

**T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
ANALİTİK KİMYA BİLİM DALI**

**ZEYTİN, ZEYTİNYAĞI VE ZEYTİN YAPRAĞINDA BULUNAN
BAZI FENOLİK BİLEŞİKLERİN TAYİNLERİ İÇİN
ELEKTROKİMYASAL VE KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLERİN
GELİŞTİRİLMESİ**

Mustafa CİTTAN

**Danışman
Prof. Dr. Ali ÇELİK**



MANİSA-2017

TEZ ONAYI

Mustafa CİTTAN tarafından hazırlanan "Zeytin, zeytinyağı ve zeytin yaprağında bulunan bazı fenolik bileşiklerin tayinleri için elektrokimyasal ve kromatografik yöntemlerin geliştirilmesi" adlı tez çalışması 26/05/2017 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri önünde Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Kimya Anabilim Dalı**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak savunulmuş ve **oyçokluğu / oybirliği** ile başarılı olarak kabul edilmiştir.

Danışman

Prof. Dr. Ali ÇELİK
Manisa Celal Bayar Üniversitesi



Jüri Üyesi

Prof. Dr. Kadriye ERTEKİN
Dokuz Eylül Üniversitesi



Jüri Üyesi

Doç. Dr. Hasan ERTAŞ
Ege Üniversitesi



Jüri Üyesi

Doç. Dr. Süleyman KOÇAK
Manisa Celal Bayar Üniversitesi



Jüri Üyesi

Doç. Dr. Nüket TİRTOM
Manisa Celal Bayar Üniversitesi



TAAHHÜTNAME

Bu tezin Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde, akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Mustafa CİTTAN



İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	III
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
TABLO DİZİNİ	IX
TEŞEKKÜR.....	X
ÖZET.....	XI
ABSTRACT.....	XII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Serbest Radikaller, Oksidatif Hasar ve Antioksidan Kavramı	2
2.2. Zeytin Bitkisi ve İçerdiği Fenolik Bileşikler	3
2.3. Ekstraksiyon	9
2.4. Karbon Nanotüpler, İletken Polimerler ve Metal Nanoparçacıklar	10
2.5. Voltammetri.....	11
2.5.1. Adsorptif Sıyırma Voltammetrisi	12
2.5.2. Döngüsel Voltammetri.....	12
2.5.3. Kare Dalga Voltammetrisi	13
2.6. Eşleşmiş Sıvı Kromatografik Teknikler	14
2.6.1. Sıvı Kromatografisi.....	14
2.6.2. Kütle Spektrometresi	15
2.7. UV/Vis Spektrofotometresi	16
2.8. Toplam Fenolik İçerik ve Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri	16
2.8.1. Cu(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasitesi Yöntemi	17
2.8.2. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Radikal Giderme Yöntemi.....	17
2.8.3. Folin-Ciocalteu Ayracı (FCR) ile Toplam Fenolik Madde Yöntemi	17
2.9. Fenolik Bileşiklerin Tayinlerinde Analitik Yaklaşımlar	18
3. DENEYSEL KISIM.....	23
3.1. Materyal.....	23
3.2. Kimyasallar	23
3.3. Voltammetri Yöntemi.....	24
3.4. LC-ESI-MS/MS Yöntemi.....	24
3.5. Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyon Yöntemleri	29
3.6. CUPRAC, DPPH ve Folin-Ciocalteu Yöntemlerinin Uygulanması	30
3.7. Karbon Nanotüplerin Hazırlanması.....	34
3.8. GCE Yüzeyine MWCNT, İletken Polimer ve Metal Nanoparçacık Modifikasyonları	34

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	38
4.1. Zeytin Yaprağı Örneklerinde Oleuropeinin Adsorptif Sıyırma Kare Dalga Voltammetrisi ile Tayini	38
4.1.1. Çalışma Koşullarının Optimizasyonu	38
4.1.2. Oleuropeinin Yalın GCE ve MWCNT/GCE Üzerinde Elektrokimyasal Davranışı	41
4.1.3. MWCNT/GCE Üzerine İletken Polimer ve Metal Nanoparçacık Modifiyesinin Etkisi	42
4.1.4. Doğrusallık, Çalışma Aralığı, Belirtme ve Tayin Sınırları	45
4.1.5. Tekrarlanabilirlik	46
4.1.6. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon Yönteminin Geri Kazanımı	47
4.1.7. Zeytin Yaprağı Örneğinde Oleuropeinin Nicel Tayini	48
4.1.8. Girişim Çalışmaları	49
4.2. Zeytin Yaprağı ve Zeytinyağı Örneklerinde Bazı Zeytin Biyofenollerinin LC-ESI-MS/MS Yöntemi ile Tayinleri	49
4.2.1. Doğrusallık	50
4.2.2. Ekstraksiyon Yöntemlerinin Geri Kazanım Değerleri	51
4.2.3. Biyofenollerin Nicel Tayinleri	52
4.3. Zeytin Yaprağı Örneklerinde Diğer Bazı Fenolik Bileşiklerin LC-ESI-MS/MS Yöntemi ile Tayinleri için Yöntem Validasyonu	52
4.3.1. Doğrusallık, Belirtme ve Tayin Sınırları	52
4.3.2. Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik	58
4.3.4. Geri Kazanım ve Yöntemin Uygulanabilirliği	61
4.3.5. Matriks Etkisi	61
4.3.6. Kararlılık	61
4.3.7. Zeytin Örneğinde Bulunan Fenolik Bileşiklerin Nicel Tayinleri	63
4.4. Zeytin Yaprağı Örneğinin Toplam Antioksidan Kapasitesi, Toplam Fenolik Madde Miktarı ve Radikal Süpürme Kapasitesinin Belirlenmesi	65
4.4.1. Kalibrasyon Eğrileri	65
4.4.2. Zeytin Yaprağı Ekstraktının Toplam Antioksidan Kapasitesi, Toplam Fenolik Madde Miktarı ve Radikal Süpürme Kapasitesi	66
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	68
KAYNAKLAR	73
ÖZGEÇMİŞ	79

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
μA	Mikroamper
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre
μM	Mikromolar
atm	Atmosfer
cm ²	Santimetre kare
dk.	Dakika
doy.	Doygun
g	Gram
kV	Kilovolt
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
mV	Milivolt
m/z	Kütle/yük oranı
mΩ	Miliohm
nm	Nanometre
nM	Nanomolar
psi	Pound per square inch (İnç kare başına pound)
rpm	Revolutions per minute (Dakikadaki devir sayısı)
R _t	Retention time (Alıkonma süresi)
s	Saniye
Al ₂ O ₃	Alüminyum oksit
Ag	Gümüş
AgCl	Gümüş klorür
Au	Altın
HAuCl ₄	Kloroaurik asit
HCl	Hidroklorik asit

HNO ₃	Nitrik asit
HOCl	Hipokloröz asit
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
H ₂ PtCl ₆	Kloroplatinik asit
H ₂ SO ₄	Sülfürik asit
In ₂ O ₃	İndiyum(III) oksit
KCl	Potasyum klorür
Mo	Molibden
NO	Azot oksit
NO·	Azot oksit radikali
N ₂	Azot gazı
OH·	Hidroksil radikali
ONOO ⁻	Peroksinitrit radikali
¹ O ₂	Singlet oksijen
O ₂ ^{-·}	Süperoksit radikali
O ₃	Ozon
Pt	Platin
RO ₂ [·]	Peroksil radikali
ABS	Acetate buffer solution (Asetat tampon çözeltisi)
AdSV	Adsorptive stripping voltammetry (Adsorptif sıyırma voltammetrisi)
BCP	Bromocresol purple (Bromkresol moru)
CE	Collision energy (Çarpışma enerjisi)
CHIT	Chitosan (Kitosan)
CNT	Carbon nanotube (Karbon nanotüp)
CPE	Carbon paste electrode (Karbon pasta elektrot)
CUPRAC	Cu(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi
CV	Cyclic voltammetry (Döngüsel voltammetri)
DAD	Diode array detector (Dizi diyot dedektör)
DMF	Dimetilformamid
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DPV	Differential puls voltammetry (Diferansiyel puls voltammetri)
E	Potansiyel
ESI	Electrospray ionization (Elektrosprey iyonizasyon)

FCR	Folin-Ciocalteu reagent (Folin-Ciocalteu ayıracı)
GAE	Galic acid equivalent (Gallik asit eşdeğeri)
GBS	Glycine buffer solution (Glisin tampon çözeltilisi)
GC	Gas chromatography (Gaz kromatografisi)
GCE	Glassy carbon electrode (Camımsı karbon elektrot)
GCPE	Glassy carbon paste electrode (Camımsı karbon pasta elektrot)
HAS	Hydrochloric acid solution (Hidroklorik asit çözeltilisi)
HPLC	High pressure liquid chromatography (Yüksek performans sıvı kromatografisi)
HRMS	High resolution mass spectrometer (Yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi)
Hz	Hertz
I	Akım
I.D.	Internal diameter (İç çap)
IE	Infusion extraction (İnfüzyon ekstraksiyonu)
IR	Infrared (Kızılötesi)
IS	Ionspray-ionization (İyonsprey-iyonizasyon)
ISTD	Internal standard (İç standart)
L	Litre
LC	Liquid chromatography (Sıvı kromatografisi)
LLE	Liquid-liquid extraction (Sıvı-sıvı ekstraksiyon)
LLME	Liquid-liquid microextraction (Sıvı-sıvı mikroekstraksiyon)
LOD	Limit of detection (Belirtme sınırı)
LOQ	Limit of quantification (Tayin sınırı)
LR	Linear range (Doğrusal aralık)
M	Molarite
MAE	Microwave-assisted extraction (Mikrodalga destekli ekstraksiyon)
ME	Matrix effect (Matriks etkisi)
MPa	Megapaskal
MRM	Multiple reaction monitoring (Çoklu reaksiyon izleme)
MS	Mass spectrometer (Kütle spektrometresi)
MWCNT	Multi-walled carbon nanotube (Çok duvarlı karbon nanotüp)
NAS	Nitric acid solution (Nitrik asit çözeltilisi)
Nc	Neokuproin

NI	Negative ion (Negatif iyon)
NMR	Nuclear magnetic resonance (Nükleer manyetik rezonans)
NPs	Nanoparticles (Nanoparçacıklar)
PAS	Perchloric acid solution (Perklorik asit çözeltisi)
PBS	Phosphate buffer solution (Fosfat tampon çözeltisi)
PI	Positive ion (Pozitif iyon)
RNS	Reactive nitrogen species (Reaktif azot türleri)
ROS	Reactive oxygen species (Reaktif oksijen türleri)
RSD	Relative standard deviation (Bağıl standart sapma)
RSK	Radikal süpürme kapasitesi
SAS	Sulfuric acid solution (Sülfürik asit çözeltisi)
SD	Standard deviation (Standart sapma)
SHS	Sodium hydroxide solution (Sodyum hidroksit çözeltisi)
SPE	Screen printed electrode (Yüzey baskılı elektrot), Solid phase extraction (Katı faza özütleme)
SWCNT	Single-walled carbon nanotube (Tek duvarlı karbon nanotüp)
SWV	Square wave voltammetry (Kare dalga voltammetrisi)
TAOK	Toplam antioksidan kapasitesi
TE	Trolox equivalent (Troloks eşdeğeri)
TFABS	Trifluoroacetic acid buffer solution (Trifloroasetik asit tampon çözeltisi)
TFAS	Trifluoroacetic acid solution (Trifloroasetik asit çözeltisi)
TFMM	Toplam fenolik madde miktarı
UAE	Ultrasound-assisted extraction (Ultrasonik destekli ekstraksiyon)
UHPLC	Ultra high performance liquid chromatography (Ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi)
USE	Ultrasound liquid-liquid extraction (Ultrasonik sıvı-sıvı ekstraksiyon)
UV/Vis	Ultraviolet/visible region (Morötesi/görünür bölge)
V	Volt
W	Watt

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Antioksidan etki mekanizması.....	3
Şekil 2.2. (a) Fulleren, (b) grafen, (c) SWCNT ve (d) MWCNT yapıları	11
Şekil 2.3. Potansiyostat cihazının şematik gösterimi	12
Şekil 2.4. Döngüsel voltammetride potansiyel-zaman eğrisi.....	12
Şekil 2.5. Döngüsel voltammogramlar	13
Şekil 2.6. Kare dalga voltammetri için uyarma sinyalleri.....	14
Şekil 2.7. Bir sıvı kromatografi cihazının şematik gösterimi.....	15
Şekil 2.8. Elektrosprey iyonizasyon şematik gösterimi	15
Şekil 2.9. Bir UV/Vis spektrofotometresinin şematik gösterimi	16
Şekil 2.10. Cu(II)'nin antioksidan bir tür ile Cu(I)'e indirgenme reaksiyonu	17
Şekil 2.11. DPPH ile antioksidan arasındaki tepkimenin mekanizması	17
Şekil 3.1. Autolab PG128N potansiyostat/galvanostat	24
Şekil 3.2. Agilent 1260 sıvı kromatografisi ile eşleşmiş 6420 kütle spektrometresi.....	25
Şekil 3.3. Türlerine ait standart kromatogram (a) hidrokstitirozol, (b) tirozol, (c) luteolin 7-glikozit, (d) apigenin 7-glikozit, (e) oleuropein.....	26
Şekil 3.4. Fenolik bileşiklerin LC-ESI-MS/MS kromatogramları.....	28
Şekil 3.5. Cem Mars 6 mikrodalga bozundurma sistemi	29
Şekil 3.6. CUPRAC yöntemi akış diyagramı.....	31
Şekil 3.7. DPPH yöntemi akış diyagramı	32
Şekil 3.8. Folin-Ciocalteu yöntemi akış diyagramı.....	33
Şekil 3.9. Jasco V-530 spektrofotometre	34
Şekil 3.10. MWCNT/GCE yüzeyine taurin monomerlerinin elektropolimerizasyonu	35
Şekil 3.11. MWCNT/GCE yüzeyine BCP monomerlerinin elektropolimerizasyonu	36
Şekil 3.12. Au nanoparçacıkların MWCNT/GCE yüzeyine kaplanması.....	36
Şekil 3.13. Pt nanoparçacıkların MWCNT/GCE yüzeyine kaplanması	37
Şekil 4.1. MWCNT/GCE ile oleuropein tayininin görsel açıklaması.....	38
Şekil 4.2. 9.25 µM oleuropeinin (a) yalın GCE üzerinde 0.1 M H ₂ SO ₄ çözeltisini karıştırarak, (b) MWCNT/GCE üzerinde, (c) MWCNT/GCE üzerinde 0.1 M H ₂ SO ₄ çözeltisini karıştırarak CV ile elde edilen yükseltgenme pik akımları	39
Şekil 4.3. (A) 9.25 µM oleuropeinin farklı destek elektrolitler kullanılarak 400 rpm de 15 dk. karıştırma sonrası, hazırlanan MWCNT/GCE üzerinde CV ile elde edilen yükseltgenme pik akımları. (B) MWCNT/GCE üzerinde 9.25 µM oleuropeinin yükseltgenme pik akımına H ₂ SO ₄ çözeltisinin konsantrasyon etkisi.	40
Şekil 4.4. (A) 0.1 M H ₂ SO ₄ ortamında (a) yalın GCE üzerinde, (b) MWCNT/GCE üzerinde, (c) MWCNT/GCE üzerinde 5 dk. karıştırma sonrası, (d) MWCNT/GCE üzerinde 10 dk. karıştırma sonrası, (e) MWCNT/GCE üzerinde 15 dk. karıştırma sonrası 9.25 µM oleuropeine ait döngüsel voltammogramlar. (B) kör döngüsel voltammogramlar (a) yalın GCE, (b) MWCNT/GCE	41

Şekil 4.5. 0.1 M H ₂ SO ₄ ortamında (A) yalın GCE ve (B) MWCNT/GCE üzerinde 9.25 µM oleuropeinin çeşitli tarama hızlarında döngüsel voltammogramları. Oleuropeinin yükseltgenme akımının tarama hızına karşı (a-j): 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300 and 400 mV s ⁻¹ oluşturulan grafiği (C) yalın GCE, (D) MWCNT/GCE için	43
Şekil 4.6. 9.25 µM oleuropeinin 15 dk. karıştırma sonrası 0.1 M H ₂ SO ₄ ortamında (a) yalın GCE, (b) AuNPs/MWCNT/GCE, (c) PtNPs/MWCNT/GCE, (d) poli(taurin)/MWCNT/GCE ve (e) MWCNT/GCE üzerinde döngüsel voltammogramları.....	44
Şekil 4.7. poli(BCP)/MWCNT/GCE yüzeyinde destek elektrolit çözeltisine (0.1 M H ₂ SO ₄) ait döngüsel voltammogram	44
Şekil 4.8. (A) 0.1 M H ₂ SO ₄ ortamında MWCNT/GCE üzerinde farklı konsantrasyonlardaki kare dalga voltammogramları (a-j): 0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.05, 0.07, 0.10, 0.30, 0.50 ve 0.70 µM oleuropein. (B) MWCNT/GCE üzerinde oleuropeine ait kalibrasyon eğrisi	45
Şekil 4.9. Oleuropein için LC-ESI-MS/MS yöntemi ile elde edilen tipik bir kalibrasyon eğrisi.....	48
Şekil 4.10. (a) numune, (b) 0.1 µM, (c) 0.3 µM oleuropein standart katma sonrası elde edilen kare dalga voltammogramlar	49
Şekil 4.11. Türlerle ait tipik kalibrasyon eğrileri	50
Şekil 4.12. İzomer türlerin molekül şekilleri (a) tirozol, (b) 2-(3-hidroksifenil)etanol	51
Şekil 4.13. Fenolik bileşiklerin kalibrasyon eğrileri	53
Şekil 4.14. CUPRAC yöntemi için troloks ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi....	65
Şekil 4.15. DPPH yöntemi için troloks ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi.....	66
Şekil 4.16. Folin-Ciocalteu yöntemi için gallik asit ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi	66

TABLO DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Dünya sofralık zeytin üretimi, ithalatı, ihracatı ve tüketimi	4
Tablo 2.2. Dünya zeytinyağı üretimi, ithalatı, ihracatı ve tüketimi	5
Tablo 2.3. Zeytin, zeytinyağı ve zeytin yaprağında bulunan fenolik bileşikler..	7
Tablo 3.1. Hedef analitlere ait ESI-MS/MS parametreleri-1	26
Tablo 3.2. Hedef analitlere ait ESI-MS/MS parametreleri-2	27
Tablo 3.3. CUPRAC yönteminde kalibrasyon için kullanılan standart çözeltiler	31
Tablo 3.4. DPPH yönteminde kalibrasyon için kullanılan standart çözeltiler	32
Tablo 3.5. Folin-Ciocalteu yönteminde kalibrasyon için kullanılan standart çözeltiler	33
Tablo 4.1. Bazı oleuropein sensörlerinin karşılaştırılması.....	46
Tablo 4.2. Gün-içi ve günler-arası tekrarlanabilirlik	47
Tablo 4.3. Mikrodalga destekli ekstraksiyon yönteminin oleuropein için geri kazanım değerleri	47
Tablo 4.4. Zeytinyağı örneklerinde UAE geri kazanımı.....	51
Tablo 4.5. Zeytin yaprağı örneklerinde MAE geri kazanımı	52
Tablo 4.6. Zeytin yaprağı ve zeytinyağı örneklerinde biyofenol miktarları	52
Tablo 4.7. Fenolik bileşiklerin doğrusallık ve duyarlık özellikleri.....	59
Tablo 4.8. Gün-içi ve günler-arası tekrarlanabilirlik	60
Tablo 4.9. Zeytin yaprağı ekstraktında fenolik bileşiklerin nicel tayinleri ve önerilen yöntemin geri kazanım değerleri	62
Tablo 4.10. Önerilen yöntemin matriks etkisi ve ekstrakt kararlılığı	63
Tablo 4.11. Zeytin ve zeytin yaprağı ekstraktlarında fenolik bileşiklerin nicel tayinleri.....	64
Tablo 4.12. Zeytin yaprağı ekstraktının toplam antioksidan kapasitesi, toplam fenolik madde miktarı ve radikal süpürme kapasitesi	67

TEŞEKKÜR

Tecrübesi ve uzman rehberliği ile çalıŐmalarım boyunca her türlü imkânı sağlayan, hiçbir zaman desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ali ÇELİK'e,

Çalışmanın gerçekleŐmesi için ayrıca çok değerli önerileri ile katkılarda bulunan Sayın Prof. Dr. Kenan DOST'a ve Doç. Dr. Süleyman KOÇAK'a,

Laboratuvar çalıŐmalarım sırasında desteklerini esirgemeyen arkadaşlarım Uzm. Burak ASLIŞEN'e, Uzm. Seda SERT'e, Uzm. Fatma DOYUK'a ve Yüksek Kimyager Buse AYDOĞAN'a,

Çalışmanın gerçekleŐmesine imkân sağlayan Manisa Celal Bayar Üniversitesi Deneysel Fen Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne ve kurum müdürü Sayın Doç. Dr. Mustafa ESKİCİ'ye,

Doktora sürecim boyunca 2211-A Yurt İçi Genel Doktora Burs Programı kapsamında maddi destek sağlayan TÜBİTAK-BİDEB'e,

2015-064 proje numarası ile tezin gerçekleŐtirilmesine maddi destek sağlayan Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne,

Doktora çalıŐmalarım süresince sonsuz sabrı, ilgi ve desteği ile sürekli yanımda olan, zorlukları kolaylaŐtıran, hayatı güzelleŐtiren sevgili eŐim Biyolog Hazal KUPLAY CİTTAN'a ve varlığı ile beni sonsuz mutlu eden oğlum Ege'ye,

Bugünlere ulaŐabilmemde büyük emekleri olan tüm değerli aile büyüklerime,

Manevi desteğini sürekli yanımda hissettiğim dostum Dr. Mehmet Bahadır ACAR'a içtenlikle teşekkür ederim.

Mustafa CİTTAN
Manisa, 2017

ÖZET

Doktora Tezi

ZEYTİN, ZEYTİNYAĞI VE ZEYTİN YAPRAĞINDA BULUNAN BAZI FENOLİK BİLEŞİKLERİN TAYİNLERİ İÇİN ELEKTROKİMYASAL VE KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Mustafa CİTTAN

Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ali ÇELİK

Bu çalışmada, zeytin, zeytinyağı ve zeytin yaprağında bulunan bazı fenolik bileşiklerin tayinleri için elektrokimyasal ve kromatografik yöntemlerin geliştirilmesi amaçlanmaktadır.

Dünya genelinde doğal antioksidanlara (gıdaların biyoaktif bileşenleri gibi) karşı giderek artan bir ilgi oluşmaktadır. Zeytin (*Olea europaea* L.) meyvesi, yağı ve yaprağı ile birlikte antioksidan kaynağı olan fenolik bileşikler bakımından oldukça zengindir. Diğer taraftan, zeytin ağacı ülkemizin bulunduğu coğrafi konum ve sahip olduğu iklim özellikleri sayesinde ülkemizde bolca yetişmektedir. Bu nedenle mükemmel derecede antioksidan kaynakları olan ve ülkemiz açısından önemli ticari değere sahip sofralık zeytin, zeytinyağı ve zeytin yapraklarında söz konusu fenolik bileşiklerin nicel tayinleri için analitik yöntemlerin geliştirilmesi önem arz etmektedir.

Güçlü bir antioksidan olan oleuropein yalnızca oleaceae familyasına ait bitkilerde bulunur. Çalışmada öncelikle, oleuropein tayini için çok duvarlı karbon nanotüp ile modifiye edilmiş camımsı karbon elektrot kullanılarak gerçekleştirilen bir elektrokimyasal yöntem önerilmiştir. Yalın camımsı karbon elektrot ile karşılaştırıldığında, oleuropein yükseltgenme pik akımı, modifiye elektrot üzerinde yaklaşık 340 kez artmıştır. Önerilen teknik valide edilmiş ve valide yöntem bir zeytin yaprağı ekstraktında oleuropeinin tayini için başarıyla uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar, LC-ESI-MS/MS yöntemi ile elde edilen veriler ile uyum içerisindedir. Çalışmada daha sonra, 31 fenolik bileşiğin analizleri için LC-ESI-MS/MS kullanılarak gerçekleştirilen basit bir yöntem valide edilmiştir. Valide yöntemin analitik özellikleri, söz konusu yöntemin zeytin yaprağı örneklerinde bulunan fenolik bileşiklerin rutin analizlerinde oldukça kullanışlı olduğunu açıkça göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Olea europaea* L., fenolik bileşikler, çok duvarlı karbon nanotüp, LC-ESI-MS/MS, voltametri, yöntem validasyonu

2017, 79 sayfa

ABSTRACT

PhD Thesis

DEVELOPMENT OF ELECTROCHEMICAL AND CHROMATOGRAPHIC METHODS FOR THE DETERMINATION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN TABLE OLIVE, OLIVE OIL AND OLIVE LEAVES

Mustafa CİTTAN

Manisa Celal Bayar University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Ali ÇELİK

In this study, it is aimed to develop electrochemical and chromatographic methods for the determination of phenolic compounds in table olive, olive oil and olive leaves.

There is a rising interest in natural antioxidants as bioactive components of foods. Olive (*Olea europaea* L.) is quite abundant in terms of phenolic compounds which are antioxidant sources together with fruit, oil and leaf. On the other hand, the olive tree grows abundantly in our country thanks to the geographical location of our country and its climate characteristics. Therefore, it is important to develop analytical methods for the quantitative determination of phenolic compounds in table olive, olive oil and olive leaves, which are excellent antioxidant resources and have significant commercial value for our country.

Oleuropein, a powerful antioxidant, is found only in plants belonging to the oleaceae family. In present study, a multi-walled carbon nanotube modified glassy carbon electrode was proposed to prepare an electrochemical sensing platform for the determination of oleuropein. Compared to the bare glassy carbon electrode, the oxidation peak current of oleuropein increased about 340 times at the modified electrode. The proposed technique was validated and the validated method was successfully applied to the determination of oleuropein in an olive leaf extract. The results obtained were in agreement with those obtained by LC-ESI-MS/MS. Moreover a simple method was validated for the analysis of 31 phenolic compounds using LC-ESI-MS/MS. Analytical properties of the validated method was satisfied the routine analysis of phenolic compounds in olive leaves samples.

Keywords: *Olea europaea* L., phenolic compounds, multi-walled carbon nanotube, LC-ESI-MS/MS, voltammetry, method validation

2017, 79 pages

1. GİRİŞ

Reaktif oksijen ve azot türleri günlük hücresel aktiviteler sonucunda insan vücudunda üretilerek, hücre içi enzimler (süperoksit dismutaz, glutasyon peroksidaz ve katalaz) tarafından kontrol edilmektedir. Bakteri ve parazitlere karşı sitotoksik etkiler göstererek yarar sağlamalarının yanı sıra söz konusu türler, aşırı üretimleri ya da vücuda çeşitli dış etkenler ile alınmaları yoluyla değerli biyomoleküllerde (DNA, yağlar, proteinler) oksidatif hasar oluşturabilmektedir [1]. Bu hasar, kanser, kardiyovasküler ve diğer kronik hastalıkların riskleri ile doğrudan ilişkilidir.

Antioksidan hipotezi “antioksidanların oksidatif hasarları önlemelerinin yanı sıra, diyet ile artan alımlarının da kronik hastalıkların risklerini azaltacaktır” şeklinde tanımlanmakta [2] ve dünya genelinde doğal antioksidanlara karşı giderek artan bir ilgi oluşmaktadır [3]. Kardiyovasküler hastalıklar ve çeşitli kanserlere karşı meyve ve sebze yönünden beslenmenin gerekliliği, söz konusu türlerin önemli oranda antioksidan (özellikle fenolik bileşenler) içermelerine bağlanmaktadır [4]. Örneğin flavonoidler, son yıllarda çeşitli biyolojik sistemlerde antioksidan olarak tanımlanan çok geniş dağılımlı bir fenolik bileşik grubudur [5–9].

Akdeniz ülkelerinde bolca yetişen zeytin (*Olea europaea* L.) antioksidan özellik gösteren fenolik bileşikler bakımından oldukça zengindir [3, 10, 11]. Fenolik bileşikler zeytinin meyvesi, yağı ve yapraklarında değişen miktarlarda bulunmaktadır. Özellikle zeytin yaprakları fenolik bileşiklerin ucuz kaynaklarından. Bu nedenle, fenolik bileşiklerin nicel tayinleri için basit ve etkin ekstraksiyon teknikleri ile güvenilir analiz metotları geliştirmek önemlidir.

Tüm bu bilgiler eşliğinde, zeytin, zeytinyağı ve zeytin yaprağında bulunan bazı fenolik bileşiklerin tayinleri için elektrokimyasal ve kromatografik yöntemlerin geliştirilmesi bu tez projesinin amacını oluşturmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Serbest Radikaller, Oksidatif Hasar ve Antioksidan Kavramı

Bir veya daha fazla eşlenmemiş elektrona sahip herhangi bir kimyasal türe serbest radikal denir. Söz konusu türlerin reaktiviteleri değişken olmakla birlikte genel olarak kararlılıkları düşüktür. Bu nedenle radikaller çeşitli etkileşimler yoluyla başka bir radikal ya da molekül ile kolayca reaksiyona girebilirler.

Hidroksil ($\text{OH}\cdot$), süperoksit ($\text{O}_2\cdot^-$), azot oksit ($\text{NO}\cdot$) ve peroksil ($\text{RO}_2\cdot$) serbest radikalleri canlı organizmada en çok karşılaşılan türlerdir. Diğer taraftan, peroksinitrit ($\text{ONOO}\cdot$), hipokloröz asit (HOCl), hidrojen peroksit (H_2O_2), singlet oksijen ($^1\text{O}_2$) ve ozon (O_3) serbest radikal değildir, ancak canlı organizmada kolayca serbest radikal reaksiyonlarına yol açarlar. Bu nedenle “reaktif oksijen türleri” (ROS) terimi yalnızca $\text{OH}\cdot$, $\text{O}_2\cdot^-$, $\text{NO}\cdot$ ve $\text{RO}_2\cdot$ radikallerini içermek ile kalmaz, aynı zamanda radikal olmayan $\text{ONOO}\cdot$, HOCl , H_2O_2 , $^1\text{O}_2$ ve ozon O_3 türlerini de kapsar [1].

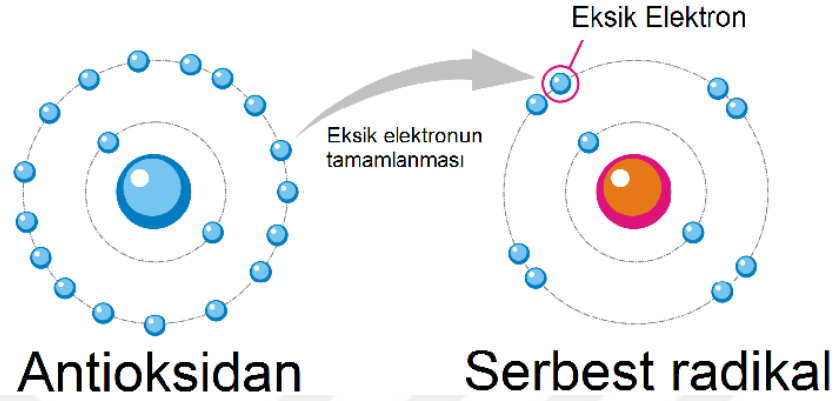
Azot oksit (NO) ve metabolitlerini içeren yoğun araştırmalar, literatüre “reaktif azot türleri” (RNS) olarak yeni bir terim daha ortaya çıkarmıştır [12–14]. ROS, RNS ile birlikte canlı organizmada hem zararlı hem de faydalı türler olarak ikili bir rol oynamaktadırlar [15]. Söz konusu türlerin bakteri ve parazitlere karşı sitotoksik etkiler göstermelerinin yanı sıra, aşırı miktarları hayati biyomoleküllerde oksidatif hasar oluşturabilmektedir. Dolayısıyla, bu iki tür genel olarak ROS/RNS şeklinde topluca anılmaktadır. ROS/RNS genellikle;

- i. UV, gamma ve X-ışınlarına maruziyet sonucu,
- ii. metal katalizli reaksiyonların yan ürünleri olarak,
- iii. iltihaplanma sonrasında nötrofiller ve makrofajlar tarafından,
- iv. mitokondri ile katalizlenmiş elektron taşıma reaksiyonlarının yan ürünleri olarak,

açığa çıkarlar [16].

“Yükseltgenmeyi önleyici” anlamına gelen antioksidanlar, değerli biyomoleküllerde oksidatif hasara yol açabilen serbest radikaller ve ROS/RNS ile tepkimeye girerek, söz konusu reaktif türlerin olası zararlarını azaltabilmektedir. Bu

durum, antioksidanlar üzerine birçok araştırmacı tarafından büyük çaplı yürütülen araştırma çalışmalarının sebebini iyi bir Şekilde açıklamaktadır [17–19]. Bir antioksidanın serbest bir radikal ile reaksiyonu Şekil 2.1.’de basitçe verilmiştir.



Şekil 2.1. Antioksidan etki mekanizması.

Antioksidanlar, serbest radikallere elektron vererek söz konusu radikalleri kararlı hale getirirken, kendileri isimleri ile anılan görece çok daha kararlı radikallere dönüşürler. Oluşan antioksidan radikalleri oldukça kararlı oldukundan vücut mekanizmaları içerisinde zamanla giderilirler.

