

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

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
ANALİTİK KİMYA BİLİM DALI**

**DİŞBUDAK(FRAXINUS EXCELSIOR-FRAXINUS AMERICANA)
AĞACININ YAPRAKLARINDAKİ TOPLAM FENOLİK
BİLEŞİKLER VE ANTİOKSİDAN KAPASİTESİNİN TAYİNİ**

Buse AYDOĞAN

**Danışman
Prof. Dr. Ali ÇELİK**



MANİSA-2016

**Buse
AYDOĞAN**

**DIŞBUDAK(FRAXINUS EXCELSIOR-FRAXINUS AMERICANA) AĞACININ
YAPRAKLARINDAKİ TOPLAM FENOLİK BİLEŐİŐLER VE ANTİOKSİDAN
KAPASİTESİNİN TAYİNİ**

2016

TEZ ONAYI

Buse AYDOĞAN tarafından hazırlanan "**Dişbudak (Fraxinus Excelsior- Fraxinus Americana) ağacının yapraklarındaki toplam fenolik bileşikler ve antioksidan kapasitesinin tayini**" adlı tez çalışması 29/11/2016 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri önünde Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Kimya Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak savunulmuş ve **oyçokluğu / oybirliği** ile başarılı olarak kabul edilmiştir.

Danışman

Prof. Dr. Ali ÇELİK
Manisa Celal Bayar Üniversitesi

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Müşerref ARDA
Ege 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.

Buse AYDOĞAN



İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|---|-------|
| İÇİNDEKİLER | I |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ | III |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | V |
| TABLO DİZİNİ | VII |
| TEŞEKKÜR..... | VIII |
| ÖZET..... | IX |
| ABSTRACT..... | XI |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres | 3 |
| 2.2. Oksijen ve Özellikleri..... | 3 |
| 2.3. Reaktif Oksijen Türlerini Süpürücü Bileşikler..... | 3 |
| 2.4. Reaktif Oksijen Türleri..... | 4 |
| 2.4.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$)..... | 4 |
| 2.4.2. Hidroksil Radikali ($OH\cdot$)..... | 4 |
| 2.4.3. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)..... | 5 |
| 2.4.4. Singlet Oksijen (1O_2) | 5 |
| 2.4.5. Lipid Peroksil Radikali ($LOO\cdot$)..... | 5 |
| 2.5. Antioksidanlar | 5 |
| 2.6. Doğal Antioksidanlar..... | 6 |
| 2.6.1. Askorbik Asit (C Vitamini) | 6 |
| 2.6.2. α -tokoferol | 7 |
| 2.6.3. Karotenoidler | 7 |
| 2.6.4. Polifenolik Bileşikler | 8 |
| 2.6.4.1. Flavonoidler | 11 |
| 2.6.4.2. Fenolik Asitler..... | 12 |
| 2.6.4.3. Fenolik Polimerler(Tanenler)..... | 13 |
| 2.7. Sentetik Antioksidanlar | 13 |
| 2.7.1. Bütilenmiş Hidroksitoluen (BHT)..... | 13 |
| 2.7.2. Troloks | 14 |
| 2.8. Toplam Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri..... | 14 |
| 2.8.1. Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi (ORAC) Yöntemi | 15 |
| 2.8.2. TRAP (Total Radical Trapping Parameter; Toplam Radikal Yakalayıcı Antioksidan Parametre) | 16 |
| 2.8.3. Krosin Yöntemi..... | 16 |
| 2.8.4. Toplam Oksiradikal Söndürme Kapasite (TOSC) Yöntemi | 17 |
| 2.8.5. Diklorofloresin-diasetat (DCFH-DA) Yöntemi..... | 17 |
| 2.8.6. Troloks Eşiti Antioksidan Kapasite (TEAC)Yöntemi | 17 |
| 2.8.7. FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power; Fe(III) İyonu İndirgeyici Antioksidan Gücü) Yöntemi | 18 |
| 2.8.8. Cu-II İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi Yöntemi (CUPRAC) | 19 |
| 2.8.9. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Radikal Giderme Yöntemi..... | 20 |
| 2.8.10. Toplam Fenolik Madde Tayin Yöntemi (Folin-Ciocalteu)..... | 21 |
| 2.9. Çalışma Materyali Hakkında Bilgi..... | 22 |
| 2.9.1. Yerli Dişbudak (Fraxinus Excelsior) | 22 |
| 2.9.2. Amerikan Dişbudak (Fraxinus Americana)..... | 23 |
| 3. DENEYSEL KISIM..... | 24 |

| | |
|--|----|
| 3.1. Materyal..... | 24 |
| 3.1.1. Çalışma Materyali..... | 24 |
| 3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler..... | 24 |
| 3.1.3. Kullanılan Cihazlar..... | 25 |
| 3.1.4. Çözeltilerin Hazırlanması..... | 25 |
| 3.2. Yöntemler..... | 27 |
| 3.2.1. Çalışma Materyalinin Analize Hazırlanması..... | 27 |
| 3.2.2. Yaprakların Ekstraksiyonu..... | 27 |
| 3.2.3. Yaprakların İnfüzyonu (Demlenmesi)..... | 27 |
| 3.2.4. Bu Çalışmada Kullanılan Yöntemlerin Validasyonu..... | 30 |
| 3.2.4.1. Folin-Ciocalteu Reaktifi ile Fenolik Bileşiklerin Tayini..... | 30 |
| 3.2.4.2. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Yöntemiyle Radikal Giderme Kapasitesi Tayini..... | 37 |
| 3.2.4.3. Cu-II İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi (CUPRAC) Yöntemiyle Toplam Antioksidan Kapasitesi Tayini..... | 41 |
| 3.2.5. Yaprak Ekstraktlarının Analizi..... | 45 |
| 3.2.5.1. Folin-Ciocalteu Yöntemi ile Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini..... | 45 |
| 3.2.5.2. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Yöntemiyle Radikal Giderme Kapasitesinin Tayini..... | 46 |
| 3.2.5.3. Cu-II İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi (CUPRAC) Yöntemiyle Toplam Antioksidan Kapasitesi Tayini..... | 48 |
| 3.2.5.4. Dişbudak Ekstraktlarında bulunan antioksidanlar ve miktarları..... | 50 |
| 3.2.5.4.1. Oleuropein tayini..... | 50 |
| 3.2.5.4.2. Dişbudak ekstraktlarındaki diğer antioksidanların tayini..... | 51 |
| 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA..... | 52 |
| 4.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini Deneylerinden Elde Edilen Bulgular..... | 52 |
| 4.2. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Yöntemiyle Radikal Giderme Kapasite Tayini Deneylerinden Elde Edilen Bulgular..... | 55 |
| 4.3. Cu-II İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi Yöntemiyle (CUPRAC) Toplam Antioksidan Kapasite Tayini Deneylerinden Elde Edilen Bulgular..... | 57 |
| 4.4. LC-MS/MS İle Elde Edilen Bulgular..... | 61 |
| 5. SONUÇ ve ÖNERİLER..... | 63 |
| KAYNAKLAR..... | 67 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 74 |

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|-------------------------------|--|
| O ₂ · ⁻ | Süperoksit radikali |
| RO· | Alkoksil radikali |
| ROO· | Alkil peroksi radikali |
| NO· | Azot oksit radikali |
| BHT | Bütillenmiş hidroksi toluen |
| TBHQ | Tersiyer bütül hidrokinon |
| BHA | Bütillenmiş hidroksi anisol |
| PG | Propil gallat |
| C vitamini | Askorbik asit |
| DNA | Deoksiribo nükleik asit |
| Gallik asit | 3, 4, 5-trihidroksibenzoik asit |
| Ferulik asit | 3-metoksi, 4-hidroksisinnamik asit |
| Kafeik asit | 3, 4-dihidroksi sinamik asit: C ₉ H ₈ O ₄ |
| Troloks | 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit |
| ET | Elektron transferine dayanan yöntemler |
| HAT | Hidrojen atomu transfer reaksiyonlarına dayanan yöntemler |
| ORAC | Oksijen radikal absorbands kapasite yöntemi |
| TRAP | Toplam radikal yakalayıcı antioksidan parametre |
| TOSC | Toplam oksiradikal söndürme kapasite yöntemi |
| DCFH-DA | Diklorofloresin-diasetat yöntemi |
| TEAC | Troloks eşiti antioksidan kapasite yöntemi |
| FRAP | Demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan gücü yöntemi |
| CUPRAC | Cu (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi |
| DPPH | 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil |
| ABTS | 2,2-azinobis(3-etilbenzothiazolin-6-sulfonik asit) |
| Neokuproin | 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin |
| AAPH | 2,2-azobis-(2-amidinopropan)dihidroklorid |
| DCF | Diklorofloresin |
| IC ₅₀ | Başlangıçtaki DPPH konsantrasyonunu yarıya düşürmek için gerekli olan antioksidan ekstraktı konsantrasyonu (µg/mL) |
| HRP | Horse radish peroksidaz |
| ABAP | 2,2'-azobis (2-metil-propionamidin) diklorid |

| | |
|-----------------------------|---|
| KMBA | α -keto- γ -(methilthio) butirik asit sodyum tuzu |
| GC | Gaz kromotografisi |
| UV/ VIS | Ultraviyole/ Görünür Bölge |
| ϵ | Molar absorblama katsayısı |
| $\epsilon_{\text{troloks}}$ | Troloksun molar absorpsiyon katsayısı ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) |
| TE | Troloks eşdeğeri |
| TEAK | Troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi |
| GAE | Gallik asit eşdeğeri |
| ABS | Absorbans |
| FCR | Folin-Ciocalteu Reaktifi |
| Bs | Belirtme sınırı |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | Sayfa |
|--|-------|
| Şekil 2.1. Askorbik asit genel yapısı..... | 7 |
| Şekil 2.2. α -tokoferol açık yapısı..... | 7 |
| Şekil 2.3. Fenol açık yapısı..... | 8 |
| Şekil 2.4. Temel flavonoid yapısı..... | 12 |
| Şekil 2.5. Bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) yapısı..... | 14 |
| Şekil 2.6. Troloks açık yapısı..... | 14 |
| Şekil 2.7. 2,2-azobis-(2-amidinopropan)dihidroklorid (AAPH)'in moleküler yapısı | 16 |
| Şekil 2.8. Potasyum persülfat oksidasyonu ile ABTS ²⁻ 'den oksidan ABTS• ' nin oluşması. | 18 |
| Şekil 2.9. Cu(II)' nin antioksidan madde ile Cu(I)' e indirgemesi..... | 19 |
| Şekil 2.10. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikalinin kimyasal yapısı..... | 20 |
| Şekil 2.11. Antioksidan-DPPH radikali tepkime mekanizması..... | 20 |
| Şekil 2.12. Yerli Dişbudak (Fraxinus Excelsior) ağacı..... | 22 |
| Şekil 2.13. Yerli Dişbudak (Fraxinus Excelsior) ağacı yaprakları..... | 22 |
| Şekil 2.14. Amerikan Dişbudak (Fraxinus Americana) ağacı..... | 23 |
| Şekil 2.15. Amerikan Dişbudak (Fraxinus Americana) ağacı yaprakları..... | 23 |
| Şekil 3.1. Yerli Dişbudak ağacı yapraklarına ait bitkinin toplanıp, kurutulup, infüzyon ve %70'lik metanol-su ekstraksiyonu uygulanması işlemi..... | 28 |
| Şekil 3.2. Amerikan Dişbudak ağacı yapraklarına ait bitkinin toplanıp, kurutulup, infüzyon ve %70'lik metanol-su ekstraksiyonu uygulanması işlemi..... | 29 |
| Şekil 3.3. 10 farklı gallik asit derişimi için elde edilen kalibrasyon grafiği..... | 31 |
| Şekil 3.4. 5 farklı gallik asit derişimi için elde edilen kalibrasyon grafiği..... | 33 |
| Şekil 3.5. Troloks miktarına (μ mol) karşı absorbands değerlerine ait grafik..... | 38 |
| Şekil 3.6. Troloks miktarına (μ mol) karşılık % inhibisyon değerlerine göre çizilen grafik..... | 39 |
| Şekil 3.7. A) troloks B) gallik asit (model çözelti) için elde edilen kalibrasyon eğrileri..... | 41 |
| Şekil 3.8. Troloks standardı için elde edilen kalibrasyon grafiği..... | 43 |
| Şekil 3.9. CUPRAC metodunda A) troloks B) gallik asit (model çözelti) için elde edilen kalibrasyon eğrileri..... | 44 |
| Şekil 3.10. Folin-Ciocalteu yönteminde kalibrasyon grafiği için hazırlanan gallik asit çalışma çözeltilerinin renk skalası..... | 46 |
| Şekil 3.11. DPPH yönteminde kalibrasyon grafiği için hazırlanan troloks çalışma çözeltilerinin renk skalası..... | 47 |
| Şekil 3.12. CUPRAC yönteminde kalibrasyon grafiği için hazırlanan troloks çalışma çözeltilerinin renk skalası..... | 49 |
| Şekil 4.1. İnfüzyon örnekleri için kullanılan gallik asit kalibrasyon grafiği..... | 53 |
| Şekil 4.2. %70'lik MeOH-su örnekleri için kullanılan gallik asit kalibrasyon grafiği..... | 53 |
| Şekil 4.3. Toplam fenolik madde miktarı tayininde çözücü olarak %70'lik MeOH-su kullanıldığında elde edilen sonuçlar..... | 54 |
| Şekil 4.4. İnfüzyon örnekleri için kullanılan troloks kalibrasyon grafiği..... | 56 |
| Şekil 4.5. İnfüzyon örnekleri için kullanılan troloks konsantrasyonuna karşı %inhibisyon grafiği..... | 56 |
| Şekil 4.6. %70'lik MeOH-su örnekleri için kullanılan troloks kalibrasyon grafiği ... | 56 |
| Şekil 4.7. %70'lik MeOH-su örnekleri için kullanılan troloks konsantrasyonuna karşı %inhibisyon grafiği..... | 57 |
| Şekil 4.8. CUPRAC deneylerinde kullanılan ve troloks standardı ile elde edilen..... | 59 |

| | |
|--|----|
| kalibrasyon grafiği | 59 |
| Œekil 4.9. Bakır-II iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi (CUPRAC) deneylerinde çözücü olarak %70'lik MeOH-su kullanıldığında elde edilen sonuçlar | 59 |
| Œekil 5.1. Ekstraktların toplam fenolik madde miktarına karşı CUPRAC değerleri . grafiği | 64 |
| Œekil 5.2. Toplam fenolik madde miktarına karşı DPPH deneylerinden elde edilen radikal giderme kapasitesi grafiği | 65 |

