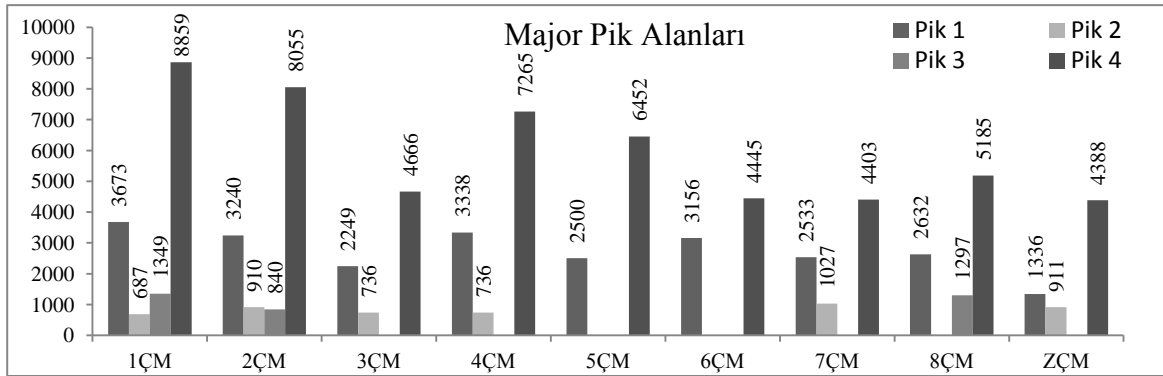
Şekil 108. Dal kısımlarının (6DM) online-HPLC-FRAP yönteminde DAD dedektörünün farklı dalga boylarındaki kromatogramlarının çakıştırılması.

Dal kısımlarının HPLC analizlerinde DAD dedektörünün farklı dalga boylarında 1, 6, 8, 9 ve 11 nolu pikler ortak olarak bulundu. 1 nolu pikin 348 nm'deki absorbandsının diğer dalga boylarına göre daha düşük olduğu belirlendi. 8, 9 ve 11 nolu piklerin 308, 324 ve 348 nm'deki absorbandsları diğer dalga boylarına göre daha büyüktür. 280 nm dalga boyunda numaralandırılan piklerin hepsinin var olduğu belirlendi (Şekil 108.).



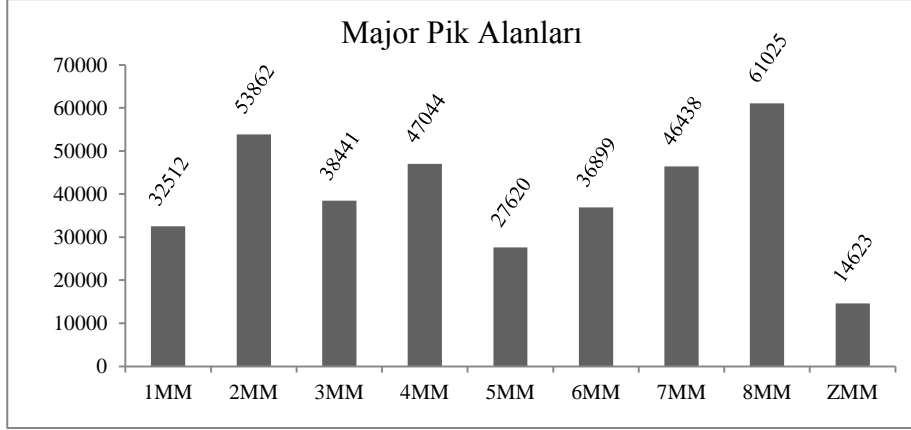
Şekil 109. Yaprak kısımlarının (6YM) online-HPLC-FRAP yönteminde DAD dedektörünün farklı dalga boylarındaki kromatogramlarının çakıştırılması.

Yaprak kısımlarının HPLC analizlerinde 1, 6 ve 7 nolu pikler ortak olarak belirlendi. 1 nolu pik 348 nm’de diğer dalga boylarına göre daha küçük, 6 ve 7 nolu pikler de 324 ve 348 nm’de diğer dalga boylarına göre daha büyük olarak belirlendi. 9 nolu pikin 308 ve 324 nm’de, 4 nolu pikin de 280, 274, 324 ve 348 nm’de bulunduğu tespit edildi (Şekil 109.).



Şekil 110. Çekirdek kısımlarının metanollü ekstraktlarının online-HPLC-FRAP yönteminde 595 nm’deki major pik alanları.

Çekirdek kısımlarının HPLC analizlerinden hesaplanan major pik alanları Şekil 110.'da verilmiştir. Pik 4 için alan diğerlerinden daha büyük bulundu.

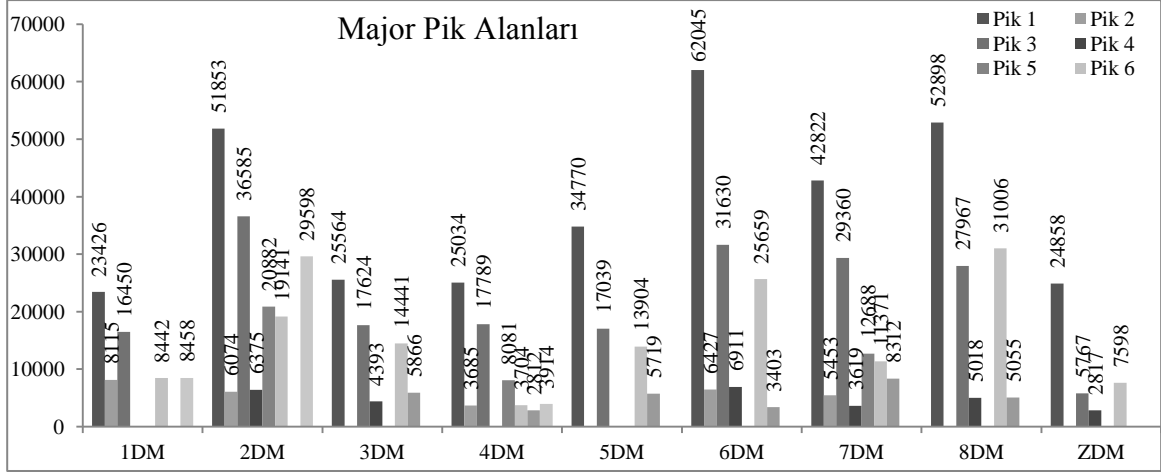


Şekil 111. Meyve kısımlarının metanollü ekstraktlarının online-HPLC-FRAP yönteminde 595 nm'deki major pik alanları.

Meyve kısımlarının HPLC analizinde 8MM numunesinin major pik alanı en büyük, ZMM numunesinin ki ise en küçük olarak bulundu (Şekil 111.).

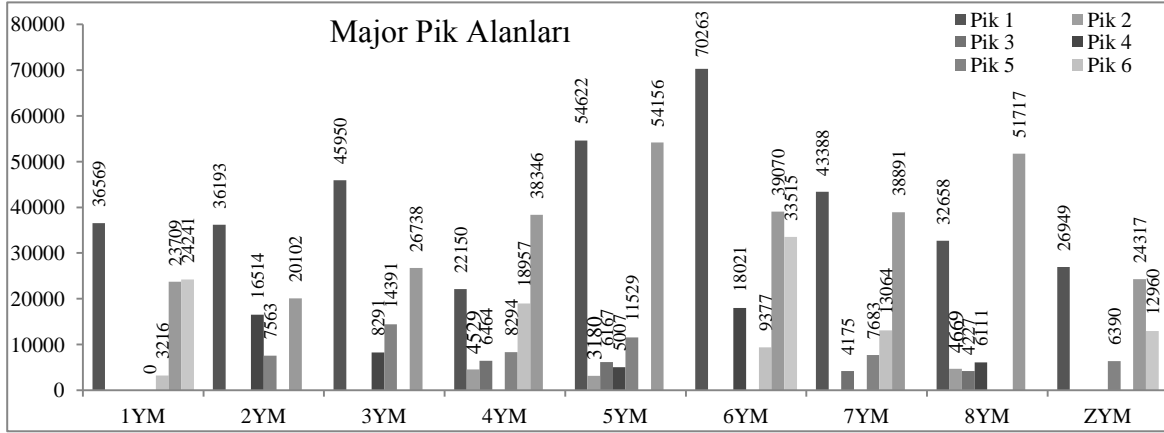
Tablo 9. Çekirdek ve meyve kısımlarının HPLC analizlerinde major piklerin alıkonma zamanları.