2.2. Zeytin Bitkisi ve İçerdiği Fenolik Bileşikler

Sofralık zeytin, zeytin bitkisinin meyvelerinden hazırlanan ürünlerdir. Zeytinin kültüre alınmasının 5500 yıl önce ‘‘Oleaster’’ olarak bilinen yabani Akdeniz zeytininin, Güney Avrupa ve Kuzey Afrika boyunca yayılmaya başlayan insan güçlerini takip ederek başladığı düşünülmektedir [20]. Zeytinyağı ise söz konusu meyvenin sıkılması ile elde edilen bir yağ çeşididir. Dünyada zeytin ve zeytinyağı üretimi büyük oranda Akdeniz’e kıyısı olan ülkelerde yoğunlaşmıştır. Zeytin ve zeytinyağının çeşitli ülkelerce üretimine, ithalatına, ihracatına ve tüketime ilişkin son altı yıla ait veriler Tablo 2.1. ve Tablo 2.2.’de sırasıyla verilmiştir.

Tablo 2.1. Dünya sofralık zeytin üretimi, ithalatı, ihracatı ve tüketimi [21]

Ülke	Üretim ort. ^a (%)	İthalat ort. ^a (%)	İhracat ort. ^a (%)	Tüketim ort. ^a (%)
Arnavutluk	30.8 (1.2)	3.1 (0.5)	2.3 (0.3)	31.5 (1.3)
Cezayir	197.9 (7.7)	7.3 (1.2)	0.0 (0.0)	202.3 (8.0)
Arjantin	101.7 (4.0)	0.3 (0.1)	66.0 (10.2)	31.8 (1.3)
Hırvatistan	1.2 (0.0)	1.7 (0.3)	0.5 (0.1)	2.5 (0.1)
Mısır	418.0 (16.3)	0.3 (0.1)	83.4 (12.9)	333.0 (13.2)
İran	55.7 (2.2)	1.3 (0.2)	0.0 (0.0)	56.0 (2.2)
Irak	8.0 (0.3)	15.0 (2.4)	0.0 (0.0)	23.0 (0.9)
İsrail	16.8 (0.7)	5.7 (0.9)	0.3 (0.1)	22.0 (0.9)
Ürdün	33.7 (1.3)	0.7 (0.1)	4.5 (0.7)	27.3 (1.1)
Lübnan	20.9 (0.8)	2.3 (0.4)	1.6 (0.2)	22.1 (0.9)
Libya	3.0 (0.1)	8.9 (1.4)	0.0 (0.0)-	11.9 (0.5)
Fas	108.3 (4.2)	0.1 (0.0)	77.9 (12.0)	32.0 (1.3)
Karadağ	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)
Tunus	23.8 (0.9)	0.0 (0.0)	1.6 (0.2)	22.2 (0.9)
Türkiye	392.8 (15.3)	0.0 (0.0)	68.2 (10.5)	335.4 (13.3)
Avrupa Birliği	812.0 (31.6)	99.1 (15.7)	286.8 (44.3)	587.2 (23.3)
Toplam A	2224.0 (86.7)	146.5 (23.2)	592.8 (91.7)	1740.3 (69.2)
Suudi Arabistan	4.5 (0.2)	33.2 (5.3)	0.0 (0.0)	37.7 (1.5)
Avustralya	3.6 (0.1)	17.2 (2.7)	0.0 (0.0)	21.0 (0.8)
Brezilya	0.0 (0.0)	102.8 (16.3)	0.0 (0.0)	102.8 (4.1)
Kanada	0.0 (0.0)	28.7 (4.5)	0.0 (0.0)	28.7 (1.1)
Şili	25.6 (1.0)	10.2 (1.6)	3.4 (0.5)	32.3 (1.3)
USA	71.3 (2.8)	142.4 (22.6)	5.2 (0.8)	209.3 (8.3)
Japonya	0.0 (0.0)	4.1 (0.6)	0.0 (0.0)	4.1 (0.2)
Meksika	9.9 (0.4)	9.3 (1.5)	0.5 (0.1)	18.7 (0.7)
Filistin	10.8 (0.4)	0.0 (0.0)	0.4 (0.1)	9.9 (0.4)
Peru	68.9 (2.7)	0.1 (0.0)	27.5 (4.3)	42.5 (1.7)
Rusya	0.0 (0.0)	55.3 (8.8)	0.0 (0.0)	55.3 (2.2)
Suriye	133.0 (5.2)	0.0 (0.0)	17.0 (2.6)	117.0 (4.7)
İsviçre	0.0 (0.0)	6.3 (1.0)	0.0 (0.0)	6.3 (0.2)
Diğer (Üretici)	15.0 (0.6)	10.0 (1.6)	0.0 (0.0)	25.0 (1.0)
Diğer (Üretici olmayan)	0.0 (0.0)	65.3 (10.3)	0.0 (0.0)	65.3 (2.8)
Toplam B	342.6 (13.3)	484.6 (76.8)	54.0 (8.3)	775.6 (30.8)
Toplam Dünya	2566.6 (100.0)	631.1 (100.0)	646.8 (100.0)	2515.9 (100.0)

^ason 6 yıl ortalama veri (1000 ton)

Tablo 2.2. Dünya zeytinyağı üretimi, ithalatı, ihracatı ve tüketimi [21]

Ülke	Üretim ort. ^a (%)	İthalat ort. ^a (%)	İhracat ort. ^a (%)	Tüketim ort. ^a (%)
Arnavutluk	9.8 (0.3)	1.2 (0.1)	0.0 (0.0)	11.0 (0.4)
Cezayir	61.6 (2.1)	0.1 (0.0)	0.0 (0.0)	59.5 (2.0)
Arjantin	24.7 (0.8)	0.0 (0.0)	18.6 (2.3)	6.3 (0.2)
Hırvatistan	4.3 (0.1)	2.3 (0.3)	0.0 (0.0)	6.3 (0.2)
Mısır	15.3 (0.5)	2.8 (0.3)	3.0 (0.4)	14.5 (0.5)
İran	4.8 (0.2)	4.9 (0.6)	0.0 (0.0)	9.7 (0.3)
Irak	0.0 (0.0)	4.5 (0.6)	0.0 (0.0)	4.5 (0.1)
İsrail	15.3 (0.5)	4.2 (0.5)	0.3 (0.0)	18.6 (0.6)
Ürdün	23.3 (0.8)	3.0 (0.4)	2.7 (0.3)	21.2 (0.7)
Lübnan	20.1 (0.7)	2.9 (0.4)	5.2 (0.6)	19.3 (0.6)
Libya	16.1 (0.5)	0.0 (0.0)	0.3 (0.0)	15.6 (0.5)
Fas	121.7 (4.1)	7.3 (0.9)	17.1 (2.1)	118.5 (3.9)
Karadağ	0.5 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.5 (0.0)
Tunus	178.7 (6.1)	0.0 (0.0)	144.9 (17.8)	34.5 (1.1)
Türkiye	164.0 (5.6)	0.0 (0.0)	34.8 (4.3)	130.8 (4.3)
Avrupa Birliği	2050.8 (69.6)	121.3 (15.0)	541.0 (66.4)	1705.3 (56.6)
Toplam A	2708.9 (92.0)	153.2 (19.0)	711.6 (96.6)	2173.6 (72.2)
Suudi Arabistan	3.0 (0.1)	18.4 (2.3)	0.5 (0.1)	20.7 (0.7)
Avustralya	16.0 (0.5)	27.7 (3.4)	4.8 (0.6)	39.0 (1.3)
Brezilya	0.0 (0.0)	65.3 (8.1)	0.0 (0.0)	65.3 (2.2)
Kanada	0.0 (0.0)	39.3 (4.9)	0.0 (0.0)	39.3 (1.3)
Şili	17.1 (0.6)	0.7 (0.1)	10.3 (1.3)	7.7 (0.3)
Çin	3.8 (0.1)	34.3 (4.2)	0.0 (0.0)	35.5 (1.2)
USA	5.7 (0.2)	295.7 (36.6)	5.5 (0.7)	294.8 (9.8)
Japonya	0.0 (0.0)	49.3 (6.1)	0.0 (0.0)	49.3 (1.6)
Meksika	0.0 (0.0)	13.8 (1.7)	0.5 (0.1)	13.3 (0.4)
Norveç	0.0 (0.0)	3.6 (0.4)	0.0 (0.0)	3.6 (0.1)
Filistin	19.8 (0.7)	0.0 (0.0)	4.3 (0.5)	15.3 (0.5)
Rusya	0.0 (0.0)	23.4 (2.9)	0.0 (0.0)	23.4 (0.8)
Suriye	158.0 (5.4)	0.0 (0.0)	15.5 (1.9)	138.0 (4.6)
İsviçre	0.0 (0.0)	13.8 (1.7)	0.0 (0.0)	13.6 (0.5)
Tayvan	0.0 (0.0)	6.8 (0.8)	0.0 (0.0)	6.8 (0.2)
Diğer (Üretici)	14.8 (0.5)	2.5 (0.3)	5.0 (0.6)	12.3 (0.4)
Diğer (Üretici olmayan)	0.0 (0.0)	60.8 (7.5)	0.0 (0.0)	60.8 (2.0)
Toplam B	235.6 (8.0)	655.0 (81.0)	46.3 (5.7)	838.5 (27.8)
Toplam Dünya	2944.5 (100.0)	808.2 (100.0)	814.2 (100.0)	3012.1 (100.0)

^ason 6 yıl ortalama veri (1000 ton)

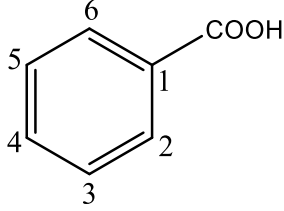
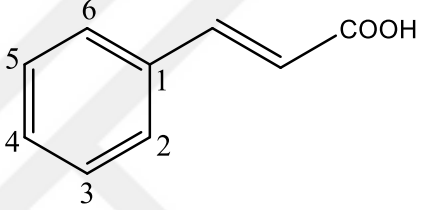
Ülkemiz coğrafi konumu ve iklim özellikleri nedeniyle dünyanın öncü zeytin ve zeytinyağı üreticilerindedir. Tablo 2.1. ve Tablo 2.2. ülkemizin dünya sofralık zeytin ve zeytinyağı üretiminde ve ihracatında önemli paylara sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Diğer taraftan, söz konusu değerler sofralık zeytin ve zeytinyağının Türkiye için ekonomik değerini açık bir şekilde göstermektedir.

Bitkilerin ikincil metabolitleri olan fenolik bileşikler, bitkinin hastalık direncini arttırmada ve zararlılara karşı mücadelesinde önemli roller oynamaktadırlar [22, 23]. Bununla birlikte daha çok ilgi uyandıran tarafı ise, zeytinyağı içeriğindeki birçok fenolik bileşiğin, diyet ile alımı ve kardiyovasküler hastalık veya kanser riski arasında bir ilişki kurmak amacıyla incelenmesi olmuştur. Bu amaçla devam eden ve tamamlanan çalışmalar, zeytinyağının insan sağlığı üzerine yararlı etkilerinin söz konusu fenolik bileşikler ile ilişkilendirilebileceğini göstermektedir [24]. Önemli antioksidan özellik gösteren birçok fenolik bileşik sofralık zeytin, zeytinyağı ve zeytin yaprağının hepsinde birden ortak olarak bulunmaktadır. Söz konusu türlerde bulunan fenolik bileşiklerin en önemli sınıflandırması sekoiridoidler, fenil etil alkoller, flavonoidler ve fenolik asitler şeklinde yapılmaktadır (Tablo 2.3.).

Tablo 2.3. Zeytin, zeytinyağı ve zeytin yaprağında bulunan fenolik bileşikler [25]

Bileşik	Substituent	Yapı
Sekoiridoidler		
Oleuropein	R ₁ -OH	
Ligstroside	R ₁ -H	
Sekoiridoid aglikonlar		
Oleuropein aglikon	R ₁ -OH	
Ligstroside aglikon	R ₁ -H	
Fenil etil alkoller		
Tirozol	4-OH	
Hidroksitirozol	3,4-OH	
Flavonoidler		
Apigenin	R ₁ -OH, R ₂ -H	
Luteolin	R ₁ -OH, R ₂ -OH	
Apigenin	R ₁ -OGlik, R ₂ -H	
7-glikozit	R ₁ -OGlik, R ₂ -OH	
Luteolin	R ₁ -OGlik, R ₂ -OH	
7-glikozit		

Tablo 2.3. (devamı)

Bileşik	Substituent	Yapı
Benzoik ve türev asitler		
3-Hidroksibenzoik asit	3-OH	
4- Hidroksibenzoik asit	4-OH	
3,4- Hidroksibenzoik asit	3,4-OH	
Vanilik asit	3-OCH ₃ , 4-OH	
Gallik asit	3,4,5-OH	
Siringik asit	3,5-OCH ₃ , 4-OH	
Sinnamik asitler ve türevleri		
o-Kumarik asit	2-OH	
p-Kumarik asit	4-OH	
Kafeik asit	3,4-OH	
Ferulik asit	3-OCH ₃ , 4-OH	
Sinapik asit	3,5-OCH ₃ , 4-OH	

Oleaceae familyasında bolca bulunan oleuropein, sekoiridoid grubuna ait bir türdür. Sekoiridoidler genellikle glikozitlere bağlı, terpenlerin ikincil metabolizması tarafından üretilen bileşiklerdir. Yalnızca *Olea europaea* L. türünü de içeren *Oleaceae* familyasına ait bitkilerde bulunan sekoiridoidler, kimyasal yapı içerisinde glikozit veya aglikonik formlarında elenolik asit varlığı ile karakterize edilirler. Genel olarak, bir fenil etil alkol (hidroksitirozol ve tirozol), elenolik asit ve glikozidik bir parça ile oluşurlar. Sekoiridoidlerin aglikonik formları, zeytinlerin ezilmesi sırasında kendiliğinden oluşan glikozidazlar yoluyla glikozitlerin hidrolizi sonucu zeytinyağında oluşmaktadır. Oluşan bu yeni tür yağlı ve sulu kısmın her ikisinde görülmekle beraber, içerdiği polar fonksiyonel gruplar nedeniyle genellikle su fraksiyonunda daha konsantre olarak bulunmaktadır [25].

Diğer taraftan zeytinyağının depolanması sırasında hidroksitirozol (3-hidroksitirozol) ve tirozol [2-(4-hidroksifenil)etanol] gibi daha basit fenolik türlerin oluşması ile sonuçlanan hidrolitik mekanizmalar da gerçekleşebilmektedir [26].

İkincil aromatik bitki metabolitleri ile kendiliğinden oluşan fenolik asitler, bitki aleminin büyük bir kesiminde görülmektedir [27, 28]. Fenolik asitler gıdaların antioksidan özellikleri ile ilişkilidir [29] ve fenolik asitlere olan ilgi oksidatif hasar (koroner hastalıkları, inme ve kanser) ile ilişkilendirilebilecek söz konusu asitlerin meyve ve sebzelerdeki hastalıklara karşı koruyucu rolünden kaynaklanmaktadır [30, 31].

Flavonoidler yaygın ikincil bitki metabolitleridir. Son yıllarda flavonoidlerin kanser ve koroner hastalıklarının da içerisinde bulunduğu sağlık üzerine etkilerini vurgulayan yayınların sayısı giderek artmaktadır [32–34].

2.3. Ekstraksiyon

Nitel ve nicel analizlerin her biri aynı zamanda etkin bir örnek hazırlama sürecini de kapsamaktadırlar. Bu nedenle son yıllarda süreci kısaltan, otomasyona uygun, organik çözücü tüketimini azaltan ve örnek hazırlama maliyetini düşüren yeni ekstraksiyon tekniklerine giderek artan bir talep oluşmaktadır [35, 36]. Bu yöntemlerden mikrodalga destekli ekstraksiyon [37] ve ultrasonik destekli ekstraksiyon [38] zeytin yaprağı ve zeytin örneklerindeki fenolik bileşiklerin ekstraksiyonları için kullanılmıştır.

Mikrodalga destekli ekstraksiyon (MAE), örnek matriksindeki analitlerin ekstraksiyon çözücüsüne alınması amacıyla numune ile temas halindeki çözücülerini ısıtmak için mikrodalga enerjisinin kullanılması sürecidir [39]. Uygulanan mikrodalgaların ekstraksiyon süresini oldukça kısaltması ve kullanılan sistemlerinin çoklu numune ekstraksiyonuna olanak sağlaması, yöntemin en önemli avantajlarından biridir.

Ultrasonik destekli ekstraksiyon (UAE) yöntemi çözücüye gönderilen ses dalgalarının, çözücü içerisindeki molekülleri titreştirmesi esasına dayanmaktadır. Söz konusu titreşim çözücü içerisindeki diğer moleküllere aktararak devam eder. Bu enerjinin aktarımı sırasında moleküller birbirine yakınlaşıp, uzaklaşan moleküller arasında kabarcıklar oluşmaktadır. Kabarcıkların birbirine yaklaşan moleküller arasında ani patlaması çok kısa bir süre için yaklaşık 5500 °C sıcaklık ve 50 MPa

düzeyinde basınç oluşturmaktadır [40]. Oluşan bu mekanizma ultrasonik desteğin çeşitli ekstraksiyon işlemlerinde uygulanabilirliğini etkin kılmaktadır.

Diğer taraftan, kurutulmuş bitkilerden kimyasal bileşiklerin ve lezzet bileşenlerinin ekstraksiyonu için infüzyon (IE) yöntemi de kullanılabilir. Bu ekstraksiyon yöntemi geleneksel olarak demleme adıyla da bilinmektedir.

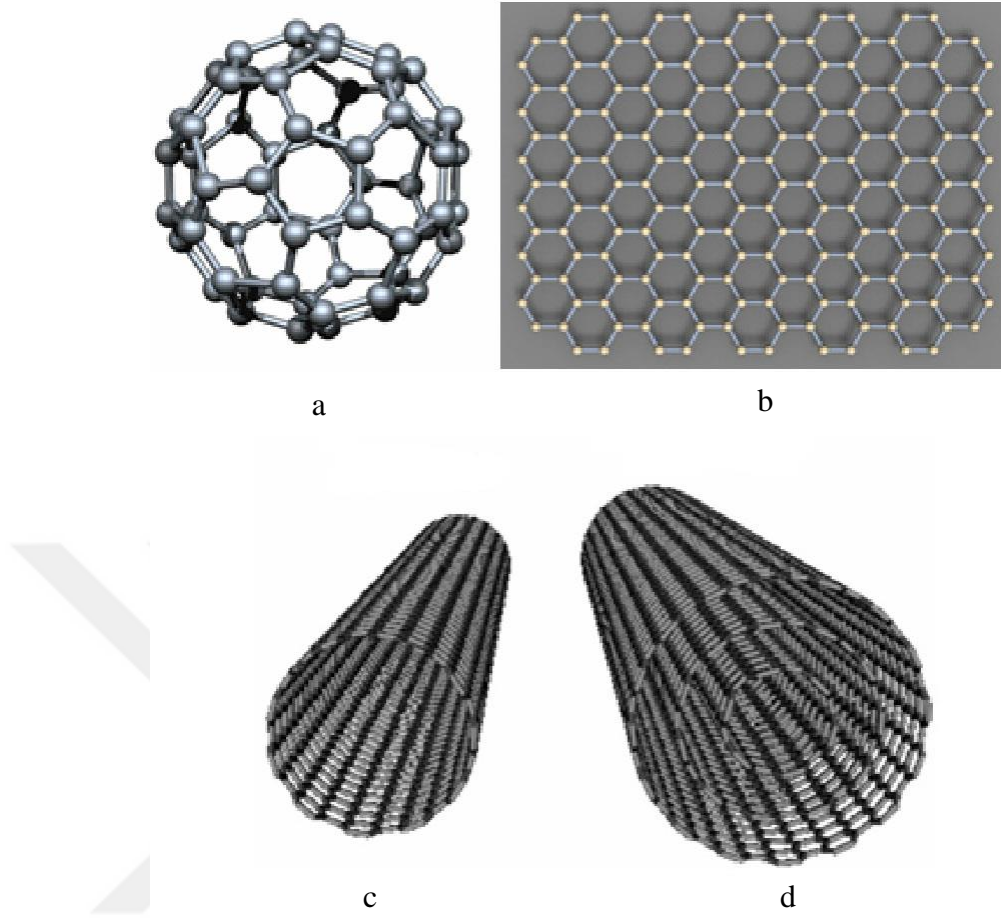
2.4. Karbon Nanotüpler, İletken Polimerler ve Metal Nanoparçacıklar

Karbon nanotüpler (CNT) silindirik nano yapıdaki karbon allotroplarıdır, fulleren (Şekil 2.2a.) tipi yapılardır. Grafen (Şekil 2.2b.) yüzeyinin silindir şeklinde kıvrılmış hali olarak düşünülebilirler. Geniş yüzey alanı, düşük elektrik direnci, son derece yüksek mekanik dayanımı, olağanüstü yük taşıma özellikleri ve yüksek kimyasal kararlılığı gibi fiziksel ve katalitik özellikler karbon nanotüpleri elektrokimyasal sensör uygulamaları için ideal elektrot malzemeleri haline getirmektedir [41].

Karbon nanotüpler genel olarak tek duvarlı karbon nanotüpler (SWCNT) ve çok duvarlı karbon nanotüpler (MWCNT) olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Tek bir grafen yüzeyinin silindir şeklinde kıvrılması ile SWCNT elde edilirken, tabakalar halindeki grafen yüzeylerinin silindir şeklinde kıvrılmaları MWCNT meydana getirmektedir (Şekil 2.2c. ve 2.2d.).

İletken polimerler metaller ve inorganik yarı iletkenlere benzer elektriksel ve optik özelliklerinin yanı sıra; sentez kolaylığı ve metallere kıyasla iyi işlenebilirlik gibi cazip özelliklere sahiptirler [42]. Polimer modifiye edilmiş karbon yüzeyli elektrotlar; duyarlık, seçicilik, kararlılık ve tekrarlanabilirlik gibi parametrelerde iyileştirmeler sağlama amacı ile analitik çalışmalara uyarlanabilmektedir [43].

Diğer taraftan, olağanüstü katalitik aktiviteleri nedeniyle son yıllarda soy metal nanoparçacıklar, yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonları için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [44].

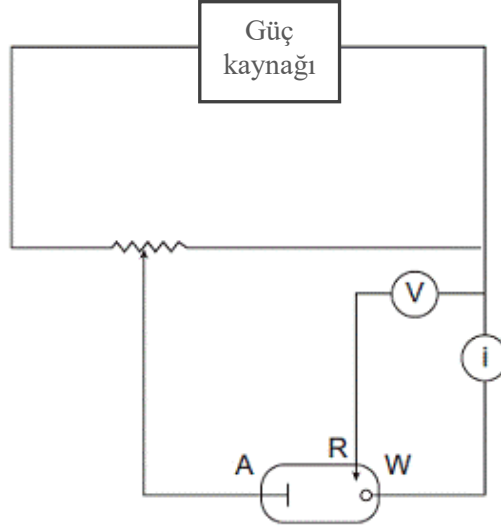


Şekil 2.2. (a) Fulleren, (b) grafen, (c) SWCNT ve (d) MWCNT yapıları.

2.5. Voltammetri

Voltammetri; elektrokimyasal süreçler sırasında potansiyel ve akım arasındaki ilişkinin gözlemlendiği teknikler topluluğudur [45]. Uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak çizilen akım voltammogram olarak adlandırılır ve yükseltgenme veya indirgenme reaksiyonunda yer alan türler hakkında nitel ve nicel bilgiler sağlar [46].

İlk voltammetrik teknikler yalnızca iki elektrodun kullanımına dayanmasına rağmen, modern voltammetri Şekil 2.3.'de şematik olarak gösterilen üçlü elektrot potansiyostatından yararlanmaktadır [47].



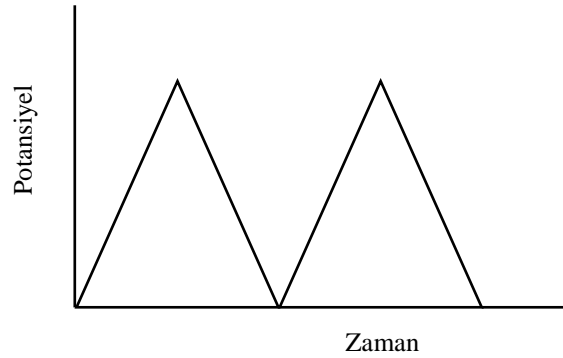
Şekil 2.3. Potansiyostat cihazının şematik gösterimi. A, yardımcı elektrot; R, referans elektrot; W, çalışma elektrodu; V, voltmetre ve i, galvanometre.

2.5.1. Adsorptif Sıyırma Voltammetrisi

Voltammetrik sıyırma teknikleri biriktirme ve sıyırma süreçleri olmak üzere genel olarak iki basamaktan oluşmaktadır. Adsorptif sıyırma voltammetrisinde (AdSV) biriktirme basamağı elektroliz olmadan gerçekleştirilmektedir. Bunun yerine analit, söz konusu çalışma elektrodu üzerinde adsorplanarak birikmektedir. Biriktirme basamağının tamamlanmasının ardından potansiyel anodik veya katodik yönde taranır.

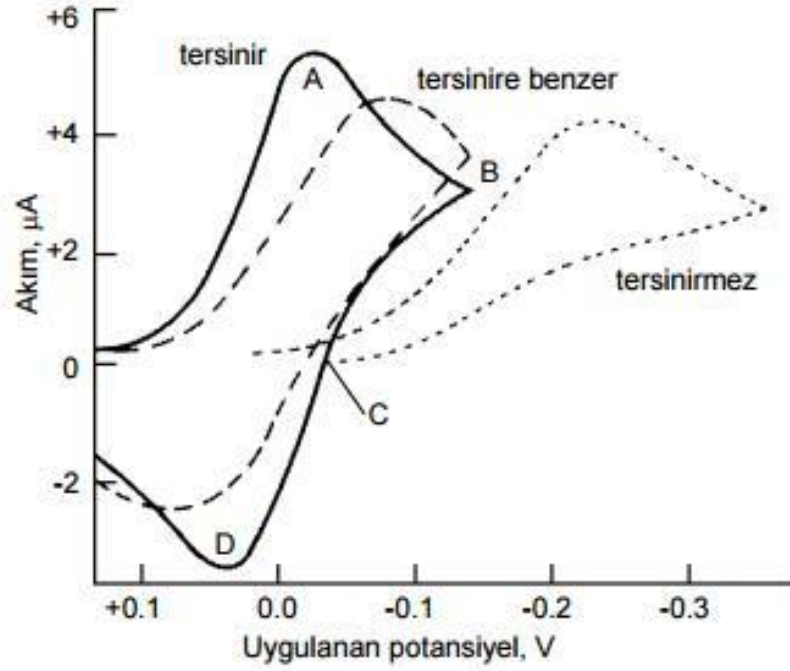
2.5.2. Döngüsel Voltammetri

Döngüsel voltammetri (CV) yönteminde çalışma elektroduna zamana karşı uygulanan potansiyel Şekil 2.4.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Döngüsel voltammetride potansiyel-zaman eğrisi.

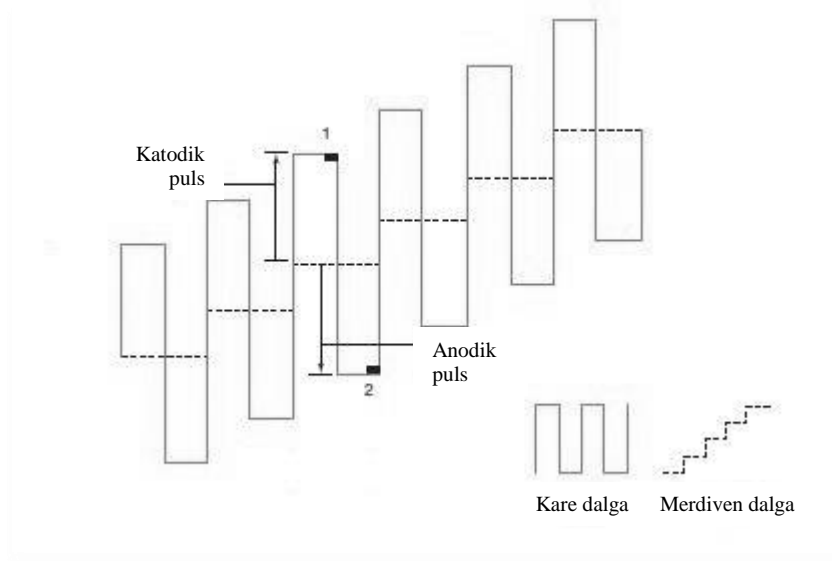
Yöntemde çalışma elektrodunun potansiyeli, zamana karşı doğrusal olarak değiştirilir ve istenilen potansiyel değerine ulaşıldıktan sonra elektrot potansiyeli, başlangıç potansiyeline geri döndürülmek üzere ters yönde yeniden taranır. Sonuçta; Şekil 2.5.'de verilen döngüsel voltammogramlar elde edilir. Teknik, türlerin yükseltgenme-indirgenme özelliklerini açıklamak ve elektrot tepkimelerinin dönüşümlü olup olmadığını belirlemek için sıklıkla kullanılmaktadır.



Şekil 2.5. Döngüsel voltammogramlar.

2.5.3. Kare Dalga Voltammetrisi

Voltammetrik teknikler arasında en etkin voltaj profiline sahip kare dalga voltammetrisi (SWV), Şekil 2.6.'da gösterilen bir merdiven üzerine bindirilmiş kare dalgalardan oluşan puls uygulama tekniğini kullanmaktadır [48]. Akım, 1 ve 2 rakamları ile numaralandırılan bölgelerde ölçülmektedir. Analit; katodik puls sırasında elektrot yüzeyinde indirgenirken, anodik puls sırasında indirgenen analit yeniden yükseltgenmektedir. Uygulanan puls tekniği yardımı ile sağladığı yüksek duyarlık, söz konusu yöntemin analitik çalışmalarda sıklıkla kullanılması ile sonuçlanmıştır.



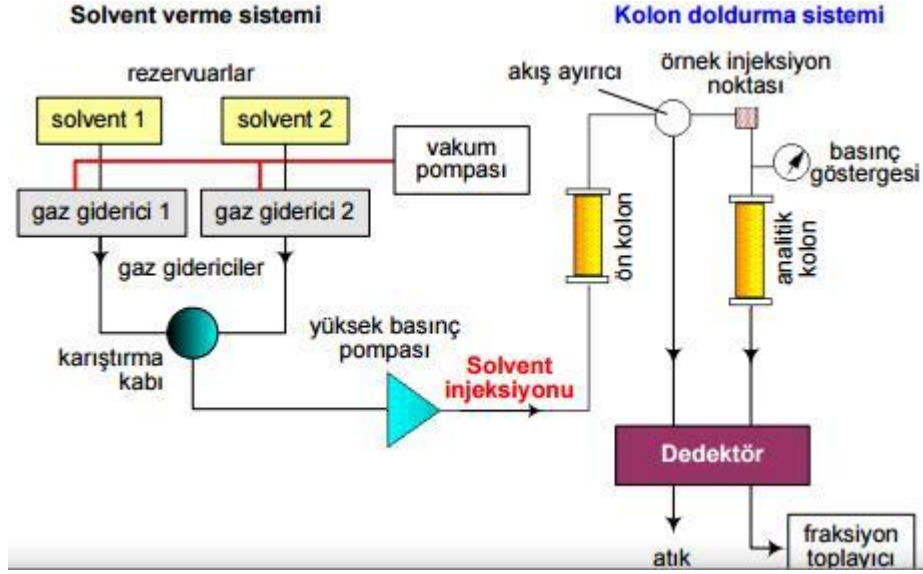
Şekil 2.6. Kare dalga voltammetri için uyarma sinyalleri [49].

2.6. Eşleşmiş Sıvı Kromatografik Teknikler

2.6.1. Sıvı Kromatografisi

Kromatografi tekniği ilk defa, Rus botanikçi M.S. Tswett tarafından, renkli bitki pigmentlerinin ayrılması için geliştirilmiştir. Kromatografi adı, Tswett'in çalışmalarında gözlemlediği bireysel renkli bantları belirtmek için, iki Yunanca kelimenin, chroma, "renk" ve graphein, "yazma", bir araya getirilmesi ile oluşturulmuştur. Günümüzde son derece etkin bir ayırma yöntemi olarak kabul edilmektedir. Kromatografik yöntemlerde hareketli (mobil) ve sabit (durgun) olmak üzere iki faz bulunmaktadır. Kromatografi genel olarak; maddelerin, hareketli bir faz yardımıyla sürüklenirken, sabit faz üzerindeki farklı davranışları ile ayrılmasına dayanan tekniktir.

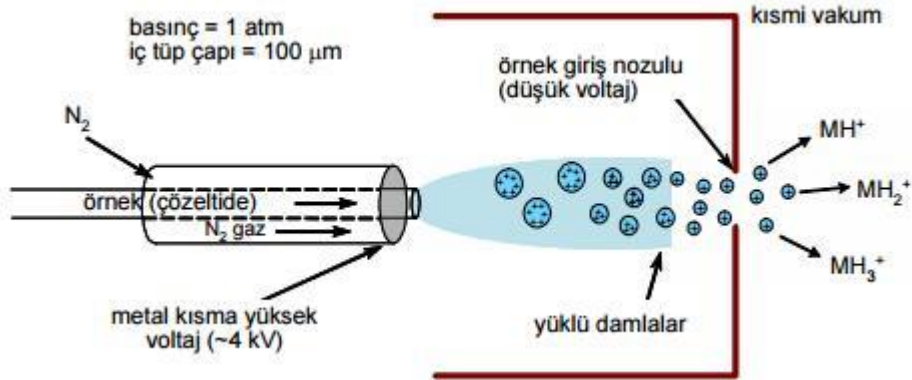
Kromatografik teknikler sahip oldukları birçok farklı niteliğe göre sınıflandırılabilir. En çok tercih edilen yöntemlerden biri ise hareketli fazın fiziksel özelliğine göre yapılan sınıflandırmadır. Sıvı kromatografisi, hareketli fazı sıvı olan tüm kromatografik yöntemlerin genel adıdır. Basit bir cihaz Şekil 2.7.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.7. Bir sıvı kromatografi cihazının şematik gösterimi.