TABLO DİZİNİ

| | Sayfa |
|--|--------------|
| Tablo 2.1. Zeytin ve zeytinyağındaki fenolik bileşikler | 10 |
| Tablo 2.2. Fenolik asitlerin genel yapısı | 12 |
| Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler | 24 |
| Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar | 25 |
| Tablo 3.3. 10 farklı gallik asit derişimi için hazırlanan standart çalışma çözeltileri . | 30 |
| Tablo 3.4. 5 farklı gallik asit derişimi için hazırlanan standart çalışma çözeltileri ... | 32 |
| Tablo 3.5. Gallik asit standart çözeltileri için absorbands değerleri | 32 |
| Tablo 3.6. Model çözelti (gallik asit)'nin gün içi ve günler arası elde edilen sonuçları | 33 |
| Tablo 3.7. Folin-Ciocalteu yöntemiyle elde edilen bulgular..... | 35 |
| Tablo 3.8. DPPH yönteminde troloks standart çözeltilerinin hazırlanışı..... | 37 |
| Tablo 3.9. Kontrol çözeltisi için absorbands değerleri | 38 |
| Tablo 3.10. Troloks standartları için absorbands ve % inhibisyon değerleri..... | 38 |
| Tablo 3.11. Model (gallik asit) çözeltileri için absorbands değerleri | 39 |
| Tablo 3.12. Troloks standartları (mmol/mL) için hesaplanan ΔA değerleri..... | 40 |
| Tablo 3.13. Model (gallik asit, mmol/mL) çözeltiler için hesaplanan ΔA değerleri | 40 |
| Tablo 3.14. CUPRAC yönteminde kalibrasyon grafiğı için hazırlanan troloks çalışma çözeltileri..... | 42 |
| Tablo 3.15. Troloks standart çözeltisi için absorbands değerleri..... | 42 |
| Tablo 3.16. Model (gallik asit) çözeltileri için absorbands değerleri | 43 |
| Tablo 3.17. Folin-Ciocalteu yönteminde hazırlanan gallik asit standart çalışma çözeltileri..... | 45 |
| Tablo 3.18. DPPH yönteminde troloks standart çözeltilerinin hazırlanışı..... | 47 |
| Tablo 3.19. CUPRAC yönteminde kalibrasyon grafiğı için kullanılan troloks çalışma çözeltileri..... | 49 |
| Tablo 4.1. Yerli ve Amerikan Dişbudak ağacı yaprakları örneklerinin toplam fenolik madde miktarları (ortalama değer \pm standart sapma)..... | 52 |
| Tablo 4.2. Yerli ve Amerikan Dişbudak ağacı yaprakları örneklerinin radikal giderme kapasite değerleri (ortalama değer \pm standart sapma)..... | 55 |
| Tablo 4.3. Yerli ve Amerikan Dişbudak ağacı yaprakları örneklerinin toplam antioksidan kapasite içerikleri (ortalama değer \pm standart sapma) | 58 |
| Tablo 4.4. Ekstraktlardaki analizi yapılan fenolik bileşikler ve miktarları (ortalama değer \pm standart sapma) | 61 |

TEŞEKKÜR

Üniversite hayatım boyunca bilgi ve deneyimlerinden her zaman yararlanabildiğim, bana her konuda destek olan, çalışmalarım süresince hoşgörü, ilgi, anlayış ve tecrübelerini hiç eksik etmeyen, kendisini tanımaktan büyük onur duyduğum çok kıymetli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ali ÇELİK'e,

Çalışmalarım süresince bilgi ve tecrübeleriyle beni aydınlatan, eğitimimin her aşamasında yardım ve desteğini gördüğüm, çalışmalarımın bugünlere gelmesinde büyük emeği olan çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Kenan DOST'a,

LC-MS cihazını kullanmamı sağlayan Manisa Celal Bayar Üniversitesi DEFAM laboratuvarına, analiz aşamasında her türlü imkan ve desteği veren hocam Sayın Arş. Gör. Mustafa CİTTAN'a ve deneylerim sırasında bana yardımcı olan hocam Sayın Arş. Gör. Mertcan ÖKSÜZ'e,

Hayatım boyunca bana destek olan ve her zaman yanımda olan başta büyükbabam Recep VARDAR olmak üzere çok sevdiğim aileme sonsuz teşekkür ederim.

Buse AYDOĞAN
Manisa, 2016

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DİŞBUDAK(FRAXINUS EXCELSIOR-FRAXINUS AMERICANA) AĞACININ YAPRAKLARINDAKİ TOPLAM FENOLİK BİLEŞİKLER VE ANTIOKSİDAN KAPASİTESİNİN TAYİNİ

Buse AYDOĞAN

Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ali ÇELİK

Bu çalışmayla, Batı Anadolu ve Akdeniz Bölgelerinde yetişen ve zeytingiller (Oleaceae) familyasından olan Yerli (Fraxinus Excelsior) ve Amerikan Dişbudak (Fraxinus Americana) 'ın yapraklarında toplam fenolik madde miktarı, toplam antioksidan kapasitesi, radikal giderme kapasitesi belirlenerek Ülkemiz için ekonomik potansiyeli ortaya konulmaya çalışılmıştır.

Yerli ve Amerikan Dişbudak ağaçlarının yaprakları kurutulup havanda toz haline getirildikten sonra ekstraksiyon ve infüzyon işlemleri uygulanmıştır. Dişbudak bitkisi yapraklarına ait ekstraktlardaki toplam fenolik madde miktarı (Folin-Ciocalteu), toplam antioksidan kapasitesi CUPRAC (Cu (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite) ve radikal giderme kapasitesi DPPH (DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali giderme kapasite) yöntemleri ile spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir.

Sonuçlara göre toplam fenolik madde miktarı tayini için; Amerikan Dişbudağı'nın %70(h/h)'lık metanol-su ekstraktlarında 110,92±4,75 mg GAE/ g örnek, Yerli Dişbudak %70(h/h)'lık metanol-su ekstraktında ise 70,21±3,64 mg GAE/ g örnek bulunurken infüzyon örneklerinde Amerikan Dişbudağı için 45,06±5,16 mg GAE/ g örnek, Yerli Dişbudak için ise 46,45±4,49 mg GAE/ g örnek bulunmuştur.

DPPH yönteminde %70(h/h)'lık metanol-su ekstraktları Amerikan Dişbudak için 2,21±0,01 mg Troloks eşdeğeri/ g örnek, Yerli Dişbudak için 2,19±0,04 mg Troloks eşdeğeri/ g örnek olarak hesaplanmıştır. İnfüzyon örneklerinde ise Amerikan Dişbudak 2,08±0,07 mg Troloks eşdeğeri/ g örnek, Yerli Dişbudak 2,08±0,07 mg Troloks eşdeğeri/ g örnek olarak radikal giderme kapasitesi hesaplanmıştır.

CUPRAC yönteminde %70(h/h)'lık metanol-su ekstraktları Amerikan Dişbudak için 238,38±6,74 mg Troloks eşdeğeri/ g örnek, Yerli Dişbudak için 138,45±5,07 mg Troloks eşdeğeri/ g örnek olarak hesaplanmıştır. İnfüzyon örneklerinde ise Amerikan Dişbudak 76,74±3,31 mg Troloks eşdeğeri/ g örnek, Yerli

Dişbudak 91,42±2,66 mg Troloks eşdeğeri/ g örnek olarak toplam antioksidan kapasitesi hesaplanmıştır.

Zeytingillerin ana bileşeni olan oleuropein miktarı Yerli Dişbudak ağacı yapraklarında %70(h/h)'lık metanol-su ekstraktları için 55192,12 ± 3863,45 µg/g, infüzyon örneklerinde ise 29442,74 ± 2060,99 µg/g olarak bulunurken, Amerikan Dişbudak ağacı yaprakları %70(h/h)'lık metanol-su ekstraktlarında 27085,27 ± 1895,97 µg/g, infüzyona ait örneklerde 17298,65 ± 1210,91 µg/g olarak bulunmuştur.

Tirozol miktarı Yerli Dişbudak ağacı yaprakları %70(h/h)'lık metanol-su ekstraktlarında 153,37 ± 12,27 µg/g, infüzyon örneklerinde 405,89 ±27,35 µg/g bulunmuş olup, Amerikan Dişbudak ağacı yapraklarının %70(h/h)'lık metanol-su ekstraktlarında 119,49 ± 16,30 µg/g, infüzyon örneklerinde 362,79 ±25,39 µg/g bulunmuştur.

Hidroksitirozol miktarı Yerli Dişbudak ağacı yaprakları %70(h/h)'lık metanol-su ekstraktlarında 118,40 ±15,25 µg/g, infüzyon örneklerinde 392,11 ±26,15 µg/g bulunmuş olup, Amerikan Dişbudak ağacı yapraklarının %70(h/h)'lık metanol-su ekstraktlarında 161,45 ±19,37 µg/g, infüzyon örneklerinde 496,33±27,35 µg/g bulunmuştur.

Çalışmada incelenen Yerli Dişbudak ağacı yapraklarına ait %70(h/h)'lık metanol-su ekstraktlarında miktarı yüksek olan diğer fenolik bileşiklerden klorogenik asit 1764,67 ± 24,63 µg/g; hesperidin ve verbaskosid miktarları ise sırasıyla 23691,29 ± 1147,36 µg/g; 2809,06 ± 78,63 µg/g örnek olarak bulunurken, infüzyon örneklerinde hyperoside 329,28 ± 25,04 µg/g; hesperidin ve verbaskosid miktarları sırasıyla 7091,47 ± 305,54 µg/g ; 6850,13 ± 968,07 µg/g örnek olduğu saptanmıştır.

Amerikan Dişbudak ağacı yapraklarına ait %70(h/h)'lık metanol-su ekstraktlarında luteolin 7-glukozid 983,58 ± 30,38 µg/g; hesperidin ve verbaskosid miktarları sırasıyla 14369,23 ± 238,02 µg/g; 18585,06 ± 265,43 µg/g olarak bulunurken, infüzyon örneklerinde klororogenik asit 963,49 ± 51,64 µg/g; hesperidin ve verbaskosid miktarları sırasıyla 11086,24 ± 1131,70 µg/g; 846,60 ± 133,88 µg/g olarak tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Yerli Dişbudak, Amerikan Dişbudak, Zeytingiller, Toplam fenolik madde miktarı, CUPRAC, DPPH, Oleuropein

2016, 74 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

DETERMINATION OF TOTAL PHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT CAPACITY IN FRAXINUS EXCELSIOR AND FRAXINUS AMERICANA LEAVES

Buse AYDOĞAN

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

Supervisor: Prof. Dr. Ali ÇELİK

In this work, total amounts of the phenolic matter, total antioxidant capacities and radical scavenging capacity were determined in Fraxinus Excelsior and Fraxinus Americana leaves growing in the Western Anatolia and Mediterranean regions and belonging to the family of Oleaceae and the economic potential of these species for our country was evaluated.

Both the extraction and infusion processes were applied to the samples after the leaves of Fraxinus Excelsior and Fraxinus Americana were dried and powdered. Total amounts of the phenolic matter, total antioxidant capacities and radical scavenging capacity of the leaves extracts were determined spectrophotometrically by Folin-Ciocalteu, CUPRAC (Cupric ion reducing antioxidant capacity) and DPPH (DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging capacity) methods, respectively.

Total amounts of the phenolic matter in the methanol:water (70:30, v/v) extracts of the leaves were determined as 110.92 ± 4.75 mg GAE/ g sample and 70.21 ± 3.64 mg GAE/ g sample in Fraxinus Americana and Fraxinus Excelsior, respectively. Moreover, 45.06 ± 5.16 mg GAE/ g sample for Americana Fraxinus and 46.45 ± 4.49 mg GAE/ g sample for Fraxinus Excelsior were found in the infusion extracts of the leaves.

DPPH methods in the methanol:water (70:30, v/v) extracts of the leaves were calculated as 2.21 ± 0.01 mg TE/ g sample and 2.19 ± 0.04 mg TE/ g sample via DPPH method in Fraxinus Americana and Fraxinus Excelsior, respectively. In addition, 2.08 ± 0.07 mg TE/ g sample for Americana Fraxinus and 2.08 ± 0.07 mg TE/ g sample for Fraxinus Excelsior were found in the infusion extracts of the leaves.

CUPRAC methods in the methanol:water (70:30, v/v) extracts of the leaves were determined as 238.38 ± 6.74 mg TE/ g sample and 138.45 ± 5.07 mg TE/ g sample with CUPRAC method in Fraxinus Americana and Fraxinus Excelsior, respectively. Furthermore, 76.74 ± 3.31 mg TE/ g sample for Americana Fraxinus and

91.42±2.66 mg TE/ g sample for *Fraxinus Excelsior* were calculated in the infusion extracts of the leaves.

Oleuropein, the major component of the Oleaceae family, was found as 55192.12 ± 3863.45 µg/g in the methanol:water (70:30, v/v) extract, 29442.74 ± 2060.99 µg/g in the infusion extract of *Fraxinus Excelsior* leaves and 27085.27 ± 1895.97 µg/g in the methanol:water (70:30, v/v) extract, 17298.65 ± 1210.91 µg/g in the infusion extract of *Fraxinus Americana* leaves.

Tyrosol amount of the extracts of *Fraxinus Excelsior* leaves were found as 153.37 ±12.27 µg/g and 405.89 ±27.35 µg/g in the methanol:water (70:30, v/v) extract and the infusion extract, respectively. In addition, 119.49 ±16.30 µg/g tyrosol for the methanol:water (70:30, v/v) extract and 362.79 ±25.39 µg/g tyrosol for the infusion extract of *Fraxinus Americana* were determined quantitatively.

Hydroxytyrosol was determined as 118.40 ±15.25 µg/g in the methanol:water (70:30, v/v) extract, 392.11 ±26.15 µg/g in the infusion extract of *Fraxinus Excelsior* leaves and 161.45 ±19.37 µg/g in the methanol:water (70:30, v/v) extract, 496.33±27.35 µg/g in the infusion extract of *Fraxinus Americana* leaves.

Chlorogenic acid, hesperidin and verbascoside which are abundant in *Fraxinus Excelsior* leaves were found as 1764.67 ± 24.63 µg/g, 23691.29 ± 1147.36 µg/g and 2809.06 ± 78.63 µg/g in the methanol:water (70:30, v/v) extracts, respectively. Furthermore, hyperoside, hesperidin and verbascoside were determined as 329.28 ± 25.04 µg/g, 7091.47 ± 305.54 µg/g and 6850.13 ± 968.07 µg/g in the infusion extracts of *Fraxinus Excelsior* leaves.

Luteolin 7-glucoside, hesperidin and verbascoside amounts were found as 983.58 ± 30.38 µg/g, 14369.23 ± 238.02 µg/g and 18585.06 ± 265.43 µg/g in the methanol:water (70:30, v/v) extracts of *Fraxinus Americana* leaves. In addition, chlorogenic acid, hesperidin and verbascoside were determined as 963.49 ± 51.64 µg/g, 11086.24 ± 1131.70 µg/g and 846.60 ± 133.88 µg/g in the infusion extracts of *Fraxinus Americana* leaves.

Keywords: *Fraxinus Excelsior*, *Fraxinus Americana*, Oleaceae, Total amounts of the phenolic matter, CUPRAC, DPPH, Oleuropein

2016, 74 pages

1. GİRİŞ

Şifalı bitkileri insanlar geçmişten günümüze kadar gerek gıda gerekse ilaç yapımı gibi çeşitli alanlarda kullanmışlardır. Günümüzde şifalı bitki droglarının modern tıp uygulamalarına alternatif olarak sıklıkla kullanıldığı hatta fitoterapi eğitimi alan doktorların bunları reçetelerine yazabildikleri görülmektedir. Bu nedenle sağlık açısından olumlu sonuçlar doğuran doğal materyallerden hazırlanan drog ve ekstraktların elde edilmesi ve ticari tüketimi araştırmacıların üzerinde durduğu bir konu olmuştur.

Antioksidan bileşikler içeren meyve ve sebzelerin yanı sıra geleneksel olarak tıbbi amaçla kullanılan ve şifalı bitkiler olarak bilinen bitki türlerinin insan sağlığı açısından önemi oldukça yüksektir. Antioksidanların, yiyeceklerde veya vücutta düşük derişimlerde bulunduğu zaman, oksidasyonu önemli derecede engelleyici ve geciktirici oldukları belirtilmiştir [1].

Antioksidanlar, vücuttaki kimyasal prosesler (özellikle oksidasyon) sonucunda oluşan, başta kanser olmak üzere, şeker hastalığı ve kalp-damar hastalıklarına neden olan ve yüksek derecede reaktif olan serbest radikalleri sönmleyen maddelerdir. Antioksidanların bir kısmını vücut, serbest radikallere karşı bir savunma sistemi olarak kendisi üretirken, antioksidanların önemli bir kısmı da doğal ürünlerden karşılanmaktadır. Fenolik bileşikler etkili doğal antioksidanlardan olup fenolik asitler, flavonoidler ve fenolik polimerler (tanenler)'i içeren bileşiklerdir [2].

Şifalı bitkilerin kökleri, yaprakları, dalları/gövdeleri, kabukları, çiçekleri, meyveleri gibi değişik kısımları genellikle polifenolik bileşikler (antioksidanlar) bakımından zengindir. Türkiye coğrafi konumundan dolayı floristik anlamda oldukça zengin olup, iklim ve toprak özellikleri bakımından birçok bitkinin ana vatanı olmuştur.