Numune	Pik 1	Pik 2	Pik 3	Pik 4		Numune	Pik 1
1ÇM	5.219	6.994	15.088	36.269		1MM	5.315
2ÇM	5.267	7.297	15.230	36.751		2MM	5.182
3ÇM	5.309	14.942		36.321		3MM	5.313
4ÇM	5.215	6.989		35.821		4MM	5.148
5ÇM	5.262			36.795		5MM	5.188
6ÇM	5.189			36.364		6MM	5.176
7ÇM	5.242	6.949		36.178		7MM	5.234
8ÇM	5.204		15.208	36.976		8MM	5.289
ZÇM	5.248	7.480		37.272		ZMM	5.276



Şekil 112. Dal kısımlarının metanollü ekstraktlarının online-HPLC-FRAP yönteminde 595 nm'deki major pik alanları.

Dal kısımlarının HPLC analizlerinden elde edilen major pikler Şekil 112.'de verilmiştir. Numunelerde bulunan Pik 1'in alanı diğer piklerden daha büyük bulundu.

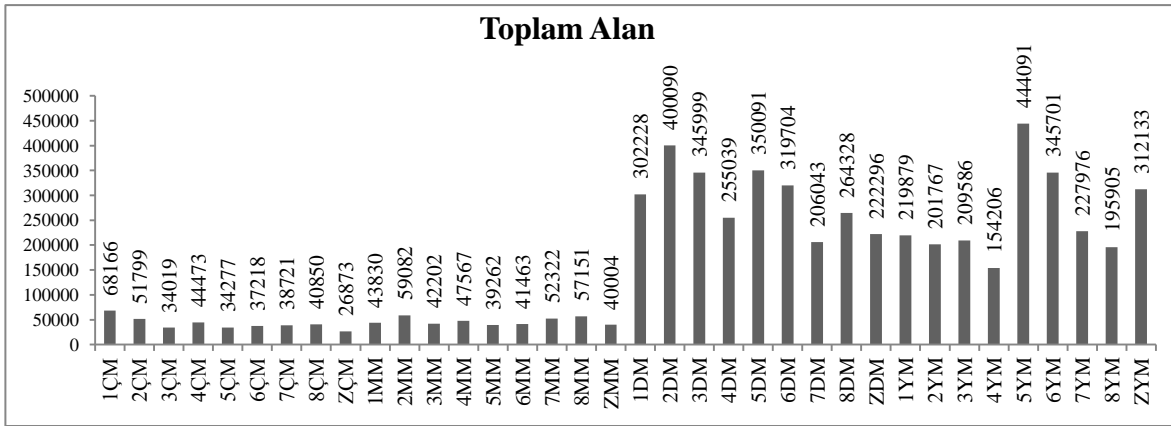


Şekil 113. Yaprak kısımlarının metanollü ekstraktlarının online-HPLC-FRAP yönteminde 595 nm'deki major pik alanları.

Yaprak kısımlarının HPLC analizlerinde major pik alanları Şekil 113.'de verilmiştir. 8YM numunesinde major pikler arasında en büyük olan pik 6'dır. Diğer numunelerde ise pik 1 en büyük alana sahiptir.

Tablo 10. Dal ve yaprak kısımlarının HPLC analizlerinde major piklerin alıkonma zamanları

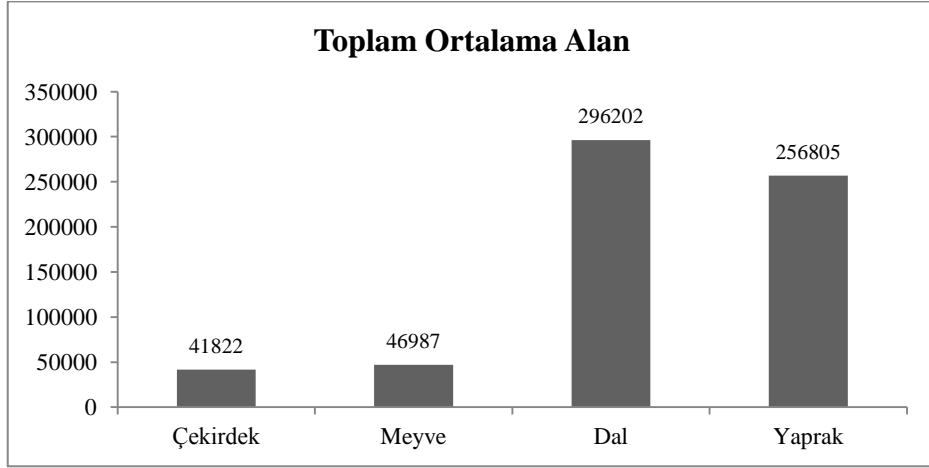
Numune	Pik 1	Pik 2	Pik 3	Pik 4	Pik 5	Pik 6	Pik 7	Pik 8
1DM	5.286	12.905	14.902			29.170		35.587
2DM	5.276	13.136	15.025	17.036	20.627	28.992		35.620
3DM	5.301		14.990	17.018		28.925	31.556	
4DM	5.257	13.173	15.089		20.431	29.156	31.743	35.642
5DM	5.257		15.143			29.078	31.730	
6DM	5.376	13.272	15.183	17.128		29.193	31.705	
7DM	5.305	13.110	14.976	16.914	20.584	28.991	31.692	
8DM	5.263		14.936	16.904		28.949	31.539	
ZDM	5.272		14.907	16.883		29.268		
1YM	5.266				16.764	24.471	29.135	32.142
2YM	5.295			14.937	16.786		28.897	
3YM	5.274			15.044	16.964		29.243	
4YM	5.336	7.716	11.107		17.330	24.955	28.629	
5YM	5.375	7.804	11.304	15.259	17.337		28.606	
6YM	5.301			15.215		24.933	28.671	33514,6
7YM	5.366		11.317		17.472	25.006	28.743	
8YM	5.303	7.712	11.126	15.208			28.750	
ZYM	5.249				17.398		29.608	32.546



Şekil 114. Meyve, çekirdek, dal ve yaprak kısımlarının metanollü ekstraktlarının online-HPLC-FRAP yönteminde 595 nm'deki toplam pik alanları.

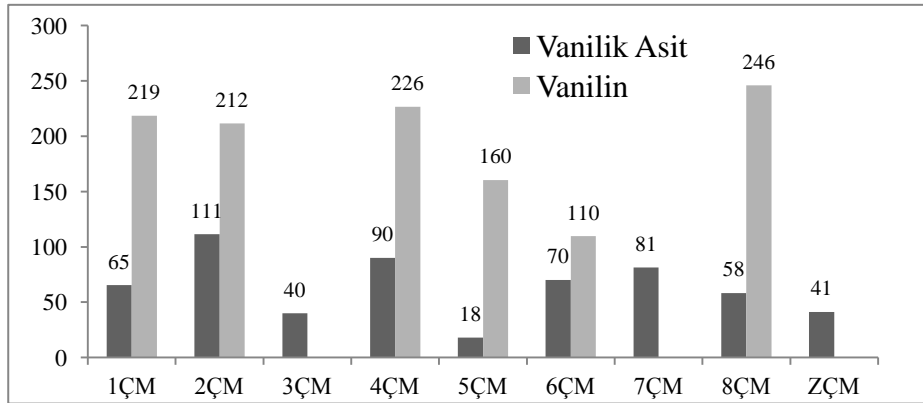
Meyve, çekirdek, dal ve yaprak kısımlarının metanollü ekstraktlarının online-HPLC-FRAP yönteminde 595 nm'deki toplam pik alanları Şekil 114'de verilmiştir. Çekirdek kısımları arasında en büyük toplam pik alanına 1ÇM numunesinin ve en küçük toplam pik alanına ise ZÇM numunesinin sahip olduğu bulundu. Meyve kısımları arasında en büyük

toplam pik alanına 2MM numunesi ve en küçük alana 5MM numunesi sahiptir. Dal kısımları arasında 2DM numunesi en büyük toplam pik alanına, 7DM numunesi en küçük toplam pik alanına sahiptir. Yaprak kısımları arasında 5YM numunesi en büyük toplam pik alanına, 4YM numunesi en küçük toplam pik alanına sahiptir (Şekil 114.).