2.6.2. Kütle Spektrometresi

Kütle spektrometresi (MS), analit moleküllerinin pozitif ya da negatif yüklü iyonlarına dönüştürülmesi yoluyla, analit hakkında nitel (yapı) ve nicel (molekül ağırlığı ve konsantrasyonu) bilgiler vermektedir. Bu amaçla analit moleküller ilk olarak iyonizasyon kaynağı adı verilen bir sistem yardımı ile pozitif ya da negatif taneciklerine dönüştürülürler. İyonlar daha sonra kütle analizöründen geçerler ve kütle/yük (m/z) oranına göre dedektörün farklı bölümlerine ulaşırlar. İyonların dedektör ile teması sonrası, kullanılabilir sinyaller bir bilgisayar sistemi tarafından üretilir ve kaydedilir [50].



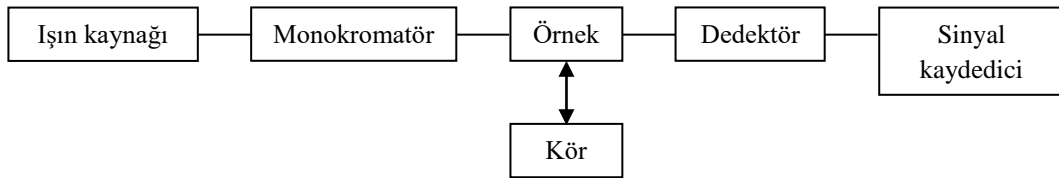
Şekil 2.8. Elektrosprey iyonizasyon şematik gösterimi.

Elektrosprey iyonizasyon (ESI), termal olarak kararsız büyük moleküllerin gaz fazı iyonlarının (parçalanmadan) üretilmesi için yaygın olarak kullanılan yumuşak bir iyonizasyon tekniğidir [51]. Paslanmaz çelikten yapılan nebülazör püskürtme ucuna uygulanan potansiyel (3-5 kV), hareketli faz ile birlikte sürüklenen molekülleri pozitif ya da negatif olarak yükler. Hareketli faz, çözücünün buharlaşarak iyonların gaz haline getirildiği ısıtılmış ara yüzeye püskürtülür [52]. Sonuç olarak iyonlar kütle analizörüne girerek, MS sisteminde analiz edilirler.

2.7. UV/Vis Spektrofotometresi

UV/Vis absorpsiyon spektroskopisi, bir hücre içerisindeki çözeltinin yaklaşık 160-800 nm dalga boyları arasındaki ışığı absorplama miktarını ölçmeye dayanan tekniktir. Cihazdan çıkan ışın şiddeti ile ışığın çözeltiden geçtikten sonra ölçülen ışın şiddeti arasındaki ilişkiden nicel analizler gerçekleştirilmektedir. Türlerin maksimum absorpsiyon yaptıkları dalga boyları değerlendirilerek de nispeten nitel analizler yapılabilmektedir.

UV/Vis spektrofotometreleri, bir ışın kaynağı (genel olarak tungsten ve döteryum lamba), dalga boyu seçicisi olarak bir monokromatör, uygun bir dedektör ve bir sinyal kaydedicisinden oluşan basit ve ucuz cihazlardır (Şekil 2.9.).



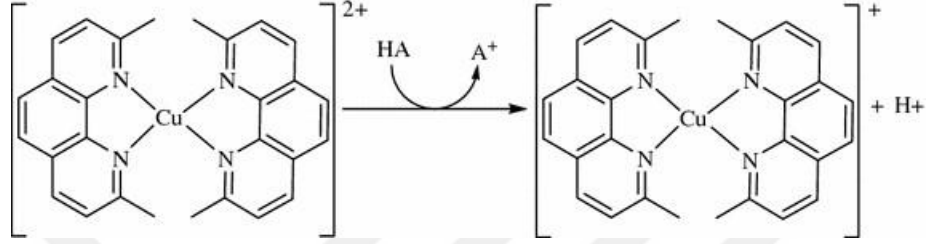
Şekil 2.9. Bir UV/Vis spektrofotometresinin şematik gösterimi[47].

2.8. Toplam Fenolik İçerik ve Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri

Günümüzde toplam fenolik içeriği ve antioksidan kapasitesini ölçmek için birçok yöntem kullanılmaktadır. Toplam antioksidan kapasite tayin yöntemleri, antioksidanlar ile reaktif türler arasındaki reaksiyonun termodinamiğini ölçmeye yarayan tekniklerdir [53].

2.8.1. Cu(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasitesi Yöntemi

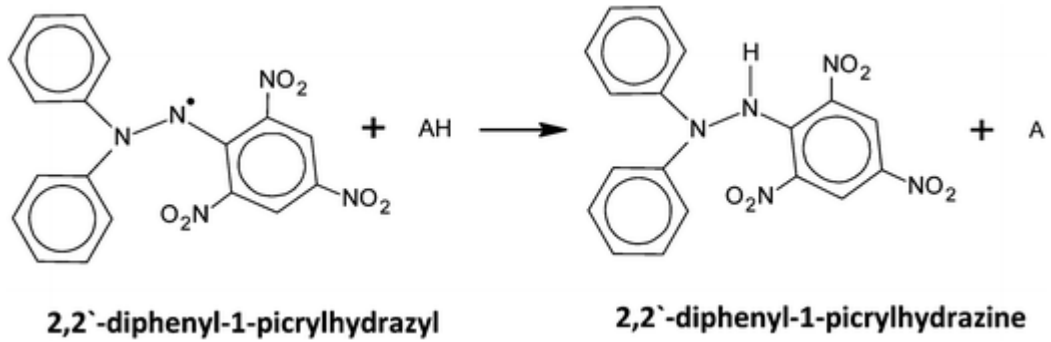
Cu(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasitesi yönteminde (CUPRAC), 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (Neokuproin-Nc)'in Cu(II) ile oluşturduğu bakır(II)-neokuproin kompleksinin (Cu(II)-Nc), 450 nm'de maksimum absorbans veren bakır(I)-neokuproin [Cu(I)-Nc] kelatine indirgenme yeteneğinden yararlanılarak toplam antioksidan kapasitesi hesaplanmaktadır [54].



Şekil 2.10. Cu(II)'nin antioksidan bir tür ile Cu(I)'e indirgenme reaksiyonu.

2.8.2. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Radikal Giderme Yöntemi

Yöntem, 517 nm dalga boyunda maksimum absorbansa sahip [55] DPPH serbest radikale antioksidan tür tarafından gerçekleştirilen proton transferi sonucu, söz konusu dalga boyundaki azalan absorbansın ölçülmesi esasına dayanmaktadır [56, 57].



Şekil 2.11. DPPH ile antioksidan arasındaki tepkimenin mekanizması.

2.8.3. Folin-Ciocalteu Ayırıcı (FCR) ile Toplam Fenolik Madde Yöntemi

Yöntem, Folin-Ciocalteu reaktifinin (FCR) bazik ortamda fenolik türler ile indirgenip, fenolik bileşiklerin yükseltgenmesine dayanan bir redoks tepkimesidir. Fenolik bileşiklerden molibden'e elektron aktarımına [Mo (VI) + e⁻ → Mo (V)]

dayanan yöntemde reaksiyon sonrası oluşan mavi renkli çözeltinin absorbanası yaklaşık 760 nm dalga boyunda okunur [58, 59].

2.9. Fenolik Bileşiklerin Tayinlerinde Analitik Yaklaşımlar

Zeytinyağı içerisindeki toplam fenolik bileşikler ilk olarak, fenoliklerin fonksiyonel hidroksi gruplarının FCR ile reaksiyona sokulmasına dayanan kolorimetrik yöntemler ile analizlenmiştir [58, 60]. Yöntem çok spesifik olmamasına rağmen (renk veren reaksiyon, okside olabilen herhangi bir fenolik hidroksi grubundan kaynaklanabilir), hızlı ve basit olmasından dolayı toplam fenolik bileşik içeriğinin tayininde oldukça popülerdir.

Son yıllarda, proton nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR) başarılı bir şekilde zeytinyağı analizinde kullanılmıştır [61, 62].

Montedoro ve ark. [63] NMR, UV ve kızılötesi (IR) yöntemlerini kullanarak fenolik bileşiklerin karakterizasyonunu gerçekleştirmelerinin yanında, dört yeni yapıyı belirleyerek bu alana öncü olmuşlardır. Yeni tanımlanmış bileşiklerin hidroksitirozol ve tirozol'e bağlı elenolik asitin dialdehitik formları olarak oleuropein aglikonun izomerleri olduğunu belirlemişlerdir.

Ballus ve ark. [64] zeytinyağındaki 17 fenolik bileşiğin ayrımını kapiler zon elektroforez yöntemi ile sağlayarak tayinlerini gerçekleştirmişlerdir. Önerilen yöntem valide edilip, Brezilya marketlerinde satılan 15 zeytinyağı örneğine uygulanmıştır.

Zeytinyağı içerisinde bulunan sekoiridoidlerden olan oleocanthal ve oleaceinin nicel tayini için kapiler elektroforez (CE) yöntemi ilk defa Vulcano ve ark. [65] tarafından geliştirilmiştir. Önerilen yöntem ile birlikte aynı zamanda tirozol ve hidroksitirozolün tayinleri gerçekleştirilmiştir. Nicel sonuçlar zeytinyağındaki oleocanthal and oleacein miktarlarının, literatürdeki yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) sonuçları ile uyumlu olduğunu göstermektedir.

Bonoli ve ark. [66], zeytinyağında en yüksek oranda bulunan 21 adet fenolik bileşiğin ayrımı için önerdikleri CE yöntemi için, tampon konsantrasyonu, tampon

pH'si, uygulanan voltaj ve sıcaklık gibi 4 farklı değişkeni optimize etmişlerdir. Ayrımı sağlanan fenoliklerin tayini dizi diyot dedektör (DAD) ile gerçekleştirilmiştir. Optimize edilen yöntem, antioksidan karakterlerinin tayini için çeşitli İtalyan zeytinyağı örneklerine uygulanmıştır.

Zeytin yapraklarının ana fenolik bileşiği olan oleuropein için basit, kesin ve seçimli bir HPLC-UV metodu Al-Rimawi [67] tarafından valide edilmiştir. Ayırmalar bir C₁₈ (5 µm, 150 x 4.6 mm) kolonu ile asetonyitril/fosfat tamponunun pH=3 (20:80, v/v) hareketli faz olarak kullanılmasıyla sağlanmış, nicel tayinler ise 280 nm dalga boyunda oleuropeinin absorbansı ölçülerek gerçekleştirilmiştir. Yöntemin düşük olan gözlenebilme ve tayin sınırları, düşük konsantrasyonlardaki oleuropeinin tayinine olanak sağlamaktadır.

Oleuropein ve metabolitleri olan hidroksitirozol ve tirozolün insan plazmasında eş zamanlı tayinine ilişkin bir HPLC-DAD yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir [68]. Önerilen yöntem yüksek geri kazanım etkisine (%85-100) sahip bir katı faza özütleme (C₁₈ kolon kullanılarak) yöntemi içermektedir. Gözlenebilme sınırları oleuropein ve tirozol için 50 ng mL⁻¹ ve hidroksitirozol için 75 ng mL⁻¹ olan yöntemin istatistiksel sonuçları, her bir tür için iyi bir doğruluğa, doğrusallığa ve %6.5'dan daha az olan RSD değeri ile tekrarlanabilirliğe sahip olduğunu göstermektedir.

Yeni ve hızlı bir HPLC-DAD yöntemi *Heliotropium thermophilum*'da bulunan fenolik asitlerin (gallik asit, protokatekuik asit, 4-hidroksibenzoik asit, klorojenik asit, vanilik asit, kafeik asit, siringik asit, p-kumarik asit, ferulik asit, benzoik asit, 2-hidroksisinnamik asit, absisik asit ve trans-sinnamik asit) ve rutin tayini için valide edilmiştir [69]. İki farklı bölgeden toplanan toplam sekiz adet örnek önerilen yöntem ile analizlenmiştir. Ek olarak, *H. thermophilum* örneklerinin fenolik bileşimindeki sıcaklığa bağlı değişiklikler değerlendirilmiştir.

Talhaoui ve ark. [70] "Sikitita" zeytin yapraklarındaki fenolik fraksiyonun tanımlanmasını ve tayinini HPLC-DAD-MS yöntemi ile gerçekleştirmiş ve benzer diğer türlerden elde edilen sonuçlar ile karşılaştırmışlardır. Nitel tayinler HPLC-MS

cihazı ile gerçekleştirilirken, türlerin nicel tayinleri HPLC-DAD yöntemi ile sağlanmıştır.

Yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi ile birleştirilmiş oldukça hassas, hızlı ve spesifik bir ultra yüksek performanslı sıvı kromatografi (UHPLC-HRMS/MS) yöntemi, insan deneklerinde diyet ile alınan oleuropein emilimini araştırmak için geliştirilmiş ve valide edilmiştir [71]. Geliştirilen yöntem, basit bir katı faza ekstraksiyon işleminden sonra, insan serumunda oleuropeinin belirlenmesi için başarıyla uygulanmıştır.

Atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon-uçuş zamanlı kütle spektrometri ile birleştirilmiş gaz kromatografisine (GC) dayalı yeni bir analitik yaklaşımın, zeytinyağından elde edilen fenolik bileşiklerin analizi için uygulanabilirliği değerlendirilmiştir [72]. Yöntemin LOD değerleri analizi gerçekleştirilen bileşiklere göre 0.13-1.05 ppm arasında değişmektedir. Çok sayıda fenolik bileşik nitel olarak belirlenirken, bunlardan yalnızca 21 tanesi nicel olarak analizlenebilmiştir.

Angerosa ve ark. [73] zeytinyağındaki sekoiridoid ve fenolik bileşik türevlerini GC-MS yöntemi kullanarak tayin etmişlerdir. Yöntemde kimyasal iyonlaşma tekniğinin kullanılması, elektron bombardımanı yöntemi kullanılması sonucu elde edilemeyen ana iyonların tayinine imkân sağlamıştır. Moleküler kütleler hakkında elde edilen bilgiler, zeytinyağlarında glikozit formlarından oluşan aglikon türlerinin tam karakterizasyonu için önemli katkı sağlamıştır.

Hidroksitirozol ve tirozolün nicel tayini zeytinyağı tüketiminden sonra insan idrarında GC-MS yöntemi ile gerçekleştirilmiştir [74]. İdrar örnekleri akut zeytinyağı alımından önce ve sonra gerçekleştirilmiştir. Zeytinyağı alımından sonra idrardaki hidroksitirozol ve tirozol miktarları ilk 4 saat içinde maksimum değerlere ulaşacak şekilde artmıştır.

Zeytinyağındaki fenolik bileşiklerin tayinleri için herhangi bir kromatografik ya da elektroforetik ayırma olmadan, doğrudan NMR ile iyonsprey-iyonizasyon kütle spektrometresi (IS-MS/MS) ve ESI-MS/MS teknikleri kullanılarak gerçekleştirilen birkaç ilginç yöntem de tanımlanmıştır [75, 76].

Capannesi ve ark. [77] çalışmalarında değişen depolama süresi ve depolama koşulları ile zeytinyağının fenolik içeriği değerlendirirken, elektrokimyasal (diferansiyel puls voltametri) ve biyokimyasal teknikleri karşılaştırmışlardır. Söz konusu teknikler ile elde edilen sonuçlar Folin-Ciocalteu reaktifi ve HPLC kullanılmasıyla elde edilen klasik spektrofotometrik yöntem ile karşılaştırılmıştır.

Camımsı karbon elektrot (GCE) üzerinde yapısal olarak farklı 10 flavonoidin (kuersetin, galangin, chrysin, 3-hidroksiflavon, naringenin, luteolin, apigenin, flavon, kaempferol, ve naringin) elektrokimyasal davranışları CV ile çalışılmıştır [78].

In₂O₃ nanoparçacıklı modifiye camımsı karbon pasta elektrot (In₂O₃NPs/GCPE) hazırlanmış ve luteolinin hassas ve seçici elektrokimyasal tayini için kullanılmıştır [79]. Optimum deneysel koşullar altında önerilen sensör luteolin derişiminin 9.98×10^{-9} M ile 8.84×10^{-8} M olduğu doğrusal aralıkta çok hızlı bir şekilde cevap vermiştir. Yöntemin luteolin için belirtme sınırı 1.99×10^{-10} M olarak bulunmuştur. Önerilen metodun analitik performansı standart katımlı insan biyolojik sıvılarında luteolinin tayini ile değerlendirilmiştir.

Enache ve ark. [80] yüksek hassasiyet ve tekrarlanabilirlik ile zeytinyağındaki toplam orto-fenol içeriğinin belirlenmesi için bir elektroanalitik yöntem bildirmişlerdir. Önerilen yöntemde katekol, fenol, hidroksitirozol, tirozol, kafeik asit ve ferulik asitin oksidasyonlarını incelemek için CV yöntemi kullanılmıştır.

Zeytinyağındaki fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için gerekli örnek miktarını, kullanılan reaktif miktarını ve harcanan zamanı düşüren bir sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yöntemi geliştirilmiştir [81]. Yöntemin geri kazanımı %90 civarında ve tüm metodun proses etkinliği fenolik bileşiklerin çoğu için %80'den daha fazla olarak elde edilmiştir. Önerilen metodun uygulanabilirliği ve güvenilirliği gerçek numuneler kullanılarak test edilmiştir.

Zeytinyağındaki farklı türlerdeki fenolik bileşiklerin (benzoik asit türevleri, sinnamik asit türevleri, fenil etil alkoller, flavonoidler ve diğer fenolik asitler) miktarları diol ve C₁₈ kartuşları kullanılarak gerçekleştirilen katı faza özütleme (SPE)

ekstraksiyonunu takiben UHPLC-MS/MS yöntemi ile tayin edilmiştir [82]. Analitik yöntem valide edilmiş ve geri kazanım değerleri %70 (vanilik asit) ile %111 (gallik asit) arasında tekrarlanabilir olarak elde edilmiştir.

Jerman ve ark. [38] zeytindeki fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için yeni bir UAE yöntemi önermişlerdir. Dondurularak kurutulmuş zeytinlerin 1.5 g'ından fenoliklerin yeterli miktarda geri kazanımları (%94.1-98.7) için, 45 °C'de 25 mL saf metanol ile 20 dakikalık sürelerde, ardışık 3 kez ekstraksiyon işleminin yapılması gerektiğini raporlandırmışlardır.

Oleuropein ile birlikte verbaskosit, apigenin 7-glikozit ve luteolin 7-glikozit gibi diğer fenolik bileşikler, ısıtılmış sıvılar ile hareketli ve sabit yaklaşımlar kullanılarak zeytin yapraklarından ekstrakte edilmiştir [83]. Optimum çalışma koşulları altında, hedef analitlerin bozulma olmadan tamamen ekstraksiyonu, 13 dakika içinde gerçekleştirmişlerdir. Önerilen yaklaşımın, daha önceki alternatiflere göre daha konsantre ekstraktlar içerdiğini rapor etmişlerdir.

Pizarro ve ark. [84] zeytinyağı içerisindeki toplam fenolik bileşik (sıvı-sıvı ekstraksiyon (LLE), sıvı-sıvı mikroekstraksiyon (LLME) ve ultrasonik sıvı-sıvı ekstraksiyon (USE)) ve bireysel fenolik bileşik (LLME, USE ve SPE) analizlerindeki etkinliklerini belirlemek üzere farklı ekstraksiyon yöntemleri arasında karşılaştırma gerçekleştirmişlerdir. Toplam fenol içeriği için elde edilen analitik sonuçların istatistiksel değerlendirmesi LLME ve USE tekniklerinin daha fazla örnek miktarına ihtiyaç duyan, daha fazla kimyasal atık üreten ve daha fazla zaman alıcı olan LLE'ye dayalı geleneksel prosedüre güvenilir bir alternatif olacağını ifade etmişlerdir. Bireysel fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için de yine LLME ve USE tekniklerinin geri kazanım ve tekrarlanabilirlik sonuçlarına dayanarak daha uygun olduğunu göstermişlerdir.

3. DENEYSEL KISIM

3.1. Materyal

Çalışmada, geliştirilen yöntemlerin gerçek numunelere uygulanabilirliği için kullanılan zeytin, zeytinyağı ve zeytin yaprağı örnekleri (çalışmanın farklı bölümlerinde kullanılan numuneler, toplanma zamanı ve bölgesi bakımından farklılıklar göstermektedir.) Manisa'nın çeşitli bölgelerinden temin edilmiştir.

3.2. Kimyasallar

Kullanılan tüm reaktifler analitik saflıktadır. Oleuropein, gallik asit, (+)-kateşin, pirokatekol, 2,5-dihidroksibenzoik asit, 4-hidroksibenzoik asit, (-)-epikateşin, kafeik asit, siringik asit, vanilin, taksifolin, sinapik asit, p-kumarik asit, ferulik asit, rosmarinik asit, 2-hidroksisinnamik asit, pinoresinol, kuersetin, luteolin, apigenin, magnezyum sülfat heptahidrat, kalsiyum nitrat tetrahidrat, sodyum klorür, asetik asit, perklorik asit, hidroklorik asit, kloroplatinik asit, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, troloks, neokuproin, bromkresol moru (BCP), hekzan, metanol ve asetonytril Sigma-Aldrich; 2-(4-hidroksifenil)etanol (tirozol), vanilik asit, 3-hidroksibenzoik asit, 3,4-dihidroksifenilasetik asit, apigenin 7-glikozit, luteolin 7-glikozit, hesperidin, eriodiktiyol ve kaempferol Fluka; L(+)-askorbik asit, demir(II) sülfat heptahidrat, nikel(II) sülfat heksahidrat, kurşun(II) nitrat, bakır(II) nitrat trihidrat, bakır (II) klorür, sodyum hidroksit, sodyum karbonat, nitrik asit, sülfürik asit, trifloroasetik asit, formik asit, Folin-Ciocalteu reaktifi ve N,N-dimetilformamid Merck; çok duvarlı karbon nanotüp (7-15 nm çap, 10 µm uzunluk ve saflık > %95) ve 2-(3-hidroksifenil)etanol Aldrich; amonyum asetat ve o-fosforik asit J.T.Baker; taurin Alfa-Aeser; D(+) glikoz monohidrat Carlo Erba; 3-hidroksitirozol (hidroksitirozol) Sigma; verbaskosit, protokatekuik asit ve hiperoside HWI Analytik firmasından satın alınmıştır. Kullanılan tüm standart maddelerin son kullanma tarihleri izlenebilirlik açısından uygundur. Ultra saf su (18 mΩ) Milli-Q su arıtma cihazından elde edilmiştir (Millipore Co., Ltd.)

Luteolin 7-glikozit ve hesperidin hariç tüm stok çözeltiler, 500 mg L⁻¹ olacak şekilde metanol içerisinde hazırlanmıştır. Luteolin 7-glikozit ve hesperidin ise metanol içerisindeki nispeten düşük çözünürlükleri nedeniyle 100 mg L⁻¹ olarak

hazırlanmıştır. 1.0 mM H₂AuCl₄ çözeltisi, altın telin (%99.999 saflıkta) 1:3 oranında nitrik asit : hidroklorik asit içerisinde çözülmesi ile hazırlanmıştır.

3.3. Voltammetri Yöntemi

Voltammetrik ölçümler, çalışma elektrodu (3 mm çap, 0.0707 cm² geometrik alana sahip yalın camımsı karbon elektrot), yardımcı elektrot (platin tel) ve Ag/AgCl (doymuş KCl) referans elektrodu içeren üçlü elektrot sistemine sahip bir Autolab PGSTAT128N cihazı (Şekil 3.1.) ile gerçekleştirilmiştir. Döngüsel voltammetrik ölçümler; 100-1200 mV potansiyel aralığında, 50 mV s⁻¹ tarama hızı ile gerçekleştirilmiştir. Kare dalga voltammetrisi (100-1200 mV) için ise parametreler; 50 mV genlik, 10 Hz frekans ve 50 mV s⁻¹ tarama hızı şeklindedir.



Şekil 3.1. Autolab PG128N potansiyostat/galvanostat.

3.4. LC-ESI-MS/MS Yöntemi

Kromatografik analizler, Agilent 1260 Infinity sıvı kromatografisi ile eşleşmiş 6420 Triple Quad kütle spektrometresi ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2.). Açıklamaları aşağıda verilen tüm yöntemler, kromatografik parametrelerin optimizasyon işlemleri sonrasında belirlenmiştir.



Şekil 3.2. Agilent 1260 sıvı kromatografisi ile eşleşmiş 6420 kütle spektrometresi.

Zeytin yaprağı örneklerinde oleuropeinin tayini için geliştirilen elektroanalitik yöntemin doğruluğunu belirlemek amacı ile karşılaştırmalı kullanılan kromatografik teknikte Poroshell 120 EC-C18 (100 mm x 4.6 mm I.D., 2.7 μ m) kolon ile hareketli faz A (5mM amonyum asetat) ve hareketli faz B (%0.1 asetik asit içeren asetonitril) sistemi tercih edilmiştir. Akış hızı 0.4 mL dk.⁻¹, enjeksiyon hacmi 5 μ L ve kolon sıcaklığı 25 °C'dir. Gradient programı takip eden şekilde uygulanmıştır: 0.00 dk. %5 B eluent, 1.00 dk. %25 B eluent, 2.00 dk. %50 B eluent, 4.00 dk. %95 B eluent, 6.00 dk. %95 B eluent ve 7.00 dk. %5 B eluent.

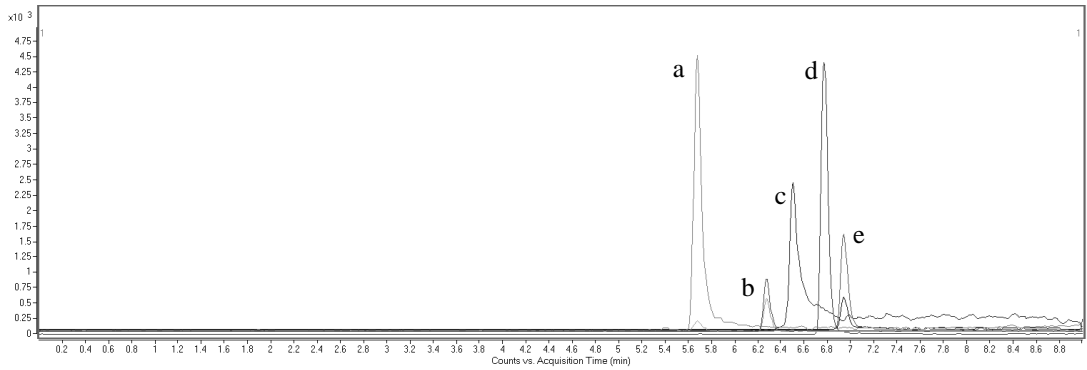
Zeytinyağı örneklerinde oleuropein, tirozol, hidroksitirozol, apigenin 7-glikozit ve luteolin 7-glikozit tayinleri Poroshell 120 EC-C18 (50 mm x 3.0 mm I.D., 2.7 μ m) kolonu ile hareketli faz A (5mM amonyum asetat) ve hareketli faz B (%0.05 asetik asit içeren asetonitril) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Akış hızı 0.4 mL dk.⁻¹, enjeksiyon hacmi 5 μ L ve kolon sıcaklığı 25 °C'dir. Gradient programı takip eden şekilde uygulanmıştır: 0.00 dk. %5 B eluent, 1.00 dk. %25 B eluent, 2.00 dk. %50 B eluent, 4.00 dk. %95 B eluent, 6.00 dk. %95 B eluent ve 7.00 dk. %5 B eluent.

Zeytin yaprağı örneklerinde oleuropein, tirozol, hidroksitirozol, apigenin 7-glikozit ve luteolin 7-glikozit tayinleri Poroshell 120 EC-C18 (100 mm x 4.6 mm I.D., 2.7 µm) kolonu ile hareketli faz A (5mM amonyum asetat) ve hareketli faz B (metanol) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Akış hızı 0.4 mL dk.⁻¹, enjeksiyon hacmi 5 µL ve kolon sıcaklığı 25 °C'dir. Gradient programı takip eden şekilde uygulanmıştır: 0.00 dk. %5 B eluent, 2.00 dk. %25 B eluent, 4.00 dk. %50 B eluent, 6.00 dk. %95 B eluent, 8.00 dk. %95 B eluent ve 9.00 dk. %5 B eluent. Hedef analitlere ait ESI-MS/MS parametreleri ve söz konusu koşullarda elde edilen standartlara ilişkin kromatogram sırasıyla Tablo 3.1. ve Şekil 3.3. 'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Hedef analitlere ait ESI-MS/MS parametreleri-1

Analit	R _t (dk.)	Öncü iyon	MRM1 (CE, V)	MRM2 (CE, V)
Hidroksitirozol	5.667	153.0 [M - H] ⁻	123.0 (10)	94.9 (18)
Tirozol	6.263	137.0 [M - H] ⁻	119.1 (12)	105.8 (12)
Luteolin 7-glikozit	6.501	447.1 [M - H] ⁻	326.7 (22)	285.0 (24)
Apigenin 7-glikozit	6.771	433.1 [M + H] ⁺	271.0 (18)	-
Oleuropein	6.941	539.2 [M - H] ⁻	377.1 (10)	275.1 (16)

R_t, alıkonma süresi; CE, çarpışma enerjisi.



Şekil 3.3. Türlerle ait standart kromatogram (a) hidroksitirozol, (b) tirozol, (c) luteolin 7-glikozit, (d) apigenin 7-glikozit, (e) oleuropein.

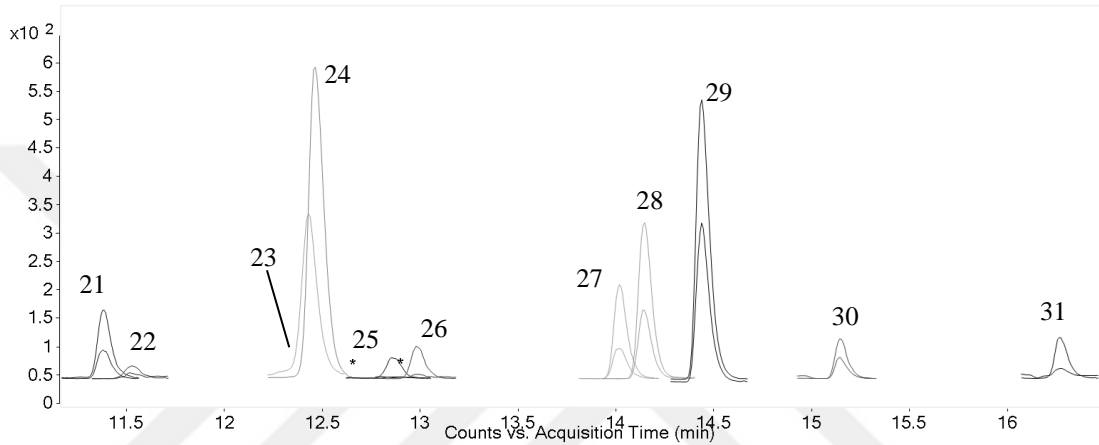
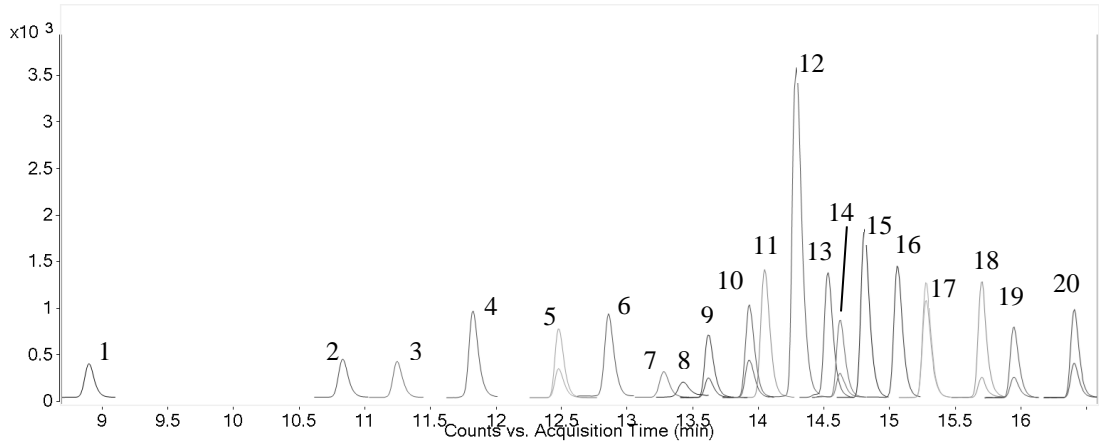
Zeytin yaprağı ve zeytin örneklerinde 31 adet fenolik bileşiğin tayinleri Poroshell 120 EC-C18 (100 mm x 4.6 mm I.D., 2.7 µm) kolonu ile hareketli faz A (%0.1 formik asit) ve hareketli faz B (metanol) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Akış hızı 0.4 mL dk.⁻¹, enjeksiyon hacmi 2 µL ve kolon sıcaklığı 25 °C'dir. Gradient

programını takip eden şekilde uygulanmıştır: 0.00 dk. %2 B eluent, 3.00 dk. %2 B eluent, 6.00 dk. %25 B eluent, 10.00 dk. %50 B eluent, 14.00 dk. %95 B eluent, 17.00 dk. % 95 B eluent ve 17.50 dk. %2 B eluent. Her bir türe ait çoklu reaksiyon izleme (MRM) geçişleri, optimum çarpışma enerjileri ve alıkonma süreleri Tablo 3.2.'de gösterilmektedir. Ek olarak, fenolik bileşiklerin temsili LC-ESI-MS/MS kromatogramları Şekil 3.4.'de verilmiştir.