Dişbudak (*Fraxinus Excelsior*) zeytingiller (*Oleaceae*) familyasından olup boyu 10 m'yi bulan, türüne göre maksimum boyu 10-30 m arasında değişebilen dolgun ve düzgün gövdeli yuvarlak tepeli ağaçlardır. Ege Bölgesi, Trakya, Kocaeli

ve Karadeniz Bölgesi. (İzmit, Çankırı, Kastamonu, Samsun, Ladik, Amasya, Gökçedağ, Maraş (Ahır dağı), Mersin (Toros dağları) havalisindeki ormanlar ve Kuzey Anadolu dağlarında bulunur.

Dişbudak ağacının yaprakları halk arasında idrar söktürücü, müşhil ve süt ifrazını arttırıcı olarak, infüzyon (%5-6) veya dekoksiyon (%2-3) halinde kullanıldığı, kabuklarının ateş düşürücü etkisine sahip olduğu belirtilmekte olup ayrıca tohumlarında idrar söktürücü olarak kullanıldığı ifade edilmektedir [3].

Polifenollerin kronik dejeneratif hastalıklara, özellikle kalp-damar hastalıklarına karşı koruyucu etkisini destekleyen bilimsel kanıtların artmasıyla [4,5] birlikte sebzeler, tahıllar, meyveler ve tıbbi bitkiler de fenolik bileşenlerin ayrı ayrı tanımlanarak miktarlarının tespit edilmesi, toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesi önemli ve güncel araştırma konularından olmuştur [6, 7]. Oleaceae familyasında bolca bulunan oleuropein, secoiridoid grubuna ait bir türdür.

Bu çalışmayla, Batı Anadolu ve Akdeniz Bölgelerinde yetişen ve zeytingiller (oleaceae) familyasından olan Yerli ve Amerikan Dişbudak (*Fraxinus Excelsior*, *Fraxinus Americana*) 'ın yapraklarındaki fenolik bileşenler ve bunların miktarları, oleuropein miktarı, toplam fenolik madde miktarı, toplam antioksidan kapasitesi ve radikal giderme kapasitesi belirlenerek Ülkemiz için ekonomik potansiyeli ortaya konulmaya çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Serbest radikaller, dış yörüngelerinde eşleşmemiş elektronu bulunduran reaktivitesi yüksek kararlı olmayan atom ya da moleküllerdir [8]. Kararlı olmayan atom ya da moleküllerin sebep olduğu inorganik maddeler biyolojik materyallerdeki moleküllerle reaksiyona girer ve bu sayede serbest hale geçerler. Serbest radikaller, dış yörüngelerindeki bu eşleşmemiş elektron eksikliğini reaksiyona girdikleri komşu moleküllerden alarak uzaklaşırlar. Bu moleküller elektron kaybettiği için kararsız hale geçtiklerinden serbest radikaller oluşur. Aralarındaki etkileşim sürekli olduğundan serbest radikale dönüşmesine neden olan reaksiyon meydana gelir. Bu reaksiyona "otokatalitik reaksiyon" denir [9, 10]. Eşleşmemiş elektron çiftleri, serbest radikallerin reaktiflik kazanmasına neden olur, buda biyolojik materyallerin zarar görmesine yol açar. Başta kanser olmak üzere, kalp damar hastalığı, şeker hastalığı gibi hastalıklara neden olur [11, 12].

Günümüzde antioksidanlara ilgi oldukça artmıştır. Bunun sebebi son yıllarda kanser gibi önemli hastalıkların erken teşhis edilmesidir. Bu amaçla oksidatif stres ve serbest radikallerin incelenmesi üzerine yapılan araştırmaların sayısı artmaktadır [13, 14].

2.2. Oksijen ve Özellikleri

Oksijen, yaşamın sürekliliğinin sağlanmasında ve yaşamı sonlandıran molekül olarak önemli rol oynar. Oksijen oksijensiz solunum yapan (anaerobik) canlılar için gelişimlerini engelleyen ya da ölümcül tesir yaratan bir moleküldür. Oksijenin anaerobikler üzerine zararlı etkisi, anaerobiklerin önemli hücre bileşenlerinin oksijen ile yükseltgenmesinden kaynaklanmaktadır [15]. Anaerobiklerin hücre bileşenlerinin oksijen ile yükseltgenmesi anaerobikler üzerine zararlı bir etkiye sahiptir.

2.3. Reaktif Oksijen Türlerini Süpürücü Bileşikler

Antioksidanlar, yükseltgenme özelliğine sahip substratlara nispeten daha düşük derişimlerde, prooksidanlarla başlatılan substratın oksidasyonunu önemli ölçüde geciktiren ya da engelleyen maddelerdir. Prooksidanlar (reaktif oksijen ve

azot türleri, serbest radikaller), nükleik asitler, proteinler ve lipidlerde oksidatif hasara neden olan, bunun sonucunda kronik dejeneratif hastalıklara yol açan toksik özellikteki maddelerdir. Glutasyon, askorbik asid, α -tokoferol, β -karoten, ürik asit, bilirubin, flavonoidler ve birçok polifenolik bileşik ile süperoksit dismutaz, glutasyon peroksidaz, askorbat peroksidaz ve katalaz gibi antioksidan olarak bilinen maddeleri içerirler [16]. Bu antioksidanlar, serbest radikalleri toksik olmayan ya da düşük toksisiteli ürünlere dönüştürerek hücrelere zarar veren reaktif türleri etkili bir biçimde süpürme özelliğine sahiptir. Reaktif oksijen türleri vb. reaktif bileşiklerin ortamda bulunması durumunda enzimlerin ve antioksidan bileşiklerin sağlıklı bir yaşam adına önemli kılmasını sağlar [17, 18]. Birtakım oksijen türlerinin ($\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2\cdot^-$ ve H_2O_2) süpürücüleri olarak gıdalarda ya da biyolojik yapılarda bulunan enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar bilinmektedir [16].

2.4. Reaktif Oksijen Türleri

2.4.1. Süperoksit Radikali ($\text{O}_2\cdot^-$)

Süperoksit radikali oksijenin bir elektron alması [19] ya da aerobik hücrelerde bulunan moleküler oksijene bir elektron transfer edilmesiyle indirgenmesi sonucu meydana gelir [20]. Süperoksit radikali eşleşmemiş elektron bulundurması sebebiyle çok fazla reaktif olmayan aynı zamanda güçlü bir antioksidan özellik göstermeyen oksidandır. Buna rağmen iskemi hasarına yol açmaktadır [19]. Süperoksit radikalinin kendisi direkt olarak zarar vermez. Hidrojen peroksit kaynağı ve geçiş metalleri iyonlarını indirgeyici özellikte olması bu radikalın önemli bir özelliğidir. Hem indirgeme hem de yükseltgeme özelliğine sahiptir [20].

2.4.2. Hidroksil Radikali ($\text{OH}\cdot$)

Hidroksil radikali; reaktif özelliğe sahip bir molekül olup serbest radikaller arasında diğer kimyasal bileşenlerle çoğunlukla reaksiyon veren bir radikaldir. Toksik özellikte ve tehlikeli bir radikaldir. Bunun nedeni; insan vücudunda bulunan her molekülü okside edebilmesinden kaynaklanır [19]. Hidroksil radikali biyokimyasal olan organik asitler, amino asitler, fosfolipidler, nükleik asitler ve şekerler gibi maddelerin birçoğu ile reaksiyon verebilir. Yarılanma ömrü kısa olan hidroksil radikalının neden olduğu serbest radikal zincir reaksiyonu olan lipid peroksidasyonu hasarıdır [21]. Hidroksil radikalının yağ asitleri başlıca

hedeflerindedir. Zar lipidlerinin peroksidasyona uğraması sonucu zarın yapısı bozulmakla birlikte zarın geçirgenliğini hızlandırarak hücre ölümüne neden olabilmektedir [22, 23].

2.4.3. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit, oksijenin iki elektron indirgenmesi ya da süperoksitlerin tepkimeleri sonucu oluşan, eşleşmemiş elektrona sahip olmayan ve radikal özellik göstermeyen bir bileşiktir [24, 23]. Oksitleyici tür olarak bilinmesi; bakır ve demir metal iyonlarının varlığı sonucu hidroksil radikalının öncülü davranmasından kaynaklanır [23]. Hücre hasarına neden olan hidrojen peroksit doymamış yağ asitlerine karşı bir etki gösterir [22].

2.4.4. Singlet Oksijen (1O_2)

Singlet oksijen, enerji kazanan oksijen elektronlardan birinin kendi orbitalinin zıt yönünde bulunan diğer bir orbitalle yer değiştirmesi sonucu meydana gelir [25]. Ortaklanmamış elektron bulunmamasından dolayı radikal özellikte olmayan bir reaktif oksijen türü olarak bilinir [26, 20]. Kovalent reaksiyonlara girebilen singlet oksijen, sahip olduğu yüksek enerjisi sayesinde etrafına dalga enerjisi olarak verir ve bu sayede tekrar oksijene dönüşebilir [23]. Singlet oksijen çoklu doymamış yağ asitleri ile birlikte doğrudan tepkimeye girerek lipid peroksidlerinin oluşmasına neden olur [22]. Singlet oksijenin, organizmada kanserli hücreleri tedavi edici ve mikrobiyel patojenlere karşı koruyucu bir etkisi vardır [20].

2.4.5. Lipid Peroksil Radikali ($LOO\cdot$)

Zincirleme bir reaksiyon; yağ asidinin üzerinde bir elektron kalacak şekilde parçalanarak lipid radikalini oluşturmasıyla ve oluşan lipid radikalının ($L\cdot$) oksijen ile reaksiyonu sonucu lipid peroksil radikalini ($LOO\cdot$) meydana getirmesi ve lipid peroksil radikalının de hidrojen atomu uzaklaştırılmasından oluşan lipid hidroperoksit ($LOOH$)'in oluşmasıyla başlar [19, 21].

2.5. Antioksidanlar

Antioksidan, diğer moleküllerin oksidasyonunu geciktiren ya da engelleyen moleküllere denir.

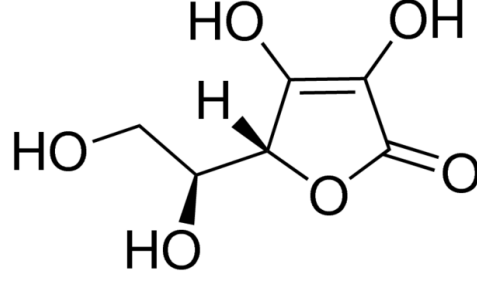
Oksidasyon; hidrojen veya elektron transfer eden bir kimyasal reaksiyondur. Serbest radikaller tarafından oksidasyon reaksiyonları gerçekleşir. Bu nedenle serbest radikaller, hücrenin hasarına yol açar ve ölümüne neden olurlar. Bunun sonucunda antioksidanlar serbest radikalleri yok etme ve zincir reaksiyonları sonlandırma amacıyla reaksiyona girerler. Doymamış yağların yükseltgenmesinin önlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda, endüstriyel proseslerde, yakıtların polimerizasyonunun önlenmesi, metallerin korozyonu gibi konular üzerinde durularak biyolojik antioksidanların önemi araştırılmıştır [27, 28].

2.6. Doğal Antioksidanlar

Doğal antioksidanlar; fenoller, flavonoidler, karotenoidler, vitaminlerdir. Bitkisel kaynaklı olan bu antioksidanlar oksijen giderilmesi, serbest radikal giderilmesi ve peroksit parçalanmasında önemli rol oynamaktadır [29]. Doğal antioksidanlar bitkilerin yapraklarında, çiçeklerinde, sebzelerde ve meyvelerde bol miktarda bulunmaktadır. Bu nedenle sebze ve meyve tüketim miktarının artırılmasıyla beraber bazı hastalıklara yakalanma riskinin azaltılacağı yönünde bu besinlerin önemi vardır [30]. En önemli doğal antioksidanlar; tokoferoller, karotenoidler, askorbik asit (C vitamini)'dir. Besinlerin üretimlerinde ve depolanmasında BHT, TBHQ, BHA ve PG gibi sentetik antioksidanlara kıyasla daha düşük aktiviteye sahip olan α -tokoferol ve askorbik asit gibi doğal antioksidan maddeler kullanılmaktadır [31, 32].

2.6.1. Askorbik Asit (C Vitamini)

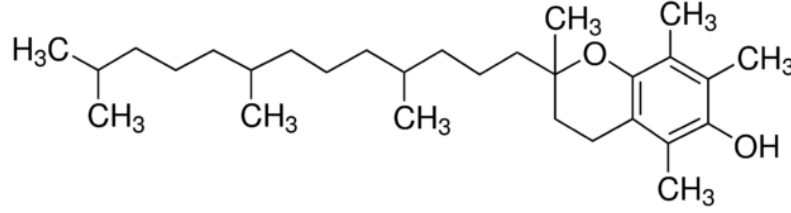
Monosakkarit türevi olup yapısı olarak glikoz ve diğer altı karbona sahip monosakkaritlere benzer bir yapı gösterir. Özel bir kokuya sahiptir. Tadı ekşi olup, hafif kokulu ve asidik karakterdedir. Güçlü bir antioksidan olması kuvvetli bir indirgen özellik göstermesinden kaynaklanmaktadır. Hidroksil radikali ve süperoksit radikali ile birlikte reaksiyona girer ve bu radikalleri ortadan kaldırır.



Şekil 2.1. Askorbik asit genel yapısı

2.6.2. α -tokoferol

E vitamininin ana bileşeni olarak bilinen doğada bol miktarda bulunan bir radikal tutucudur. Yapısında bulunan fenolik hidroksil grubuna sahip aromatik halkadan dolayı antioksidan aktiviteye sahiptir [8]. Doymamış yağ asitlerini serbest radikallerin etkisine karşı koruyan bir savunma hattı oluşturur. Yükseltgendikten sonra, parçalanmadan önce glutatyon ve askorbik asit (C vitamini) tarafından tekrar indirgenebilir.



Şekil 2.2. α -tokoferol açık yapısı

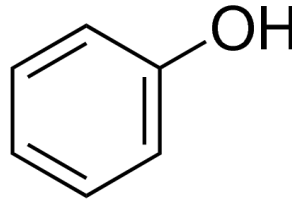
2.6.3. Karotenoidler

400-500 nm dalga boyunda maksimum soğurma vererek gıdalarda sarı-kırmızı-turuncu renkten sorumlu [33] olan karotenoidler A, C, E vitaminlerinin antioksidan özelliklerinden dolayı vücuda yeterli miktarda alındıklarında kanserden korunabildiğine yönelik çalışmalar mevcuttur [34, 35]. Bunlar birçok etki mekanizması ile birlikte kanseri önleme etkisine sahiptirler. Antioksidan aktivitesi bu mekanizmalardan biri olup, hayvanlar üzerinde araştırılan çalışmalar sonucunda antioksidanların DNA'ya zarar veren serbest radikallerin etkisini yok ederek kanserin başlangıç evresinde bu sorunu ortadan kaldırdığı ifade edilmektedir.

Birçok gıdada bulunan likopen, lutein gibi karotenoidler depolandığı organlarda antikanserojen etkisine sahiptirler. Bunun sonucunda likopen ve luteinin antioksidatif özellikte olup kanser oluşumunu engelleme özelliğine sahip oldukları bildirilmektedir [36, 37].

2.6.4. Polifenolik Bileşikler

Bir aromatik halka ve bu halkaya bağlı bir ya da daha fazla hidroksil grupları ihtiva eden maddeler fenolik bileşikler olarak adlandırılırlar. Yapısal bir çeşitliliğe sahip olup fenolik moleküller ve yüksek polimerize bileşiklere kadar sınıflandırılmaktadırlar. Buna karşın, çoğunlukla polifenoller olarak adlandırılan bu bileşikler benzen halkası içermektedirler. Fenol adı ile isimlendirilen hidroksibenzen bir tane hidroksil grubu içerir ve bilinen en basit fenolik bileşik olup oda koşullarında beyaz renkli bir katıdır. Diğer fenolik bileşikler bundan türemişlerdir.