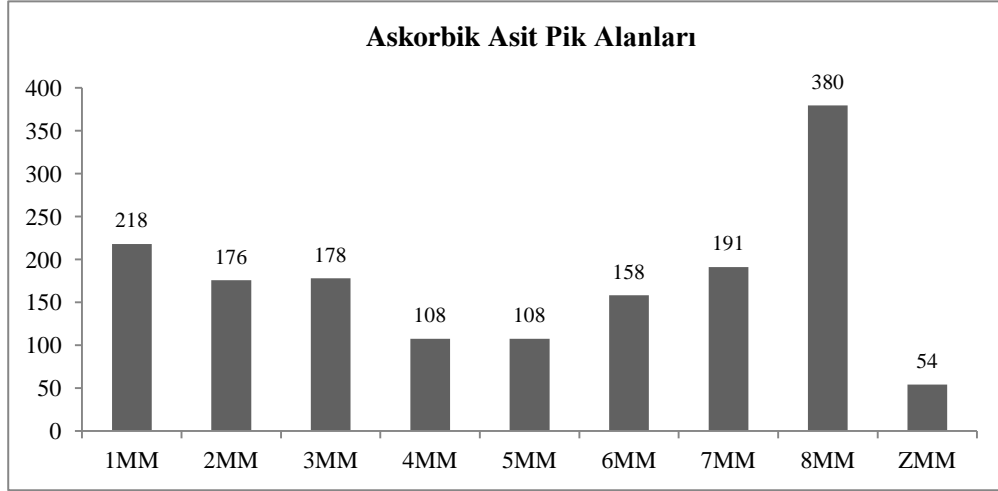
Şekil 115. Meyve, çekirdek, dal ve yaprak kısımlarının metanollü ekstraktlarının online-HPLC-FRAP yönteminde 595 nm'deki ortalama alanları (ortalama alan, kuşburnu numunesindeki toplam alanın ortalaması alınarak hesaplandı).

Çekirdek kısımlarının ortalama alanı en küçük, dal kısımlarının ortalama alanı ise en büyük olarak bulundu. Ortalama alanların küçükten büyüğe doğru sıralanışı; çekirdek, meyve, yaprak ve dal şeklinde bulundu (Şekil 115.).



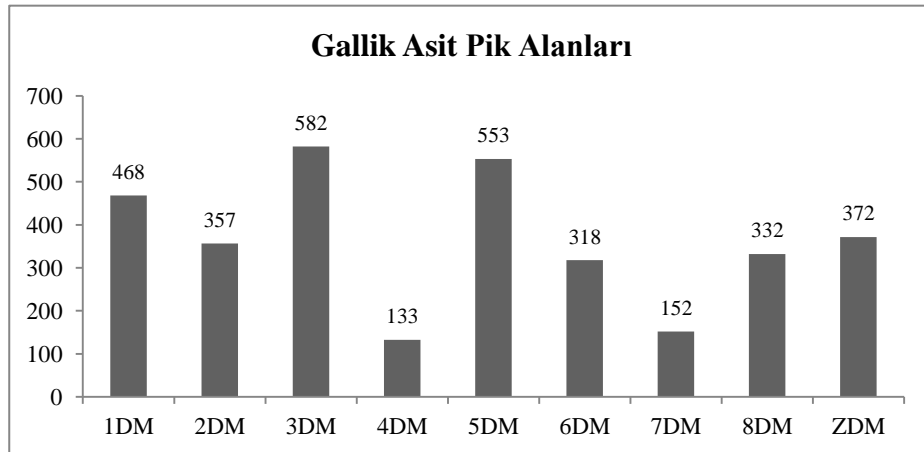
Şekil 116. Çekirdek kısımlarının HPLC analizlerinde vanilin ve vanilic asit için pik alanları (280 nm'de).

8ÇM numunesi en yüksek vanilin miktarına sahiptir. 3ÇM ve ZÇM numuneleri için vaniline rastlanmadığı için pik alanı hesaplanamadı. Vanilik asit için en büyük pik alanı 2ÇM numunesinde, en küçük 5ÇM numunesinde tespit edildi (Şekil 116.).



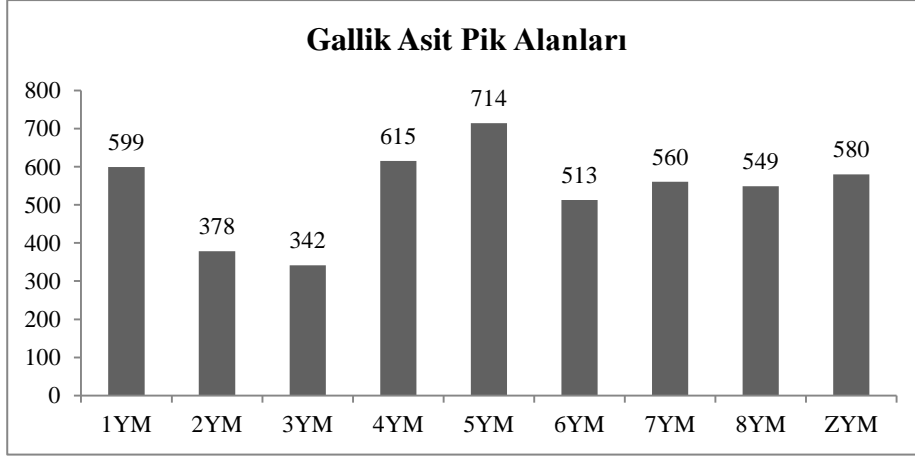
Şekil 117. Meyve kısımlarının HPLC analizlerinde askorbik asit için pik alanları (280 nm'de).

Meyve kısımlarının HPLC analizlerinde 8MM numunesi için askorbik asitin pik alanı en büyük bulundu. En küçük alan ZMM numunesi için belirlendi (Şekil 117.).



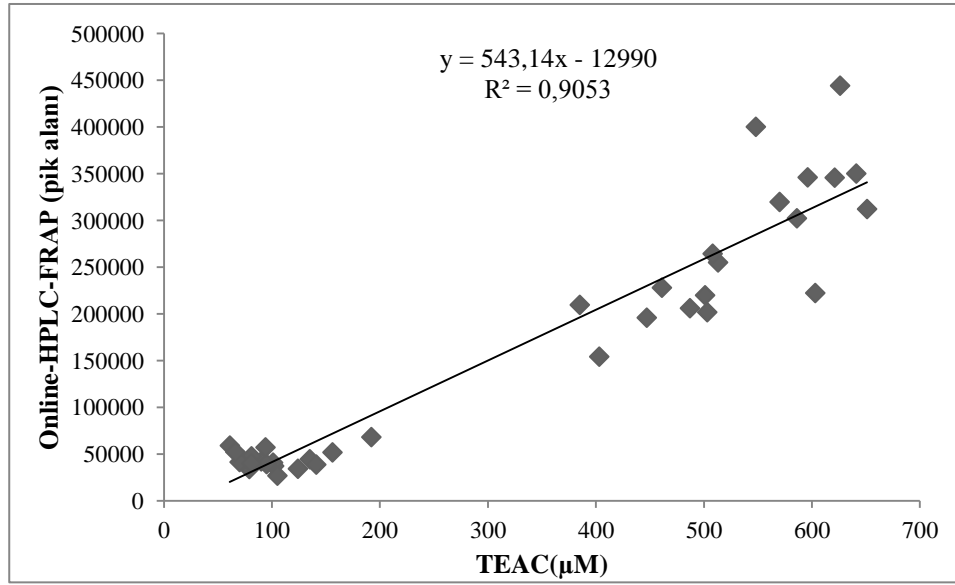
Şekil 118. Dal kısımlarının HPLC analizlerinde gallik asit için pik alanları (280 nm'de)

Dal kısımlarının HPLC analizlerinde 3DM numunesi için gallik asitin pik alanı en büyük bulundu. En küçük alan 4DM numunesi için belirlendi (118).