Tablo 3.2. Hedef analitlere ait ESI-MS/MS parametreleri-2

Analit	R _t (dk.)	Öncü iyon	MRM1 (CE, V)	MRM2 (CE, V)
NI modu ile analiz edilen bileşikler				
Gallik asit	8.891	168.9 [M - H] ⁻	125.0 (10)	-
Protokatekuik asit	10.818	152.9 [M - H] ⁻	108.9 (12)	-
3,4-Dihidroksifenilasetik asit	11.224	167.0 [M - H] ⁻	123.0 (2)	-
(+)-Kateşin	11.369	289.0 [M - H] ⁻	245.0 (6)	202.9 (12)
Pirokatekol	11.506	109.0 [M - H] ⁻	90.6 (18)	52.9 (16)
2,5-Dihidroksibenzoik asit	12.412	152.9 [M - H] ⁻	109.0 (10)	-
4-Hidroksibenzoik asit	12.439	136.9 [M - H] ⁻	93.1 (14)	-
Kafeik asit	12.841	179.0 [M - H] ⁻	135.0 (12)	-
Vanilik asit	12.843	166.9 [M - H] ⁻	151.8 (10)	122.6 (6)
Siringik asit	12.963	196.9 [M - H] ⁻	181.9 (8)	152.8 (6)
3-Hidroksibenzoik asit	13.259	137.0 [M - H] ⁻	93.0 (6)	-
Vanilin	13.397	151.0 [M - H] ⁻	136.0 (10)	-
Verbaskosit	13.589	623.0 [M - H] ⁻	461.0 (26)	160.8 (36)
Taksifolin	13.909	303.0 [M - H] ⁻	285.1 (2)	125.0 (14)
Sinapik asit	13.992	222.9 [M - H] ⁻	207.9 (6)	163.8 (6)
p-Kumarik asit	14.022	162.9 [M - H] ⁻	119.0 (12)	-
Ferulik asit	14.120	193.0 [M - H] ⁻	177.8 (8)	134.0 (12)
Luteolin 7-glikozit	14.266	447.1 [M - H] ⁻	285.0 (24)	-
Rosmarinik asit	14.600	359.0 [M - H] ⁻	196.9 (10)	160.9 (10)
2-Hidroksisinnamik asit	15.031	162.9 [M - H] ⁻	119.1 (10)	-
Pinoresinol	15.118	357.0 [M - H] ⁻	151.0 (12)	135.7 (34)
Eriodiktiyol	15.247	287.0 [M - H] ⁻	151.0 (4)	134.9 (22)
Kuersetin	15.668	301.0 [M - H] ⁻	178.6 (10)	151.0 (16)
Kaempferol	16.236	285.0 [M - H] ⁻	242.8 (16)	229.1 (18)
PI modu ile analiz edilen bileşikler				
Klorojenik asit	11.802	355.0 [M + H] ⁺	163.0 (10)	-
(-)-Epikateşin	12.458	291.0 [M + H] ⁺	139.1 (12)	122.9 (36)
Hesperidin	14.412	611.1 [M + H] ⁺	449.2 (4)	303.0 (20)
Hiperoside	14.506	465.1 [M + H] ⁺	303.1 (8)	-
Apigenin 7-glikozit	14.781	433.1 [M + H] ⁺	271.0 (18)	-
Luteolin	15.923	287.0 [M + H] ⁺	153.1 (34)	135.1 (36)
Apigenin	16.382	271.0 [M + H] ⁺	153.0 (34)	119.1 (36)

R_t, alıkonma süresi; CE, çarpışma enerjisi; NI, negatif iyon ve PI, pozitif iyon



Şekil 3.4. Fenolik bileşiklerin LC-ESI-MS/MS kromatogramları. 1-31 sayıları sırasıyla gallik asit, protokatekuiik asit, 3,4-dihidroksifenilasetik asit, klorojenik asit, (-)-epikateşin, kafeik asit, 3-hidroksibenzoik asit, vanilin, verbaskosit, taksifolin, p-kumarik asit, luteolin 7-glikozit, hiperoside, rosmarinik asit, apigenin 7-glikozit, 2-hidroksisinnamik asit, eriodiktiyol, kuersetin, luteolin, apigenin, (+)-kateşin, pirokatekol, 2,5-dihidroksibenzoik asit, 4-hidroksibenzoik asit, vanilik asit, siringik asit, sinapik asit, ferulik asit, hesperidin, pinoresinol and kaempferol temsil etmektedir. Fenolik konsantrasyonları 400 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Kütle spektrometresinde ESI kaynağı negatif ve pozitif MRM modunda çalıştırılmış, -3.5, -4 kV (NI modu) ve 3.5, 4 kV (PI modu) kapiler gerilim uygulanmıştır. Kurutucu gaz sıcaklığı ve akış hızı sırasıyla 300 °C ve 11 L dk.⁻¹ olarak, nebulizör basıncı ise 40 psi olarak ayarlanmıştır. Negatif ve pozitif iyon modunda çalışan tüm bileşikler tek bir enjeksiyon ile analizlenmiştir.

3.5. Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyon Yöntemleri

Fenolik bileşiklerin zeytin, zeytinyağı ve zeytin yaprağından ekstraksiyonları için sıklıkla UAE [85], MAE [37] ve IE [86] yöntemleri kullanılmıştır.

Uygun miktarda tartılan numune, UAE yönteminde ses dalgalarına 15 dk. boyunca maruz bırakılmıştır. Diğer taraftan MAE yönteminde ise, alınan numune üzerine 10 mL metanol/su (80/20, v/v) çözeltisi eklenmiş, mikrodalga sistemi (Şekil 3.5.) 8 dakikada 80 °C'ye gelecek ve 6 dakika 80 °C'de sabit kalacak şekilde ayarlanmıştır. Son olarak IE yöntemi, uygun miktarda numunenin 50 mL 95 °C saf su ile 1 saat boyunca demlenmesi yoluyla gerçekleştirilmiştir. Voltammetrik ve kromatografik tüm analizler öncesi ekstraktlar 0.45 µm politetrafloroetilen (PTFE) filtre yardımı ile süzülmüştür.



Şekil 3.5. Cem Mars 6 mikrodalga bozundurma sistemi.

Zeytinyağında bulunan fenolik bileşiklerin ekstraksiyonları ultrasonik destekli olarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla zeytinyağında nispeten daha fazla oranda bulunan hidroksitirozol ve tirozol tayinleri için zeytinyağından 1 g alınarak üzerine 2 mL hekzan eklenmiş ve söz konusu analitler 250 µL metanol/su (80/20,

v/v) çözeltilisine ekstrakte edilmiştir. Zeytinyağında diğer 2 türe göre daha düşük miktarda bulunan oleuropein, luteolin 7-glikozit ve apigenin 7-glikozit tayinleri için ise örnek ve hekzan miktarı 10 katına çıkarılarak, ekstraksiyon çözeltilisinin metanol/su (80/20, v/v) hacmi 250 µL olarak sabit tutulmuştur.

Zeytin ve zeytin yaprağında bulunan fenolik bileşiklerin ekstraksiyonları için mikrodalga destekli ekstraksiyon sistemi kullanılmıştır. Bu amaçla kurutulmuş ve parçalanmış numuneden 0.1 g alınarak (yalnızca zeytin yaprağı örneklerinde oleuropeinin tayini için geliştirilen elektroanalitik yöntemin doğruluğunu belirlemek amacı ile karşılaştırmalı kullanılan yöntemde örnek miktarı 0.01 g olarak alınmıştır.), mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi uygulanmıştır.

Zeytin yaprağı örneklerinde toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesi için ise 0.2 g örnek kullanılmıştır. Söz konusu örnekteki toplam antioksidan kapasiteleri, eş zamanlı MAE ve IE yöntemleri kullanılarak karşılaştırmalı olarak belirlenmiştir.

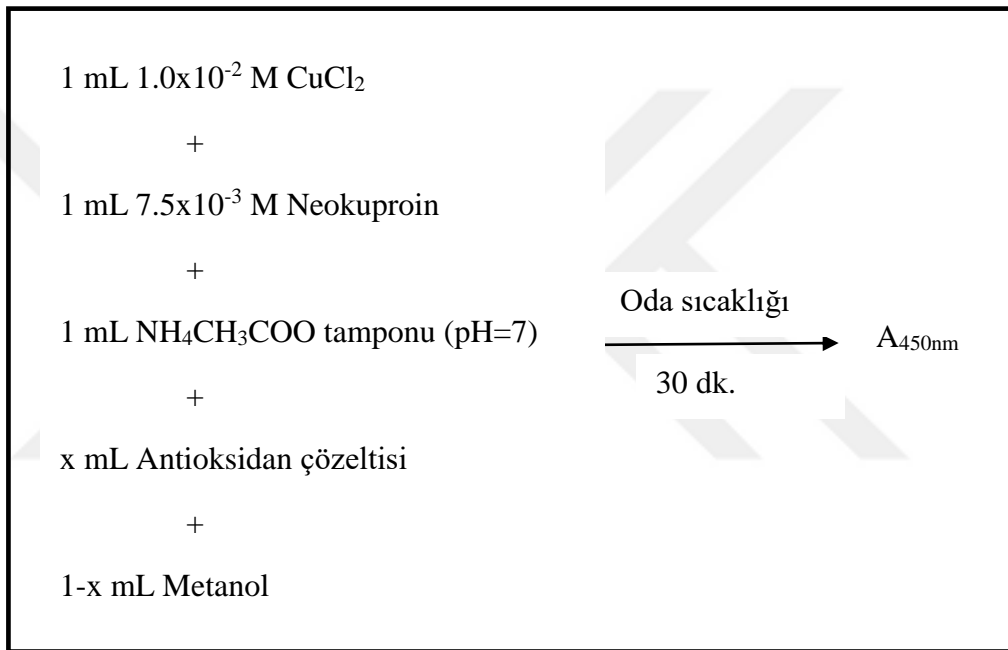
3.6. CUPRAC, DPPH ve Folin-Ciocalteu Yöntemlerinin Uygulanması

CUPRAC yönteminin doğrusallık çalışmaları, 5 farklı konsantrasyonda (1, 3, 5, 7 ve 9 mg L⁻¹) hazırlanan troloks standart çözeltileri ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla her bir konsantrasyon değeri için hesaplanan x mL 100 mg L⁻¹ stok standart antioksidan çözeltilisi üzerine (1-x) mL metanol eklenmiştir. Daha sonra 1'er mL olmak üzere sırasıyla 1.0x10⁻² M CuCl₂ çözeltilisi, 7.5x10⁻³ M neokuproin çözeltilisi ve amonyum asetat tamponu (pH=7) eklenerek, hazırlanan çözeltiler oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası standart çözeltiler ve numunelerin absorbans değerleri 450 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçülerek numunelerin toplam antioksidan kapasiteleri troloks eşdeğeri cinsinden belirlenmiştir. Kalibrasyon için kullanılan çözeltiler ve yöntemi gösterir akış diyagramı Tablo 3.3. ve Şekil 3.6.'da sırasıyla verilmiştir.

Tablo 3.3. CUPRAC yönteminde kalibrasyon için kullanılan standart çözeltiler

Std. kons. (mg L ⁻¹)	Stok çöz. alınan miktar (mL)	Eklenen metanol (mL)	Eklenen CuCl ₂ (mL)	Eklenen Nc (mL)	Eklenen tampon (mL)
1	0.04	0.96	1	1	1
3	0.12	0.88	1	1	1
5	0.20	0.80	1	1	1
7	0.28	0.72	1	1	1
9	0.36	0.64	1	1	1

Std., standart; çöz., çözelti; kons., konsantrasyon; Nc, neokuproin.



Şekil 3.6. CUPRAC yöntemi akış diyagramı.

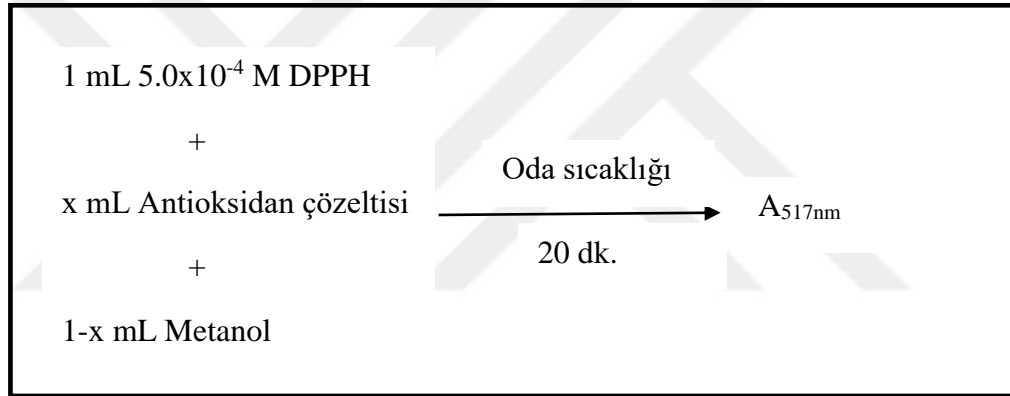
DPPH yönteminin uygulanabilmesi amacıyla kullanılan kalibrasyon eğrisi, farklı konsantrasyonlardaki troloks çözeltilerinin (1, 3, 5, 7 ve 9 mg L⁻¹) absorbanslarının konsantrasyona karşı grafiğe geçirilmesi ile oluşturulmuştur. Her bir konsantrasyon değeri için hesaplanan x mL 100 mg L⁻¹ stok standart antioksidan çözeltisi üzerine (1-x) mL metanol eklenmiş, ardından 1 mL 5.0×10^{-4} M DPPH çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında ve karanlıkta 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası standart çözeltiler ve numunelerin absorbans değerleri 517 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçülerek numunelerin radikal süpürme kapasiteleri troloks eşdeğeri cinsinden belirlenmiştir. Kalibrasyon için kullanılan

çözeltiler ve yöntemi gösterir akış diyagramı Tablo 3.4. ve Şekil 3.7.'de sırasıyla verilmiştir.

Tablo 3.4. DPPH yönteminde kalibrasyon için kullanılan standart çözeltiler

Std. kons. (mg L ⁻¹)	Stok çöz. alınan miktar (mL)	Eklenen metanol (mL)	Eklenen DPPH (mL)
1	0.02	0.98	1
3	0.06	0.94	1
5	0.10	0.90	1
7	0.14	0.86	1
9	0.18	0.82	1

Std., standart; çöz., çözelti; kons., konsantrasyon; DPPH, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil.



Şekil 3.7. DPPH yöntemi akış diyagramı.

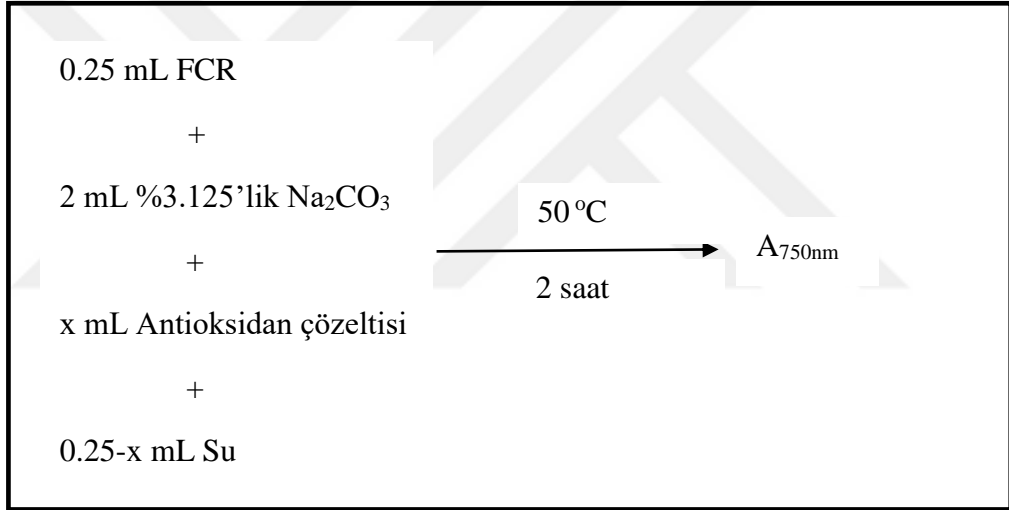
Toplam fenolik madde miktarının tayini için uygulanan Folin-Ciocalteu yöntemi için standart madde olarak gallik asit kullanılmıştır. Değişen konsantrasyonlardaki gallik asit çözeltileri (1, 3, 5, 7 ve 9 mg L⁻¹) kalibrasyon grafiği oluşturmak için kullanılmıştır. Her bir konsantrasyon değeri için hesaplanan x mL 100 mg L⁻¹ standart antioksidan çözeltisi üzerine (0.25-x) mL saf su eklenmiştir. Daha sonra, 0.25 mL Folin-Ciocalteu reaktifi (1/5 oranında seyreltilmiş) ve 2 mL %3.125'lik Na₂CO₃ çözeltisi eklenerek, hazırlanan çözeltiler su banyosunda 50 °C'de 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası standart çözeltiler ve numunelerin absorbans değerleri 750 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçülerek numunelerin toplam fenolik madde miktarları gallik asit eşdeğeri cinsinden

belirlenmiştir. Kalibrasyon için kullanılan çözeltiler ve yöntemi gösterir akış diyagramı Tablo 3.5. ve Şekil 3.8.'de sırasıyla verilmiştir.

Tablo 3.5. Folin-Ciocalteu yönteminde kalibrasyon için kullanılan standart çözeltiler

Std. kons. (mg L ⁻¹)	Stok çöz. alınan miktar (mL)	Eklene su (mL)	Eklene FCR (mL)	Eklene Na ₂ CO ₃ (mL)
1	0.025	0.225	0.250	2
3	0.075	0.175	0.250	2
5	0.125	0.125	0.250	2
7	0.175	0.075	0.250	2
9	0.225	0.025	0.250	2

Std., standart; çöz., çözelti; kons., konsantrasyon; FCR, Folin-Ciocalteu reaktifi.



Şekil 3.8. Folin-Ciocalteu yöntemi akış diyagramı.

Absorbans ölçümleri Jasco V-530 (Şekil 3.9.) spektrofotometresi ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.9. Jasco V-530 spektrofotometre.

3.7. Karbon Nanotüplerin Hazırlanması

0.04 g olarak tartılan MWCNT üzerine 150-250 °C ısıtıcı altında her seferinde 2 mL 4 kez der. HNO₃ eklenmiştir. Son buharlaşmadan kalan yaklaşık 0.5 mL'lik çözelti soğutulmuş, 5 mL saf su ile yaklaşık 7-8 defa yıkanarak asitten uzaklaştırılmıştır. 60-70 °C'de yaklaşık 1 gün boyunca kurutularak hazırlanan kalıntıdan tartılan 0.037 g karbon nanotüp, 3.7 mL dimetilformamid (DMF) içerisinde dağıtılmıştır [87].

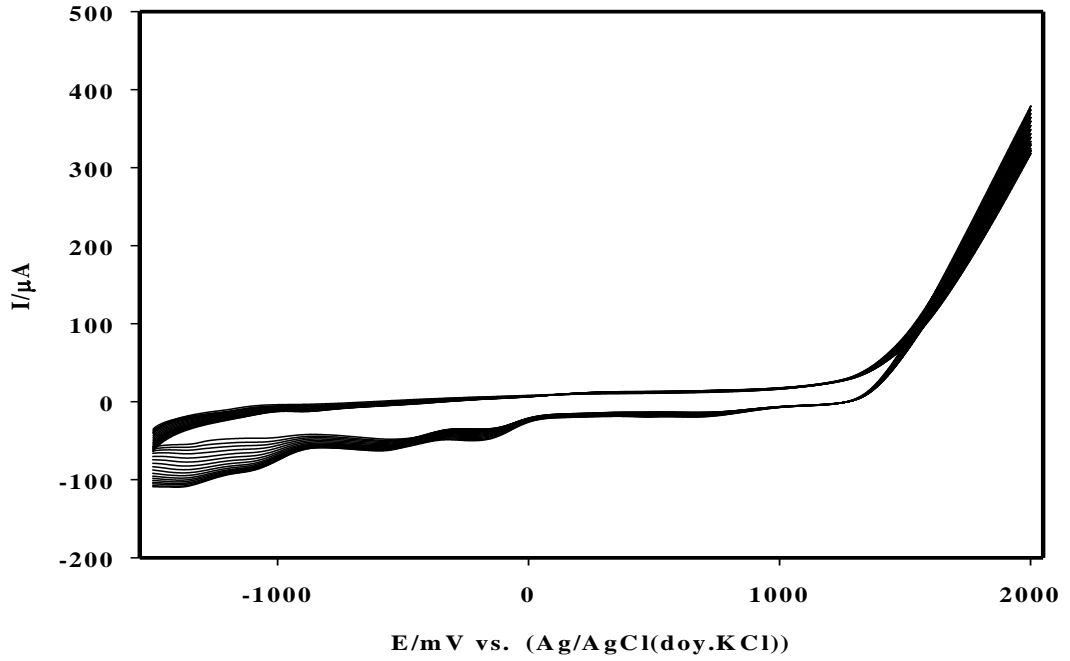
3.8. GCE Yüzeyine MWCNT, İletken Polimer ve Metal Nanoparçacık Modifikasyonları

GCE sulu Al₂O₃ ile temizlenip parlatılmıştır. Temizlenmiş GCE üzerine 10 µL MWCNT çözeltisinden damlatılarak ve yaklaşık 30 dakika 150 W IR lamba altında çözücü uçurularak MWCNT/GCE hazırlanmıştır.

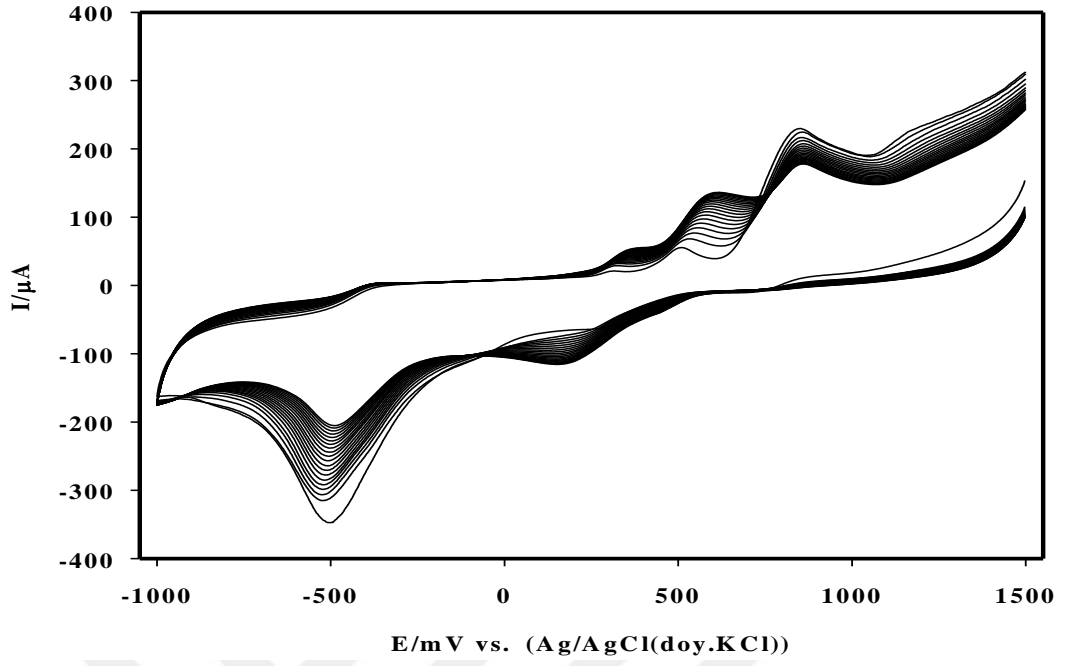
Taurin (1.0 mM) ve BCP (2.0 mM) monomerleri MWCNT/GCE yüzeyine elektrokimyasal olarak polimerleştirilmiştir. Elektropolimerizasyon taurin (Şekil 3.10.) ve BCP (Şekil 3.11.) için sırasıyla 50 mV s⁻¹ tarama hızı ile -1.5 V ile 2.0 V

[88] ve 100 mV s^{-1} tarama hızı ile 1.5 V ile -1.0 V [41] potansiyel aralığında 20 döngü olarak gerçekleştirilmiştir.

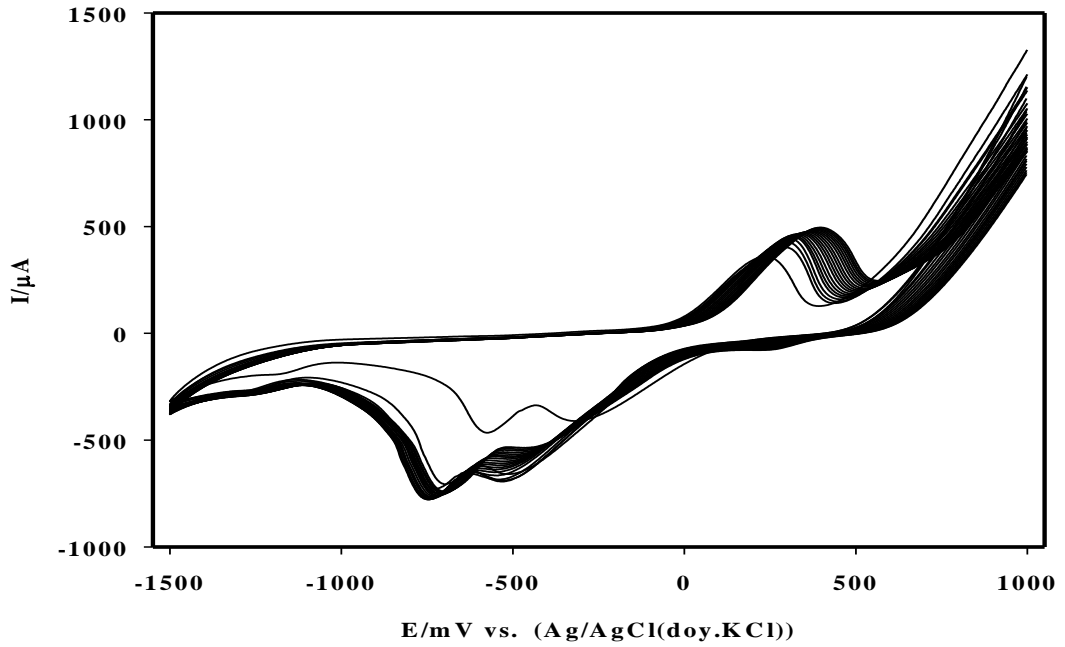
Diğer taraftan Au ve Pt nanoparçacıklar, türlerin asidik çözeltilerinden (0.1 M HCl çözeltisi ile hazırlanmış 1 mM HAuCl_4 ve $1 \text{ mM H}_2\text{PtCl}_6$) indirgenerek söz konusu elektrot yüzeyine modifiye edilmiştir. Au (Şekil 3.12.) ve Pt (Şekil 3.13.) nanoparçacıkların MWCNT/GCE yüzeyinde oluşumu döngüsel voltammetri ile 20 döngü (100 mV s^{-1}) olarak Au ve Pt için sırasıyla 1.0 V ile -1.5 V ve 0.2 V ile -1.0 V potansiyel aralığında gerçekleştirilmiştir.



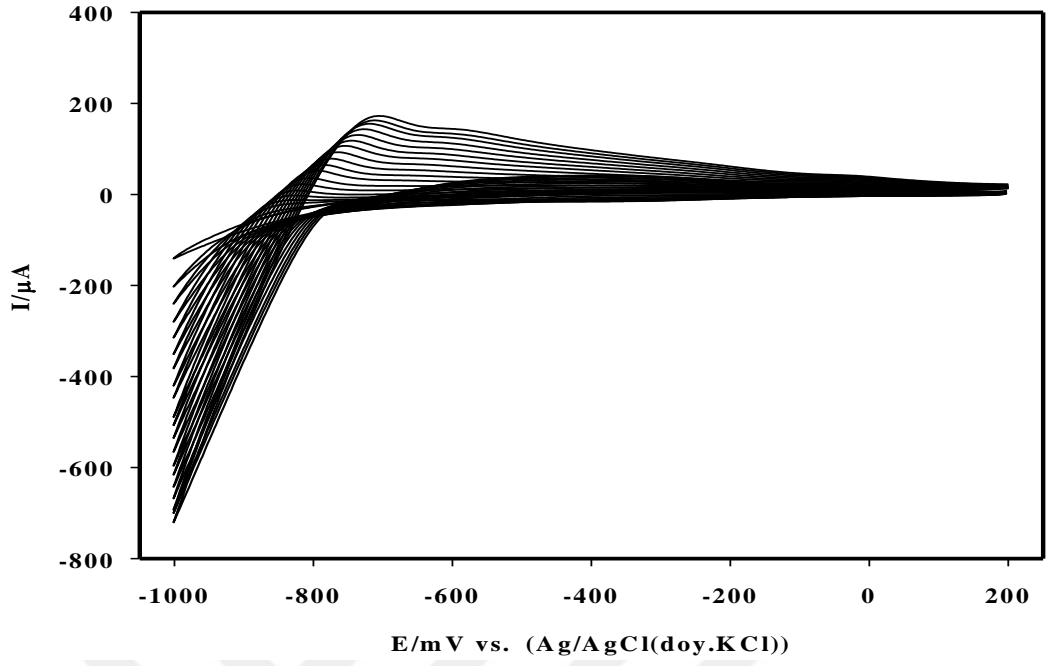
Şekil 3.10. MWCNT/GCE yüzeyine taurin monomerlerinin elektropolimerizasyonu.



Şekil 3.11. MWCNT/GCE yüzeyine BCP monomerlerinin elektropolimerizasyonu.



Şekil 3.12. Au nanoparçacıkların MWCNT/GCE yüzeyine kaplanması.



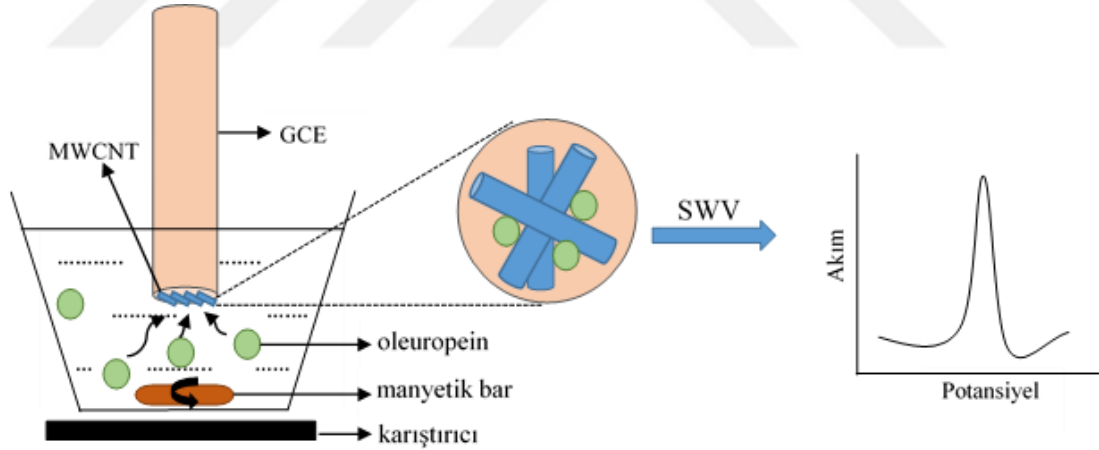
Şekil 3.13. Pt nanoparçacıkların MWCNT/GCE yüzeyine kaplanması.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Araştırma bulguları; oleuropeinin tayini için önerilen elektroanalitik yöntem, sekoiridoid ve fenil etil alkol yapılarının tayinleri için geliştirilen kromatografik yöntem, diğer bazı fenolik bileşiklerin eş zamanlı tayinleri için geliştirilen kromatografik yöntem ve zeytin yaprağı örneğinin toplam fenolik bileşen ve toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesi için uygulanan yöntemler olmak üzere 4 ana başlık altında toplanmıştır.

4.1. Zeytin Yaprağı Örneklerinde Oleuropeinin Adsorptif Sıyrma Kare Dalga Voltammetrisi ile Tayini

Çalışmanın bu bölümünde, oleuropein miktarının duyarlı bir şekilde belirlenmesi için MWCNT modifiye GCE kullanılarak gerçekleştirilen voltammetrik bir yöntem önerilmiştir (Şekil 4.1.). Yöntem, hazırlanan MWCNT/GCE yüzeyine kendiliğinden biriken oleuropeinin adsorptif sıyrma kare dalga voltammetrisi ile tayini için valide edilmiştir.