Şekil 2.3. Fenol açık yapısı

Sebze ve meyveler fenolik bileşiklerin ana kaynağı olup bu bileşikler sebze ve meyvelere kendilerine has rengi veren, duyuşal özelliklerinin oluşumunda yer alırlar [38]. Ayrıca bazı fenolik bileşikler antimikrobiyal etki gösterirler [39].

Günümüze kadar birçok bitkisel kaynaklı fenolik bileşikler tanımlanmıştır ve buna bağlı olarak yeni fenolik bileşikler tanımlanmaktadır. Fenolik bileşiklerin sahip olduğu yapısal çeşitlilik onların sınıflandırılmasını daha güç bir hale getirmektedir. Polifenollerin aktiviteleri kimyasal yapılarına bağlıdır ve güçlü antioksidan olarak bilinirler. Flavonoidler, tanenler ve fenolik asitler polifenolik bileşenlere ait türlerdir. Fenolik bileşiklerin antioksidan aktivite özellikleri, serbest radikal tutma ve asidik özelliklerinden kaynaklanmaktadır [38]. Fenoller hidrojen atomunu serbest radikallere verme eğilimindedirler [40]. Oksidatif stresin insan sağlığını etkilediği, DNA, yağ ve protein yapılarına zarar verdiği bilinmektedir. Antioksidanlar bu reaktif türlerinin olumsuz etkilerini ortadan kaldırarak reaktif oksijen türlerini yok eder ve

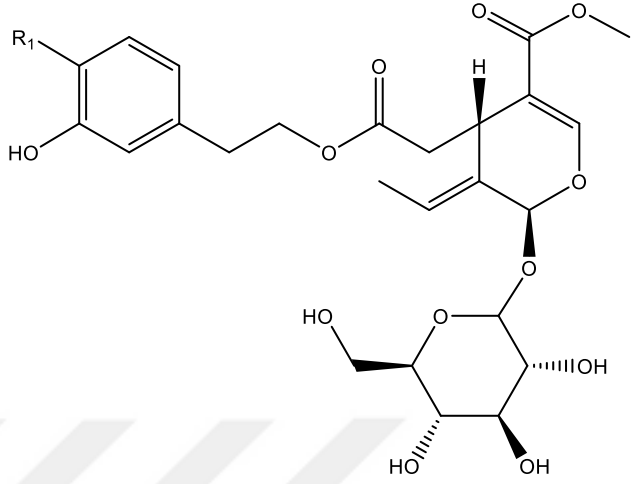
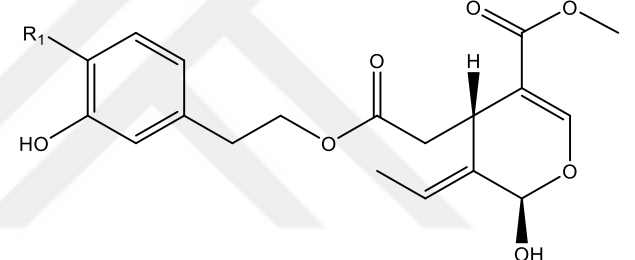
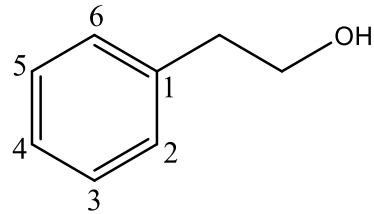
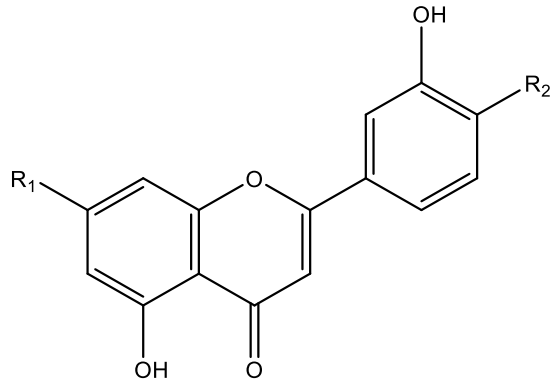
kanserli bölgedeki hücre bölünmesini azaltırlar [41, 42]. Bundan dolayıdır ki antioksidanlara ilgi gün geçtikçe önemini arttıran, üzerinde araştırma gerektiren bir konu olmuştur. Ayrıca antioksidanların başta kanser olmak üzere, kalp damar hastalıkları, Alzheimer hastalığı ilerlemesinin geciktirilmesi gibi kronik hastalıkların olumsuz etkilerini gidermede önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir [39]. İnsan beslenmesinde önemli bir rolü olan ve yapısında fenolik bileşik bulunduran bitkilere antioksidan özelliğe sahip olduklarından dolayı büyük bir ilgi gösterilmektedir.

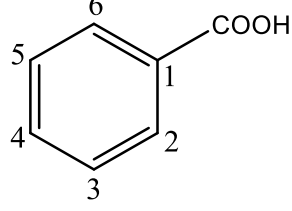
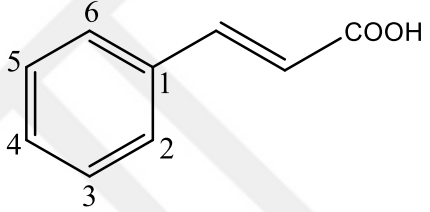
Fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitesi hidroksil gruplarının sayı ve konumlarına, aromatik halka üzerinde bulunan gruplara ve bileşiğe ait yapıya bağlıdır. Başlıca fenolik bileşik kaynağı olarak bilinen sebze ve meyveler insanların beslenmesinde önemli bir yere sahiptirler. Endüstride, tarım ve gıda sektöründe fenolik bileşiklerce zengin yan ürünler olan doğal antioksidan kaynakları oluşturulmaktadır [38]. Biofenol kaynağı olarak zeytin yağı, yaprakları ve meyvesine olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır.

Çalışmada incelenen dişbudak bitkisi zeytingiller (Oleaceae) familyasından bir bitki olup bu bitkinin polifenoller, biyofenoller; hidrokstitirozol, oleuropein, tirozol, kafeik asit, vanilik asit, verbaskosid, elenolik asit, p-kumarik asit, kateşol ve rutin içerdiği bilinmektedir.

Örneğin zeytingiller (Oleaceae) familyasından zeytinin meyve ve yağında bulunan fenolik bileşikler Tablo 2.1.'de verilmiştir.

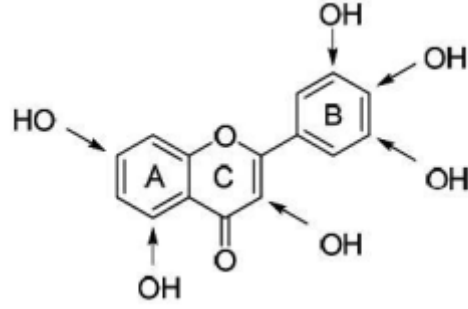
Tablo 2.1. Zeytin ve zeytinyağındaki fenolik bileşikler

| 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 7-glukosid | R ₁ -OGluc, R ₂ -H | |
| Luteolin 7-glukosid | R ₁ -OGluc, R ₂ -OH | |

| Bileşik | Substituent | Yapı |
|-------------------------------|-----------------------------|---|
| Benzoik ve türev asitler | | |
| 3-Hidroksibenzoik asit | 3-OH |  |
| p- Hidroksibenzoik asit | 4-OH | |
| 3,4- DiHidroksibenzoik 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 | |
| Sinapinik asit | 3,5-OCH ₃ , 4-OH | |

2.6.4.1. Flavonoidler

Polifenolik bir bileşik olup bitkilerin ikincil metabolitleridir. Flavonlar, flavonoller, flavanonlar, kateşinler, antosiyaninler olarak halka yapılarına göre sınıflandırılırlar [43]. Diğer bitki fenolikleri; süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), alkoksil radikali ($RO\cdot$), Alkil peroksi radikali ($ROO\cdot$), azot oksit ($NO\cdot$) radikallerini temizleme ve α -tokoferol rejenerasyonu etkisine sahip olduğu belirtilmektedir [44, 45, 46]. Antioksidan kapasitesi bileşiğin yapısı ile alakalı olup, fenolik bileşiklerde –OH grubu sayısı, flavonoidlerde B halkasının 3-OH, 4-OH ve 5-OH grupları ihtiva etmesi antioksidan aktivite göstermesinde etkilidir [47, 48].



Şekil 2.4. Temel flavonoid yapısı

2.6.4.2. Fenolik Asitler

Fenolik asitler; benzoik ve sinnamik asitler olmak üzere iki grupta incelenir. Meyvelerde bulunan sinnamik asitler, ferulik asit, kafeik asit ve kumarik asittir. Bitkilerde bulunan organik asitler ve şekerler ile esterleşen fenolik asitlerin kimyasal yapıları Tablo 2.2'de verilmiştir [49].

Tablo 2.2. Fenolik asitlerin genel yapısı: a) Benzoik asit. b) Sinnamik asit [49]

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

Ferulik asit, kumarik asit gibi fenolik bileşiklerin antioksidan aktiviteleri düşüktür. Kafeik asit gibi daha çok fenolik hidroksil grubu içeren moleküllerde antioksidan aktivite daha yüksektir. Gallik asit antioksidan etkisi yüksek olarak bilinen bir antioksidandır [50].

2.6.4.3. Fenolik Polimerler(Tanenler)

Tanenler, suda çözümlenme yeteneğine sahip olup, yüksek yapılı bitkilerin çoğunda bulunurlar. Polifenol yapısındadırlar. Tıp, ilaç, gıda alanlarında pek çok araştırmaya konu olmuştur. Tanenler dört gruba ayrılırlar. Bunlar, gallotanenler, kondense tanenler, ellagitanenler ve kompleks tanenlerdir. Molekül ağırlıkları 500-20000 Dalton arasında değişir ve çok sayıda fonksiyonel grup ve hidroksil grubu ihtiva ederler. Ayrıca protein ve başka makromoleküllerle birlikte çapraz bağ yapabilirler. Tanenler; mineraller, proteinler ve sindirim enzimleri ile birlikte kompleks oluşturarak gıdalarda beslenme değerinde azalmaya sebep olurlar.

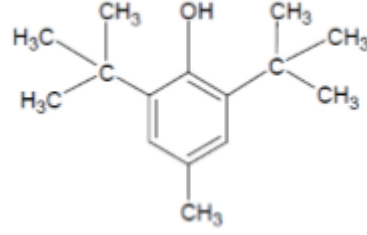
Tanen içeriği yüksek gıdaların tüketiminde birtakım kanser türlerinin oluştuğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Bunun yanı sıra belirli oranlarda tanen içeren birtakım bitkisel gıdalar kanın pıhtılaşmasını hızlandırma, kan basıncını düşürme gibi bazı fizyolojik özellik göstermektedirler. Tanenlerin miktarı ve cinsi ile bu özellikler olumlu veya olumsuz olarak nitelendirilirler. Tanenlerin antikanserojen, antimikrobiyal özelliklere sahip olduğunu gösteren bilimsel çalışmalar da mevcuttur.

2.7. Sentetik Antioksidanlar

Sentetik antioksidanlar BHT, BHA, TBHQ, PG, Trolox ile diğer sentetiklerdir [51]. Yaygın olarak kullanılan bu sentetik antioksidanların birtakım yan etkilerinin olduğu bilinmektedir [52, 53]. Yapılan bazı diğer çalışmalarla bu sentetik olarak kullanılan antioksidanların insan sağlığı açısından tehlikeli olduğu bildirilmiştir [52, 54, 55]. Örneğin farelere yüksek miktarda BHT verildiğinde karaciğerde hasara neden olduğu görülmüştür. Ayrıca karaciğerde BHT'nin sitokrom P-450 sisteminde hasara yol açtığı birtakım çalışmalarla ispatlanmıştır. Vücutta sentetik antioksidanların yüksek dozda alınması durumunda vücuttan atılmadığı ve bu sayede yağ dokusunda depolandıkları bilinmektedir [56].

2.7.1. Bütilenmiş Hidroksitoluen (BHT)

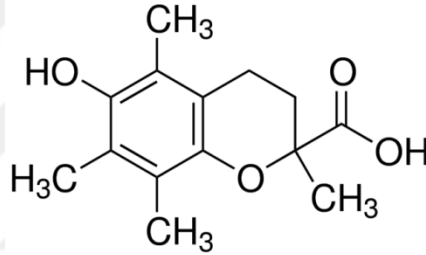
Suda çözümlenme özelliği göstermeyen, yağda çözümlenebilen bütilenmiş hidroksitoluenin görünümü beyaz kristal halindedir. Önemli bir sentetik antioksidandır. Bu antioksidan fazla tüketildiğinde vücutta alerji ve hassasiyete neden olabilmektedir.



Şekil 2.5. Bütilenmiş hidroksitoluen (BHT) yapısı

2.7.2. Troloks

Canlı sistemlerinde doğal olarak bulunmayan, E vitaminin suda çözünebilir özellikte eşdeğeri olan Troloks [6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit], birçok antioksidan aktivite tayin yöntemlerinde standart madde olarak kullanılmaktadır.



Şekil 2.6. Troloks açık yapısı

2.8. Toplam Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri

Günümüze kadar antioksidan kapasitesini tayin etmek amacıyla birçok yöntem geliştirilmiştir [18,57]. Bunlar elektron transferine (ET) ve hidrojen atomu transfer (HAT) reaksiyonlarına dayalı yöntemlerdir.

Hidrojen atomu transfer yöntemlerinin birçoğu azotlu bileşiklerin bozulması sonucunda açığa çıkan peroksil radikalleri için substrat ve antioksidanın yarışmacı reaksiyonuna dayanan bir yöntemdir.

Hidrojen atomu transfer (HAT) reaksiyonlarına dayanan yöntemler:

- Oksijen radikal absorban kapasite (ORAC),
- Toplam radikal yakalayıcı antioksidan parametre (TRAP),
- Krosin beyazlatma yöntemleri,

- Toplam oksiradikal söndürme kapasite (TOSC) yöntemi,
- Oksiradikal süpürme kapasitesi yöntemi,
- Diklorofloresin-diasetat (DCFH-DA) yöntemi'dir.

Elektron transferine (ET) dayanan yöntemlerde kapasite; oksidanın antioksidan tarafından indirgenmesi sonucu oluşan rengin değişmesiyle ölçülmektedir.

Elektron aktarımına (ET) dayanan yöntemler:

- Troloks eşiti antioksidan kapasite (TEAC veya ABTS yöntemi),
- Demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan gücü (FRAP) yöntemi,
- Cu (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite (CUPRAC) yöntemi,
- DPPH radikal söndürücü kapasite yöntemidir [58].

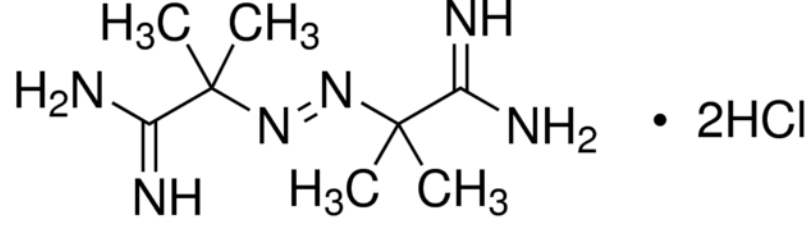
Toplam fenolik madde tayini:

- Folin Ciocalteu ayırıcı ile toplam fenolik madde tayin yöntemi (FCR)

Bu çalışmada mevcut yöntemlerden gerek kolay uygulanabilirliği ve gerekse laboratuvar imkanları dikkate alınarak elektron aktarımına dayanan yöntemlerden FCR, DPPH ve CUPRAC yöntemleri seçilmiştir.

2.8.1. Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi (ORAC) Yöntemi

Yöntem ilk olarak Cao ve Prior [59] tarafından geliştirilmiştir. Doku homojenatlarında ve plazmada bulunan birtakım doğal antioksidanların etkinliğini ölçer. Temelde antioksidan tarafından peroksil radikalinin neden olduğu oksidasyonun inhibisyonunu esas alır. Floresans yoğunluğundaki azalma ile belirlenir. Bu yüzden yöntem tek bir antioksidan ölçülmesi için yeterli olmaz. Peroksil radikalleri 2,2-azobis-(2-amidinopropan)dihidroklorid (AAPH) gibi azo bileşiklerin sıcaklıkla bozulması sonucunda oluşmaktadır [58].