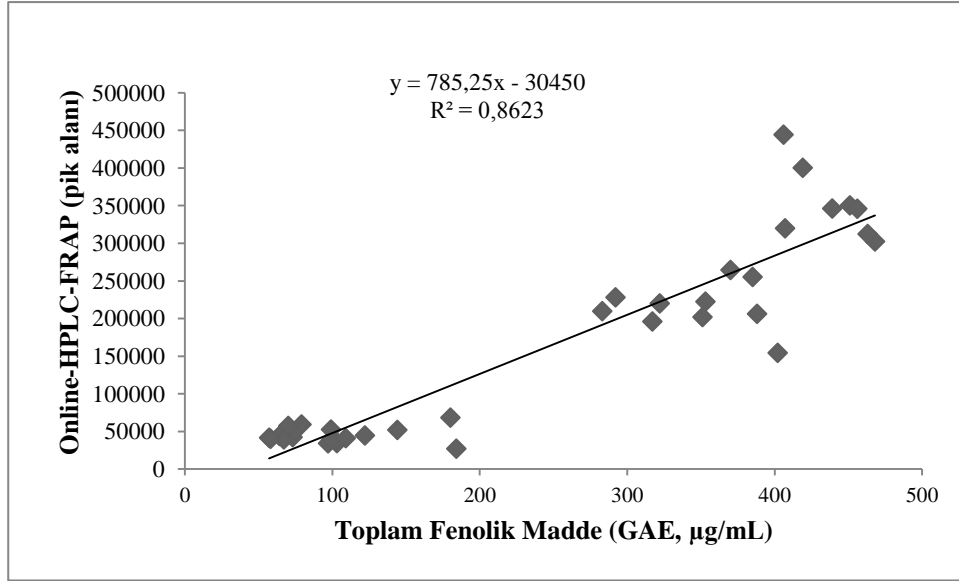
Şekil 119. Yaprak kısımlarının HPLC analizlerinde gallik asit için pik alanları (280 nm'de)

Yaprak kısımlarının HPLC analizlerinde 5YM numunesinin gallik asit pik alanı en büyük, 3YM numunesi için en küçük olarak bulundu (Şekil 119.).



Şekil 120. online-HPLC-FRAP ve offline-FRAP korelasyon grafiği.

online-HPLC-FRAP ve offline-FRAP değerleri ile elde edilen korelasyon grafiğine göre iki yöntem arasında uyum olduğu belirlendi (Şekil 120.).



Şekil 121. online-HPLC-FRAP yöntemi ve offline toplam fenolik madde tayini yöntemi korelasyon grafiği.

Online-HPLC-FRAP yönteminden elde edilen veriler ile toplam fenolik madde miktarı tayini yönteminden elde edilen verilere ait korelasyon grafiğine göre iki yöntem arasında uyum olduğu belirlendi (Şekil 121.).

3.3. Antimikrobiyal Aktivite

Tablo 11. Meyve, dal, yaprak ve çekirdek kısımlarının metanollü, ve etil asetatlı ekstraktlarının antimikrobiyal aktivite testi sonuçları: İnhibisyon yarıçapları (mm).

Numuneler	E.c.	S.t.	C.a.	S.s.	P.a.	L.m.	S.a.	A.n.	Toplam
1YE	8	8	11	-	-	-	12	-	39
2YE	7	8	9	-	-	-	10	-	34
3YE	7	12	11	-	-	-	17	11	58
4YE	11	11	13	-	-	-	14	-	49
5YE	8	12	12	-	-	-	15	-	47
6YE	-	8	14	-	-	-	15	-	37
7YE	7	-	10	-	-	-	14	-	31
8YE	14	-	13	-	-	-	16	-	43
ZYE	7	-	9	-	-	-	9	-	25

Tablo 11'in devamı,

Toplam	69	59	102	0	0	0	122	11	363
1ÇE	12	11	14	14	-	-	11	-	62
2ÇE	10	9	14	14	-	-	13	-	60
3ÇE	10	-	-	15	-	-	13	-	38
4ÇE	11	-	13	12	-	-	15	-	51
5ÇE	10	7	14	9	-	-	14	-	54
6ÇE	11	7	15	16	-	-	15	-	64
7ÇE	10	-	13	14	-	-	12	-	49
8ÇE	14	-	12	-	-	-	15	-	41
ZÇE	-	-	13	-	-	-	15	-	28
Toplam	88	34	108	94	0	0	123	0	447
1ME	10	11	10	10	-	9	11	-	61
2ME	10	8	10	10	-	9	9	-	56
3ME	11	10	9	10	-	-	9	-	49
4ME	10	9	10	10	-	10	11	-	60
5ME	10	10	10	10	-	9	9	-	58
6ME	10	10	8	11	-	8	10	-	57
7ME	11	9	11	10	-	9	10	-	60
8ME	11	-	11	-	-	9	10	-	41
ZME	8	-	10	-	-	9	10	-	37
Toplam	91	67	89	71	0	72	89	0	479
1DE	10	11	12	15	-	-	14	10	72
2DE	10	7	13	15	-	10	15	12	82
3DE	-	-	13	15	-	10	15	12	65
4DE	10	-	11	14	-	-	16	-	51
5DE	8	-	15	11	-	-	15	9	58
6DE	10	11	10	12	-	11	16	11	81
7DE	7	-	12	15	-	15	14	-	63
8DE	15	-	12	-	-	15	15	7	64
ZDE	8	-	12	-	-	13	15	9	57
Toplam	78	29	110	97	0	74	135	70	593
1MM	-	-	-	12	-	-	14	-	26
2MM	-	-	-	-	-	-	13	-	13

Tablo 11'in devamı,

3MM	-	-	-	7	-	-	11	-	18
4MM	-	-	-	-	-	-	12	-	12
5MM	-	-	-	10	-	-	12	-	22
6MM	-	-	-	12	-	-	14	-	26
7MM	-	-	-	8	-	-	15	-	23
8MM	11	-	-	-	-	-	11	-	22
ZMM	13	8	-	-	-	-	12	-	33
Toplam	24	8	0	49	0	0	114	0	195
1DM	10	-	-	11	-	14	12	-	47
2DM	7	-	-	11	-	11	11	-	40
3DM	11	-	-	11	-	10	10	-	42
4DM	10	-	-	12	-	14	12	-	48
5DM	12	-	-	8	8	9	10	-	47
6DM	10	-	-	8	7	12	12	-	49
7DM	10	-	-	12	-	12	12	-	46
8DM	10	-	-	-	-	11	11	-	32
ZDM	-	-	-	-	-	11	10	-	21
Toplam	80	0	0	73	15	104	100	0	372
1ÇM	11	7	9	-	-	-	11	-	38
2ÇM	11	10	11	10	-	-	13	-	55
3ÇM	10	9	8	10	-	-	10	-	47
4ÇM	11	9	12	11	-	-	13	-	56
5ÇM	10	9	10	10	-	-	9	-	48
6ÇM	10	-	10	11	-	-	8	-	39
7ÇM	11	12	11	11	-	-	9	-	54
8ÇM	12	-	11	-	-	-	12	-	35
ZÇM	10	-	10	-	-	-	9	-	29
Toplam	96	56	92	63	0	0	94	0	401
1YM	10	10	11	11	8	-	13	-	63
2YM	11	10	10	9	8	-	12	-	60
3YM	10	-	11	10	8	-	12	-	51
4YM	11	11	8	-	-	-	11	-	41
5YM	9	12	10	8	-	-	10	-	49

Tablo 11'in devamı,

6YM	10	11	12	7	-	-	10	-	50
7YM	7	9	12	-	-	-	13	-	41
8YM	-	-	11	-	-	-	11	-	22
ZYM	10	-	11	-	-	-	10	-	31
Toplam	78	63	96	45	24	0	102	0	408
su	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Etil asetat	9	7	7	8	7	8	9	8	63
metanol	10	7	8	7	8	-	7	8	55

Mikroorganizmalar: E.c. : *Escherichia coli*, L.m.: *Listeria Monocytogenes*, S.a.: *Staphylococcus aureus*, P.a.: *Pseudomonas aeruginosa*, S.t.: *Salmonella typhimurium*, A.n.: *Aspergillus. niger*, S.s.: *Shigella sonnei*, S.c.: *S. Ceravisiae*, C.a.: *Clostridium albicans*, -: inhibisyon yok, NT: No Test

Tablo 12. Standartların antimikrobiyal aktivite testi sonuçları: İnhibisyon yarıçapları (mm)

Numuneler	E.c.	S.t.	C.a.	S.s.	P.a.	L.m.	S.a.	A.n.
Ampicilin	42	35	-	42	30	29	27	-
Cephazolin	45	37	-	42	30	32	29	-
Nystatin	NT	NT	20	NT	NT	NT	NT	21
%70 Etanol	-	-	-	-	-	-	-	-

Mikroorganizmalar: E.c. : *Escherichia coli*, L.m.: *Listeria Monocytogenes*, S.a.: *Staphylococcus aureus*, P.a.: *Pseudomonas aeruginosa*, S.t.: *Salmonella typhimurium*, A.n.: *Aspergillus. niger*, S.s.: *Shigella sonnei*, S.c.: *S. Ceravisiae*, C.a.: *Clostridium albicans*, -: inhibisyon yok, NT: No Test

Sulu ekstraktlarla yapılan antimikrobiyal aktivite testinde inhibisyon aktivitesi gözlemlenmemiştir. Sadece 7YS numunesi *Staphylococcus aureus*'a karşı 7 mm yarıçapında inhibisyon göstermiştir.