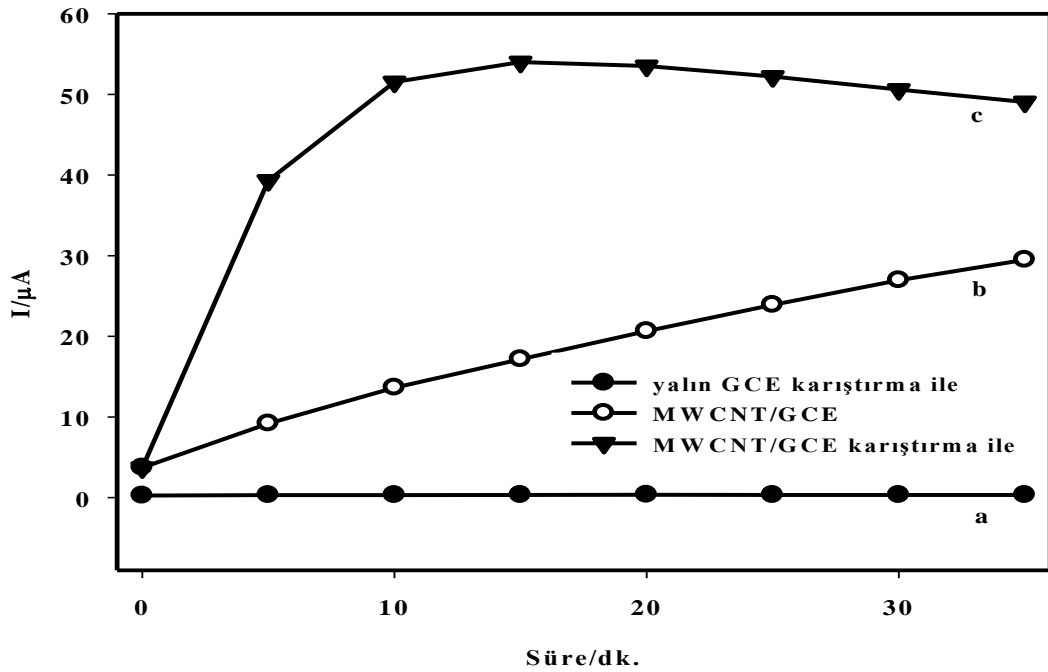


Şekil 4.1. MWCNT/GCE ile oleuropein tayininin görsel açıklaması.

4.1.1. Çalışma Koşullarının Optimizasyonu

9.25 μM oleuropeinin yalın GCE ve MWCNT/GCE üzerindeki yükseltgenme pik akımlarının değişimleri zamana karşı CV ile incelenmiştir. Bununla birlikte destek elektrolitin (0.1 M H_2SO_4) 400 rpm de karıştırılmasının oleuropein pik akımı üzerine etkisi de araştırılmıştır (Şekil 4.2.). Oleuropeinin yükseltgenme pik akımı

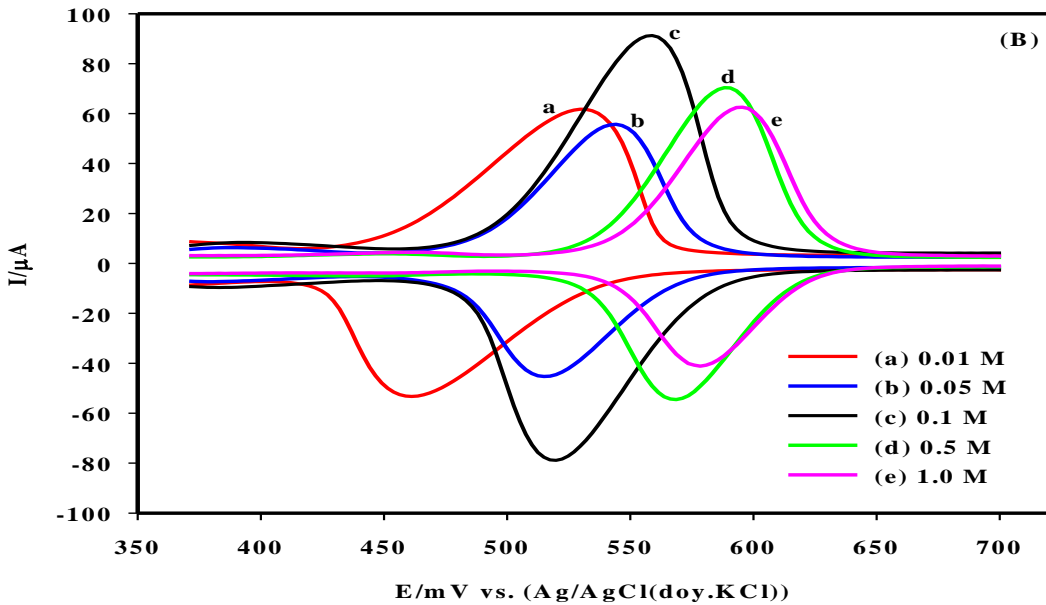
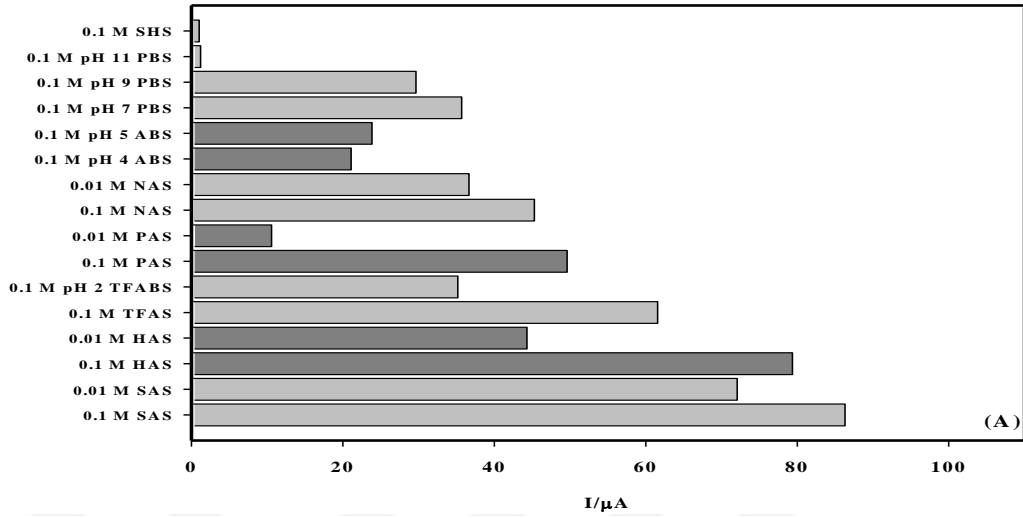
MWCNT/GCE üzerinde zamanın bir fonksiyonu olarak artarken, yalın GCE üzerinde anlamlı herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Bu duruma oleuropeinin hazırlanan MWCNT/GCE üzerinde kendiliğinden birikmesi neden olmaktadır. Diğer taraftan, oleuropeinin hazırlanan MWCNT/GCE üzerine birikmesi sırasında destek elektrolit çözeltisinin karıştırılması, yalnızca elde edilen pik akımının artmasına sebep olmamış, aynı zamanda oleuropeinin maksimum pik akımına ulaşma süresini kısaltmıştır. Sonuç olarak, oleuropeinin hazırlanan MWCNT/GCE üzerine birikme süresi 400 rpm karıştırma hızı ile birlikte 15 dk. olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.2. 9.25 μM oleuropeinin (a) yalın GCE üzerinde 0.1 M H_2SO_4 çözeltisini karıştırarak, (b) MWCNT/GCE üzerinde, (c) MWCNT/GCE üzerinde 0.1 M H_2SO_4 çözeltisini karıştırarak CV ile elde edilen yükseltgenme pik akımları. Tarama hızı: 50 mV s^{-1} .

Şekil 4.3A. 9.25 μM oleuropeinin hazırlanan MWCNT/GCE üzerinde farklı destek elektrolitler kullanılarak elde edilen yükseltgenme pik akımlarını göstermektedir. Asidik ortamın daha yüksek pik akımları sağladığı görülmektedir. Diğer taraftan Şekil 4.3B. konsantrasyonları değişen (0.01, 0.05, 0.1, 0.5 ve 1.0 M) H_2SO_4 çözeltisinde 9.25 μM oleuropeine ait dögüsel voltammogramları

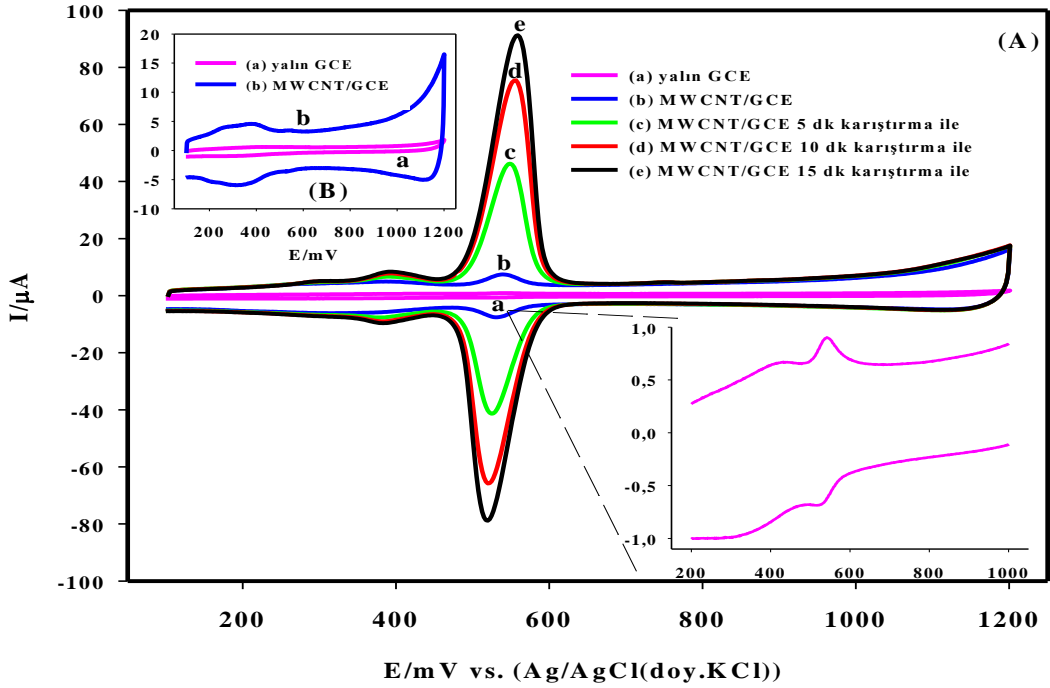
göstermektedir. Sonuçlara göre ideal destek elektrolit çözeltisi 0.1 M H₂SO₄ olarak seçilmiştir.



Şekil 4.3. (A) 9.25 μM oleuropeinin farklı destek elektrolitler kullanılarak 400 rpm de 15 dk. karıştırma sonrası, hazırlanan MWCNT/GCE üzerinde CV ile elde edilen yükseltgenme pik akımları. SHS, sodyum hidroksit çözeltisi; PBS, fosfat tampon çözeltisi; ABS, asetat tampon çözeltisi; NAS, nitrik asit çözeltisi; PAS, perklorik asit çözeltisi; TFABS, trifloroasetik asit tampon çözeltisi; TFAS, trifloroasetik asit çözeltisi; HAS, hidroklorik asit çözeltisi ve SAS, sülfürik asit çözeltisi (B) MWCNT/GCE üzerinde 9.25 μM oleuropeinin yükseltgenme pik akımına H₂SO₄ çözeltisinin konsantrasyon etkisi. Tarama hızı: 50 mV s⁻¹.

4.1.2. Oleuropeinin Yalın GCE ve MWCNT/GCE Üzerinde Elektrokimyasal Davranışı

Optimize edilen koşullarda 9.25 μM oleuropeinin yalın GCE ve MWCNT/GCE üzerinde elde edilen döngüsel voltammogramları Şekil 4.4.'de gösterilmiştir. Yalın GCE üzerinde oleuropeinin yükseltgenme pik potansiyeli 542 mV olarak saptanmıştır. MWCNT/GCE üzerinde oleuropeine ait anodik ve katodik piklerin potansiyelleri sırasıyla 559 mV ve 520 mV olarak gözlemlenmiştir. Oleuropeinin yükseltgenme pik akımı MWCNT/GCE üzerinde yaklaşık 14.5 kez yükselirken, yine MWCNT/GCE üzerinde söz konusu türün 15 dk. boyunca adsorpsiyonu ile ön deriştirilmesi sonucu elde edilen pik akımı yaklaşık 23.4 kez yükselmiştir. Sonuç olarak yalın GCE ile karşılaştırıldığında, oleuropeinin yükseltgenme pik akımı önerilen yöntem ile 340 kez artmıştır. Sonuçlar, oleuropeinin önerilen elektrot ile çok duyar bir şekilde tayin edilebileceğini göstermektedir.



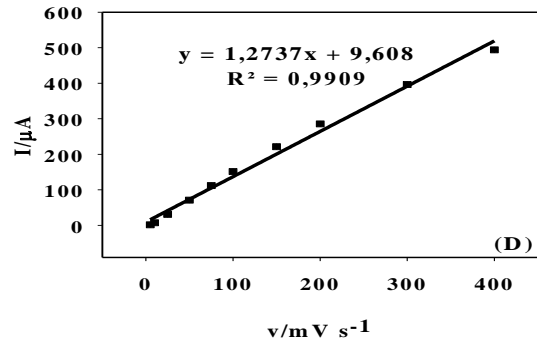
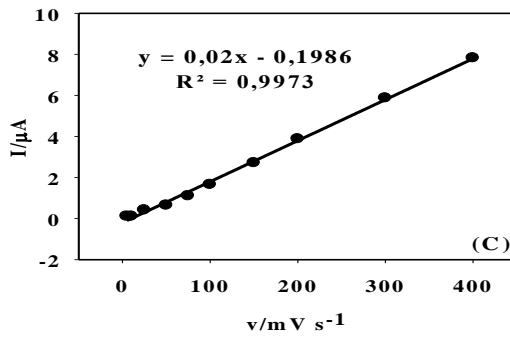
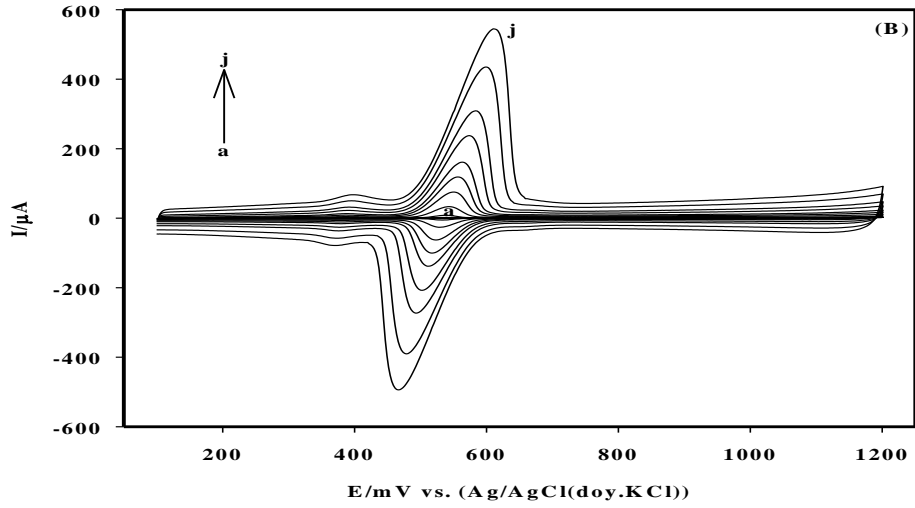
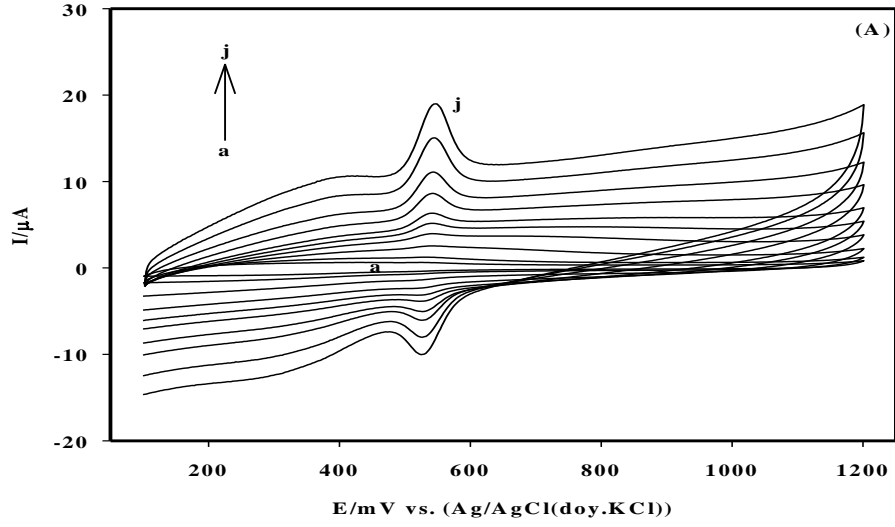
Şekil 4.4. (A) 0.1 M H_2SO_4 ortamında (a) yalın GCE üzerinde, (b) MWCNT/GCE üzerinde, (c) MWCNT/GCE üzerinde 5 dk. karıştırma sonrası, (d) MWCNT/GCE üzerinde 10 dk. karıştırma sonrası, (e) MWCNT/GCE üzerinde 15 dk. karıştırma sonrası 9.25 μM oleuropeine ait döngüsel voltammogramlar. (B) kör döngüsel voltammogramlar (a) yalın GCE, (b) MWCNT/GCE. Tarama hızı: 50 mV s^{-1} .

0.1 M H₂SO₄ ortamında yalın GCE (Şekil 4.5A) ve MWCNT/GCE (Şekil 4.5B) üzerinde 9.25 µM oleuropeinin yükseltgenmesi üzerine çeşitli tarama hızları (5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300 ve 400 mV s⁻¹) incelenmiştir. Tarama hızlarına karşı pik akımları grafiğe geçirilmiş ve her iki grafiğin de oldukça doğrusal olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.5C ve D). Bu durum söz konusu iki elektrot yüzeyindeki akımın adsorpsiyon kontrollü olduğunu göstermektedir.

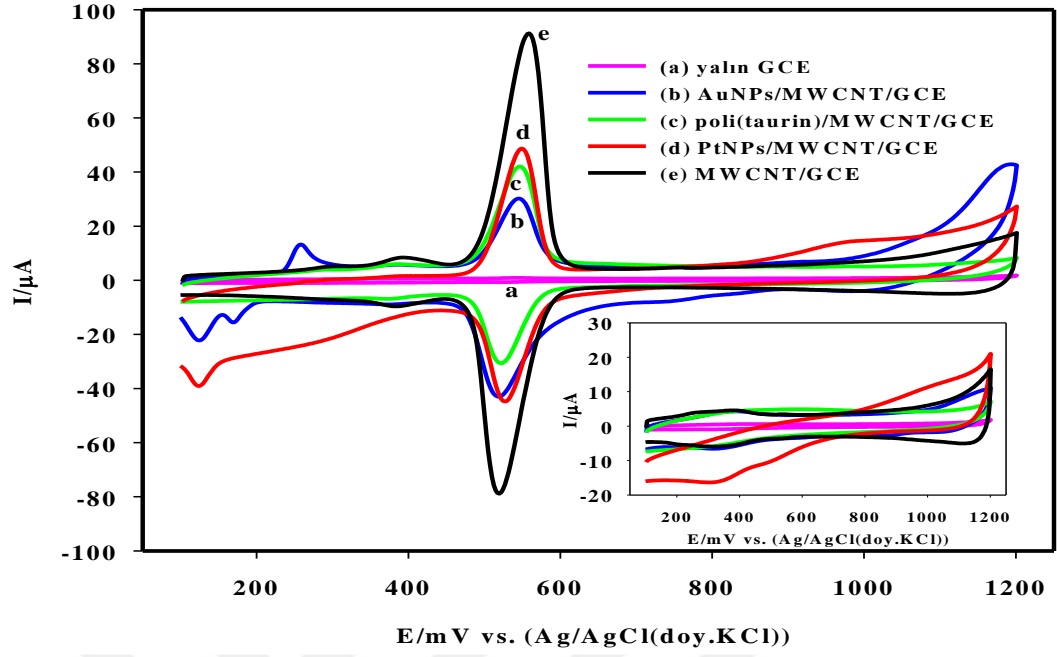
4.1.3. MWCNT/GCE Üzerine İletken Polimer ve Metal Nanoparçacık Modifiyesinin Etkisi

Oleuropeinin önerilen elektrot üzerine birikmesini daha iyi açıklayabilmek amacıyla, MWCNT/GCE üzerine iletken polimer film ve metal nanoparçacık gibi çeşitli ilave modifikasyonlar denenmiştir. Bu amaçla, taurin (1.0 mM) ve brom krezol moru (2.0 mM) monomerleri MWCNT/GCE yüzeyine elektrokimyasal olarak polimerleştirilmiştir. Diğer taraftan Au ve Pt nanoparçacıklar (NPs), türlerin asidik çözeltilerinden (0.1 M HCl çözeltisi ile hazırlanmış 1 mM HAuCl₄ ve 1 mM H₂PtCl₆) indirgenerek söz konusu elektrot yüzeyine modifiye edilmiştir.

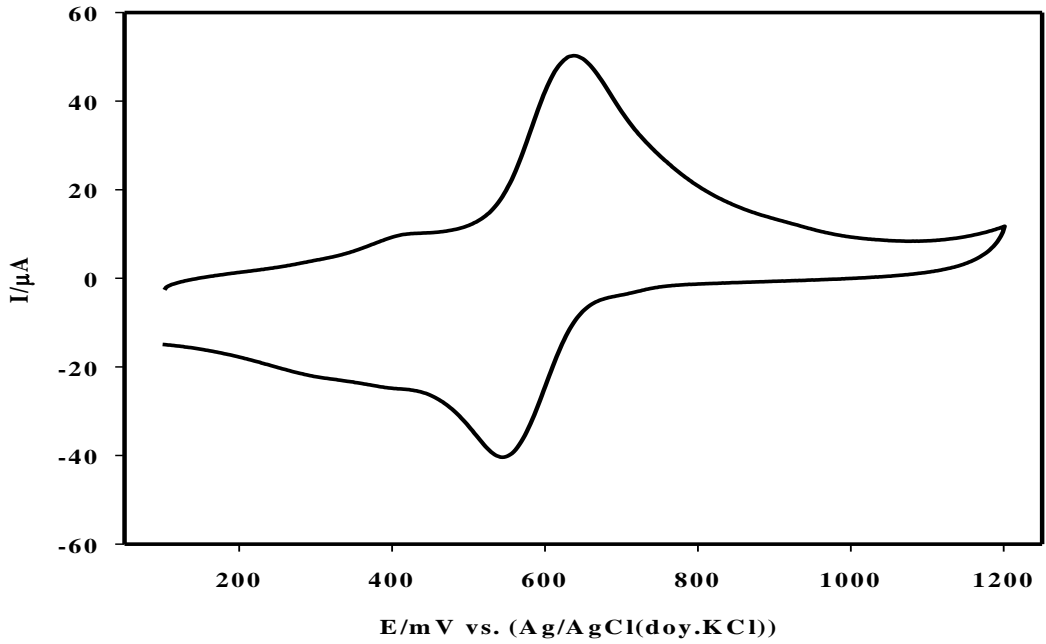
9.25 µM oleuropeinin 400 rpmde 15 dk. karıştırma sonrası 0.1 M H₂SO₄ ortamında yalın GCE, AuNPs/MWCNT/GCE, PtNPs/MWCNT/GCE, poli(taurin)/MWCNT/GCE ve MWCNT/GCE üzerinde elde edilen döngüsel voltammogramları Şekil 4.6.'de gösterilmiştir. Bununla birlikte hazırlanan poli(BCP)/MWCNT/GCE, oleuropeinin yükseltgenme potansiyeline karşılık gelen bölgede büyük bir anodik pik oluşturduğundan, oleuropeinin yükseltgenme pik akımını baskılamıştır (Şekil 4.7.). Bu nedenle poli(BCP)/MWCNT/GCE, oleuropein tayininde başarısız olmuştur.



Şekil 4.5. 0.1 M H₂SO₄ ortamında (A) yalnız GCE ve (B) MWCNT/GCE üzerinde 9.25 μM oleuropeinin çeşitli tarama hızlarında döngüsel voltammogramları. Oleuropeinin yükseltgenme akımının tarama hızına karşı (a-j): 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300 and 400 mV s⁻¹ oluşturulan grafiği (C) yalnız GCE, (D) MWCNT/GCE için.



Şekil 4.6. 9.25 μM oleuropeinin 15 dk. karıştırma sonrası 0.1 M H_2SO_4 ortamında (a) yalın GCE, (b) AuNPs/MWCNT/GCE, (c) PtNPs/MWCNT/GCE, (d) poli(taurin)/MWCNT/GCE ve (e) MWCNT/GCE üzerinde döngüsel voltammogramları. Zemin akımları arka planda verilmiştir. Tarama hızı: 50 mV s^{-1} .

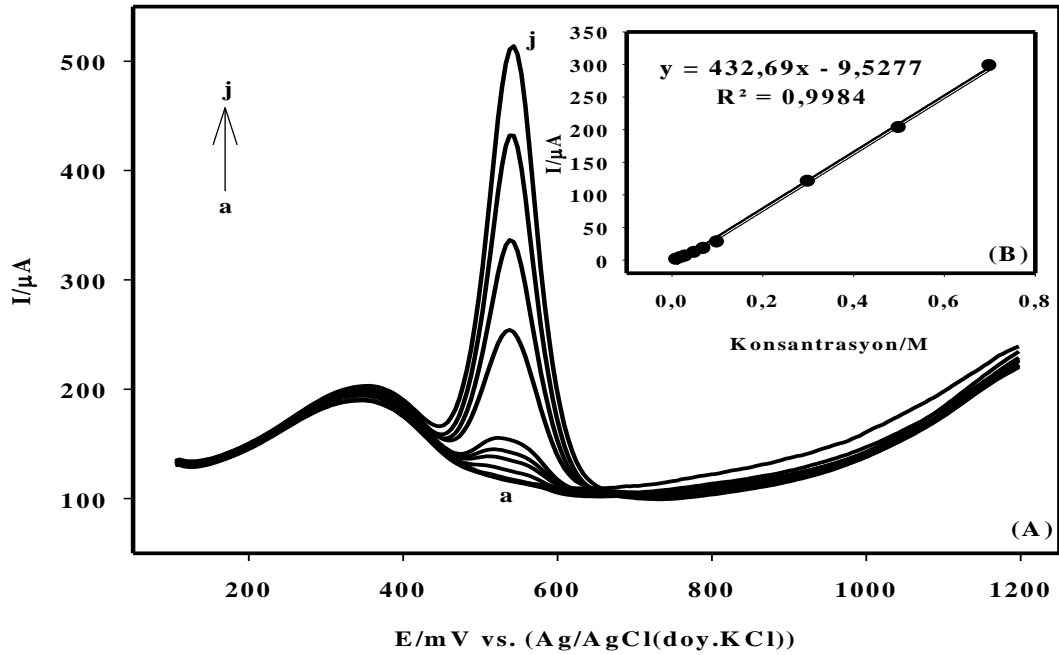


Şekil 4.7. poli(BCP)/MWCNT/GCE yüzeyinde destek elektrolit çözeltisine (0.1 M H_2SO_4) ait döngüsel voltammogram. Tarama hızı: 50 mV s^{-1} .

Sonuçlar, MWCNT/GCE yüzeyinin üzerine ilave edilen modifikasyonların (iletken polimer ve metal nanoparçacık), önerilen yüzey ile oleuropein arasındaki yüzey etkileşimini kısmen engellediğini ve eş derişimler için elde edilen oleuropein yükseltgenme pik akımlarını azalttığını göstermektedir.

4.1.4. Doğrusallık, Çalışma Aralığı, Belirtme ve Tayin Sınırları

Önerilen elektrot üzerinde oleuropeinin tayini kare dalga voltametri yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Bir dizi farklı konsantrasyondaki oleuropeine karşı okunan yükseltgenme pik akımları grafiğe geçirilmiştir. MWCNT/GCE üzerinde yaklaşık 540 mV potansiyel değerinde iyi tanımlanmış yükseltgenme pikleri Şekil 4.8A.'da gösterilmiştir. Elde edilen kalibrasyon eğrisi, yöntemin 0.01 - 0.70 μM çalışma aralığında 0.9984 korelasyon katsayısı ile oldukça doğrusal olduğunu göstermektedir (Şekil 4.8B.).



Şekil 4.8. (A) 0.1 M H_2SO_4 ortamında MWCNT/GCE üzerinde farklı konsantrasyonlardaki kare dalga voltammogramları (a–j): 0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.05, 0.07, 0.10, 0.30, 0.50 ve 0.70 μM oleuropein. Tarama hızı: 50 mV s^{-1} . (B) MWCNT/GCE üzerinde oleuropeine ait kalibrasyon eğrisi.

Belirtme (LOD) ve tayin (LOQ) sınırları sırasıyla $LOD=3SD/b$ ve $LOQ=10SD/b$ formülleri kullanılarak hesaplanmıştır (SD, 10 kör çözelti sinyalinin standart sapması; b, kalibrasyon eğrisinin eğimi). Önerilen elektrot için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 2.73 ve 9.09 nM olarak hesaplanmıştır.

Daha önce oleuropein tayini için bildirilen elektrotların karşılaştırılması Tablo 4.1.'de listelenmiştir. Verilere göre önerilen elektrotun belirtme sınırı oldukça düşüktür.

Tablo 4.1. Bazı oleuropein sensörlerinin karşılaştırılması

Elektrot	Yöntem	Ortam, pH	LOD (μ M)	LR (μ M)	Ref.
poli[Ni-(PPIX)]/GCE	Amperometri	0.01 M PBS, 7.0	1.21**	-	[89]
DNA kaplı CHIT/CPE	DPV	0.5 M PBS, 6.0	0.090***	0.30-12	[90]
SPE	DPV	10 mM GBS, 2.0	0.463*	-	[91]
MWCNT/GCE	SWV	0.1 M H ₂ SO ₄	0.00273	0.01-0.70	-

DPV, diferansiyel puls voltammetri; SWV, kare dalga voltammetri; GCE, camımsı karbon elektrot; CPE, karbon pasta elektrot; SPE, yüzey baskılı elektrot; MWCNT, çok duvarlı karbon nanotüp; poli[Ni-(PPIX)]/GCE, poli [Ni-(protoporphyrin IX)dimethyl ester]; CHIT, kitosan; PBS, fosfat tampon çözeltisi; GBS, glisin tampon çözeltisi, LOD, belirtme sınırı ve LR, doğrusal aralık.

LOD değerleri,

* kör standart sapmasının üç katının alınması yöntemi;

** gürültünün üç ile çarpılması yöntemi ve

*** bu çalışmada tarif edilen yöntem kullanılarak hesaplanmıştır.

4.1.5. Tekrarlanabilirlik

0.03, 0.10 ve 0.50 μ M oleuropein içeren üç farklı konsantrasyondaki standart çözelti, önerilen modifiye elektrodun gün-içi (herbir konsantrasyon için üç tekrar) ve günler-arası (herbir konsantrasyon için üç tekrar ve üç farklı gün) tekrarlanabilirliğini belirlemek için kullanılmıştır. Sonuçlar Tablo 4.2.'de gösterilmiştir. Gün-içi ve günler-arası tekrarlanabilirlik için sırasıyla hesaplanan %6.0 ve %9.9'dan daha düşük bağıl standart sapma (RSD) değerleri, yöntemin yeterince tekrarlanabilir olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.2. Gün-içi ve günler-arası tekrarlanabilirlik

Konsantrasyon (μM)	RSD (%)	
	Gün-içi (n=3)	Günler-arası (n=9)
0.03	5.9	9.1
0.10	4.2	8.2
0.50	4.6	9.8

RSD, bağıl standart sapma.

4.1.6. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon Yönteminin Geri Kazanımı

Zeytin yaprağı yüksek oranda oleuropein içermektedir. Bu nedenle düşük miktarda oleuropein standartlarının zeytin yaprağı üzerine standart ilave edilmesi ile gerçekleştirilen geri kazanım çalışmaları anlamsızdır. Oleuropeinin yalnızca *Oleaceae* familyasına ait bitkilerde bulunduğu bilindiğinden, ekstraksiyon yönteminin geri kazanımını hesaplamak için dut yaprağı kullanılmıştır. Geri kazanım çalışmaları 0.0100, 0.5000 ve 5.0000 mg oleuropein standartlarının 10 mg kurutulmuş dut yaprağı (her bir miktar için üç tekrar) üzerine ilave edilmesi ve standart katımlı örnekler MAE yönteminin uygulanması ile gerçekleştirilmiştir. Standart katımlı örnekler, ekstraksiyon işlemi sonrası LC-ESI-MS/MS yöntemi ile analizlenmiş (n=3) ve geri kazanılan analit miktarı hesaplanmıştır (Tablo 4.3.)