Şekil 2.7. 2,2-azobis-(2-amidinopropan)dihidroklorid (AAPH)'in moleküler yapısı

Işık ile oda koşullarında rengi değişmesi ve çok fazla çeşitliliğe sahip olması sonuçların tekrarlanabilir olmamasının nedeni değildir. Bunun nedeni ; polifenollerle ilişkiye girerek floresans kayıpları olmasından kaynaklandığı belirtilmiştir [60, 61, 62].

2.8.2. TRAP (Total Radical Trapping Parameter; Toplam Radikal Yakalayıcı Antioksidan Parametre)

İlk kez Wayner ve ark. [58] tarafından geliştirilen toplam radikal yakalayıcı parametre (TRAP) yöntemi sıcaklıkla bozulan bir azo bileşiğinin lipid peroksidasyonu süresince tüketilen oksijenin ölçülmesini esas almaktadır. Oksijen elektrodunun gerekli zaman süresince stabilitesinin sağlanamaması bu yöntemde karşılaşılan problemlerden birisidir. Zincir kırıcı antioksidanlara hassas olan TRAP yöntemi suda çözünme yeteneğine sahip peroksil radikallerinin üretimi ve lipid peroksidasyonunun başlatılması ile ilgilidir. TRAP yönteminin fazla tecrübe ve zaman gerektiren kompleks bir yöntem olduğu belirtilmektedir [63].

2.8.3. Krosin Yöntemi

Kolorimetrik bir yöntem olup, Lussignoli ve ark. [64] tarafından geliştirilen bir yöntemdir. Sıcaklıkla bozulan azo başlatıcının meydana gelen peroksil radikalleri tarafından krosinin beyazlama derecesi ölçülür. Yöntem AAPH' in sıcaklıkta bozulması ile meydana gelen peroksil radikallerinin krosini yükseltmesine dayanmaktadır [18, 61, 58]. Antioksidanlarda meydana gelen konsantrasyon değişimine duyarlı olmayan bir yöntemdir. Krosin safrandan ekstrakte edilen doğal pigmentler karışımıdır. Bu nedenle yöntemin endüstriyel alanda kullanımı sınırlı olduğu ifade edilmektedir [60, 61].

2.8.4. Toplam Oksiradikal Söndürme Kapasite (TOSC) Yöntemi

2,2'-azobis (2-metil-propionamidin) diklorid (ABAP)'ın sıcaklıkla bozulması ile peroksil radikalleri oluşur. Bunlar α -keto- γ -(methilthio) butirik asit sodyum tuzu (KMBA)'na yükseltgenerek etilen gazı oluşturur. Gaz kromatografisi (GC) ile oluşan etilen gazı ölçülür [18,65]. Mikromolardan daha küçük derişimlerde bileşikler ile çalışılabilmektedir. Kısa ömürlü test çözeltilerinin olması ve GC enjeksiyonlarına ihtiyaç duyulması TOSC yönteminin sakıncalarından olduğu bildirilmiştir [66].

2.8.5. Diklorofloresin-diasetat (DCFH-DA) Yöntemi

Kuusi ve Valkonen tarafından geliştirilen bu yöntem TRAP yöntemi ile temelini meydana getirmiştir [67]. DCFH-DA yükseltgenebilen substrat özelliğinde olup, AAPH peroksil radikali oluşturma amacıyla kullanılmıştır. Oksidasyon reaksiyonu sonucunda meydana gelen diklorofloresin (DCF)'in floresans özelliği vardır ve DCFH-DA ile peroksil radikali arasındaki yükseltgenme sonucu meydana gelmektedir. 480 nm'de uyarılır ve 526 nm'de emisyon yapar. 504 nm'de ise absorpsiyon maksimumudur. Yöntemde DCF miktarı hesaplanmakla birlikte antioksidan kapasite hesaplanmaktadır.

Yöntemde iki aşamada gerçekleşen bir antioksidan kapasite tayini vardır. Birinci aşamada, numunede bulunan antioksidanların kapasiteleri gecikme zamanı cinsinden hesaplanır ve ardından aynı numunenin üzerine bilinen miktarda troloks çözeltisinden ilave edilir. Serbest radikallerin troloksu tüketmesi sonucunda ikinci gecikme zamanı hesaplanarak iki gecikme zamanı arasında olan farktan yararlanarak troloks eşdeğeri olacak şekilde toplam antioksidan kapasitesi hesaplanır [67].

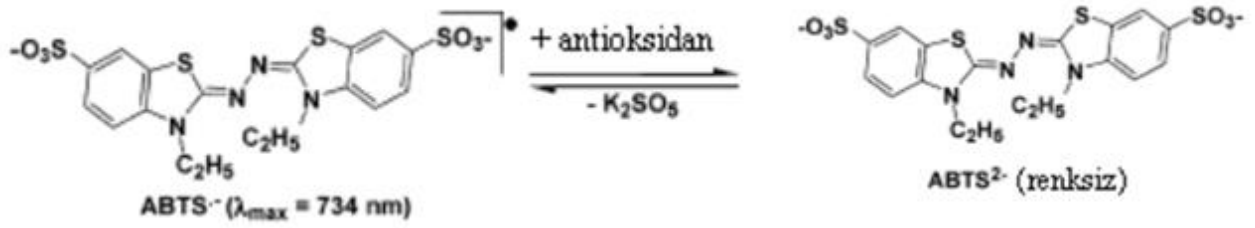
2.8.6. Troloks Eşiti Antioksidan Kapasite (TEAC)Yöntemi

TEAC yöntemi ilk olarak Miller ve ark. [68] tarafından geliştirilen bir yöntem olup sonra Re ve ark. [69] tarafından değiştirilen bir yöntemdir. Bu yöntem gıda örneklerinde antioksidan kapasitesini belirlemek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır [60, 18, 61].

Yöntem; 660, 734 ve 820 nm dalga boyunda en yüksek karakteristik absorpsiyon spektrumu veren ABTS radikal katyonunun verdiği absorbansın antioksidan ile inhibisyonuna dayanır [42]. Metmiyogloblin ile hidrojen peroksitin

aktivasyonu sonucunda oluşan ferrilmiyoglobin daha sonra 2,2-azinobis(3-etilbenzothiazollin-6-sulfonik asit) (ABTS) (Şekil 2)'den ABTS^{•-} radikal katyonunun oluşmasını sağlar. Reaksiyon ortamında hızlı reaksiyon gösteren antioksidanların ferrilmiyoglobin radikalini indirgemesi yöntemin olumsuz özelliği olarak belirtilmiştir.

ABTS^{•-}, oksidan ABTS²⁻ 'nin potasyum persülfat oksidasyonu ile oluşturulur [60, 61].



Şekil 2.8. Potasyum persülfat oksidasyonu ile ABTS²⁻ 'den oksidan ABTS^{•-} 'nin oluşması [61].

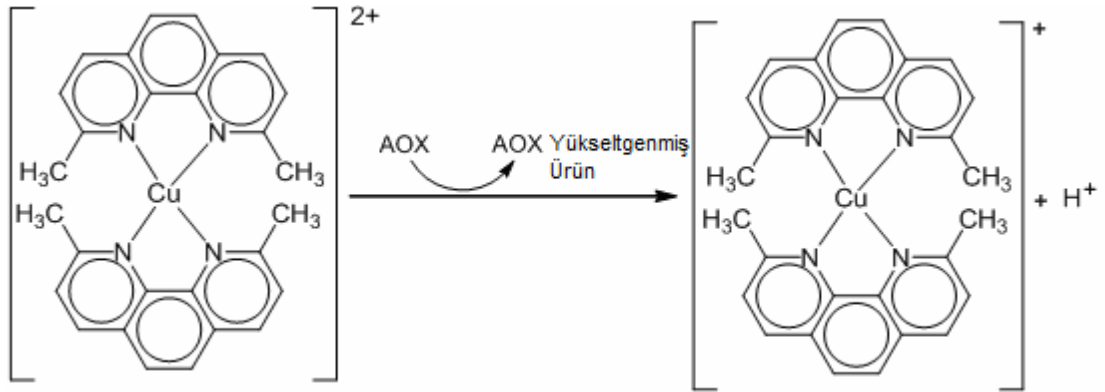
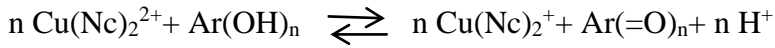
2.8.7. FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power; Fe(III) İyonu İndirgeyici Antioksidan Gücü) Yöntemi

Antioksidan varlığında Ferrictripirydyltriazine kompleksi asidik ortamda Fe⁺²'ye indirgenir. Meydana gelen renkli çözelti 595 nm'de absorbans artışına sebep olur. Sonuçlar troloks eşdeğeri olarak ifade edilir. Orijinal yöntemde 4 dakikada absorbans izlenir. Ancak bu sürede reaksiyon tamamlanmadığından izleme zamanının 30 dakika olması tavsiye edilmektedir [70].

Teorikte redoks potansiyeli Fe⁺³/ Fe⁺² redoks çiftinin potansiyelinden daha düşük olan bileşikler Fe⁺³'ü Fe⁺²'ye indirgeyebilir. Dolayısıyla bu durum FRAP değerlerinin daha yüksek çıkmasına neden olur. Analiz süresine bağlı olarak FRAP sonuçları değişebilir. Kafeik asit, kuersetin, ferulik asit, tannik asit gibi polifenolleri tanımlamak için daha uzun bir reaksiyon süresi gerekir. Yöntemde demir iyonu esas alınır. Bu nedenle antioksidan aktivite tayini için uygun değildir. Fakat diğer yöntemlere kıyasla FRAP yöntemi için ucuz, basit ve hızlı olduğu ifade edilmektedir [63, 71].

2.8.8. Cu-II İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi Yöntemi (CUPRAC)

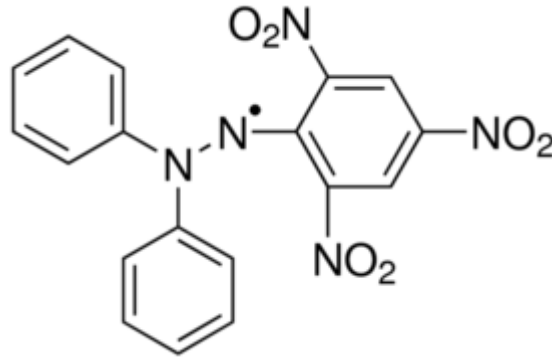
CUPRAC yöntemi; Cu(II)'nin numunedeki antioksidanlar tarafından Cu(I)'e indirgenmesi olayıdır. Kromojenik ayıraç olarak neokuproin diğer bir ismi ile 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin kullanılmaktadır. Apak ve arkadaşları tarafından geliştirilen bu yöntemde, 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (neokuproin)'in Cu(II) ile oluşturduğu bakır(II)-neokuproin kompleksinin 450 nm'de maksimum absorban veren bakır(I)-neokuproin kelatına indirgenme yeteneğinden faydalanılarak toplam antioksidan kapasitesi hesaplanmaktadır. CUPRAC yönteminde karşılaştırma maddesi olarak troloks ya da troloksa benzer bir madde kullanılmaktadır. Bu yöntemde Cu-II çözeltisi, amonyum asetatın pH=7'deki tampon çözeltisi, neokuproinin alkoldeki çözeltisi karıştırılmaktadır [72]. Bakır reaksiyonu demir reaksiyonu kinetiklerine göre hızlıdır. CUPRAC yönteminin avantajı, çok zaman almayan bir süreyle yapılan hızlı bir yöntem olmasıdır. Kompleks moleküller için 30-60 dk'lık süre gerektiren bu yöntemde gallik asit, askorbik asit, kuersetin ve ürik asit gibi maddeler için CUPRAC yöntemini daha kısa sürelerde gerçekleştirdiği ifade edilmektedir [63]. Yöntemin uygulanması kolay ve yöntemde kullanılan ayıraçların ucuz olması diğer yöntemlere göre avantaj olarak gösterilmektedir.



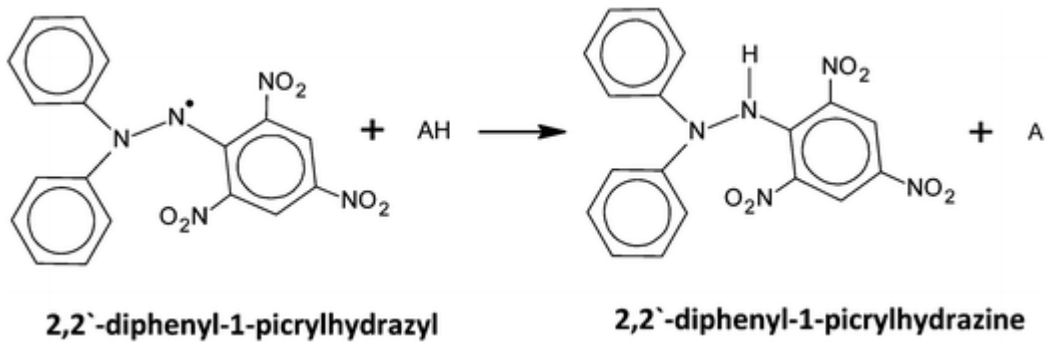
Şekil 2.9. Cu(II)'nin antioksidan madde ile Cu(I)'e indirgenmesi

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

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) kararlı olup ticari olarak satılan bir radikaldir. Organik nitrojen radikali olarak bilinmektedir [61]. Serbest bir elektronun molekülde yer değiştirmesiyle birlikte mor-menekşe rengi oluşumu gözlenir. DPPH ile hidrojen atomu veren antioksidan karıştırıldığında koyu menekşe rengi kaybolur. 517 nm'deki absorbansın azalmasına proton transferi neden olur ve bu olay absorbans sabitlenene kadar spektrofotometre ile izlenir. Böylece DPPH'nin indirgenmiş formu meydana gelir [60, 73]. Protonu alarak DPPH-H indirgenmiş forma dönüşür. Oluşan ilk serbest radikal A'dır. Basit, hızlı, kullanılabilir bir yöntem olarak DPPH radikal temizleme yöntemi bilinmektedir. Antioksidanlar DPPH ile reaksiyona yavaş girerken ya da hiç reaksiyon vermezken, peroksil radikalleri ile hızlı bir reaksiyona girebilir [63, 71, 61].



Şekil 2.10. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikalinin kimyasal yapısı



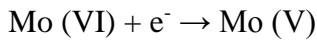
Şekil 2.11. Antioksidan-DPPH radikali tepkime mekanizması

"Antiradikal etkinlik"; DPPH'nin konsantrasyonunu %50 oranında azaltmak için gerekli antioksidan miktarına denir ve IC₅₀ (mg/mL) ile gösterilmektedir [74]. DPPH metoduna göre yapılan radikal süpürme deneylerinde ölçülen absorbanlara bağlı olarak, DPPH'nin kalibrasyon grafiğinden faydalanılarak IC₅₀ değerleri (ortamdaki serbest radikallerin konsantrasyonunun yarısını inhibe ettiği konsantrasyon) hesaplanır.

DPPH'nin kalibrasyon eğrisinden hesaplanan IC₅₀ değerleri dikkate alındığında, IC₅₀ değeri ne kadar küçükse antioksidan aktivitesi de o kadar fazladır denilebilir. Bunun anlamı aynı miktar serbest radikali en düşük konsantrasyonda süpürebilen maddeler daha kuvvetli aktivite göstermektedir [75].

2.8.10. Toplam Fenolik Madde Tayin Yöntemi (Folin-Ciocalteu)

Folin-Ciocalteu yöntemi; indirgeyici bileşikler ve fenolik bileşiklerden molibdene elektron transferine dayanan bu yöntemde oluşan kompleks mavi renktedir ve 750 nm'de maksimum absorban verir. Yöntemde standart madde olarak genellikle gallik asit (mg/mL veya µg/mL) kullanılmaktadır [83]. İlk olarak protein analizi için tasarlanan bu yöntem Singleton ve ark. tarafından şaraptaki toplam fenolik madde tayini için geliştirilmiştir [60]. Folin-Ciocalteu reaktifi ticari olarak da satılmaktadır. Gıdalarda antioksidan kapasitesinin tayininde Folin-Ciocalteu yöntemi basit, güvenilir ve tekrarlanılabilir bir yöntemdir [61, 60, 71]. Örneğin indirgenme kapasitesini ölçer.