Metanollü ve etil asetatlı ekstraktlarla yapılan antimikrobiyal aktivite testinde, inhibisyon etkisi gösterdikleri tespit edilmiştir. Etil asetatlı numunelerin mikroorganizmalara karşı toplam inhibisyon yarıçapları toplamı olarak metanollü

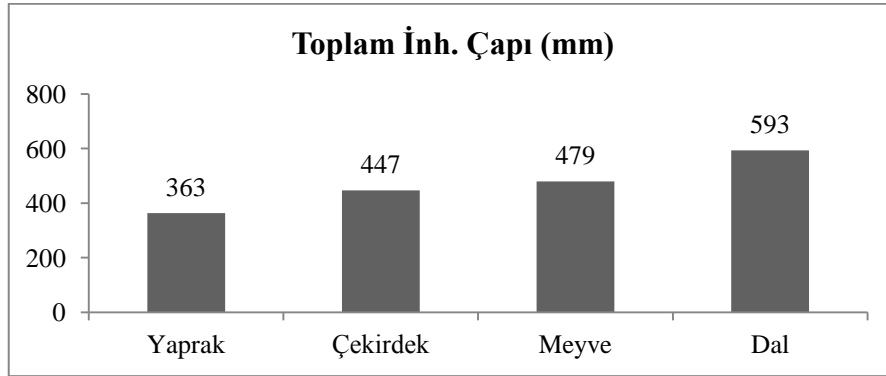
numunelere göre daha yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdikleri belirlenmiştir (Tablo 11.).

Meyve kısımlarının etil asetatlı ekstraktlarında toplam inhibisyon yarıçapı değeri en büyük olan 1ME numunesi (61mm) en yüksek aktiviteye sahip olduğu, en küçük toplam inhibisyon yarıçapı değerine sahip olan ZME numunesinin (37 mm) ise en düşük aktiviteye sahip olduğu söylenebilir (Tablo 11.).

Dal kısımlarının etil asetatlı ekstraktlarında toplam inhibisyon yarıçapları değerleri baz alınarak en yüksek antimikrobiyal aktiviteye 2DE (82 mm) numunesi ve en düşük aktiviteye 4DE (51 mm) numunesinin sahip olduğu tespit edilmiştir (Tablo 11.).

Çekirdek kısımlarının etil asetatlı ekstraktları ile yapılan antimikrobiyal aktivite testinde, toplam inhibisyon yarıçapı değerleri karşılaştırılarak, en yüksek aktiviteye 6ÇE ve en düşük aktiviteye ZÇE numunesi sahiptir (Tablo 11.).

Yaprak kısımlarının etil asetatlı ekstraktları ile yapılan antimikrobiyal aktivite testinde, toplam inhibisyon yarıçapı değerleri karşılaştırılarak, en yüksek aktiviteye 3YE ve en düşük aktiviteye ZYE numunesi sahiptir (Tablo 11.).



Şekil 122. Meyve, yaprak, dal ve çekirdek kısımlarının etil asetatlı ekstraktlarının antimikrobiyal aktivite testinde toplam inhibisyon yarıçapları (mm).

Meyve, dal, çekirdek ve yaprak kısımlarının etil asetatlı ekstraktları ile yapılan antimikrobiyal aktivite testinde dal kısmının etil asetatlı numuneleri, inhibisyon yarıçapı değerlerinin toplamı baz alınarak en yüksek aktiviteye sahiptir. En düşük antimikrobiyal aktivite ise yaprak kısımlarının etil asetatlı numunelerinde gözlemlenmiştir (Şekil 122.).

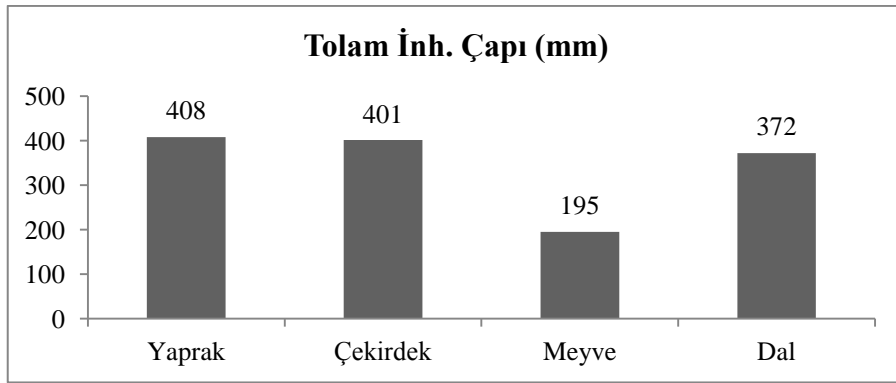
Meyve kısımlarının metanollü numuneleri ile yapılan antimikrobiyal aktivite testinden elde edilen inhibisyon yarıçapları değerlerinin toplamları karşılaştırıldığında, en

yüksek aktiviteye ZMM numunesi (33 mm), düşük aktiviteye ise 2MM numunesi sahiptir (Tablo 11.).

Dal kısımlarının metanollü ekstraktlarının antimikrobiyal aktivite testinde en yüksek aktiviteye 6DM numunesi (49 mm), en düşük aktiviteye ZDM numunesi sahiptir (Tablo 11.).

Yaprak kısımlarının metanollü ekstraktlarının antimikrobiyal aktivite testinde en yüksek aktiviteye 1YM numunesi (63 mm), en düşük aktiviteye ise 8YM numunesi (22 mm) numunesi sahiptir (Tablo 11.).

Çekirdek kısımlarının metanollü ekstraktları ile yapılan antimikrobiyal aktivite testinde en yüksek aktiviteye 4ÇM numunesi (56 mm) ve en düşük aktivite ise ZÇM numunesi (29 mm) sahiptir (Tablo 11.).

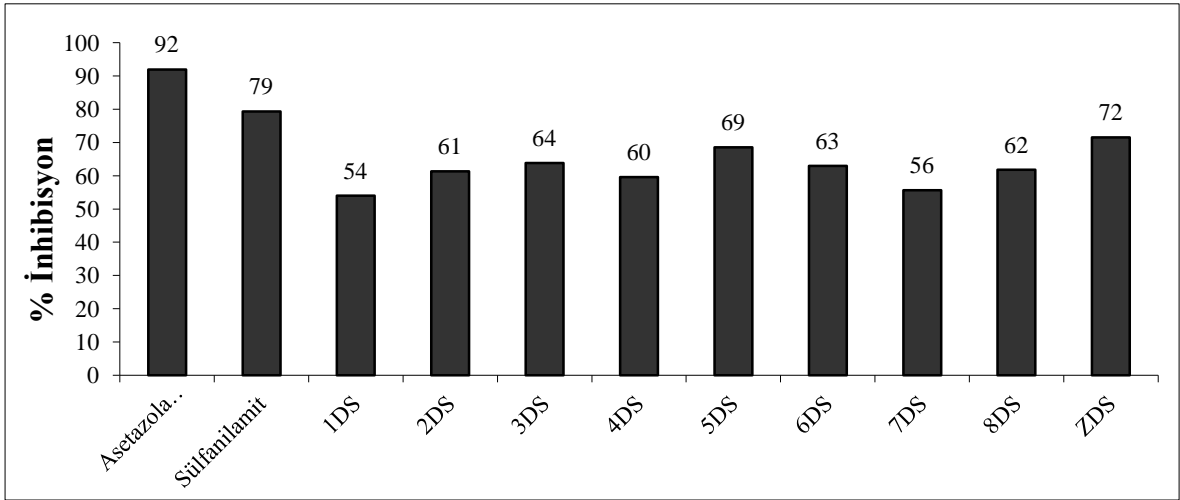


Şekil 123. Yaprak, çekirdek, dal ve meyve kısımlarının metanollü ekstraktlarının antimikrobiyal aktivite testinde toplam inhibisyon yarıçapları (mm).