Tablo 4.3. Mikrodalga destekli ekstraksiyon yönteminin oleuropein için geri kazanım değerleri

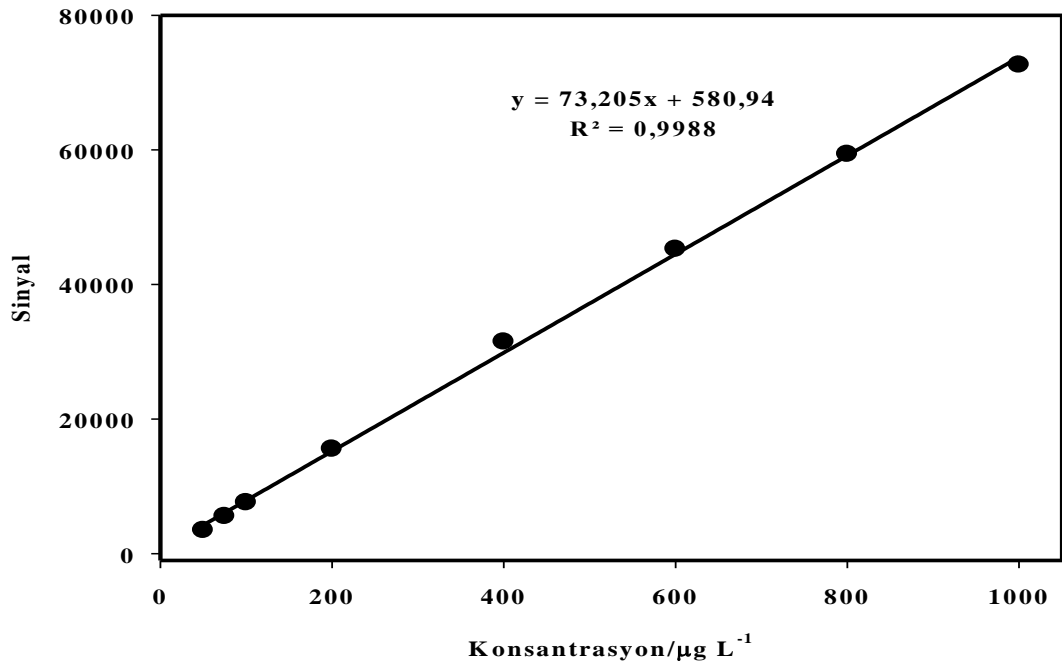
Ekilen miktar (mg)	Bulunan (mg)	Geri kazanım (%)	Ortalama geri kazanım (%) \pm SD
0.0100	0.0099	99	98 \pm 2
	0.0098	98	
	0.0096	96	
0.5000	0.4691	94	94 \pm 2
	0.4726	95	
	0.4614	92	
5.0000	4.6790	94	92 \pm 3
	4.6945	94	
	4.4645	89	

SD, standart sapma.

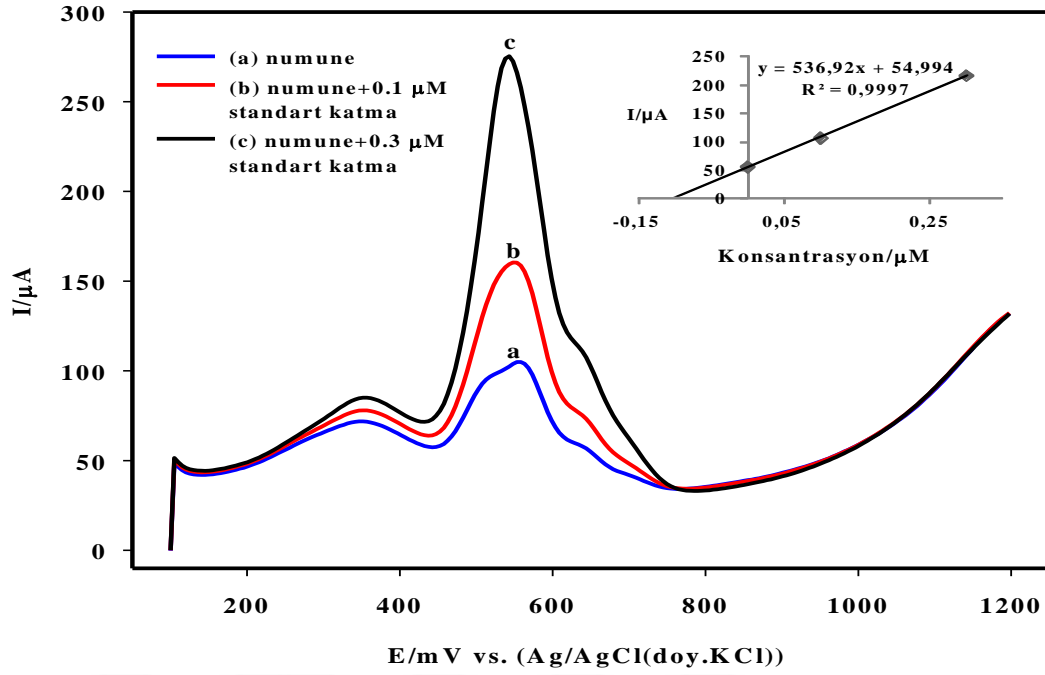
4.1.7. Zeytin Yaprağı Örneğinde Oleuropeinin Nicel Tayini

Toplanan zeytin yaprağı örneği karanlıkta, oda sıcaklığında kurutulmuş ve parçalanmıştır. 10 mg örnek mikrodalga ekstraksiyon tüplerine aktarılmış ve MAE yöntemi uygulanmıştır.

Önerilen elektrokimyasal yöntemin doğruluğunu belirlemek amacıyla örnek, voltammetrik ve kromatografik yöntemin her ikisi ile üç tekrar olarak analizlenmiştir. şekil 4.9.'de 50 ile 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ arasında değişen farklı konsantrasyondaki oleuropeinin LC-ESI-MS/MS yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrisi gösterilmektedir. Diğer taraftan, şekil 4.10. standart katma (0.1 ve 0.3 μM oleuropein) ile birlikte örnek için elde edilen kare dalga voltammogramlarını göstermektedir. Geliştirilen yöntem ve LC-ESI-MS/MS yöntemi için sırasıyla 16.5 ± 1.5 ve $15.7 \pm 1.1 \text{ mg g}^{-1}$ olarak bulunan sonuçlar uyum içerisinde-dir.



şekil 4.9. Oleuropein için LC-ESI-MS/MS yöntemi ile elde edilen tipik bir kalibrasyon eğrisi.



Şekil 4.10. (a) numune, (b) 0.1 μM , (c) 0.3 μM oleuropein standart katma sonrası elde edilen kare dalga voltammogramlar. Standart katma kalibrasyon eğrisi arka planda verilmiştir. Tarama hızı: 50 mV s^{-1} .

4.1.8. Girişim Çalışmaları

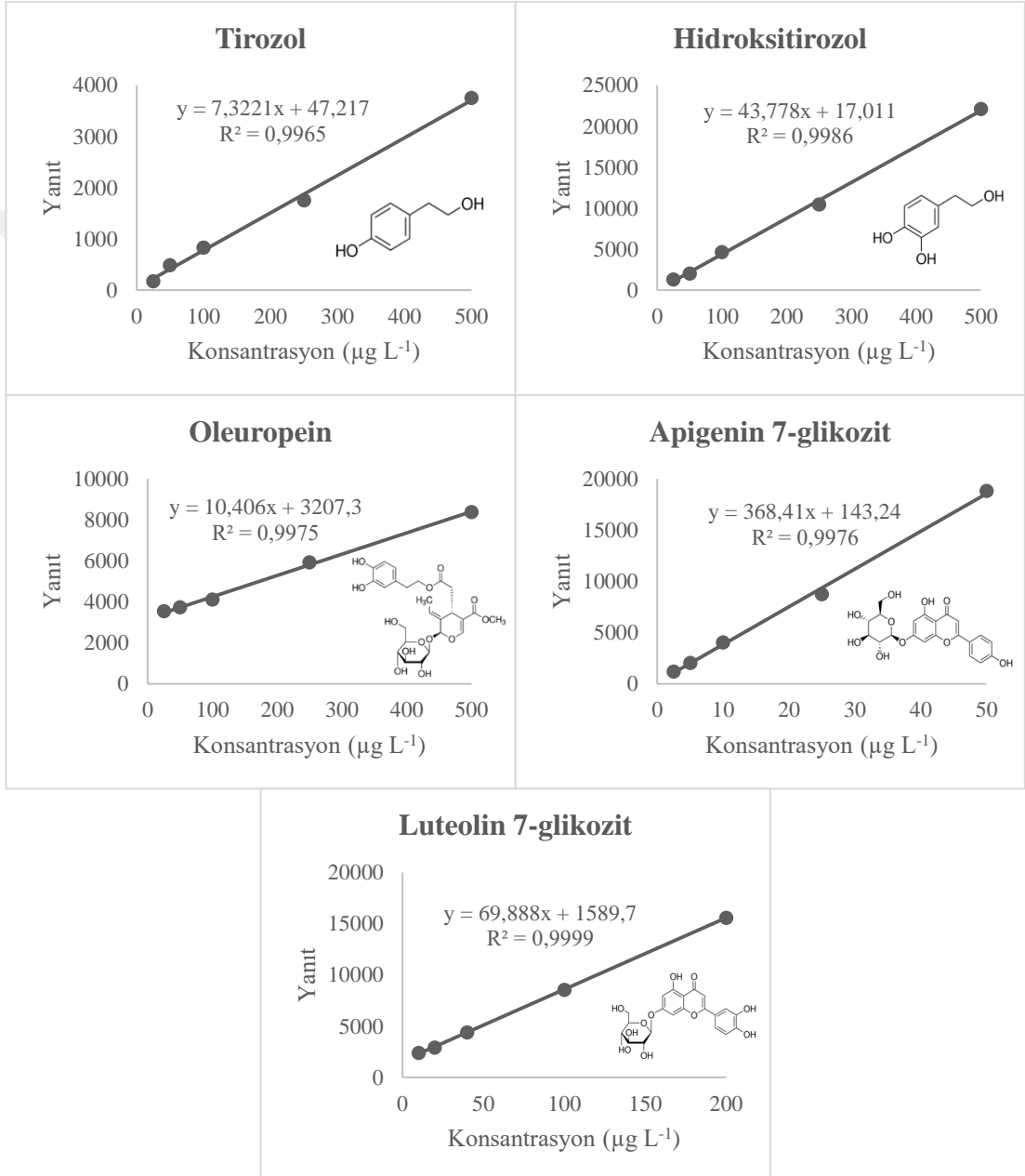
Önerilen elektrot ile oleuropein tayini sırasında bazı iyonların ve organik maddelerin girişim etkileri incelenmiştir. Oleuropein konsantrasyonunun 0.10 μM olduğu durumda, söz konusu konsantrasyon değerinin 100 katına kadar ortama eklenen Na^+ , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Pb^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , glikoz ve askorbik asit; 200 katına kadar eklenen NO_3^- analiz yöntemine herhangi bir girişimde bulunmamıştır.

4.2. Zeytin Yaprağı ve Zeytinyağı Örneklerinde Bazı Zeytin Biyofenollerinin LC-ESI-MS/MS Yöntemi ile Tayinleri

Çalışmanın bu bölümünde zeytin yaprağı ve zeytinyağı örneklerinde bulunan oleuropein, tirozol, hidroksitirozol, apigenin 7-glikozit ve luteolin 7-glikozit tayinleri için basit ve hızlı bir yöntem önerilmiştir.

4.2.1. Doğrusallık

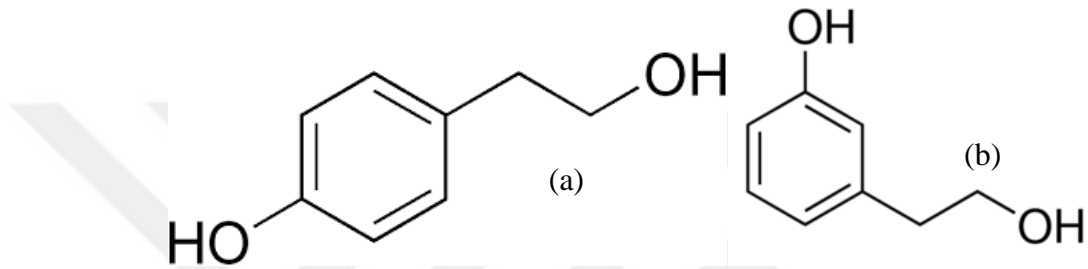
Doğrusallık çalışmaları tirozol, hidroksitirozol ve oleuropein için 25-500 µg L⁻¹; apigenin 7-glikozit için 2.5-50 µg L⁻¹ ve luteolin 7-glikozit için 10-200 µg L⁻¹ konsantrasyon aralığında bir dizi farklı standart çözelti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kalibrasyon eğrileri, yöntemin türler için belirtilen aralıklarda oldukça doğrusal olduğunu göstermektedir (Şekil 4.11.)



Şekil 4.11. Türlerine ait tipik kalibrasyon eğrileri.

4.2.2. Ekstraksiyon Yöntemlerinin Geri Kazanım Değerleri

Ekstraksiyon yöntemlerinin geri kazanımları zeytinyağı örneklerinde numune üzerine standart eklenmesi ve LC-ESI-MS/MS yöntemi ile tayin edilmesi yoluyla hesaplanmıştır (Tablo 4.4). Analit içeriğinin çok yüksek olduğu zeytin yaprağı örneklerinde ise tirozolün izomeri olan 2-(3-hidroksifenil)etanolün (ISTD) belirli oranda numune üzerine eklenmesi ve yine LC-ESI-MS/MS yöntemi ile tayin edilmesi yoluyla hesaplanmıştır (Tablo 4.5.). Söz konusu türlerin molekül şekilleri Şekil 4.12.'de verilmiştir.



Şekil 4.12. İzomer türlerin molekül şekilleri (a) tirozol, (b) 2-(3-hidroksifenil)etanol.

Tablo 4.4. Zeytinyağı örneklerinde UAE geri kazanımı

Analit	Geri Kazanım \pm SD (%)	
	Düşük Konsantrasyon*	Yüksek Konsantrasyon**
Oleuropein	97.9 \pm 6.5	111.0 \pm 0.9
Hidroksitirozol	101.4 \pm 5.7	105.7 \pm 4.6
Tirozol	99.8 \pm 2.8	102.6 \pm 6.8
Luteolin 7-glikozit	91.0 \pm 11.9	97.6 \pm 12.6
Apigenin 7-glikozit	79.0 \pm 10.9	86.2 \pm 9.3

SD, standart sapma.

*Düşük konsantrasyon değerleri apigenin 7-glikozit, oleuropein, luteolin 7-glikozit için sırasıyla 5, 10, 25 $\mu\text{g L}^{-1}$, hidroksitirozol ve tirozol için 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ 'dir.

**Yüksek konsantrasyon değerleri apigenin 7-glikozit, oleuropein, luteolin 7-glikozit için sırasıyla 10, 20, 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, hidroksitirozol ve tirozol için 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ 'dir.

Tablo 4.5. Zeytin yaprağı örneklerinde MAE geri kazanımı

ISTD	Eklene ISTD konsantrasyonu ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Geri Kazanım \pm SD (%)
2-(3-hidroksifenil)etanol	50.0	103.8 \pm 0.6

ISTD, iç standart; SD, standart sapma

4.2.3. Biyofenollerin Nicel Tayinleri

Temin edilen zeytinyağı ve zeytin yaprağı örneklerinde tespit edilen biyofenoller Tablo 4.6.'da verilmiştir.

Tablo 4.6. Zeytin yaprağı ve zeytinyağı örneklerinde biyofenol miktarları

Analit	Numune türü	
	Zeytin yaprağı	Zeytinyağı
Oleuropein	263 \pm 14 mg g ⁻¹	2.4 \pm 0.1 ng g ⁻¹
Hidroksitirozol	209 \pm 12 $\mu\text{g g}^{-1}$	10.5 \pm 0.6 $\mu\text{g g}^{-1}$
Tirozol	9.6 \pm 0.6 $\mu\text{g g}^{-1}$	14.7 \pm 0.9 $\mu\text{g g}^{-1}$
Luteolin 7-glikozit	4.9 \pm 1.2 mg g ⁻¹	17.1 \pm 4.2 ng g ⁻¹
Apigenin 7-glikozit	315 \pm 7 $\mu\text{g g}^{-1}$	0.9 \pm 0.1 ng g ⁻¹

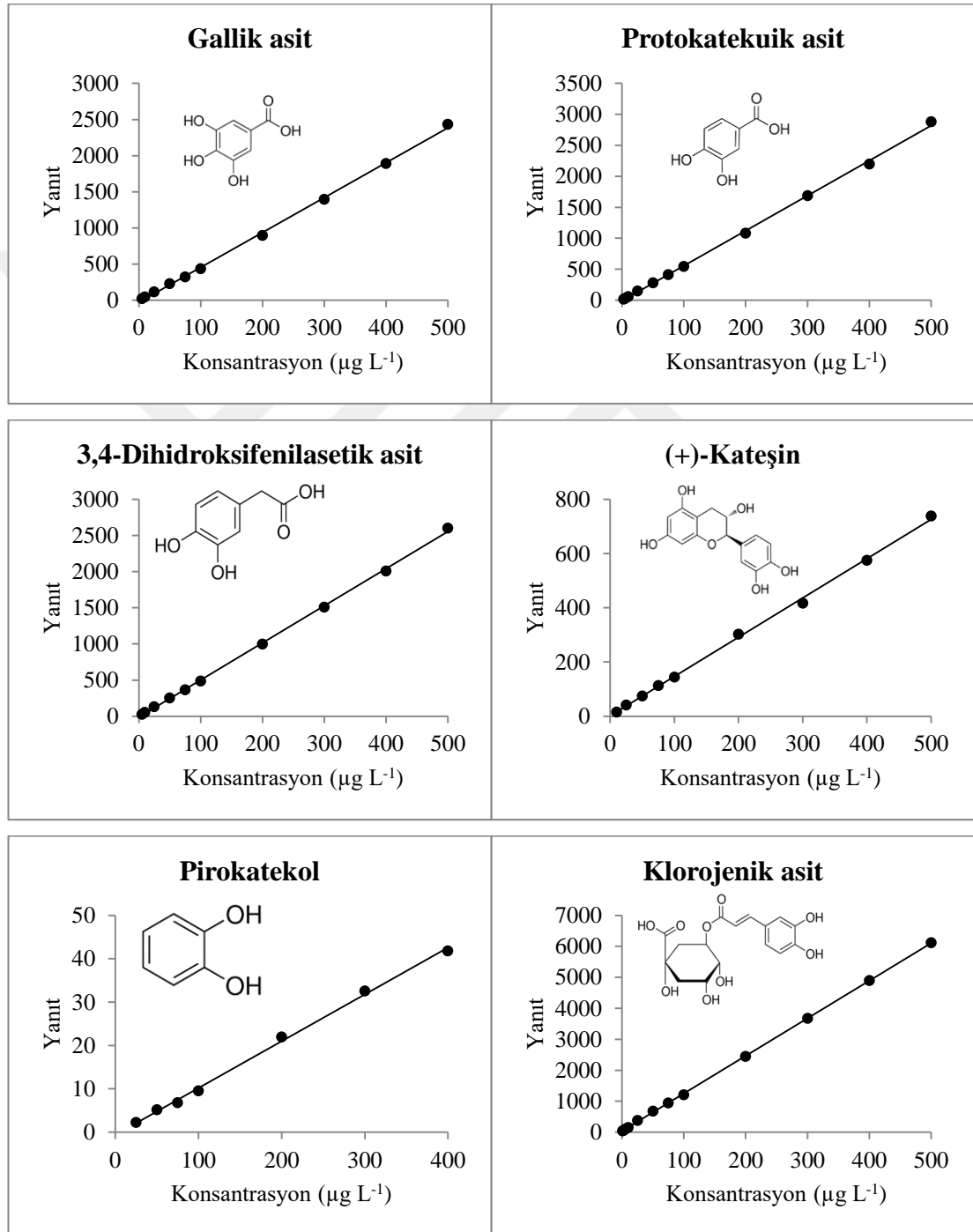
4.3. Zeytin Yaprığı Örneklerinde Diğer Bazı Fenolik Bileşiklerin LC-ESI-MS/MS Yöntemi ile Tayinleri için Yöntem Validasyonu

Çalışmanın bu bölümünde, 31 adet fenolik bileşiğin tayinlerinin eş zamanlı olarak gerçekleştirildiği bir LC-ESI-MS/MS yöntemi tarif edilmiştir. Yöntem, zeytin yaprağı ekstraktında bulunan fenolik bileşiklerin tayinleri için valide edilmiştir. Diğer taraftan önerilen yöntem kullanılarak, bir zeytin numunesi ekstraktındaki fenolik bileşiklerin nicel tayinleri gerçekleştirilmiştir.

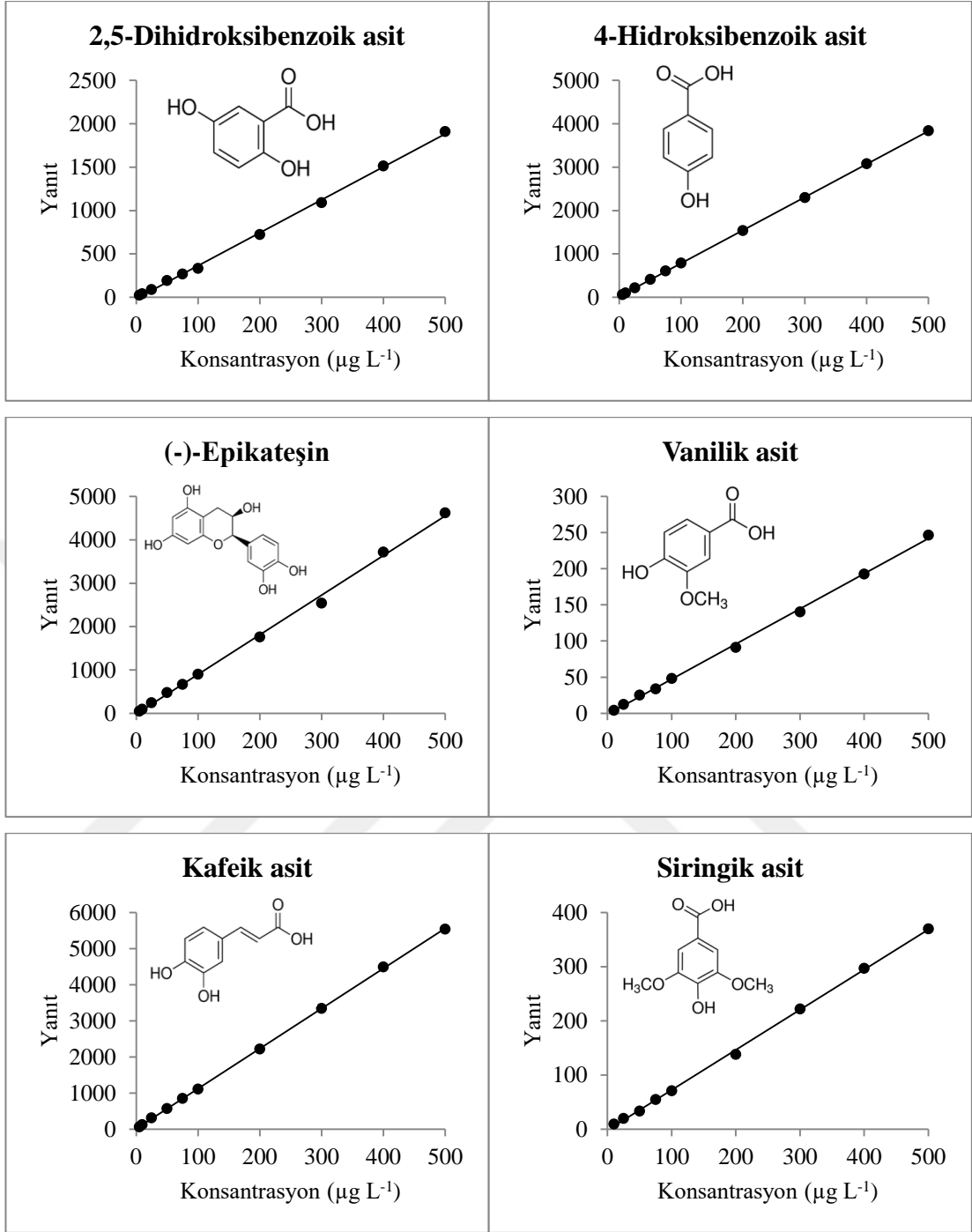
4.3.1. Doğrusallık, Belirtme ve Tayin Sınırları

Bir dizi farklı konsantrasyonlardaki fenolik bileşik standartları ile oluşturulan kalibrasyon eğrileri Şekil 4.13.'de her bir tür için ayrı ayrı verilmiştir. Kalibrasyon eğrilerini oluşturmak için kullanılan ve fenoliklere göre 1-500 $\mu\text{g L}^{-1}$ konsantrasyon aralığında değişkenlik gösteren en az 7 nokta üç paralel olarak enjekte edilmiştir. Tablo 4.7.'da gösterildiği gibi, analitler için elde edilen kalibrasyon denklemlerinin korelasyon katsayıları 0.9916'dan daha yüksektir.

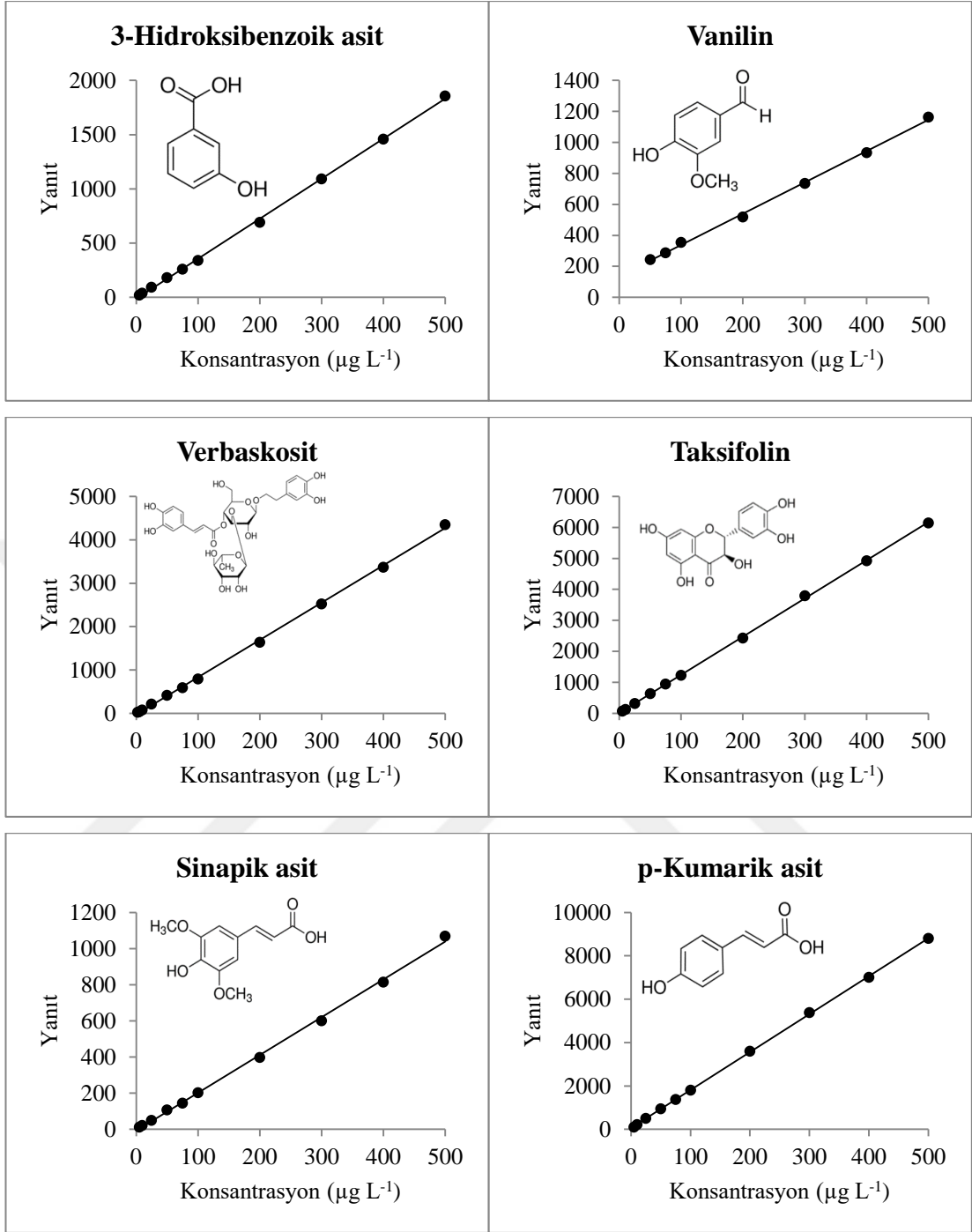
Diğer taraftan, LOD ve LOQ değerleri $LOD=3S_a/b$ ve $LOQ=10S_a/b$ formülleri kullanılarak hesaplanmıştır (S_a , düşük derişimde standart çözelti sinyallerinin standart sapması; b , kalibrasyon eğrisinin eğimi). Türlerin LOD ve LOQ değerleri Tablo 4.7.'da topluca verilmiştir.



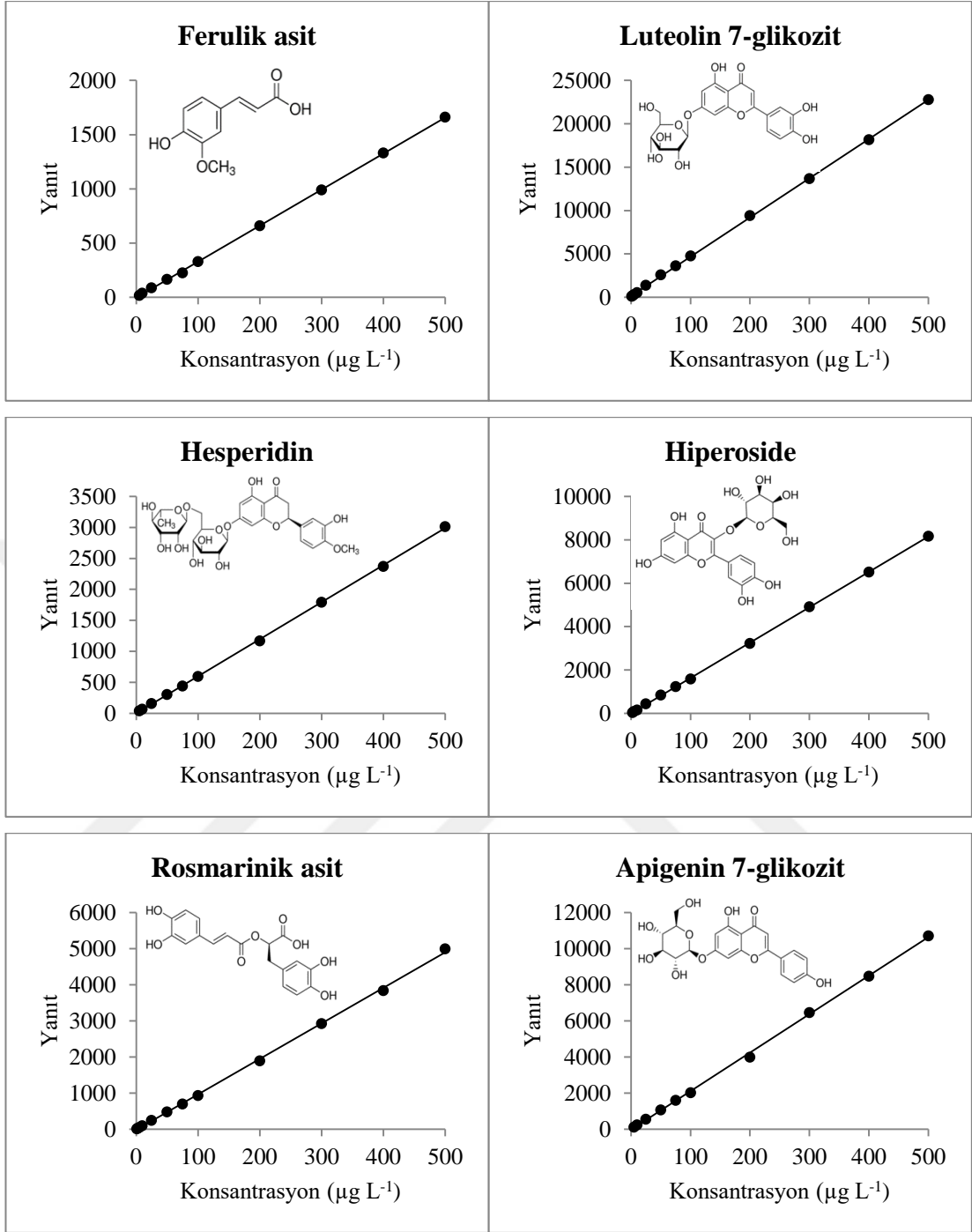
Şekil 4.13. Fenolik bileşiklerin kalibrasyon eğrileri.