Folin–Ciocalteu reaktifinin hazırlanması:

5 g sodyum tungstat dihidrat (Na₂WO₄ x 2H₂O), 1,25 g sodyum molibdat (Na₂MoO₄.H₂O), 2,5 mL %85 lik H₃PO₄, 5 mL derişik HCl eklenilir ve 35 mL su eklenir. Çözelti 10 saat oda sıcaklığında bekletilir daha sonra 7,5 g lityum sülfat, 2,5 mL su ve birkaç damla Br₂ damlatılır ve 10 saat geri soğutucu altında kaynatılıp soğutulur ve 50 mL'ye seyreltilir. Gerekirse süzülür.

Bu reaktif (Folin–Ciocalteu) ticari olarak da satılmaktadır. Bu çalışmada ticari Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılmıştır.

2.9. Çalışma Materyali Hakkında Bilgi

Zeytingiller (Oleaceae) familyasının *Fraxinus* cinsini oluşturan dişbudak ağacı, cinsine göre boyu 10 ile 35 m arasında değişen düzgün ve dolgun gövdeye sahip yuvarlak tepeli ağaçların ortak adıdır. Genel olarak Avrupa ve Asya'da yaygın bulunan dişbudak ağaçlarının birçok çeşidi mevcut olmakla birlikte Türkiye'de dişbudak ağaçları Ege ve Karadeniz Bölgelerinde yaygın olarak görülmektedir [76].

2.9.1. Yerli Dişbudak (*Fraxinus Excelsior*)

Avrupa'dan Kırım ve Kafkasya'ya, Avrupa'nın ve Batı Asya'nın en çok rastlanan ağaçlarından olan Yerli Dişbudak özellikle Britanya'da geniş bir yayılım göstermekte olup Türkiye'de de bulunan önemli bir ağaçtır. Kocaeli ve Karadeniz Bölgesi, Trakya, Mersin (Toros dağları), Maraş (Ahır dağı), Amasya, Gökçedağ, Samsun, Ladik, Kastamonu, Çankırı, İzmit gibi alanlarda da yaygındır [77].



Şekil 2.12. Yerli Dişbudak (*Fraxinus Excelsior*) ağacı



Şekil 2.13. Yerli Dişbudak (*Fraxinus Excelsior*) ağacı yaprakları

2.9.2. Amerikan Dişbudak (*Fraxinus Americana*)

Amerika'nın doğusunda doğal olarak yetişen bir dişbudak türüdür.



Şekil 2.14. Amerikan Dişbudak (*Fraxinus Americana*) ağacı



Şekil 2.15. Amerikan Dişbudak (*Fraxinus Americana*) ağacı yaprakları

3. DENEYSEL KISIM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışma Materyali

Yerli Dişbudak (*Fraxinus Excelsior*) ve Amerikan Dişbudak (*Fraxinus Americana*) bitkisine ait numuneler, Haziran 2015 döneminde Manisa Muradiye Orman Fidanlık İşletmesi'nde toplandı. Yapraklar saf su ile yıkandı, nem ve güneş ışığından korunarak karanlık bir ortama alınıp kurutuldu. Numuneler daha sonra +4°C'deki buzdolabında karanlık ortamda muhafaza edildi.

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

| Madde Adı | Satın alınan firma |
|------------------------------------|---------------------------|
| Gallik asit | Sigma Aldrich |
| Ferulik asit | Sigma Aldrich |
| Kafeik asit | Sigma Aldrich |
| DPPH | Sigma Aldrich |
| Neokuproin | Sigma Aldrich |
| Troloks | Sigma Aldrich |
| Vanilik asit | Fluka |
| Na ₂ CO ₃ | Merck |
| CuCl ₂ | Merck |
| Folin-Ciocalteu reaktifi | Merck |
| CH ₃ COONH ₄ | Panreac |
| Metanol | Riedel-de Haën |

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar

| Adı | Satın alınan firma |
|--|--|
| UV/VIS Spektrofotometre | Jasco V-530 |
| LC-MS/MS | Sıvı kromatografi: Agilent Technologies 1260 Infinity |
| | Kütle spektrometresi: Agilent Technologies 6420 Triple Quad |
| Ultrasonik banyo | Elma Transsonic Digitals |
| Su banyosu | Memmert |
| Etüv | Nüve EN 400 |
| Santrifüj | Hettich-Zentrifugen EBA 20 |
| Analitik terazi | Sartorius M-Pact AX224 |
| pH metre | Hanna Instruments pH 211 Microprocessor |
| Otomatik mikro pipetler (10-100 µL ve 100-1000 µL) | Brand transferpette |
| Buzdolabı | Altus al 366 |

3.1.4. Çözeltilerin Hazırlanması

Gallik asit stok çözeltisi: 0,0025 g gallik asit ($m_a = 188,1$ g/mol) 25 mL saf suda çözünerek hazırlanmıştır. Elde edilen bu çözeltinin konsantrasyonu (100 mg/L) (100 ppm) olarak hesaplanmıştır.

Ferulik asit çözeltisi: 0,01 g ferulik asit ($m_a = 194,184$ g/mol) 100 mL saf suda çözünerek hazırlanmıştır. Elde edilen bu çözeltinin konsantrasyonu (100 mg/L) (100 ppm) olarak hesaplanmıştır.

Vanilik asit çözeltisi: 0,01 g vanilik asit ($m_a = 168,15$ g/mol) 100 mL saf suda çözünerek hazırlanmıştır. Elde edilen bu çözeltinin konsantrasyonu (100 mg/L) (100 ppm) olarak hesaplanmıştır.

Kafeik asit çözeltisi: 0,01 g kafeik asit ($m_a = 180,157$ g/mol) 100 mL saf suda çözünerek hazırlanmıştır. Elde edilen bu çözeltinin konsantrasyonu (100 mg/L) (100 ppm) olarak hesaplanmıştır.

Folin-Ciocalteu reaktifi: Ticari olarak satın alındı.

Na₂CO₃ çözeltisi: **3,10 g Na₂CO₃** ($m_a = 105,99$ g/mol) **100 mL saf suda** çözünerek %3,1 (a/h)'lık Na₂CO₃ çözeltisi hazırlanmıştır.

Troloks çözeltisi: **0,0025 g troloks** ($m_a = 250,29$ g/mol) **25 mL saf suda** çözünerek hazırlanmıştır. Elde edilen bu çözeltinin konsantrasyonu $3,9 \times 10^{-4}$ M olarak hesaplanmıştır.

Neokuproin çözeltisi: **0,0407 g neokuproin** ($m_a = 217,27$ g/mol) **25 mL metanolde** çözünerek hazırlanmıştır. Elde edilen bu çözeltinin konsantrasyonu $7,5 \times 10^{-3}$ M olarak hesaplanmıştır.

Bakır(II) klorür (CuCl₂) çözeltisi: **0,0336 g CuCl₂** ($m_a = 134,45$ g/mol) **25 mL saf suda** çözünerek hazırlanmıştır. Elde edilen bu çözeltinin konsantrasyonu $1,0 \times 10^{-2}$ M olarak hesaplanmıştır.

Amonyum asetat tampon (NH₄Ac) çözeltisi: **1,927 g amonyum asetat** ($m_a = 77,08$ g/mol) **25 mL saf suda** çözünerek (pH=7) hazırlanmıştır.

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) çözeltisi: **0,005 g DPPH** ($m_a = 394,32$ g/mol) **25 mL metanolde** çözünerek hazırlanmıştır. Elde edilen bu çözeltinin konsantrasyonu $5,00 \times 10^{-4}$ M olarak hesaplanmıştır. Daha sonra hazırlanan bu çözeltiye 3 kat seyreltme işlemi uygulanmıştır.

%70'lik MeOH-su çözeltisi: **175 mL MeOH üzerine 75 mL saf su** eklenerek %70 (h/h)'lık MeOH-su çözeltisi hazırlanmıştır.

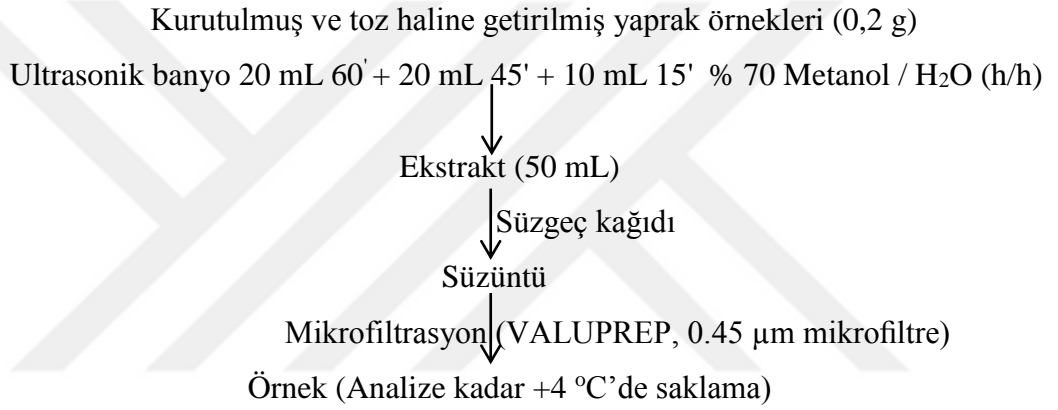
3.2. Yöntemler

3.2.1. Çalışma Materyalinin Analize Hazırlanması

Yerli ve Amerikan Dişbudak ağaçlarının kurutulmuş yaprakları havanda toz haline getirildikten sonra $0,2000 \pm 0,0002$ g alınıp ekstraksiyon ve infüzyon işlemleri uygulanmıştır. Ekstraktlardaki toplam fenolik madde miktarı Folin-Ciocalteu, toplam antioksidan kapasitesi CUPRAC ve radikal giderme kapasitesi DPPH yöntemleri ile spektrofotometrik olarak, içeriği ise LC-MS ile tayin edilmiştir.

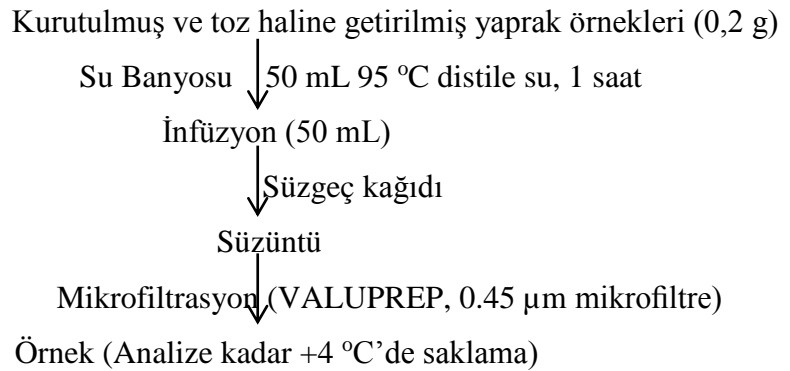
3.2.2. Yaprakların Ekstraksiyonu

Bitki Örneklerinin %70'lik Metanol-Su Ekstraksiyonu



3.2.3. Yaprakların İnfüzyonu (Demlenmesi)

Bitki Örneklerinin İnfüzyonu





Şekil 3.1. Yerli Dişbudak ağacı yapraklarına ait bitkinin toplanıp, kurutulup, infüzyon ve %70'lik metanol-su ekstraksiyonu uygulanması işlemi



Şekil 3.2. Amerikan Dişbudak ağacı yapraklarına ait bitkinin toplanıp, kurutulup, infüzyon ve %70'lik metanol-su ekstraksiyonu uygulanması işlemi

3.2.4. Bu Çalışmada Kullanılan Yöntemlerin Validasyonu

3.2.4.1. Folin-Ciocalteu Reaktifi ile Fenolik Bileşiklerin Tayini

Folin-Ciocalteu yöntemi bitkilerde toplam fenolik madde miktarının tespit edilmesinde sıkça kullanılmaktadır. Bu çalışmada da bu amaçla Folin-Ciocalteu yöntemi tercih edilmiştir. Bitki ekstraktlarında toplam fenolik madde miktarını tespit etmeden önce söz konusu yöntemin uygulanabilirliği ile ilgili bazı validasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Folin-Ciocalteu yönteminde toplam fenolik madde miktarı gallik asit cinsinden ifade edilmektedir. Bu nedenle validasyon çalışmalarında gallik asit standart madde olarak kullanılmıştır.

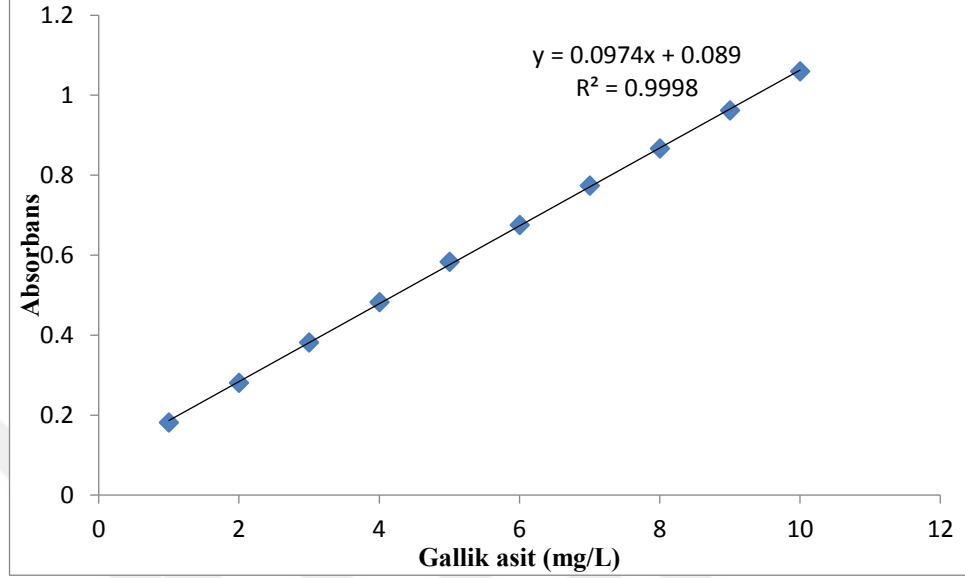
Toplam fenolik madde miktarı tayini için kullanılan Folin-Ciocalteu yönteminin doğrusallığını tespit etmek amacıyla 10 (on) farklı derişim (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mg/L) de gallik asit çözeltileri hazırlanarak kalibrasyon grafiği çizilmiştir.

Tablo 3.3.'de hazırlanışı ayrıntılı olarak verilen standart çalışma çözeltilerinden her bir derişim için tablodaki miktarlarda alındıktan sonra 500 µL'ye tamamlayacak şekilde saf su eklenmiş, üzerlerine 500 µL Folin Ciocalteu reaktifi ve 4 mL Na₂CO₃ çözeltilerinden eklenerek son hacim 5 mL'ye tamamlandıktan sonra 50 °C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda absorbans değerleri 750 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülmüştür. Sıfırlama işlemi (500 µL su+ 500 µL Folin Ciocalteu reaktifi+ 4 mL Na₂CO₃) ile yapılmıştır.