Meyve, dal, çekirdek ve yaprak kısımlarının metanollü ekstraktları ile yapılan antimikrobiyal aktivite testinde meyve kısımlarının metanollü ekstraktları, inhibisyon yarıçapı değerlerinin toplamı baz alınarak, en yüksek aktiviteye sahiptir. En düşük antimikrobiyal aktivite ise meyve kısımlarının metanollü ekstraktlarında belirlendi (Şekil 123.).

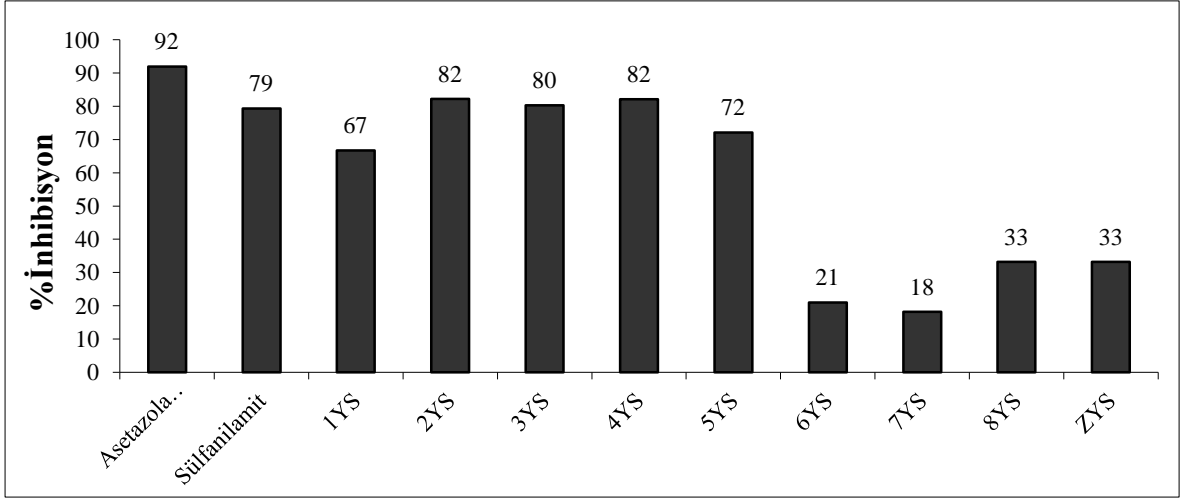
3.4. Karbonik Anhidraz (CA) Enzimi İnhibisyonu

Dal, yaprak, meyve ve çekirdek kısımlarından elde edilen sulu ekstraktların (1 mg/mL konsantrasyonda) karbonik anhidraz enzimi üzerine inhibisyon etkileri esteraz aktivitesi tayini yöntemine göre araştırıldı. Standart inhibitör olarak asetazolamid ve sülfanilamid kullanıldı.



Şekil 124. Dal kısımlarının sulu ekstraktlarının karbonik anhidraz enzimi inhibisyon değerleri (% inhibisyon)

Dal kısımlarının sulu ekstraktları ile yapılan CA inhibisyonu çalışmasında en yüksek %inhibisyon değeri ZDS numunesinde belirlendi. En düşük inhibisyon etkisi ise 1DS numunesinde belirlendi (Şekil 124.).



Şekil 125. Yaprak kısımlarının sulu ekstratlarının CA enzimi inhibisyon değerleri (%inhibisyon).

Yaprak kısımlarının sulu ekstratlarının CA enzimi inhibisyon aktivitesi çalışmasında 2YS ve 4YS numuneleri en yüksek aktiviteye, 7YS numunesi ise en düşük aktiviteye sahiptir (Şekil 125.).

Çekirdek ve meyve kısımlarının sulu ekstratları ile yapılan CA enzimi inhibisyon aktivitesi çalışmasında inhibisyon aktivitesi gözlemlenmedi.

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Ülkemizde birçok bölgede yetişmekte olan kuşburnu bitkisinin farklı ağaçlardan toplanan meyve, yaprak, dal ve çekirdek kısımlarının metanollü, etil asetatlı ve sulu ekstraktları ile biyoaktivite özelliklerinin araştırıldığı bu çalışmada antioksidan aktivite, antimikrobiyal aktivite ve karbonik anhidraz (CA) enzimi üzerine inhibisyon etkileri incelendi. Ayrıca Online-HPLC-FRAP yöntemi ile antioksidan aktivite araştırılarak offline yöntemle sonuçlar karşılaştırıldı.

Toplam fenolik madde miktarı yönteminde yaprak ve dal kısımlarının metanollü ekstraktlarının toplam fenolik madde içerikleri meyve ve çekirdek kısımlarından daha yüksek bulundu. Dal kısımlarının metanollü ekstraktları, yaprak kısımlarından biraz daha fazla fenolik madde içerdiği bulundu. Ayrıca çekirdek kısımlarının da meyve kısımlarına göre daha fazla fenolik madde içerdiği belirlendi Dal kısımları arasında 1DM numunesi (468 µg GAE /mL) en fazla fenolik madde içeriğine sahiptir. Yaprak kısımları arasında ise en yüksek fenolik madde içeriği ZYM numunesinde (463 µg GAE /mL) belirlendi(Şekil 19.). Dal, yaprak, meyve ve çekirdek kısımlarının sulu ekstraktları ile yapılan toplam fenolik madde miktarı analizlerinde dal ve yaprak kısımlarının meyve ve çekirdek kısımlarından daha fazla fenolik madde içerdiği tespit edildi. Meyve kısımlarının sulu ekstraktları, çekirdek kısımlarınakilere göre daha fazla fenolik madde içeriğine sahiptir. Dal ve yaprak kısımlarının sulu ekstraktları için ise yaprak kısımlarında daha fazla fenolik bileşik miktarı olduğu tespit edildi (Şekil 37, 38). Meyve kısımları içerisinde ZMS numunesi diğer sulu meyve numunelerine göre daha fazla fenolik kompozisyon içermektedir (Şekil 29.). Sulu çekirdek numunelerinde en yüksek fenolik madde 4ÇS numunesinde, en düşük ise 6ÇS numunesinde bulundu (Şekil 33.). Sulu dal kısımları arasında en yüksek fenolik madde içeriği ZDS numunesinde (169 µg GAE /mL) ve en düşük 1DS numunesinde (106 µg GAE /mL) belirlendi (Şekil 35.). Sulu yaprak numunelerinde en yüksek fenolik madde kompozisyonu 2YS numunesinde bulundu (Şekil 31.). Toplam fenolik madde tayini yönteminde, metanollü yaprak, dal ve çekirdek numunelerinin sulu dal, yaprak ve çekirdek numunelerinden daha fazla fenolik kompozisyana sahip oldukları bulundu. Sulu meyve kısımlarında ise fenolik madde miktarı metanollü meyve kısımlarından daha yüksek bulundu (Şekil 37.). Su ve metanol çözücülerinin kuşburnu numuneleri için fenolik bileşik ekstrakte etme özellikleri

karşılaştırıldığında, metanolün genel itibariyle daha fazla fenolik bileşik eldesi sağladığı testler sonucunda belirlendi. Toplam fenolik madde miktarı testlerinde, kuşburnu bitkisinin dal ve yaprak kısımlarının hem metanollü hem de sulu ekstraktlarında daha yüksek fenolik madde miktarı içerdiklerinin tespiti ile kuşburnu bitkisinin bu kısımlarının fenolik bileşik kaynağı oluşturmaları açısından son derece önemli olduklarını göstermektedir.