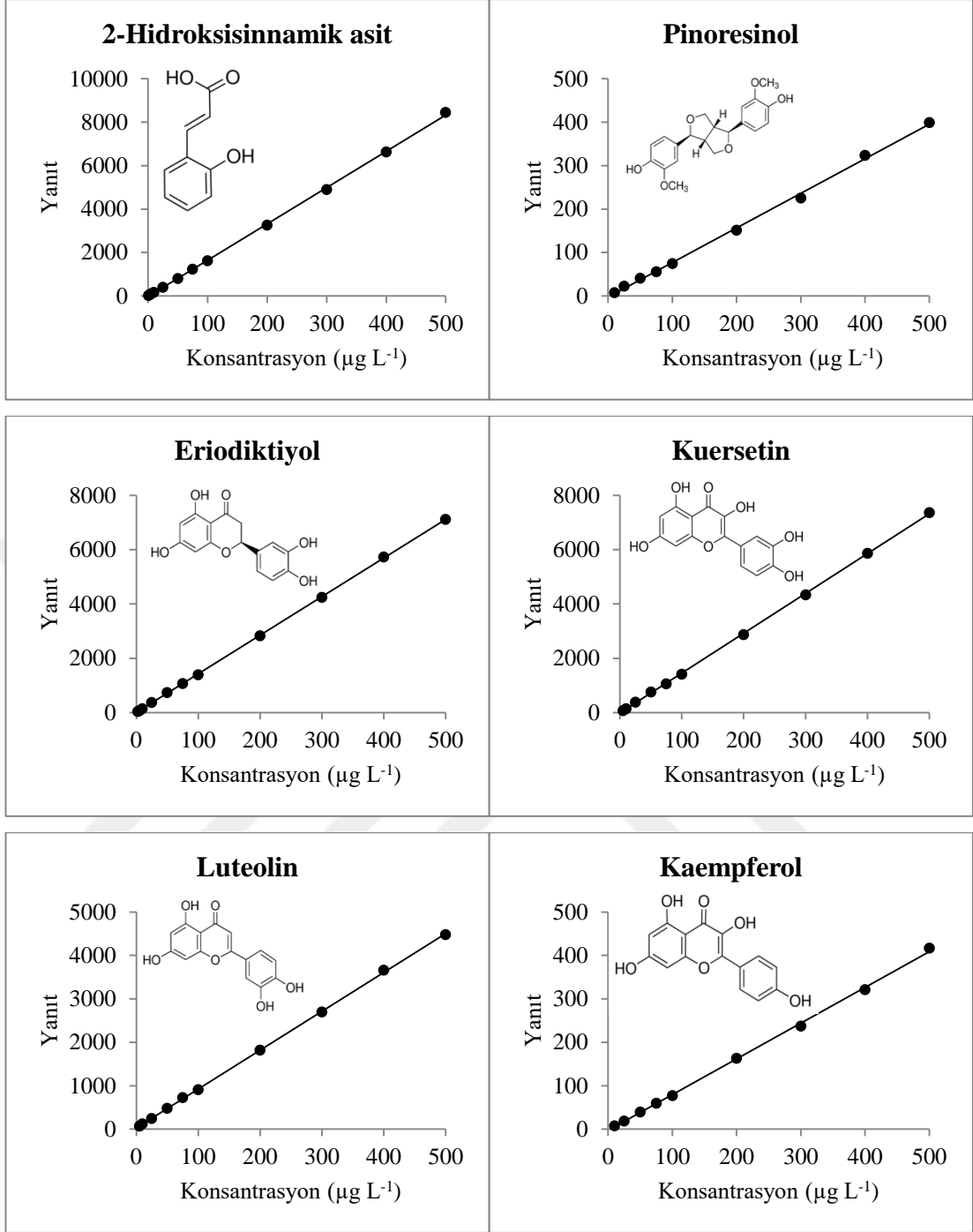
Şekil 4.13. Fenolik bileşiklerin kalibrasyon eğrileri (devamı).



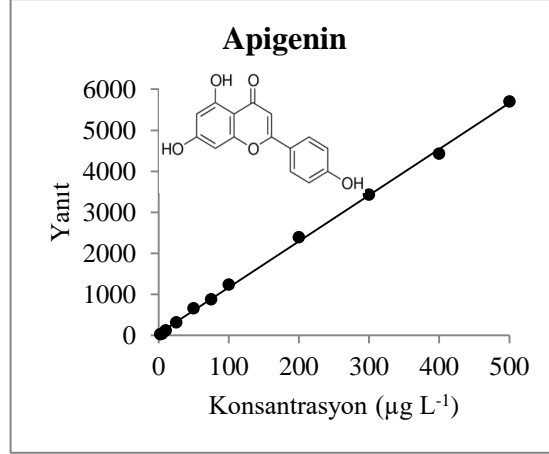
Şekil 4.13. Fenolik bileşiklerin kalibrasyon eğrileri (devamı).



Şekil 4.13. Fenolik bileşiklerin kalibrasyon eğrileri (devamı).



Şekil 4.13. Fenolik bileşiklerin kalibrasyon eğrileri (devamı).



Şekil 4.13. Fenolik bileşiklerin kalibrasyon eğrileri (devamı).

4.3.2. Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik

Üç farklı konsantrasyondaki kalibrasyon standartları ve bir zeytin yaprağı numunesi (aynı numuneden MAE yöntemi ile elde edilen ekstraktlar), önerilen yöntemin gün-içi (her bir konsantrasyon ve ekstrakt için üç tekrar) ve günler-arası (her bir konsantrasyon ve ekstrakt için üç tekrar ve üç farklı gün) tekrarlanabilirliğini belirlemek için kullanılmıştır. Tablo 4.8.'de gösterildiği gibi fenolik bileşikler için hesaplanan gün-içi ve günler-arası tekrarlanabilirliklerin bağıl standart sapmaları sırasıyla %9.4 ve %16'dan daha düşüktür.

Tablo 4.7. Fenolik bileşiklerin doğrusallık ve duyarlık özellikleri

Bileşik	Doğrusallık ve duyarlık özellikleri				
	Aralık ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Regresyon		LOD ($\mu\text{g g}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g g}^{-1}$)
		Doğrusal denklem	R ²		
Gallik asit	5-500	$y = 4.82x - 26.48$	0.9988	0.15	0.49
Protokatekuik asit	2.5-500	$y = 5.65x - 9.99$	0.9990	0.12	0.39
3,4-Dihidroksifenilasetik asit	5-500	$y = 5.13x - 12.39$	0.9990	0.14	0.45
(+)-Kateşin	10-500	$y = 1.45x + 1.95$	0.9974	0.40	1.3
Pirokatekol	25-400	$y = 0.11x - 0.52$	0.9916	0.96	3.2
Klorojenik asit	1-500	$y = 12.14x + 32.34$	0.9995	0.05	0.18
2,5-Dihidroksibenzoik asit	5-500	$y = 3.79x - 14.12$	0.9980	0.21	0.71
4-Hidroksibenzoik asit	5-500	$y = 7.62x + 22.79$	0.9996	0.17	0.57
(-)-Epikateşin	5-500	$y = 9.11x - 9.99$	0.9971	0.19	0.62
Kafeik asit	5-500	$y = 11.09x + 16.73$	0.9997	0.26	0.85
Vanilik asit	10-500	$y = 0.49x - 1.61$	0.9968	0.31	1.1
Siringik asit	10-500	$y = 0.74x - 1.54$	0.9975	0.38	1.3
3-Hidroksibenzoik asit	5-500	$y = 3.69x - 12.29$	0.9991	0.19	0.62
Vanilin	50-500	$y = 2.02x + 135.49$	0.9926	1.5	5.1
Verbaskosit	2.5-500	$y = 8.59x - 28.05$	0.9988	0.08	0.27
Taksifolin	5-500	$y = 12.32x + 9.98$	0.9993	0.18	0.61
Sinapik asit	5-500	$y = 2.09x - 6.79$	0.9974	0.26	0.88
p-Kumarik asit	5-500	$y = 17.51x + 53.73$	0.9997	0.19	0.64
Ferulik asit	5-500	$y = 3.32x - 4.30$	0.9992	0.14	0.48
Luteolin 7-glikozit	1-500	$y = 45.25x + 156.48$	0.9996	0.05	0.15
Hesperidin	5-500	$y = 5.98x + 0.42$	0.9993	0.17	0.58
Hiperoside	2.5-500	$y = 16.32x - 1.26$	0.9998	0.10	0.33
Rosmarinik asit	1-500	$y = 9.82x - 17.98$	0.9989	0.06	0.19
Apigenin 7-glikozit	1-500	$y = 21.33x - 31.69$	0.9983	0.04	0.14
2-Hidroksisinnamik asit	1-500	$y = 16.72x - 26.94$	0.9996	0.06	0.20
Pinoresinol	10-500	$y = 0.80x - 2.69$	0.9966	0.39	1.3
Eriodiktiyol	2.5-500	$y = 14.24x - 0.50$	0.9998	0.08	0.27
Kuersetin	5-500	$y = 14.68x - 18.25$	0.9997	0.12	0.41
Luteolin	5-500	$y = 8.96x + 26.80$	0.9992	0.13	0.45
Kaempferol	10-500	$y = 0.82x - 3.06$	0.9959	0.33	1.1
Apigenin	2.5-500	$y = 11.29x + 38.05$	0.9987	0.10	0.32

LOD, belirtme sınırı; LOQ, tayin sınırı

Tablo 4.8. Gün-içi ve günler-arası tekrarlanabilirlik

Bileşik	Gün-içi (%RSD, n=3)				Günler-arası (%RSD, n=9)			
	Düş.	Orta	Yük.	Eks.	Düş.	Orta	Yük.	Eks.
Gallik asit	2.9	0.6	0.5	1.8	9.9	2.0	3.4	13
Protokatekuik asit	1.9	1.0	0.7	1.3	9.5	1.5	2.6	6.4
3,4-Dihidroksifenilasetik asit	4.3	1.7	0.7	1.1	9.6	3.1	2.7	14
(+)-Kateşin	5.6	3.8	2.6	nd	7.9	7.7	3.9	nd
Pirokatekol	9.4	6.2	3.5	nd	15	9.5	9.1	nd
Klorojenik asit	1.7	0.3	0.3	6.0	9.5	2.6	1.7	13
2,5-Dihidroksibenzoik asit	7.4	1.5	1.1	2.9	10	2.2	1.8	12
4-Hidroksibenzoik asit	4.3	1.9	1.4	3.9	11	3.3	2.5	5.7
(-)-Epikateşin	4.0	9.0	0.4	nd	9.3	9.8	5.0	nd
Kafeik asit	4.1	1.0	0.7	1.9	11	2.0	1.4	9.7
Vanilik asit	7.3	5.3	1.9	4.0	11	6.7	4.5	9.7
Siringik asit	5.6	3.2	1.3	3.5	8.4	4.0	4.3	14
3-Hidroksibenzoik asit	5.7	2.0	1.0	nd	9.2	2.4	1.5	nd
Vanilin	6.2	2.5	2.2	nd	8.1	3.7	4.8	nd
Verbaskosit	3.5	2.6	2.2	5.6	15	3.0	3.0	16
Taksifolin	4.6	0.8	0.2	2.6	8.4	1.9	1.4	9.3
Sinapik asit	3.1	2.9	2.2	2.9	9.0	2.9	4.3	7.3
p-Kumarik asit	3.0	0.4	0.8	2.3	15	3.1	2.1	8.8
Ferulik asit	7.3	1.2	0.4	3.9	9.2	3.8	1.9	9.8
Luteolin 7-glikozit	2.3	0.3	0.5	2.9	6.9	2.8	2.0	12
Hesperidin	5.5	1.3	0.7	3.5	9.6	3.0	2.4	6.9
Hiperoside	1.8	1.4	0.5	5.1	11	2.7	3.7	8.4
Rosmarinik asit	2.3	1.9	0.5	nd	9.2	2.7	2.4	nd
Apigenin 7-glikozit	1.5	0.7	0.5	2.9	6.4	4.0	4.2	6.8
2-Hidroksisinnamik asit	5.1	1.9	0.6	nd	11	2.5	1.6	nd
Pinoresinol	3.6	3.1	2.3	5.5	15	6.8	4.6	13
Eriodiktiyol	3.7	1.9	0.8	2.8	11	2.3	1.4	9.2
Kuersetin	2.3	0.7	0.7	4.7	7.4	1.5	1.0	9.8
Luteolin	2.9	0.3	0.1	0.9	6.3	1.8	2.8	4.4
Kaempferol	7.9	2.6	0.8	3.7	9.7	4.0	4.1	10
Apigenin	6.7	1.4	0.4	4.9	9.0	4.6	5.3	5.8

Düş., düşük konsantrasyon; Ort., orta konsantrasyon; Yük., yüksek derişim; Eks., ekstraksiyon; RSD, bağıl standart sapma; nd., zeytin yaprağı ekstraktında tespit edilememiştir. Düşük konsantrasyon, klorojenik asit, apigenin 7-glikozit, luteolin 7-glikozit, rosmarinik asit ve 2-hidroksisinnamik asit için $2.5 \mu\text{g L}^{-1}$; protokatekuik asit, verbaskosit, hiperoside, eriodiktiyol ve apigenin için $5 \mu\text{g L}^{-1}$; gallik asit, 3,4-dihidroksifenilasetik asit, 2,5-dihidroksibenzoik asit, 4-hidroksibenzoik asit, (-)-epikateşin, kafeik asit, 3-hidroksibenzoik asit, taksifolin, sinapik asit, p-kumarik asit, ferulik asit, hesperidin, kuersetin ve luteolin için $10 \mu\text{g L}^{-1}$; (+)-kateşin, vanilik asit, siringik asit, pinoresinol ve kaempferol için $25 \mu\text{g L}^{-1}$; pirokatekol için $50 \mu\text{g L}^{-1}$; vanilin için $75 \mu\text{g L}^{-1}$ dir. Orta ve yüksek konsantrasyon değerleri sırasıyla 200 and $400 \mu\text{g L}^{-1}$ dir.

4.3.4. Geri Kazanım ve Yöntemin Uygulanabilirliği

Geri kazanım çalışmaları, 0.1 g zeytin yaprağı örneğine farklı miktarlarda fenolik bileşik standardı ilave edilmesi ve standart katımlı örneklerin MAE tekniğine tabi tutulması sonrası LC-ESI-MS/MS yöntemi ile tayin edilmesi yoluyla gerçekleştirilmiştir. Geri kazanılan analit miktarları hesaplanmıştır. Tablo 4.9.'de verildiği gibi; her durumda %78.1 ile %108.7 arasında değişen nicel geri kazanım değerleri elde edilmiştir.

Çalışmada önerilen ve valide edilen yöntemin uygulanabilirliği, bir zeytin yaprağı ekstraktının içerdiği fenolik bileşiklerin üç tekrarlı tayinleri ile değerlendirilmiştir. Nicel tayinler için Şekil 4.13.'de verilen kalibrasyon eğrileri kullanılmıştır. Zeytin yaprağı ekstraktında, (+)-kateşin, pirokatekol, (-)-epikateşin, 3-hidroksibenzoik asit, vanilin, rosmarinik asit ve 2-hidroksisinnamik asit tespit edilmemiştir. Zeytin yaprağı ekstraktının fenolik bileşen içeriği Tablo 4.9.'de verilmiştir.

4.3.5. Matriks Etkisi

ESI-MS yöntemi ile gerçekleştirilen nicel analizlerde önemli bir dezavantaj matriks etkisinin gözlenebilme olasılığıdır. ESI, sinyal baskılamasına veya daha az sıklıkla analitin sinyalinin güçlenmesine neden olabilecek matriks bileşenlerine duyarlıdır [92–96]. Bu nedenle önerilen analitik yöntemin matriks etkisini incelemek önemlidir. Zeytin yaprağı için kör matrikslerin bulunmaması nedeniyle, yöntemin matriks etkisi, fenolik bileşiklerin $10 \mu\text{g g}^{-1}$ olduğu konsantrasyonda belirlenmiştir (Tablo 4.10.). Fenolik bileşikler için matriks etkileri, $A(\text{matriks} + \text{std})$ 'nın standart eklemeli matrikse verilen yanıt; $A(\text{matriks})$ 'nın yalnızca matrikse verilen yanıt ve $A(\text{std})$ 'nın sadece standarda verilen yanıt olduğu üç pik alanının karşılaştırılması yolu ile göreceli olarak aşağıdaki eşitlik yardımıyla hesaplanmıştır [97].

$$ME(\%) = \left[\frac{A(\text{matriks} + \text{std}) - A(\text{matriks})}{A(\text{std})} - 1 \right] \times 100(\%) \quad (4.1)$$

4.3.6. Kararlılık

Numune ekstraktının kararlılığı, önerilen MAE yöntemi kullanılarak hazırlanan zeytin yaprağı ekstraktının, hazırlandıktan 0, 2, 4, 6 ve 8 saat sonra

enjekte edilmesi ile değerlendirilmiştir. Aynı ekstrakt için elde edilen yanıtlar Tablo 4.10.'da bağıl standart sapmalar ile ifade edilmiştir. Sonuçlar önerilen yöntem ile hazırlanan ekstraktların 8 saat boyunca kararlı olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.9. Zeytin yaprağı ekstraktında fenolik bileşiklerin nicel tayinleri ve önerilen yöntemin geri kazanım değerleri

Bileşik	İçerik ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Düşük konsantrasyon (n=3)			Yüksek konsantrasyon (n=3)		
		Std. ilave ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Bulunan ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Geri kazanım (%)	Std. ilave ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Bulunan ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Geri kazanım (%)
1	2.58±0.56	5.00	7.63±0.34	101.1±5.3	50.00	55.65±1.38	106.1±2.4
2	17.48±3.70	5.00	20.54±2.91	97.1±0.9	50.00	66.75±1.35	98.5±5.0
3	0.47±0.06	5.00	4.80±0.02	86.5±1.4	50.00	48.01±4.17	95.1±8.4
4	nd	5.00	5.15±0.29	103.0±5.9	50.00	50.96±0.66	101.9±1.3
5	nd	5.00	5.33±0.31	106.7±6.1	50.00	48.33±2.42	96.7±4.8
6	2.67±0.08	5.00	7.30±0.25	92.7±6.3	50.00	51.19±1.60	97.0±3.4
7	5.54±1.00	5.00	10.50±0.76	99.1±5.3	50.00	56.68±1.23	102.3±2.1
8	15.31±0.98	5.00	20.23±1.02	98.4±7.6	50.00	65.83±0.69	101.0±0.7
9	nd	5.00	4.49±0.08	89.8±1.6	50.00	48.22±0.55	96.4±1.1
10	15.34±3.11	5.00	19.92±3.29	91.7±3.7	50.00	66.59±2.98	102.5±1.6
11	15.87±4.59	5.00	20.63±5.00	95.1±8.5	50.00	70.23±4.24	108.7±3.8
12	2.72±0.98	5.00	7.92±0.51	104.1±9.5	50.00	50.70±2.21	95.9±6.3
13	nd	5.00	5.14±0.27	102.9±5.5	50.00	49.98±1.49	100.0±3.0
14	nd	5.00	4.94±0.32	98.9±6.5	50.00	50.01±0.34	100.0±0.7
15	2912.4±183.9	-	-	-	2500.0	4774.1±57.3	78.1±7.7
16	8.21±1.18	5.00	11.92±1.77	85.1±15.7	50.00	54.50±0.74	92.6±2.9
17	4.89±1.24	5.00	9.34±1.87	88.9±13.2	50.00	53.59±4.05	97.4±6.0
18	81.07±9.21	5.00	81.12±6.63	91.5±3.5	50.00	123.93±6.54	85.7±7.6
19	45.53±9.78	5.00	50.19±9.62	93.3±6.1	50.00	94.57±9.22	98.1±9.2
20	2247.2±90.9	100.0	2342.7±132.8	94.9±4.3	1000.0	3171.5±31.2	97.0±3.2
21	304.05±9.52	35.00	337.49±9.49	95.6±1.7	350.00	602.98±27.95	85.4±6.3
22	66.92±5.72	5.00	68.63±3.60	89.2±17.7	50.00	114.04±2.65	94.2±9.2
23	nd	5.00	4.88±0.15	97.7±3.1	50.00	49.46±1.36	98.9±2.7
24	346.89±17.11	30.00	369.42±18.88	94.9±1.6	300.00	610.66±26.89	87.9±3.6
25	nd	5.00	4.67±0.22	93.4±4.3	50.00	47.09±1.21	94.2±2.4
26	4.01±0.66	5.00	8.36±1.62	87.3±13.6	50.00	46.74±4.35	85.5±9.3
27	6.77±0.58	5.00	11.41±0.33	94.2±9.3	50.00	50.45±2.69	87.3±6.5
28	40.40±3.33	5.00	42.96±0.87	89.5±5.5	50.00	87.25±2.68	93.7±1.7
29	219.60±3.93	5.00	223.63±5.19	94.6±1.8	50.00	263.39±6.72	87.6±6.7
30	2.86±0.77	5.00	7.55±0.42	93.8±10.7	50.00	50.25±1.64	94.8±3.3
31	92.51±25.98	5.00	107.52±27.39	100.4±0.5	50.00	154.88±30.87	104.8±6.9

1-31 sırasıyla gallik asit, protokatekuik asit, 3,4-dihidroksifenilasetik asit, (+)-kateşin, pirokatekol, klorojenik asit, 2,5-dihidroksibenzoik asit, 4-hidroksibenzoik asit, (-)-epikateşin, kafeik asit, vanilik asit, siringik asit, 3-hidroksibenzoik asit, vanilin, verbaskosit, taksifolin, sinapik asit, p-kumarik asit, ferulik asit, luteolin 7-glikozit, hesperidin, hiperoside, rosmarinik asit, apigenin 7-glikozit, 2-hidroksisinnamik asit, pinoresinol, eriodiktiyol, kuersetin, luteolin, kaempferol ve apigenini temsil etmektedir. Std., standart; nd, zeytin yaprağı ekstraktında tespit edilememiştir.

Tablo 4.10. Önerilen yöntemin matriks etkisi ve ekstrakt kararlılığı

Bileşik	Matriks etkisi (% , n=3)	Kararlılık (%RSD, n=3)
Gallik asit	-4.5 (1.1) ^a	8.0
Protokatekuik asit	-5.6 (1.7)	3.5
3,4-Dihidroksifenilasetik asit	-6.5 (1.4)	13
(+)-Kateşin	-3.3 (1.5)	nd
Pirokatekol	-5.6 (0.3)	nd
Klorojenik asit	-3.2 (0.9)	3.4
2,5-Dihidroksibenzoik asit	-5.4 (0.3)	5.8
4-Hidroksibenzoik asit	-5.9 (1.5)	4.7
(-)-Epikateşin	-7.3 (0.9)	nd
Kafeik asit	-7.5 (1.7)	8.2
Vanilik asit	-11 (1.9)	13
Siringik asit	-8.1 (2.9)	11
3-Hidroksibenzoik asit	-9.7 (1.8)	nd
Vanilin	-0.6 (0.3)	nd
Verbaskosit	-9.2 (2.6)	5.4
Taksifolin	-4.2 (1.8)	9.1
Sinapik asit	-10 (1.8)	9.9
p-Kumarik asit	-2.4 (1.0)	3.3
Ferulik asit	-10 (0.4)	2.9
Luteolin 7-glikozit	-8.5 (1.6)	7.8
Hesperidin	-3.6 (1.8)	2.1
Hiperoside	-7.3 (1.6)	3.7
Rosmarinik asit	-4.3 (1.8)	nd
Apigenin 7-glikozit	-7.6 (2.5)	4.1
2-Hidroksisinnamik asit	-11 (1.9)	nd
Pinoresinol	-17 (3.5)	17
Eriodiktiyol	-16 (1.6)	3.3
Kuersetin	9.8 (2.3)	2.7
Luteolin	-16 (3.1)	8.0
Kaempferol	-11 (2.3)	16
Apigenin	-2.7 (0.8)	2.4

^a Standart sapma (SD)

RSD, bağıl standart sapma; nd, zeytin yaprağı ekstraktında tespit edilememiştir.

4.3.7. Zeytin Örneğinde Bulunan Fenolik Bileşiklerin Nicel Tayinleri

Zeytin yaprağında bazı fenolik bileşiklerin tayinleri için önerilen ve valide edilen LC-ESI-MS/MS yöntemi, bir zeytin numunesi ekstraktı içerisinde bulunan fenolik bileşiklerin belirlenmesi için kullanılmıştır. Nicel tayinler için Şekil 4.13.'de verilen kalibrasyon eğrileri ile üç tekrar olarak gerçekleştirilmiştir. Zeytin numunesi ekstraktında bulunan fenolik bileşiklerin miktarları, daha önce verilen zeytin yaprağı numunesinin içeriği ile karşılaştırmalı olarak Tablo 4.11.'de birlikte verilmiştir.

Tablo 4.11. Zeytin ve zeytin yaprağı ekstraktlarında fenolik bileşiklerin nicel tayinleri

Bileşik	İçerik ($\mu\text{g g}^{-1}$)	
	Zeytin (n=3)	Zeytin yaprağı (n=3)
Gallik asit	nd	2.58±0.56
Protokatekuik asit	14.0±1.01	17.5±3.70
3,4-Dihidroksifenilasetik asit	nd	0.47±0.06
(+)-Kateşin	nd	nd
Pirokatekol	nd	nd
Klorojenik asit	3.96±0.09	2.67±0.08
2,5-Dihidroksibenzoik asit	nd	5.54±1.00
4-Hidroksibenzoik asit	3.43±0.18	15.3±0.98
(-)-Epikateşin	nd	nd
Kafeik asit	1.58±0.13	15.3±3.11
Vanilik asit	12.6±1.00	15.9±4.59
Siringik asit	nd	2.72±0.98
3-Hidroksibenzoik asit	nd	nd
Vanilin	nd	nd
Verbaskosit	19.4±4.23	2912±184
Taksifolin	8.23±1.16	8.21±1.18
Sinapik asit	nd	4.89±1.24
p-Kumarik asit	2.23±0.10	81.1±9.21
Ferulik asit	0.67±0.06	45.5±9.78
Luteolin 7-glikozit	736±52.7	2247±90.9
Hesperidin	1549±62.5	304±9.52
Hiperoside	80.5±6.98	66.9±5.72
Rosmarinik asit	nd	nd
Apigenin 7-glikozit	43.1±7.55	346±17.1
2-Hidroksisinnamik asit	nd	nd
Pinoresinol	2.59±0.13	4.01±0.66
Eriodiktiyol	11.6±0.50	6.77±0.58
Kuersetin	26.3±3.79	40.4±3.33
Luteolin	298±34.5	219±3.93
Kaempferol	68.9±5.95	2.86±0.77
Apigenin	17.4±1.44	92.5±26.0

Zeytin numunesi ekstraktında; gallik asit, 3,4-dihidroksifenilasetik asit, (+)-kateşin, pirokatekol, 2,5-dihidroksibenzoik asit, (-)-epikateşin, siringik asit, 3-hidroksibenzoik asit, vanilin, sinapik asit, rosmarinik asit ve 2-hidroksisinnamik asit tespit edilmemiştir. Söz konusu türlerden gallik asit, 3,4-dihidroksifenilasetik asit, 2,5-dihidroksibenzoik asit, siringik asit ve sinapik asit yalnızca zeytin numunesi ekstraktında tespit edilmezken, bahsi geçen diğer türlere her iki numune türü ekstraktlarında da rastlanmamıştır. Zeytin yaprağı ekstraktı ile karşılaştırıldığında zeytin numunesi ekstraktı, genel olarak, gerek içerdiği fenolik bileşik sayısı

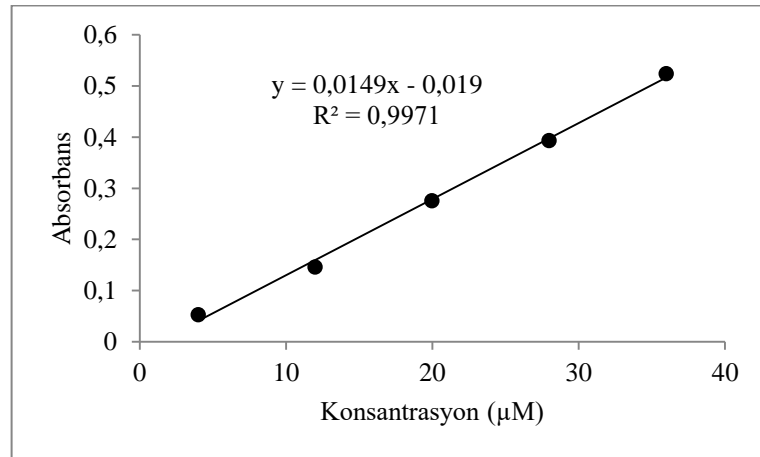
açısından ve gerekse de içerdiği fenolik türlerin miktarları bakımından daha fakirdir. Örneğin; zeytin yaprağı ekstraktında 4-hidroksibenzoik asit, kafeik asit, verbaskosit, p-kumarik asit, ferulik asit, luteolin 7-glikozit, apigenin 7-glikozit, kuersetin ve apigenin, zeytin numunesi ekstraktına göre kaydedeğer miktarda yüksek bulunmuştur. Diğer taraftan, yalnızca hesperidin ve kaempferol miktarları, zeytin numunesi ekstraktında zeytin yaprağı ekstraktına göre önemli oranda yüksek tespit edilmiştir.

4.4. Zeytin Yaprağı Örneğinin Toplam Antioksidan Kapasitesi, Toplam Fenolik Madde Miktarı ve Radikal Süpürme Kapasitesinin Belirlenmesi

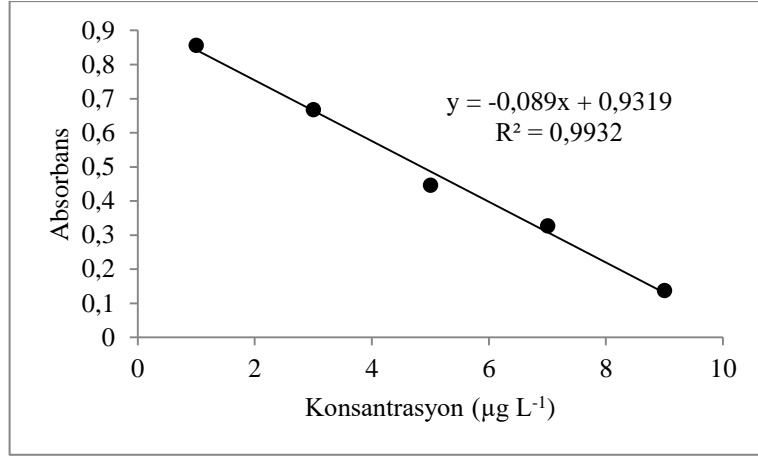
Çalışmanın son bölümünde, bir zeytin yaprağı numunesinden iki farklı ekstraksiyon yöntemi (MAE ve IE) ile ekstrakte edilen çözeltilerin toplam antioksidan kapasitesi, toplam fenolik madde miktarı ve radikal süpürme kapasitesi sırasıyla CUPRAC, Folin-Ciocalteu ve DPPH yöntemleri ile belirlenmiştir.

4.4.1. Kalibrasyon Eğrileri

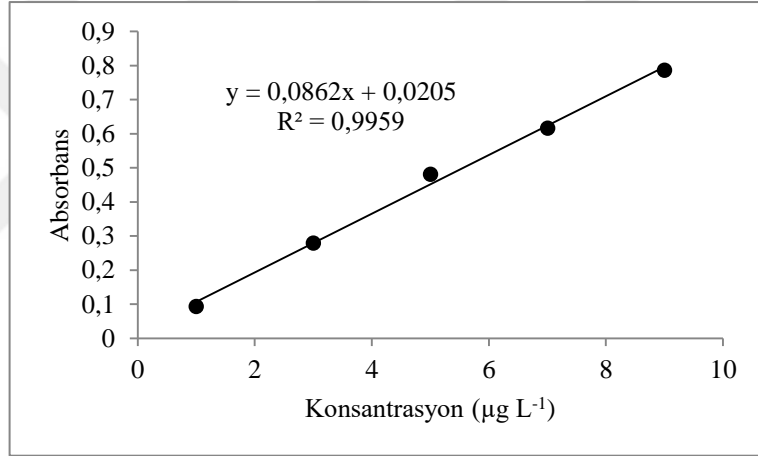
CUPRAC, DPPH ve Folin-Ciocalteu yöntemleri için standartlar (CUPRAC ve DPPH için troloks; Folin-Ciocalteu için gallik asit) ile elde kalibrasyon grafikleri sırasıyla Şekil 4.14., Şekil 4.15. ve Şekil 4.16.'da verilmiştir.



Şekil 4.14. CUPRAC yöntemi için troloks ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi.



Şekil 4.15. DPPH yöntemi için troloks ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi.



Şekil 4.16. Folin-Ciocalteu yöntemi için gallik asit ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi.

4.4.2. Zeytin Yaprağı Ekstraktının Toplam Antioksidan Kapasitesi, Toplam Fenolik Madde Miktarı ve Radikal Süpürme Kapasitesi

Karanlıkta, oda sıcaklığında kurutulan ve parçalanmış zeytin yaprağı numunesinin iki farklı teknik ile elde edilen ekstraktlarının toplam antioksidan kapasitesi, toplam fenolik madde miktarı ve radikal süpürme kapasitesi sırasıyla CUPRAC, Folin-Ciocalteu ve DPPH yöntemleri ile üç tekrar olarak belirlenmiştir. Hesaplamalar Şekil 4.14., Şekil 4.15. ve Şekil 4.16. verilen kalibrasyon grafikleri ile gerçekleştirilmiş, sonuçlar CUPRAC ve DPPH yöntemleri için troloks eşdeğeri cinsinden, Folin-Ciocalteu yöntemi için ise gallik asit eşdeğeri cinsinden Tablo 4.12.'de verilmiştir.

Tablo 4.12. Zeytin yaprağı ekstraktının toplam antioksidan kapasitesi, toplam fenolik madde miktarı ve radikal süpürme kapasitesi

Analiz	Ekstraksiyon Yöntemi	
	MAE	IE
TAOK (mg TE/ g örnek)	193.9±3.0	185.8±13.0
RSK (mg TE/g örnek)	2.04±0.05	1.42±0.04
TFMM (mg GAE/g örnek)	66.6±1.3	65.1±3.3

TAOK, toplam antioksidan kapasitesi; RSK, radikal süpürme kapasitesi; TFMM, toplam fenolik madde miktarı; TE, troloks eşdeğeri; GAE, gallik asit eşdeğeri.

Sonuçlar, zeytin yaprağı numunesinden iki farklı ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ekstraktların TAOK ve TFMM içeriği açısından oldukça yakın olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan, MAE yöntemi kullanılarak elde edilen ekstrakt için hesaplanan RSK, IE yöntemi kullanılarak elde edilen ekstrakt çözeltisine oranla daha yüksek bulunmuştur.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Fitoterapide fonksiyonel veya işlevsel gıda olarak adlandırılan birçok sebze ve meyveye karşı içerdikleri mineral, vitamin ve doğal antioksidanlar nedeniyle giderek artan bir ilgi oluşmaktadır [3, 98]. Zeytin (*Olea europaea* L.) meyvesi, yağı ve yaprağı ile birlikte antioksidan kaynağı olan fenolik bileşikler bakımından oldukça zengindir. Özellikle zeytin yaprakları fenolik bileşiklerin ucuz kaynaklarındanındır.