Tablo 3.3. 10 farklı gallik asit derişimi için hazırlanan standart çalışma çözeltileri

| Gallik asit çalışma çözeltileri (mg/L) | 100 mg/L Gallik asit stok çözeltilerinden alınan miktar (µL) | Eklenen saf su miktar (µL) | Folin-Ciocalteu Reaktifi (µL) | Na ₂ CO ₃ (mL) | Toplam hacim(mL) |
|--|--|----------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|------------------|
| 1 | 50 | 450 | 500 | 4 | 5 |
| 2 | 100 | 400 | 500 | 4 | 5 |
| 3 | 150 | 350 | 500 | 4 | 5 |
| 4 | 200 | 300 | 500 | 4 | 5 |
| 5 | 250 | 250 | 500 | 4 | 5 |

| | | | | | |
|----|-----|-----|-----|---|---|
| 6 | 300 | 200 | 500 | 4 | 5 |
| 7 | 350 | 150 | 500 | 4 | 5 |
| 8 | 400 | 100 | 500 | 4 | 5 |
| 9 | 450 | 50 | 500 | 4 | 5 |
| 10 | 500 | - | 500 | 4 | 5 |



Şekil 3.3. 10 farklı gallik asit derişimi için elde edilen kalibrasyon grafiği

On(10) farklı derişimde gallik asit standart çözeltileri için çizilen kalibrasyon eğrisinde yeterli doğrusallık ($R^2 = 0,9998$) ve bağıl hata %5'in altında bulunduğundan daha sonraki yapılan çalışmalarda çalışma standardı sayısı azaltılarak 5 (beş) farklı derişimde (1, 3, 5, 7, 9 mg/L) gallik asit çalışma çözeltileriyle çizilen kalibrasyon grafiği tercih edilmiştir.

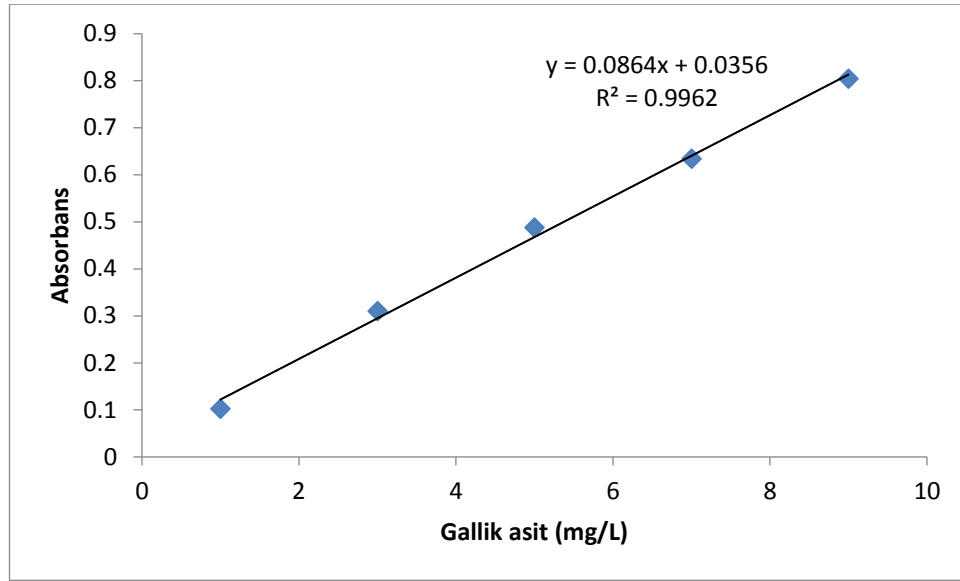
Tablo 3.4.'de hazırlanışı ayrıntılı olarak verilen standart çalışma çözeltilerinden her bir derişim için tablodaki miktarlarda alındıktan sonra 250 μL 'ye tamamlayacak şekilde saf su eklenmiş, üzerlerine 250 μL Folin Ciocalteu reaktifinden ve 2 mL Na_2CO_3 çözeltisinden eklenerek son hacim 2,5 mL'ye tamamlandıktan sonra 50°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda absorbans değerleri 750 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülmüştür. Sıfırlama işlemi (250 μL su+ 250 μL Folin Ciocalteu reaktifi+ 2 mL Na_2CO_3) ile yapılmıştır.

Tablo 3.4. 5 farklı gallik asit derişimi için hazırlanan standart çalışma çözeltileri

| Gallik asit çalışma çözeltileri (mg/L) | 100 mg/L Gallik asit stok çözeltilisinden alınan miktar(μ L) | Eklenen saf su miktar (μ L) | Folin-Ciocalteu Reaktifi (μ L) | Na ₂ CO ₃ (mL) | Toplam hacim (mL) |
|--|---|----------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|-------------------|
| 1 | 25 | 225 | 250 | 2 | 2,5 |
| 3 | 75 | 175 | 250 | 2 | 2,5 |
| 5 | 125 | 125 | 250 | 2 | 2,5 |
| 7 | 175 | 75 | 250 | 2 | 2,5 |
| 9 | 225 | 25 | 250 | 2 | 2,5 |

Tablo 3.5. Gallik asit standart çözeltileri için absorbands değerleri

| Gallik asit (mg/L) | Absorbans (750 nm) | Ortalama Absorbans |
|--------------------|----------------------------|--------------------|
| 1 | 0,1024 0,1025 0,1024 | 0,1024 |
| 3 | 0,3096 0,3097 0,3097 | 0,3097 |
| 5 | 0,4878 0,4877 0,4876 | 0,4877 |
| 7 | 0,6340 0,6339 0,6340 | 0,6340 |
| 9 | 0,8042 0,8041 0,8043 | 0,8042 |



Şekil 3.4. 5 farklı gallik asit derişimi için elde edilen kalibrasyon grafiği

Toplam fenolik madde miktarı tayini için, 50, 100, 150 µL'lik üç farklı gallik asit (model çözelti) hacmi ve 50°C'de 2 saat inkübasyon süresi kullanılmıştır. 50, 100, 150 µL'lik üç farklı örnek hacmi üzerine 250 µL FCR ve 2 mL Na₂CO₃ çözeltisi ilave edildikten sonra toplam hacim 2,5 mL olacak şekilde çözücüsünden ilave edilerek 50°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda örnek absorbansı 750 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunmuştur.

Tablo 3.6. Model çözelti (gallik asit)'nin gün içi ve günler arası elde edilen sonuçları

| Gallik asit çalışma çözeltileri (mg/L), n=5 | Gün içi doğru denkleminde hesaplanan ortalama konsantrasyon değerleri (mg/L), n=5 | Günler arası ortalama konsantrasyon (mg/L), n=3 | Günler arası %Bağıl hata | Günler arası Standart sapma (s) | Günler arası Bağıl standart sapma |
|---|---|---|--------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| 2 | 1.gün: 2,18 2.gün: 1,98 3.gün: 2,07 | 2,08 | 3,91 | 0,10 | 4,82 |
| 4 | 1.gün: 4,08 2.gün: 4,05 3.gün: 4,12 | 4,06 | 1,56 | 0,04 | 0,95 |
| 6 | 1.gün: 5,98 2.gün: 6,23 | 6,10 | 1,73 | 0,15 | 2,40 |

| | | | | | |
|--|-------------|--|--|--|--|
| | 3.gün: 6,23 | | | | |
|--|-------------|--|--|--|--|

Gün içi ve günler arası (üç gün arayla üç defa) yapılan gallik asit tayinlerinde bağıl standart sapma sırasıyla 2 mg/L için % 4,82; 4 mg/L için % 0,95 ve 6 mg/L için % 2,40 olarak bulunmuş olup bu bağıl hataların kabul edilecek büyüklükte olduğu görülmüştür.

Gerçek numunelerde gallik asit dışında fenolik yapıda birçok bileşen bulunmaktadır. Bunlardan en sık rastlanan türler vanilik asit, ferulik asit, kafeik asit vb.'dir. Folin-Ciocalteu yöntemi tüm fenolik bileşikleri gallik asit cinsinden vermektedir. Bu nedenle ortaya çıkabilecek hataları görmek amacıyla yöntemin analitik performansı gallik asit, vanilik asit, ferulik asit, kafeik asit standart çözeltileri kullanılarakda incelenmiştir. Seçilen her bir çözelti ve bunların karışımlarıyla oluşturulan standart çözeltiler ayrı ayrı analizlenmiş ve madde miktarları gallik asit eşdeğeri cinsinden hesaplanmıştır.

Tablo 3.7. Folin-Ciocalteu yöntemiyle elde edilen bulgular

| Model çözelti | Model çözelti konsantrasyonu (mg/L) | Ortalama absorbans (n=3) | Ortalama konsantrasyon (mg/L), (n=3) | %Bağıl hata |
|----------------------------------|--|---------------------------------|---|--------------------|
| Gallik asit | 2 | 0,2191 | 2,12 | 6,22 |
| | 4 | 0,3977 | 4,19 | 4,76 |
| | 6 | 0,5776 | 6,27 | 4,56 |
| Ferulik asit | 2 | 0,2017 | 1,92 | -3,88 |
| | 4 | 0,3557 | 3,70 | -7,39 |
| | 6 | 0,5088 | 5,48 | -8,72 |
| Vanilik asit | 2 | 0,1958 | 1,85 | -7,28 |
| | 4 | 0,3486 | 3,62 | -9,43 |
| | 6 | 0,5079 | 5,47 | -8,89 |
| Kafeik asit | 2 | 0,2551 | 2,54 | 27,01 |
| | 4 | 0,5181 | 5,58 | 39,62 |
| | 6 | 0,7394 | 8,14 | 35,76 |
| Gallik Asit+ Vanilik asit | 2 | 0,2081 | 1,99 | -0,17 |
| | 4 | 0,3873 | 4,07 | 1,77 |
| | 6 | 0,5417 | 5,86 | -2,36 |

| | | | | |
|---|----------|--------|------|-------|
| | | | | |
| Gallik Asit+ Kafeik Asit | 2 | 0,3129 | 3,21 | 60,49 |
| | 4 | 0,5694 | 6,18 | 54,46 |
| | 6 | 0,7492 | 8,26 | 37,65 |
| Gallik Asit+Ferulik Asit | 2 | 0,1928 | 2,11 | 5,54 |
| | 4 | 0,3278 | 3,73 | -6,78 |
| | 8 | 0,6712 | 7,85 | -1,92 |
| Gallik Asit+Ferulik Asit+Vanilik Asit | 3 | 0,2820 | 2,90 | -3,34 |
| | 6 | 0,5217 | 5,64 | -5,92 |
| | 9 | 0,7503 | 8,26 | -8,18 |
| Gallik asit+ Ferulik Asit+ Vanilik Asit+ Kafeik Asit | 2 | 0,2493 | 2,47 | 23,66 |
| | 4 | 0,4792 | 5,13 | 28,35 |
| | 6 | 0,6374 | 6,97 | 16,10 |

Her bir durum için madde miktarları (kafeik asit hariç) $\pm\%10$ 'luk bağıl hata kapsamında bulunmuştur. Bu durum, toplam fenolik madde miktarı tayininde Folin-Ciocalteu yönteminin doğruluk ve tekrarlanabilirliğinin oldukça iyi ve uygulanabilir olduğunu göstermiştir.

3.2.4.2. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Yöntemiyle Radikal Giderme Kapasitesi Tayini

Söz konusu DPPH radikal giderme ya da temizleme yöntemi basit, hızlı ve kolay uygulanabilir bir yöntem olarak sıklıkla tercih edilmektedir.

DPPH yöntemi ile radikal giderme kapasitesi tayininde troloks standart maddesi kullanılmıştır. Standart kalibrasyon grafiği için 5 farklı konsantrasyonda (1, 3, 5, 7, 9 mg/L) troloks çalışma çözeltileri hazırlanmıştır. Çalışma çözeltileri 100 mg/L troloks stok çözeltisinden (0,0025 g troloks/25 mL metanol) hazırlanmıştır.

Tablo 3.8'de görüldüğü gibi istenilen derişimde troloks çalışma çözeltileri hazırlamak için 100 mg/L stok çözeltiden her bir derişim için hesaplanan miktarlarda alınarak, metanol ile 1000 µL'ye tamamlandıktan sonra üzerlerine 1 mL DPPH eklenerek son hacim 2 mL'ye tamamlanmıştır. Tüpler oda sıcaklığında, karanlık ortamda 20 dakika bekletildikten sonra absorbans değerleri 517 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülmüştür. Sıfırlama işlemi (2000 µL metanol) ile yapılmış ve % inhibisyon amacıyla kontrol çözeltisi (1 mL MeOH+ 1 mL DPPH) hazırlanmıştır.

Tablo 3.8. DPPH yönteminde troloks standart çözeltilerinin hazırlanışı

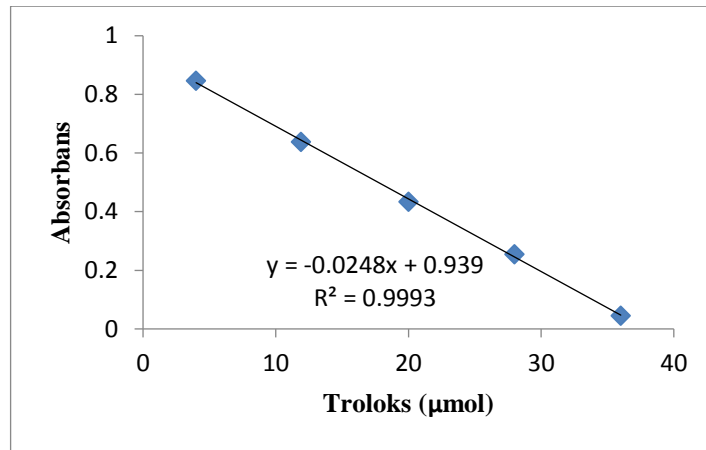
| Troloks çalışma çözeltileri (mg/L) | 100 mg/L Troloks stok çözeltisinden alınan miktar (µL) | Eklenen metanol miktar (µL) | Eklenen DPPH miktarı(mL) | Toplam hacim (mL) |
|---|---|------------------------------------|---------------------------------|--------------------------|
| 1 | 20 | 980 | 1 | 2 |
| 3 | 60 | 940 | 1 | 2 |
| 5 | 100 | 900 | 1 | 2 |
| 7 | 140 | 860 | 1 | 2 |
| 9 | 180 | 820 | 1 | 2 |

Tablo 3.9. Kontrol çözeltisi için absorbans değerleri

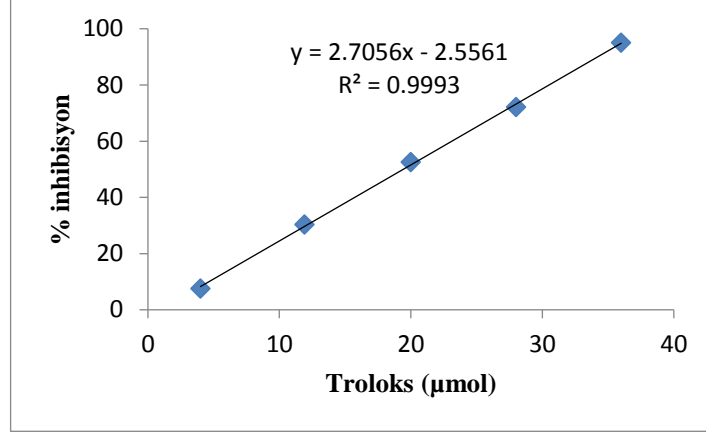
| Kontrol çözeltisi (1 mL MeOH+ 1 mL DPPH) | Absorbans | Ortalama absorbans |
|--|---|--------------------|
| | 0,9164-0,9163-0,9154- 0,9152-0,9151-0,9153 | 0,9156 |

Tablo 3.10. Troloks standartları için absorbans ve % inhibisyon değerleri

| Troloks(mg/L) | Troloks (μ mol) | Absorbans | Ortalama absorbans | %inhibisyon |
|---------------|-------------------------|---|-----------------------|-------------|
| 1 | 4,0 | 0,8470-0,8468- 0,8469-0,8465- 0,8463 | 0,8467 | 7,5268 |
| 3 | 11,9 | 0,6375-0,6383- 0,6378-0,6385- 0,6384 | 0,6381 | 30,3093 |
| 5 | 20,0 | 0,4341-0,4343- 0,4340-0,4346- 0,4344 | 0,4343 | 52,5697 |
| 7 | 28,0 | 0,2553-0,2550- 0,2556-0,2554- 0,2553 | 0,2553 | 72,1150 |
| 9 | 36,0 | 0,0459-0,0458- 0,0458- 0,04662- 0,0458 | 0,0459 | 94,9870 |



Şekil 3.5. Troloks miktarına (μ mol) karşı absorbans değerlerine ait grafik



Şekil 3.6. Troloks miktarına (µmol) karşılık % inhibisyon değerlerine göre çizilen grafik

% inhibisyon aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ inhibisyon} = (\text{Ab}_{\text{Skontrol}} - \text{Ab}_{\text{Örnek}}) / \text{Ab}_{\text{Skontrol}} \times 100$$

$\text{Ab}_{\text{Skontrol}}$: 1 mL MeOH+ 1 mL DPPH çözeltisi absorbansı

$\text{Ab}_{\text{Örnek}}$: 20. dakikada örnek absorbansı

Radikal giderme kapasite tayini için, 40, 80, 120 µL'lik üç farklı gallik asit (model çözelti) hacmi ve oda sıcaklığında karanlık ortamda 20 dakika inkübasyon süresi kullanılmıştır. 40, 80, 120 µL'lik üç farklı örnek hacmi üzerine 1 mL DPPH çözeltisi ilave edildikten sonra toplam hacim 2 mL olacak şekilde çözücüsünden ilave edilerek oda sıcaklığında karanlık ortamda 20 dakika inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda örnek absorbansı 517 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunmuştur.