DPPH radikali temizleme aktivitesi yönteminde dal, yaprak, çekirdek ve meyve kısımlarının metanollü ekstraktlarının SC₅₀ değerleri karşılaştırıldığında, dal ve yaprak kısmının çekirdek ve meyve kısmından daha yüksek radikal temizleme aktivitesi gösterdikleri belirlendi. Meyve kısımlarının metanol ekstraktlarında aktivite, çekirdek, dal ve yaprak kısımlarıninkilere göre daha düşük çıktı. Metanollü dal numunelerinde aktivite en yüksek olarak belirlendi (Şekil 41, 42, 43 ve 44). Metanollü dal numuneleri arasında 2DM numunesinin DPPH radikali temizleme aktivitesi en yüksek (SC₅₀; 0,00214 mg/mL), 4DM numunesinin (SC₅₀; 0,00474 mg/mL) ise en düşük olduğu belirlendi (Şekil 42.). Metanollü çekirdek kısımlarında DPPH radikali temizleme aktivitesi en düşük olan 6ÇM numunesi (SC₅₀; 0,02567 mg/mL), en yüksek olan ise 1ÇM numunesidir (SC₅₀; 0,01197 mg/mL). Çekirdek kısımlarının DPPH radikali temizleme aktivitesi, testlerde kullanılan standart antioksidan olan BHT ve Trolox'a göre daha düşük çıktı (Şekil 41.). Yaprak kısımlarının metanollü ekstraktlarının DPPH radikali temizleme aktiviteleri arasında en yüksek aktiviteye ZYM numunesinde (SC₅₀; 0,00353 mg/mL), en düşük aktiviteye ise 7YM numunesinde (SC₅₀; 0,00706 mg/mL) rastlandı (Şekil 43.). Sulu ekstraktlarda yaprak kısımlarının DPPH radikali temizleme aktivitesi, dal, çekirdek ve meyve kısımlarına göre daha yüksek bulundu (Şekil 44, 45, 46, 47). Yaprak kısımlarında 2YS numunesinin aktivitesi en yüksek, ZYS numunesinin ise en düşüktür (Şekil 47.). Meyve kısımlarının sulu ekstraktları ile yapılan DPPH radikali temizleme aktivitesi testlerinde en yüksek aktivite 5MS numunesinde (0,0048 mg/mL) tespit edildi (Şekil 44.). Çekirdek kısımlarının sulu ekstraktlarında DPPH radikali temizleme aktivitesi diğer kısımlara göre düşük tespit edildi (Şekil 45). Etil asetatlı numunelerde en yüksek DPPH radikali temizleme aktivitesine dal kısımlarının, en düşük aktiviteye ise çekirdek kısımlarının sahip olduğu belirlendi (Şekil 48, 49, 50, 51). Dal kısımlarının etil asetatlı ekstraktlarında en yüksek DPPH radikali temizleme aktivitesine 1DE numunesi sahiptir (SC₅₀; 0,0009 mg/mL). Etil asetatlı yaprak numunelerinin DPPH radikali temizleme aktivitesi dal numunelerinin aktivitesinden sonra en yüksektir (Şekil 49). Yaprak ve dal kısımları etil asetatlı numuneler içerisinde meyve ve çekirdekten daha yüksek DPPH radikali temizleme aktivitesine

sahiptir (Şekil 52). Dal kısımları arasında en yüksek DPPH radikali temizleme aktivitesine sahip olan metanollü ekstraktlardır (Şekil 53.). Sulu dal numuneleri DPPH radikali temizleme aktivitesi en düşük olan numunelerdir (Şekil 53.). Meyve kısımlarının sulu ekstraktlarının ise metanollü ve etil asetatlı ekstraktlardan daha yüksek DPPH temizleme aktivitesi gösterdikleri belirlendi (Şekil 52.). Yaprak kısımlarının sulu ve metanollü ekstraktlarının DPPH temizleme aktiviteleri numunelere göre değişiklik gösterdiği, yani bazı numunelerde metanollü ekstraktların aktivitesi yüksekken bazı numunelerde sulu ekstraktların aktivitesi yüksek bulundu (Şekil 54.).

Yapılan antioksidan aktivite belirleme çalışmaları sonucunda meyve kısımlarının sulu ekstraktlarının aktivitesinin yüksek olduğu bulunmuştur. Meyve kısımlarının metanollü ekstraktlarında antioksidan aktivitenin düşük olduğu bulunmuştur. Dal, yaprak ve çekirdek kısımlarının metanollü ekstraktlarında antioksidan aktivitenin yüksek olduğu bulunmuştur. Yaprak ve dal kısımlarının antioksidan özellikleri, meyve ve çekirdek kısımlarından daha yüksek olduğu görülmüştür. Çekirdek kısımlarının metanollü, etil asetatlı ve sulu ekstraktlarının diğer bitki kısımlarının ekstraktlarından daha düşük aktiviteye sahip oldukları tespit edilmiştir. Dal ve yaprak kısımlarının ekstraktların antioksidan aktivitelerinin birbirine yakın olduğu görülmüştür.

Sulu kısımlarla yapılan karbonik anhidraz enzimi inhibisyon etkisi çalışmasında dal ve yaprak kısımlarının inhibisyon özelliği taşıdıkları belirlenmiştir. Dal kısımlarının yaprak kısımlarına göre daha yüksek inhibisyon aktivitesine sahip oldukları bulunmuştur. Çekirdek ve meyve kısımlarının sulu ekstraktlarında ise CA enzimine karşı inhibisyon özelliği göstermedikleri tespit edilmiştir.

Antimikrobiyal testlerde metanollü ve etil asetatlı ekstraktların, mikroorganizmaların büyümelerini engelleyici inhibisyon özelliğine sahip oldukları belirlenmiştir ve etil asetatlı numunelerin metanollülere göre daha yüksek aktivite gösterdikleri bulunmuştur (Tablo 11). Sulu kısımlar ise antimikrobiyal testlerde herhangi bir aktivite göstermemiştir.

Metanollü ekstraktlarla yapılan HPLC analizlerinde, dal ve yaprak kısımlarının online-FRAP değerleri daha yüksek çıkmıştır. En düşük online-FRAP aktivitesine çekirdek kısımlarında rastlanmıştır. Yapılan analizler sonucunda elde edilen kromatogramlar laboratuarda mevcut olan standartların kromatogramlarıyla karşılaştırılarak; çekirdek kısımlarının vanilin ve vanilik asit içerdiği, yaprak ve dal kısımlarının gallik asit içerdiği ve meyve kısımlarının da askorbik asit içerdiği belirlendi.

Online-HPLC-FRAP yönteminden elde edilen antioksidan aktivite değerleri ile offline-FRAP yönteminden elde edilen değerler karşılaştırılarak, iki yöntem arasında korelasyon olduğu belirlenmiştir. Ayrıca HPLC analizlerinden elde edilen veriler toplam fenolik madde miktarı yöntemiyle de korelasyon göstermiştir.

Kuşburnu bitkisinin yaygın olarak meyvesinden yararlanılmaktadır. Bu çalışmada dal ve yaprak kısımlarının önemli derecede biyoaktivite gösterdiği görülmüştür. Bu nedenle yaprak ve dal kısımlarının kullanımının elverişli hale getirilmesi ve yaygınlaştırılması amacıyla ileri çalışmalar yapmak faydalı olacaktır.

Karbonik anhidraz enzimi inhibitörleri farmakolojik olarak yüksek öneme sahip maddelerdir. Kuşburnu bitkisinin yaprak ve dal kısımlarında gözlemlenen CA enzimi inhibisyon aktivitesinden sorumlu olan bileşiklerin araştırılması, belki de yeni bir CA enzimi inhibitörünün varlığının tespiti açısından faydalı olacaktır.

Sonuç olarak farklı kuşburnu ağaçlarından elde edilen ekstraktların biyoaktivite açısından büyük bir öneme sahip oldukları görülmüştür.