Diğer taraftan, zeytin ağacı ülkemizin bulunduğu coğrafi konum ve sahip olduğu iklim özellikleri sayesinde ülkemizde bolca yetişmektedir. Bu nedenle mükemmel derecede antioksidan kaynakları olan ve ülkemiz açısından önemli ticari değere sahip sofralık zeytin, zeytinyağı ve zeytin yapraklarında söz konusu fenolik bileşiklerin nicel tayinleri için analitik yöntemlerin geliştirilmesi önem arz etmektedir.

Yalnızca zeytingiller (*oleaceae*) familyasına özgü bitkilerde bulunan, sekoiridoid grubuna ait oleuropein, oldukça güçlü bir antioksidan olup, zeytin yaprağının fenolik türler açısından en baskın bileşenidir. Çalışmanın ilk bölümünde literatürde tayinine genel olarak kromatografik yöntemlerin öncülük ettiği oleuropeinin zeytin yaprağındaki miktarının duyarlı bir şekilde belirlenmesi için MWCNT modifiye GCE kullanılarak gerçekleştirilen kare dalga voltammetrik bir yöntem önerilmiştir.

Oleuropeinin oldukça geniş yüzey alanına sahip MWCNT üzerine olan olağanüstü adsorpsiyon ilgisi nedeniyle geliştirilen yöntem, yalnız GCE kullanılarak gerçekleştirilen klasik yönteme göre yaklaşık 340 kez daha duyar hale gelmiş ve önerilen yöntem adsorptif sıyırma kare dalga voltammetri olarak adlandırılmıştır.

Literatürde sıklıkla yükseltgenme-indirgenme tepkimelerine elektrokatalitik etkiler gösterdiği belirtilen yalnız GCE üzerine metal nanoparçacık ya da iletken polimer modifiye girişimleri, önerilen yüzey ile oleuropein arasındaki adsorpsiyon ilişkisini kısmen engelleyerek eş derişimler için elde edilen oleuropein yükseltgenme pik akımını azaltması nedeniyle tarif edilen yöntemde başarısız olmuştur. Oleuropein

yükseltgenme pik akımlarının tarama hızlarına karşı oldukça doğrusal olan grafikleri, önerilen elektrot yüzeyindeki akımın adsorpsiyon kontrollü olduğunu destekler niteliktedir.

Geliştirilen elektrot nispeten dar olan (kütle spektrometresi ile eşleşmiş sıvı kromatografik yöntemler ile kıyaslandığında) 0.01 ile 0.70 μM konsantrasyon aralığında 0.9984 korelasyon katsayısı ile oldukça doğrusal çalışmaktadır. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 2.73 ve 9.09 nM olarak hesaplanmıştır. Oleuropein tayini için çeşitli elektrotlar kullanılarak gerçekleştirilen bazı elektrokimyasal yöntemler bildirilmiştir [89-91]. Söz konusu elektrotlar için verilen ve 0.09 ile 1.21 μM arasında değişen belirtme sınırları, bu çalışmada önerilen elektrodun belirtme sınırı ile kıyaslandığında bir hayli yüksektir. Bu durum önerilen yöntemin oldukça duyar oleuropein analizi gerçekleştirmeye imkân sağladığını göstermektedir. Diğer taraftan, gün-içi ve günler-arası kesinlik için elde edilen ve sırasıyla %6.0 ve %9.9'dan daha düşük olan bağıl standart sapma değerleri, voltammetrik yöntemin yeterince tekrarlanabilir olduğunu belirtmektedir. Oleuropeinin nicel analizi öncesi kullanılan MAE yönteminin geri kazanım değerleri %92 ile %98 arasında değişmektedir. Ayrıca, aynı zeytin yaprağı numunesi için önerilen voltammetrik yöntem ve LC-ESI-MS/MS yöntemi kullanılarak elde edilen sonuçlar uyum içerisindedir.

Sonuç olarak; oleuropein tayini için önerilen söz konusu elektrokimyasal sensör, kromatografik yöntemler ile karşılaştırıldığında, pratikliği ve düşük maliyeti nedeniyle cazip hale gelmekte ve var olan tekniklere iyi bir alternatif oluşturmaktadır.

Çalışmanın ikinci aşamasında zeytin yaprağı ve zeytinyağı örneklerinde bulunan oleuropein, tirozol, hidroksitirozol, apigenin 7-glikozit ve luteolin 7-glikozit tayinleri için basit ve hızlı bir LC-ESI-MS/MS yöntemi önerilmiştir. Analiz öncesi zeytin yaprağı ekstraksiyonu için tercih edilen MAE tekniği ile zeytinyağı ekstraksiyonu için tercih edilen UAE tekniklerinin her ikisi için hesaplanan ve %79 ile %106 arasında değişkenlik gösteren fenolik madde geri kazanım değerleri, zeytin yaprağı ve zeytinyağı numunelerindeki söz konusu bileşenlerin tayinlerinin önerilen yöntem kullanılarak kolayca gerçekleştirilebileceğini göstermektedir. Bununla

birlikte, oleuropeinin zeytin yapraklarında literatür ile paralellik gösteren ve kütlege yaklaşık %26'ya ulaşan miktarları oldukça ilgi çekicidir [3].

Sıvı kromatografik yöntemlerde, oleuropein için çalışmanın bir bölümünde oldukça düşük bir eğim ile elde edilen doğrusallık grafiği (Şekil 4.11.), hareketli fazın organik bileşen türünün değiştirilmesi yoluyla giderilmiştir (Şekil 4.9.). Metanol yerine asetonitril olarak değiştirilen hareketli faz B'nin, düşük çözücü viskozitesinin ince damlacıklar üretmek için daha ideal olması nedeniyle ESI verimliliğini arttırdığı düşünülmektedir [99]. Diğer taraftan, analitin elüsyonu sırasında hareketli fazın asidik özelliğinin artırılması, silanol gruplarının baskılanarak, pik şeklinin daha iyi olması ile sonuçlanabilmektedir [100]. Organik faza eklenen %0.1 asetik asit, hareketli faz B bileşiminin oldukça yüksek olduğu gradient programının sonlarına doğru elüe edilen oleuropeinin pik şeklini iyileştirilmiştir. Bu etkiler sonucu, oleuropein için alınan sinyal ve dolayısıyla doğrusallık grafiğinin eğimi başarıyla artırılmıştır.

Çalışmanın bir sonraki bölümünde ise; gıda ürünlerinde sıklıkla rastlanan 31 adet fenolik bileşiğin tayinlerinin eş zamanlı olarak gerçekleştirildiği bir LC-ESI-MS/MS yöntemi tarif edilmiştir. Yöntem, zeytin yaprağı ekstraktında bulunan fenolik bileşiklerin tayinleri için valide edilmiştir.

Önerilen yöntem $1-500 \mu\text{g L}^{-1}$ (aralık, fenolik bileşik türlerine göre farklılık göstermektedir.) konsantrasyon aralığında, en düşüğü 0.9916 olan korelasyon katsayısı değerleri ile oldukça doğrusaldır. LOQ değerleri fenolik türlere göre $0.14 \mu\text{g g}^{-1}$ ile $3.2 \mu\text{g g}^{-1}$ arasında değişkenlik göstermektedir. Yöntem tekrarlanabilirliği, kalibrasyon standartlarının yanı sıra bir zeytin yaprağı numunesinden MAE tekniğiyle elde edilen çözeltiler (aynı numuneden MAE yöntemi ile elde edilen ekstraktlar) ile birlikte eş zamanlı olarak gerçekleştirilen analizler yardımıyla değerlendirilmiştir. Kesinlik için gün-içi %9.4 ve günler-arası %16'dan daha düşük hesaplanan bağıl standart sapma değerleri, analiz ve ekstraksiyon yöntemlerinin oldukça tekrarlanabilir olduğunu göstermektedir. MAE yöntemi söz konusu analitler için %78.1 ile %108.7 arasında değişen oranlarda geri kazanım değerleri sağlamış ve yine söz konusu ekstraksiyon yöntemi kullanılarak hazırlanan ekstraktların 8 saat boyunca kararlı kaldığı belirlenmiştir. Matris bileşenlerine oldukça duyar olan ESI

teknikinin önerilen yöntemde kullanılması sonucu, en yüksek %17 oranında olmak üzere fenolik bileşiklerin sinyallerinin bir miktar baskılandığı (yöntemde matriks etkisi, fenolik bileşiklerden kuersetin hariç tüm türlerde sinyal baskılanması olarak gözlemlenmiştir.) belirlenmiştir. Günler-arası tekrarlanabilirlik için hesaplanan bağıl standart sapma değerlerinden kaydadeğer miktarda yüksek olmayan söz konusu sayısal veriler, yöntemde analitlerin matriks bileşenlerinden oldukça az miktarda etkilendiğini göstermektedir. Yöntemin uygulanabilirliği, bir zeytin yaprağı ekstraktında bulunan fenolik bileşiklerin nicel tayinlerinin gerçekleştirilmesi yoluyla değerlendirilmiştir.

Zeytin yaprağında bazı fenolik bileşiklerin tayinleri için önerilen ve valide edilen LC-ESI-MS/MS yöntemi ayrıca bir zeytin numunesi ekstraktı içerisinde bulunan fenolik bileşiklerin belirlenmesi için kullanılmıştır. Sonuç olarak, önerilen yöntemin diğer bazı gıda maddelerindeki fenolik bileşiklerin nicel tayinleri için de başarılı olacağı öngörülmektedir.

Çalışmanın son bölümünde, çalışma boyunca tarif edilen ve metanol kullanılarak gerçekleştirilen MAE yöntemine alternatif olabilecek, aynı zamanda insan tüketimi için de uygun, su ile demleme (IE) yönteminin ekstraksiyon performansı, bir zeytin yaprağı numunesinden söz konusu iki farklı ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakte edilen çözeltilerin toplam antioksidan kapasiteleri, toplam fenolik madde miktarları ve radikal süpürme kapasiteleri karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Radikal süpürme kapasiteleri hariç diğer iki parametre için iki farklı yöntemden elde edilen sonuçlar, söz konusu ekstraksiyon yöntemlerinin performanslarının karşılaştırılabilir derecede yakın olduğunu belirtmektedir. Sonuçlar zeytin yaprağından fenolik bileşiklerin ekstraksiyonları için sıcak su ile demleme gibi basit bir yöntemin bile, nispeten etkin bir ekstraksiyon tekniği olduğunu göstermektedir.

Diğer taraftan, Silva ve ark.'nın [101] Portekiz'de yetişen 3 farklı zeytin ağacı türü yapraklarında tespit ettikleri toplam fenolik madde miktarları tannik asit eşdeğeri olarak 11.7-40.1 mg g⁻¹ arasında değişmektedir. Kontogianni ve ark. [102] ise söz konusu değeri zeytin yapraklarının metanolik ekstraktlarında Folin-Ciocalteu yöntemi ile 68.9-483.1 mg g⁻¹ olarak tayin etmişlerdir. Son olarak; İspanya, İtalya,

Fransa ve Tunus'ta yetişen 8 farklı zeytin ağacı türünün yapraklarında toplam fenolik madde miktarı Folin-Ciocalteu yöntemi ile gallik asit eşdeğeri cinsinden 73.05-144.19 mg g⁻¹ olarak Salah ve ark. [103] tarafından bildirilmiştir. Bu durum zeytin yaprağında bulunan fenolik bileşik miktarlarının, bitkinin yetiştiği bölgenin toprak yapısına, iklim şartlarına ve yaprağın ağaçtan toplanma zamanına göre farklılıklar gösterebileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmanın bulguları ise, farklı araştırmacıların bildirdiği değer aralığı ile uyum içerisindedir.

Çalışma boyunca kullanılan ekstraksiyon yöntemleri oldukça basit ve hızlıdır. Bununla birlikte, söz konusu yöntemlerin her biri analiz öncesi son aşamada, ekstraktın bir PTFE filtre yardımıyla süzülmesi işlem basamağını içermektedir. Diğer taraftan, bazı durumlarda hedef analitlerin membran filtreler tarafından adsorplandığı ve oldukça düşük miktarlarda geri kazanıldığı bilinmektedir. Çalışmada, ekstraksiyon öncesi gerçekleştirilen standart katmalar için elde edilen yüksek geri kazanım değerleri, hedef analitlerin ekstraksiyon işlemlerinde PTFE filtrelerin kullanılmasının herhangi bir sakıncası olmadığını açıkça göstermektedir. Benzer şekilde, Yoshida ve ark. [104] hedef analitlere benzer moleküllerden olan kateşinlerin yeşil çaydan ekstraksiyonları için çeşitli deneysel koşulları incelemeleri sırasında, en yüksek geri kazanım değerlerini PTFE filtreler kullanarak gerçekleştirdikleri çalışmalarda elde etmişlerdir.

Bu çalışma ile fenolik bileşiklerin tayinlerine ilişkin elektrokimyasal ve kromatografik yöntemlerin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Önerilen yöntemlerin uygulama kolaylıkları ve analitik özellikleri yüksek antioksidan özellikleri olan ve ülkemiz açısından önemli ticari değere sahip sofralık zeytin, zeytinyağı ve zeytin yapraklarında bulunan fenolik bileşiklerin nicel tayinlerinde oldukça ilgi çekicidir.

KAYNAKLAR

1. Aruoma, O.I. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1998, 75, 199–212.
2. Stanner, S.A., Hughes, J., Kelly, C.N.M., Buttriss, J. A review of the epidemiological evidence for the “antioxidant hypothesis”. *Public Health Nutr.* 2004, 7, 407–422.
3. Benavente-García, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuño, A., et al. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chem.* 2000, 68, 457–462.
4. Hertog, M.G.L., Feskens, E.J.M., Kromhout, D., Hertog, M.G.L., et al. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet.* 1993, 342, 1007–1011.
5. Benavente-García, O., Castillo, J., Marin, F.R., Ortuño, A., et al. Uses and Properties of Citrus Flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45, 4505–4515.
6. Morel, I., Lescoat, G., Cogrel, P., Sergent, O., et al. Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. *Biochem. Pharmacol.* 1993, 45, 13–19.
7. Salah, N., Miller, N.J., Paganga, G., Tijburg, L., et al. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arch. Biochem. Biophys.* 1995, 322, 339–346.
8. Van Acker, S.A.B.E., Van Den Berg, D., Tromp, M.N.J.L., Griffioen, D.H., et al. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.* 1996, 20, 331–342.
9. Wang, P., Zheng, R. Inhibitions of the autoxidation of linoleic acid by flavonoids in micelles. *Chem. Phys. Lipids.* 1992, 63, 37–40.
10. Tripoli, E., Giammanco, M., Tabacchi, G., Di Majo, D., et al. The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutr. Res. Rev.* 2005, 18, 98–112.
11. Meza-Miranda, E.R., Rangel-Zúñiga, O.A., Marín, C., Pérez-Martínez, P., et al. Virgin olive oil rich in phenolic compounds modulates the expression of atherosclerosis-related genes in vascular endothelium. *Eur. J. Nutr.* 2016, 55, 519–527.
12. McAndrew, J., Patel, R.P., Jo, H., Cornwell, T., et al. The interplay of nitric oxide and peroxynitrite with signal transduction pathways: implications for disease. *Semin. Perinatol.* 1997, 21, 351–366.
13. Moncada, S., Palmer, R.M., Higgs, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 1991, 43, 109–142.
14. Rubbo, H., Darley-Usmar, V., Freeman, B.A. Nitric Oxide Regulation of Tissue Free Radical Injury. *Chem. Res. Toxicol.* 1996, 9, 809–820.
15. Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J., et al. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell. Biochem.* 2004, 266, 37–56.
16. Cadenas, E. Biochemistry of Oxygen Toxicity. *Annu. Rev. Biochem.* 1989, 58, 79–110.
17. Porter, W.L. Paradoxical behavior of antioxidants in food and biological systems. *Toxicol. Ind. Health.* 1993, 9, 93–122.
18. Papas, A.M. Oil-soluble antioxidants in foods. *Toxicol. Ind. Health.* 1993, 9, 123–149.

19. Duthie, S.J., Ma, A., Ross, M.A., Collins, A.R. Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Cancer Res.* 1996, 56, 1291–1295.
20. Besnard, G., Khadari, B., Baradat, P., Bervillé, A. *Olea europaea* (Oleaceae) Phylogeography based on Chloroplast DNA polymorphism. *Tag Theoretical and Applied Genetics.* 2001, 104, 1353–1361.
21. International Olive Council, 2017. (<http://www.internationaloliveoil.org>)
22. Servili, M., Montedoro, G. Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2002, 104, 602–613.
23. Silva, S., Gomes, L., Leitao, F., Coelho, A. V., et al. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of *Olea europaea* L. Fruits and Leaves. *Food Sci. Technol. Int.* 2006, 12, 385–395.
24. Dimitrios, B. Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends Food Sci. Technol.* 2006, 17, 505–512.
25. Preedy, V.R., Watson, R.R. *Olives and olive oil in health and disease prevention*, 1st ed. Ed: Victor R. Preedy, Ronald Ross Watson, Elsevier, 2010.
26. Tsimidou, M. Polyphenols and quality of virgin olive oil in retrospect. *Ital. J. Food Sci.* 1998, 10, 99–116.
27. Exarchou, V., Godejohann, M., van Beek, T.A., Gerothanassis, I.P., et al. LC-UV-Solid-Phase Extraction-NMR-MS Combined with a Cryogenic Flow Probe and Its Application to the Identification of Compounds Present in Greek Oregano. *Anal. Chem.* 2003, 75, 6288–6294.
28. Prim, N., Pastor, F.I., Diaz, P. Biochemical studies on cloned *Bacillus* sp. BP-7 phenolic acid decarboxylase PadA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2003, 63, 51–56.
29. Maga, J.A. Simple phenol and phenolic compounds in food flavor. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1978, 10, 323–372.
30. Gomes, C.A., Girão da Cruz, T., Andrade, J.L., Milhazes, N., et al. Anticancer Activity of Phenolic Acids of Natural or Synthetic Origin: A Structure–Activity Study. *J. Med. Chem.* 2003, 46, 5395–5401.
31. Robbins, R.J. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 2866–2887.
32. Le Marchand, L. Cancer preventive effects of flavonoids—a review. *Biomed. Pharmacother.* 2002, 56, 296–301.
33. Nestel, P. Isoflavones: their effects on cardiovascular risk and functions. *Curr. Opin. Lipidol.* 2003, 14, 3–8.
34. Kandaswami, C., Lee, L., Lee, P.H., et al. The antitumor activities of flavonoids. *In Vivo (Brooklyn).* 2005, 19, 895–909.
35. Wan, H.B., Wong, M.K. Minimization of solvent consumption in pesticide residue analysis. *J. Chromatogr. A.* 1996, 754, 43–47.
36. Poole, C.F., Poole, S.K. Trends in extraction of semivolatile compounds from solids for environmental analysis. *Anal. Commun.* 1996, 33, 11H–14H.
37. Japón-Luján, R., Luque-Rodríguez, J.M., Luque de Castro, M.D. Multivariate optimisation of the microwave-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *Anal. Bioanal. Chem.* 2006, 385, 753–759.
38. Jerman, T., Trebše, P., Mozetič Vodopivec, B. Ultrasound-assisted solid liquid extraction (USLE) of olive fruit (*Olea europaea*) phenolic compounds. *Food Chem.* 2010, 123, 175–182.
39. Eskilsson, C.S., Björklund, E. Analytical-scale microwave-assisted extraction. *J. Chromatogr. A.* 2000, 902, 227–250.

40. Yüksel, F. Ultrasound Applications in Food Technology. *Electron. J. Food Technol.* 2013, 2, 29–38.
41. Koçak, S., Aslışen, B. Hydrazine oxidation at gold nanoparticles and poly(bromocresol purple) carbon nanotube modified glassy carbon electrode. *Sensors Actuators B Chem.* 2014, 196, 610–618.
42. Heeger, A.J. Semiconducting and Metallic Polymers: The Fourth Generation of Polymeric Materials (Nobel Lecture). *Angew. Chemie Int. Ed.* 2001, 40, 2591–2611.
43. Ates, M. A review study of (bio)sensor systems based on conducting polymers. *Mater. Sci. Eng. C.* 2013, 33, 1853–1859.
44. Li, J., Lin, X. Electrocatalytic oxidation of hydrazine and hydroxylamine at gold nanoparticle-polypyrrole nanowire modified glassy carbon electrode. *Sensors Actuators B Chem.* 2007, 126, 527–535.
45. Bard, A.J. The Rise of Voltammetry: From Polarography to the Scanning Electrochemical Microscope. *J. Chem. Educ.* 2007, 84, 644–650.
46. Maloy, J.T. Factors affecting the shape of current-potential curves. *J. Chem. Educ.* 1983, 60, 285–289.
47. Harvey, D. *Modern Analytical Chemistry*, 1st ed. McGraw-Hill, 2000.
48. Osteryoung, J. Voltammetry for the Future. *Acc. Chem. Res.* 1993, 26, 77–83.
49. Harris, D.C. *Quantitative Chemical Analysis*, 8th ed. W.H. Freeman and Company, New York, 2010.
50. Ho, C.S., Lam, C.W.K., Chan, M.H.M., Cheung, R.C.K., et al. Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *Clin. Biochem. Rev.* 2003, 24, 3–12.
51. Banerjee, S., Mazumdar, S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *Int. J. Anal. Chem.* 2012, 2012, 1–40.
52. Snyder, L.R., Kirkland, J.J., Dolan, J.W. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 3rd ed. Wiley, New Jersey, 2010.
53. Okan, O.T., Varlıbaş, H., Öz, M., Deniz, İ. Antioksidan Analiz Yöntemleri ve Doğu Karadeniz Bölgesinde Antioksidan Kaynağı Olarak Kullanılabilecek Odun Dışı Bazı Bitkisel Ürünler. *Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Derg.* 2013, 13, 48–59.
54. Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E. Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 7970–7981.
55. Huang, D., Ou, B., Prior, R.L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 1841–1856.
56. MacDonald-Wicks, L.K., Wood, L.G., Garg, M.L. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *J. Sci. Food Agric.* 2006, 86, 2046–2056.
57. Lo Scalzo, R. Organic acids influence on DPPH scavenging by ascorbic acid. *Food Chem.* 2008, 107, 40–43.
58. Singleton, V.L., Rossi, J.A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 1965, 16, 144–158.
59. Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 1999, 299, 152–178.

60. Gutfinger, T. Polyphenols in olive oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1981, 58, 966–968.
61. Sacchi, R., Addeo, F., Paolillo, L. ¹H and ¹³C NMR of virgin olive oil. An overview. *Magn. Reson. Chem.* 1997, 35, S133–S145.
62. Vlahov, G. Application of NMR to the study of olive oils. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 1999, 35, 341–357.
63. Montedoro, G., Servili, M., Baldioli, M., Selvaggini, R., et al. Simple and hydrolyzable compounds in virgin olive oil. 3. Spectroscopic characterizations of the secoiridoid derivatives. *J. Agric. Food Chem.* 1993, 41, 2228–2234.
64. Ballus, C.A., Meinhart, A.D., de Souza Campos, F.A., Bruns, R.E., et al. Doehlert design-desirability function multi-criteria optimal separation of 17 phenolic compounds from extra-virgin olive oil by capillary zone electrophoresis. *Food Chem.* 2014, 146, 558–568.
65. Vulcano, I., Halabalaki, M., Skaltsounis, L., Ganzera, M. Quantitative analysis of pungent and anti-inflammatory phenolic compounds in olive oil by capillary electrophoresis. *Food Chem.* 2015, 169, 381–386.
66. Bonoli, M., Montanucci, M., Gallina Toschi, T., Lercker, G. Fast separation and determination of tyrosol, hydroxytyrosol and other phenolic compounds in extra-virgin olive oil by capillary zone electrophoresis with ultraviolet-diode array detection. *J. Chromatogr. A.* 2003, 1011, 163–172.
67. Al-Rimawi, F. Development and validation of a simple reversed-phase HPLC-UV method for determination of oleuropein in olive leaves. *J. Food Drug Anal.* 2014, 22, 285–289.
68. Tsbopoulos, A., Gikas, E., Papadopoulos, N., Aligiannis, N., et al. Simultaneous determination of oleuropein and its metabolites in plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B.* 2003, 785, 157–164.
69. Yıldırım, S., Kadioğlu, A., Sağlam, A., Yaşar, A. Determination of phenolic acids and rutin in *Heliotropium thermophilum* by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. *Instrum. Sci. Technol.* 2017, 45, 35–48.
70. Talhaoui, N., Gómez-Caravaca, A.M., León, L., De la Rosa, R., et al. Determination of phenolic compounds of “Sikitita” olive leaves by HPLC-DAD-TOF-MS. Comparison with its parents “Arbequina” and “Picual” olive leaves. *LWT - Food Sci. Technol.* 2014, 58, 28–34.
71. Lemonakis, N., Mougios, V., Halabalaki, M., Skaltsounis, A.L., et al. A novel bioanalytical method based on UHPLC-HRMS/MS for the quantification of oleuropein in human serum. Application to a pharmacokinetic study. *Biomed. Chromatogr.* 2016, 30, 2016–2023.
72. García-Villalba, R., Pacchiarotta, T., Carrasco-Pancorbo, A., Segura-Carretero, A., et al. Gas chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-time of flight mass spectrometry for profiling of phenolic compounds in extra virgin olive oil. *J. Chromatogr. A.* 2011, 1218, 959–971.
73. Angerosa, F., D’Alessandro, N., Corana, F., Mellerio, G. Characterization of phenolic and secoiridoid aglycons present in virgin olive oil by gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1996, 736, 195–203.

74. Miró-Casas, E., Farré Albaladejo, M., Covas, M.I., Rodriguez, J.O., et al. Capillary Gas Chromatography–Mass Spectrometry Quantitative Determination of Hydroxytyrosol and Tyrosol in Human Urine after Olive Oil Intake. *Anal. Biochem.* 2001, 294, 63–72.
75. Capasso, R. A review on the electron ionization and fast atom bombardment mass spectrometry of polyphenols naturally occurring in olive wastes and some of their synthetic derivatives. *Phytochem. Anal.* 1999, 10, 299–306.
76. De Nino, A., Mazzotti, F., Perri, E., Procopio, A., et al. Virtual freezing of the hemiacetal–aldehyde equilibrium of the aglycones of oleuropein and ligstroside present in olive oils from Carolea and Coratina cultivars by ionspray ionization tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 2000, 35, 461–467.
77. Capannesi, C., Palchetti, I., Mascini, M., Parenti, A. Electrochemical sensor and biosensor for polyphenols detection in olive oils. *Food Chem.* 2000, 71, 553–562.
78. Mülazımoğlu, İ.E., Mülazımoğlu, A.D. Investigation of Sensitivity Against Different Flavonoid Derivatives of Aminophenyl-Modified Glassy Carbon Sensor Electrode and Antioxidant Activities. *Food Anal. Methods.* 2012, 5, 1419–1426.
79. Ibrahim, H., Temerk, Y. Novel sensor for sensitive electrochemical determination of luteolin based on In₂O₃ nanoparticles modified glassy carbon paste electrode. *Sensors Actuators B Chem.* 2015, 206, 744–752.
80. Enache, T.A., Amine, A., Brett, C.M.A., Oliveira-Brett, A.M. Virgin olive oil ortho-phenols--electroanalytical quantification. *Talanta.* 2013, 105, 179–186.
81. Becerra-Herrera, M., Sánchez-Astudillo, M., Beltrán, R., Sayago, A. Determination of phenolic compounds in olive oil: New method based on liquid–liquid micro extraction and ultra high performance liquid chromatography–triple–quadrupole mass spectrometry. *LWT - Food Sci. Technol.* 2014, 57, 49–57.
82. Alarcón Flores, M.I., Romero-González, R., Garrido Frenich, A., Martínez Vidal, J.L. Analysis of phenolic compounds in olive oil by solid-phase extraction and ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 2012, 134, 2465–2472.
83. Japón-Luján, R., de Castro, L., Luque de Castro, M.D. Superheated liquid extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *J. Chromatogr. A.* 2006, 1136, 185–191.
84. Pizarro, M.L., Becerra, M., Sayago, A., Beltrán, M., et al. Comparison of Different Extraction Methods to Determine Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. *Food Anal. Methods.* 2013, 6, 123–132.
85. Reboredo-Rodríguez, P., Rey-Salgueiro, L., Regueiro, J., González-Barreiro, C., et al. Ultrasound-assisted emulsification–microextraction for the determination of phenolic compounds in olive oils. *Food Chem.* 2014, 150, 128–136.
86. Silva, S., Gomes, L., Leitao, F., Coelho, A. V., et al. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of *Olea europaea* L. Fruits and Leaves. *Food Sci. Technol. Int.* 2006, 12, 385–395.
87. Bakır, Ç.C., Şahin, N., Polat, R., Dursun, Z. Electrocatalytic reduction of oxygen on bimetallic copper–gold nanoparticles–multiwalled carbon nanotube modified glassy carbon electrode in alkaline solution. *J. Electroanal. Chem.* 2011, 662, 275–280.

88. Koçak, Ç.C., Altın, A., Aslışen, B., Koçak, S. Electrochemical Preparation and Characterization of Gold and Platinum Nanoparticles Modified Poly(taurine) Film Electrode and Its Application to Hydrazine Determination. *Int. J. Electrochem. Sci.* 2016, 11, 233–249.
89. Dall’Orto, V.C., Danilowicz, C., Rezzano, I., Carlo, M.D., et al. Comparison between Three Amperometric Sensors for Phenol Determination in Olive Oil Samples. *Anal. Lett.* 1999, 32, 1981–1990.
90. Mohamadi, M., Mostafavi, A., Torkzadeh-Mahani, M. Electrochemical determination of biophenol oleuropein using a simple label-free DNA biosensor. *Bioelectrochemistry.* 2015, 101, 52–57.
91. Capannesi, C., Palchetti, I., Mascini, M., Parenti, A. Electrochemical sensor and biosensor for polyphenols detection in olive oils. *Food Chem.* 2000, 71, 553–562.
92. Pascoe, R., Foley, J.P., Gusev, A.I. Reduction in matrix-related signal suppression effects in electrospray ionization mass spectrometry using on-line two-dimensional liquid chromatography. *Anal. Chem.* 2001, 73, 6014–6023.
93. Zrostlíková, J., Hajšlová, J., Poustka, J., Begany, P. Alternative calibration approaches to compensate the effect of co-extracted matrix components in liquid chromatography–electrospray ionisation tandem mass spectrometry analysis of pesticide residues in plant materials. *J. Chromatogr. A.* 2002, 973, 13–26.
94. Hajšlová, J., Zrostlíková, J. Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. *J. Chromatogr. A.* 2003, 1000, 181–197.
95. Reemtsma, T. Liquid chromatography–mass spectrometry and strategies for trace-level analysis of polar organic pollutants. *J. Chromatogr. A.* 2003, 1000, 477–501.
96. Stüber, M., Reemtsma, T. Evaluation of three calibration methods to compensate matrix effects in environmental analysis with LC-ESI-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 2004, 378, 910–916.
97. Wu, R., Ma, F., Zhang, L., Li, P., et al. Simultaneous determination of phenolic compounds in sesame oil using LC–MS/MS combined with magnetic carboxylated multi-walled carbon nanotubes. *Food Chem.* 2016, 204, 334–342.
98. Milner, J.A. Functional foods and health promotion. *J. Nutr.* 1999, 129, 1395–1397.
99. Kostianen, R., Kauppila, T.J. Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 2009, 1216, 685–699.
100. Snyder, L.R., Kirkland, J.J., Glajch, J.L. *Practical HPLC Method Development*, 2nd ed. Wiley, New York, 1997.
101. Silva, S., Gomes, L., Leitão, F., Coelho, A.V., Vilas Boas, L. Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L. Fruits and leaves. *Food Sci. Technol. Int.* 2006, 12, 385–395.
102. Kontogianni, V.G., Gerothanassis, I.P. Phenolic compounds and antioxidant activity of olive leaf extracts. *Nat. Prod. Res.* 2012, 26, 186–189.
103. Salah, M.B., Abdelmelek, H., Abderraba, M. Study of Phenolic Composition and Biological Activities Assessment of Olive Leaves From Different Varieties Grown in Tunisia. *Med. Chem.* 2012, 2, 107–111.
104. Yoshida, Y., Kiso, M., Goto, T. Efficiency of the extraction of catechins from green tea. *Food Chem.* 1999, 67, 429–433.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Mustafa CİTTAN
Doğum Yeri ve Yılı : Aydın, 1987
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : mustafa.cittan@cbu.edu.tr

Eğitim Durumu

Lise : Aydın Lisesi, YDAL, 2005
Lisans : Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, 2010
Yüksek Lisans : Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya A.B.D., 2013

Mesleki Deneyim

- Ege Üniversitesi, İlaç Geliştirme & Farmakokinetik Araştırma-Uygulama Merkezi, Araştırmacı Operatör, 2010-2011
- Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Araştırma Görevlisi, 2011-

Yayımları

1. Cittan, M., Tirtom, V.N., Dinçer, A., Çelik, A. Epichlorohydrin crosslinked chitosan-clay composite beads for on-line preconcentration and determination of chromium(III) by flow injection flame atomic absorption spectrometry. *Analytical Methods*. 2014, 6, 5298-5303.
2. Atmaca, H., Bozkurt, E., Cittan, M., Tepe, H.D. Effects of Galium aparine extract on the cell viability, cell cycle and cell death in breast cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*. 2016, 186, 305-310.
3. Cittan, M., Koçak, S., Çelik, A., Dost, K. Determination of oleuropein using multiwalled carbon nanotube modified glassy carbon electrode by adsorptive stripping square wave voltammetry. *Talanta*. 2016, 159, 148-154.