5. KAYNAKLAR

- Akkuş, İ., 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Yay., Konya.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S. E. ve Altun, M., 2005. Total Antioxidant Capacity Assay of Human Serum Using Copper (II)-neocuproine as Chromogenic Oxidant: The CUPRAC Method, Taylor & Francis, 39, 9, 949-961.
- Arslan Burnaz, N., 2012. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Baskin, S.I. ve Salem, H., 1997. Oxidants, antioxidants, and free radicals. Washington DC: Taylor and Francis, , 79-120.
- Bravo, L., 1998. Polyphenol Chemistry, Dietary Sources, Metabolism and Nutritional Significance, Nutr. Rev., 56, 317-333.
- Burak, M. ve Çimen, Y., 1999. Flavonoidler ve Antioksidan Özellikleri. T. Klin. Tıp Bilimleri, 19, 296-304.
- Carr, A.C., Zhu, B.Z. ve Frei, B., 2000. Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and alpha-tocopherol (vitamin E). Circ Res; 87, 349-354.
- Cemeroğlu, B., 2004. Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi 1. Cilt. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, 35, 77-88.
- Chang, L.C., Kinghorn, A.D. ve Tringali, C., 2001. Bioactive Compounds from Natural Sources, Taylor & Francis, 159.
- Cuendet, M., Hostettmann, P. ve Potterat, O., 1997. Iridoid Glucosides with Free Radical Scavenging Properties from *Fagraea blumei*, Helv. Chim. Akta, 80, 1144-1152.
- Dıġrak, M., Alma, M.H., İçlim, A. ve Şen, S., 1998. Antibacterial and Antifungal Effects of Various Commercial Plant Extracts, Pharmaceutical Biology, 36, 5, 1-5.
- Di Mascio, P. Murphy, M.E. ve Sies, H. 1991. Antioxidan defense system: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. Am. J. Clin. Nutr. 53, 194-200.
- Dillard, C.J. ve German, J.B., 2000. Phytochemicals: Nutraceuticals and Human Health, J Sci Food Agric., 80, 1744-1756.
- Diplock, A. 1998. Healthy lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients. ILSI Europe concise monograph series, 59 p.
- Doğan, A., Kazankaya, A., Çelik, F. ve Uyak, C., 2006. Kuşburnunun Halk Hekimliğindeki Yeri VeBünyesindeki Bileşenler Açısından Yararları, II.Ulusal Üzümsü Meyveler Sempozyumu, Eylül, Tokat, Bildiriler Kitabı; 299-303.

- Dündar, Y. ve Aslan, R., 2000. Hekimlikte Oksidatif Stres ve Antioksidanlar, I. Basım, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Afyon.
- Ercişli, S. ve Güteryüz, M., 2005. Rose Hip Utilization in Turkey. Proceedings of the I. International Rose Hip Conference, Acta, 690, 77–82.
- Erel, O., 2004. A Novel Automated Direct Measurement Method for Total Antioxidant Capacity Using a New Generation, More Stable ABTS Radical Cation, Clin. Biochem., 37, 4, 277-285.
- Giese, J., 1994. Spices and Seasoning Blends: A taste for all seasons. Food Technol. 48, 4, 87-98.
- Harborne, J.B., 1994. The Flavonoids Advances in Research Since 1986, Chapman & Hall/CRC, USA, 638.
- İlisulu, K., 1992. İlaç ve Baharat Bitkileri. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları 1250, Ders Kitabı No:360, 302s.
- Kalaycıoğlu, A. ve Öner, C., 1994. Bazı Bitki Ekstraksiyonlarının Antimutajenik Etkilerinin Amest-Salmonella Test Sistemi ile Araştırılması, Tr. J. Botany, 18, 117-122.
- Kayalı, R. ve Çakatay, U., 2004. Basic Mechanisms of Protein Oxidation, Cerrahpaşa J Med, 35, 83-89.
- Kazaz, S. ve Baydar, H., Erbaş, S., 2009. Carotenoid composition of Rosa canina fruits determined by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography., J. Pharm.Biomed. Anal. 16,521-528.
- Koleva, I.I., Niederlander, H.A.G. ve van Beek, T.A., 2000, Anal. Chem. 72, 2323.
- Koleva, I.I., Niederlander, H.A.G. ve van Beek, T.A., 2001, Anal. Chem. 73, 3373.
- Kurilich, A.C., Clevidence, B.A., Britz, S.J., Simon, P.W. ve Novotny, J.A., 2005. Plasma and Urine Responses Are Lower for Acylated vs Nonacylated Anthocyanins from Raw and Cooked Purple, J.Agric. Food Chem, 53, 6537-6542.
- Larson, R.A. 1988. The antioxidants of higher plants. Phytochemistry. 27,4, 969-978.
- Niederlander, H.A.G., Koleva, I.I. ve van Beek, T.A., 2008. Antioxidant activity assays on-line with liquid chromatography, Journal of Chromatography A, 1210, 121–134.
- Nilson, O., 1972. Flora of Turkey and East Aegean Islands. (Ed.P.H. Davis) 4, Edinburgh University Press, 106-128.
- Nojavan, S., Khalilian, F., Kiaie, F.M., Rahimi, A., Arabanian, A. ve Chalavi, S., 2008. Extraction and quantitative determination of ascorbic acid during different maturity stages of Rosa canina L. fruit , Journal of Food Composition and Analysis, 21, 300–305.

- Orhan, D.D., Hartevioğlu, A., Küpeli, E. ve Yeşilada, E., 2007. In vivo anti-inflammatory and antinociceptive activity of the crude extract and fractions from *Rosa canina* L. Fruits., Journal of Ethnopharmacology; 112, 394–400.
- Oyaizu, M., 1986. Studies on Product of Browning Reaction Prepared from Glucose Amine, Jap. J. Nutr., 44, 307-315.
- Özdemir, F., Topuz, A. ve Karkacier, M., 1998. (Akdeniz Univ., Faculty of Agriculture, Antalya (Turkey). Div. of Food Science and Technology) The effect of heating method and formulation on marmalade quality produced from rose hip pulp, Journal of Engineering Sciences, 4,1-2, 577-580.
- Porter, N.A. 1985. Mechanism of fatty acid and phospholipid autoxidation. In “Chemical Changes in Food During Processing”, T. Richardson and J.W. Finley (Eds), 73-105.
- Proteggente, A.R., Rehman, A., Halliwell, B., Rice-Evans C.A., 1997. Potential problems of ascorbate and iron supplementation: prooxidant effect in vivo? Biochem Biophys Res Commun 2000, 277, 535-540.
- Rein, E., Kharazmi, A. ve Winther, K., 2004. A herbal remedy, Hyben Vital (stand. powder of a subspecies of *Rosa canina* fruits), reduces pain and improves general wellbeing in patients with osteoarthritis-a double-blind, placebo-controlled, randomised trial, Phytomedicine, 11,5, 383-391.
- Shahidi, F. ve Naczk, M., 1995. Food Phenolics. Technomic Publishing Company Book, Lanchester, USA, 199-225.
- Shelef, L. A., 1983. Antimicrobial Effects of Spices. J. Food Safety, 6, 29-44.
- Sinha, S.N. ve Ray, U.S., 2009. Total antioxidant status at high altitude in lowlanders and native 83 highlanders: role of uric acid, High Alt Med Biol; 10, 269-274.
- Skoog, D.A., James Holler, F. ve Nieman, T.A., Principles of Instrumental Analysis, Fifth Edition, Saunders College Publishing, 1998.
- Slinkard, K. ve Singleton, V. L., 1977. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manuel Methods, Am. J. Enol. Viticult., 28, 49-55.
- Türkben, C., 2003. Kuşburnu. ISBN: 975–6958–70–7, Bursa. 53s.
- URL-1,; <http://tr.wikipedia.org/wiki/Ku%C5%9Fburnu>, 25 Ocak 2012.
- URL-2,; http://en.wikipedia.org/wiki/Rose_hip, 13 Mayıs 2012.
- URL-3; http://www.genetikbilimi.com/gen/serbest_radikaller.html, 15 Mayıs 2012.
- URL-4; <http://www.exrx.net/Nutrition/Antioxidants/Introduction.html>, 10 Nisan 2012.

URL-5; <http://www.rei-shi.com/tibbi-etkisi/anti-oksidan-etkisi>, 15 Nisan 2012.

URL-6; <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01.doc>, 12 Mayıs 2012.

URL-7; <http://tr.wikipedia.org/wiki/Polifenol>, 10 Mayıs 2012.

URL-8; http://en.wikipedia.org/wiki/High-performance_liquid_chromatography, 29 Nisan 2012.

Yılmaz, S. ve Ozan, S. T., 2003. Meme Kanserli Hastalarda Lipid Peroksidasyonu ve Bazı Enzim Aktiviteleri Arasındaki İlişki, Türk Biyokimya Dergisi, 28, 4, 252-256.

Yıldız, O. ve Alpaslan, M., 2012. Properties of rose hip marmalades, Food Technol. Biotechnol., 50, 1, 98–106.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Zonguldak'ta doğdu. 2003 yılında Gökçebey Çok Programlı Lisesi'nden mezun oldu. 2004-2009 yılları arasında KTÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde lisans eğitimi gördü. 2010 yılında KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Programı'na başladı. Yabancı dili iyi derecede İngilizce olup, evlidir.