Tablo 3.11. Model (gallik asit) çözeltileri için absorbans değerleri

| Model çözelti(gallik asit) (mg/L), n=3 | Absorbans, n=3 | Ortalama absorbans |
|---|--|--------------------|
| 2 | 0,2010-0,2005-0,2004- 0,2004-0,2001 | 0,2005 |
| | 0,2237-0,2231-0,2232- 0,2233-0,2229 | 0,2232 |
| | 0,2087-0,2088-0,2087- 0,2087-0,2086 | 0,2087 |
| 4 | 0,0633-0,0632-0,0633- 0,0631-0,0628 | 0,0631 |
| | | |

| | | |
|---|--|--------|
| 4 | 0,0752-0,0747-0,0749- 0,0748-0,0749 | 0,0749 |
| | 0,0629-0,0617-0,0616- 0,0618-0,0618 | 0,0620 |
| 6 | 0,0538-0,0540-0,0540- 0,0541-0,0540 | 0,0540 |
| | 0,0601-0,0601-0,0602- 0,0603-0,0604 | 0,0602 |
| | 0,0605-0,0605-0,0604- 0,0603-0,0602 | 0,0604 |

Örneklerin radikal giderme kapasitelerini saptamak amacıyla Rodriguez ve arkadaşlarının [78] uyguladığı prosedür kullanılmıştır. Bu amaçla troloks ve model çözelti (gallik asit)'lerin derişimlerine karşılık ΔA değişim grafiğinden hesaplanan eğimlerinden gidilerek radikal giderme kapasiteleri hesaplanmıştır.

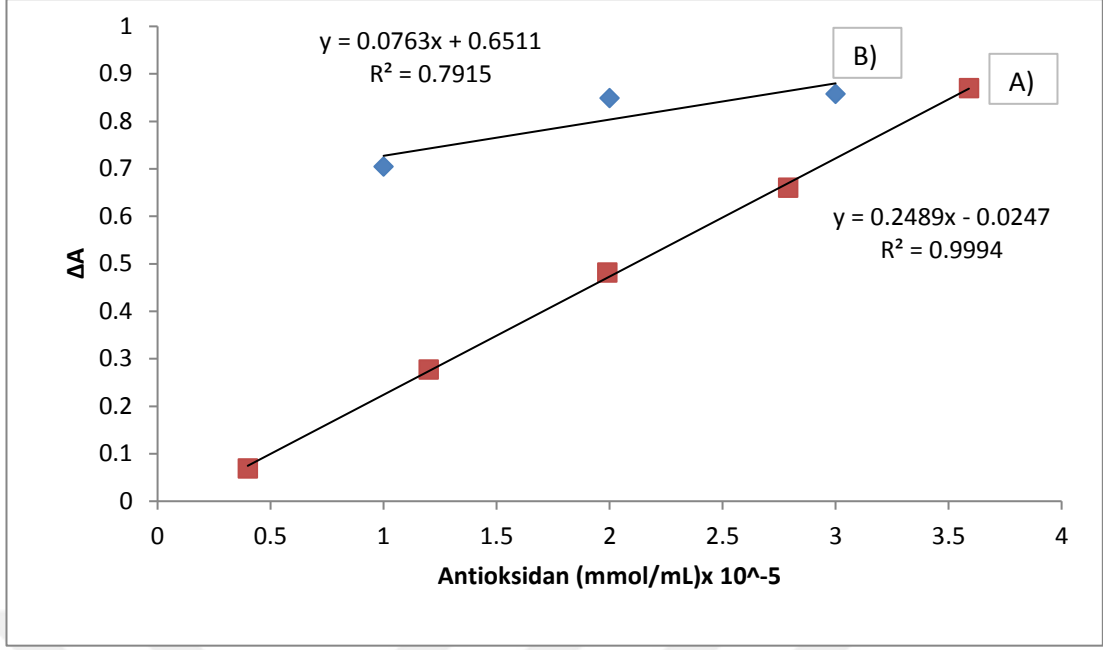
$$\Delta A = \text{Abs}_{(\text{DPPH çözeltisi})} - \text{Abs}_{(\text{DPPH} + \text{örnek})}$$

Tablo 3.12. Troloks standartları (mmol/mL) için hesaplanan ΔA değerleri

| Troloks (mg/L) | Troloks (mmol/mL) | ΔA |
|----------------|-----------------------|------------|
| 1 | $3,99 \times 10^{-6}$ | 0,0689 |
| 3 | $1,20 \times 10^{-5}$ | 0,2775 |
| 5 | $1,99 \times 10^{-5}$ | 0,4813 |
| 7 | $2,79 \times 10^{-5}$ | 0,6603 |
| 9 | $3,59 \times 10^{-5}$ | 0,8697 |

Tablo 3.13. Model (gallik asit, mmol/mL) çözeltiler için hesaplanan ΔA değerleri

| Model çözelti (gallik asit) (mg/L) | Model çözelti (gallik asit) (mmol/mL) | ΔA |
|---------------------------------------|--|------------|
| 2 | $1,06 \times 10^{-5}$ | 0,7048 |
| 4 | $2,13 \times 10^{-5}$ | 0,8489 |
| 6 | $3,19 \times 10^{-5}$ | 0,8574 |



Şekil 3.7. A) troloks B) gallik asit (model çözelti) için elde edilen kalibrasyon eğrileri

HESAPLAMA

Troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi (TEAK) aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır.

Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAK) = $(m_{\text{Standart}} / m_{\text{örnek}})$

m_{Standart} : Troloks konsantrasyonuna (mmol/mL) karşı ΔA değerleriyle çizilen grafiğin eğimi

$m_{\text{örnek}}$: Örnek (gallik asit) konsantrasyonuna (mmol/mL) karşı ΔA değerleriyle çizilen grafiğin eğimi

Gallik asit (model çözelti) için;

Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAK) = $(m_{\text{Standart}} / m_{\text{örnek}})$

= $(0,1984)/(0,0763)$

TEAK_{gallik asit} = 2,60

3.2.4.3. Cu-II İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi (CUPRAC) Yöntemiyle Toplam Antioksidan Kapasitesi Tayini

CUPRAC (Bakır(II) İndirgeyici Antioksidan Kapasitesi) yöntemi ile toplam antioksidan kapasitesinin tayin edilmesinde standart madde olarak troloks

kullanılmıştır. Standart grafiğinin hazırlanmasında kullanılmak üzere stok troloks çözeltisi (100 mg/L) hazırlanmıştır. Standart kalibrasyon grafiği için 5 farklı konsantrasyonda (1, 3, 5, 7, 9 mg/L) troloks çalışma çözeltileri hazırlanmıştır.

Tablo 3.14.'de hazırlanışı ayrıntılı olarak verilen troloks çalışma çözeltilerinden her bir derişim için tablodaki miktarlarda alındıktan sonra 1000 µL'ye tamamlayacak şekilde metanol eklenmiş üzerlerine 1 mL CuCl₂ çözeltisi, 1 mL Neokuproin çözeltisi, 1 mL Amonyum Asetat Tamponu (pH=7) eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda absorbens değerleri 450 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülmüş ve sıfırlama işlemi (1 mL CuCl₂+ 1 mL NH₄Ac tamponu+ 1 mL neokuproin+ 1 mL MeOH) ile yapılmıştır.

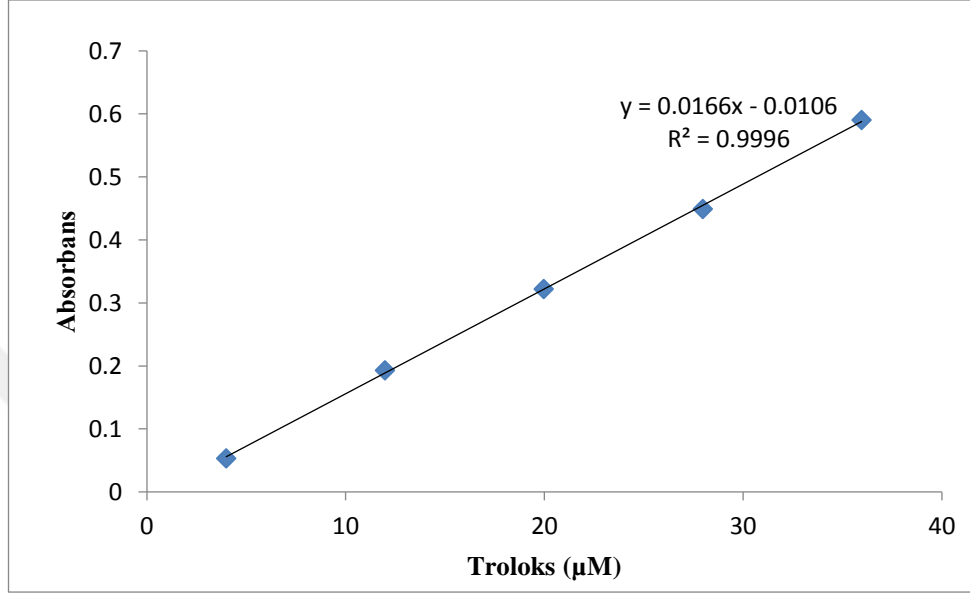
Tablo 3.14. CUPRAC yönteminde kalibrasyon grafiği için hazırlanan troloks çalışma çözeltileri

| Troloks çalışma çözeltileri (mg/L) | 100 mg/L Troloks stok çözeltisinden alınan miktar(µL) | Eklenen metanol miktar (µL) | Eklenen CuCl₂ miktarı (mL) | Eklenen Neokuproin miktarı(mL) | Eklenen Amonyum asetat tamponu (pH=7) Miktarı(mL) | Toplam hacim (mL) |
|---|--|------------------------------------|--|---------------------------------------|--|--------------------------|
| 1 | 40 | 960 | 1 | 1 | 1 | 4 |
| 3 | 120 | 880 | 1 | 1 | 1 | 4 |
| 5 | 200 | 800 | 1 | 1 | 1 | 4 |
| 7 | 280 | 720 | 1 | 1 | 1 | 4 |
| 9 | 360 | 640 | 1 | 1 | 1 | 4 |

Tablo 3.15. Troloks standart çözeltisi için absorbens değerleri

| Troloks (mg/L) | Troloks (µM) | Absorbans(450 nm) | Ortalama absorbens |
|-----------------------|---------------------|------------------------------------|---------------------------|
| 1 | 3,99 | 0,0539-0,0538-0,0535-0,0537-0,0533 | 0,0536 |
| 3 | 11,98 | 0,1930-0,1930-0,1933-0,1935-0,1932 | 0,1932 |
| 5 | 19,97 | 0,3226-0,3223-0,3228-0,3223- | 0,3224 |

| | | | |
|---|-------|--|--------|
| | | 0,3221 | |
| 7 | 27,97 | 0,4508-0,4494- 0,4484-0,4489- 0,4484 | 0,4492 |
| 9 | 35,96 | 0,5908-0,5903- 0,5921-0,5899- 0,5904 | 0,5907 |



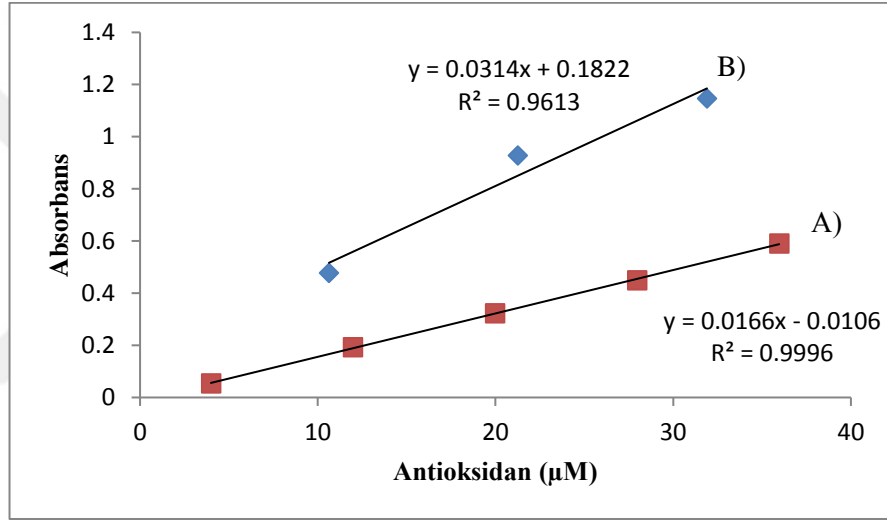
Şekil 3.8. Troloks standardı için elde edilen kalibrasyon grafiği

Toplam antioksidan kapasitesi tayini için, 80, 160, 240 µL'lik üç farklı hacimde gallik asit (model çözelti) çözeltisi oda sıcaklığında karanlık ortamda 30 dakika inkübasyona tabi tutulmuştur. Daha sonra herbirinin üzerine 1 mL ($1,0 \times 10^{-2}$ M) Cu(II) klorür çözeltisi, 1 mL ($7,5 \times 10^{-3}$ M) neokuproin çözeltisi ve 1 mL (1 M) amonyum asetat tampon (pH=7,0) çözeltisi ilave edildikten sonra toplam hacim 4 mL olacak şekilde çözücüsü ilave edilerek oda sıcaklığında karanlık ortamda 30 dakika inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda örnek absorbansı 450 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunmuştur.

Tablo 3.16. Model (gallik asit) çözeltileri için absorbans değerleri

| Model çözelti(gallik asit) (µM), n=3 | Absorbans(450 nm), (n=3) | Ortalama absorbans |
|--------------------------------------|--|--------------------|
| 10,63 | 0,4847-0,4804-0,4805- 0,4799-0,4798 | 0,4810 |
| | 0,4810-0,4813-0,4789- 0,4792-0,4789 | 0,4799 |
| | 0,4732-0,4724-0,4713- | 0,4720 |

| | | |
|-------|------------------------------------|--------|
| | 0,4720-0,4712 | |
| 21,26 | 0,9296-0,9252-0,9249-0,9260-0,9255 | 0,9262 |
| 21,26 | 0,9456-0,9455-0,9416-0,9412-0,9407 | 0,9429 |
| | 0,9190-0,9137-0,9138-0,9141-0,9152 | 0,9152 |
| 31,9 | 1,1974-1,1893-1,1958-1,1979-1,1889 | 1,1939 |
| | 1,1393-1,1306-1,1395-1,1302-1,1367 | 1,1353 |
| | 1,1136-1,1101-1,1091-1,1102-1,1086 | 1,1103 |



Şekil 3.9. CUPRAC metodunda A) troloks B) gallik asit (model çözelti) için elde edilen kalibrasyon eğrileri

Hesaplama:

Model çözelti(gallik asit) için toplam antioksidan kapasitesi Apak ve ark.'larının [79] belirttiği şekilde hesaplanmıştır. CUPRAC metodunda Troloks'un molar absorblama katsayısı $1,66 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.

$$\epsilon_{\text{Troloks}}: 1,66 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{\text{Gallik asit}}: 3,14 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$$

$$\text{TEAK}_{\text{gallik asit}} = \epsilon_{\text{Gallik asit}} / \epsilon_{\text{Troloks}} = 3,14 \times 10^4 / 1,66 \times 10^4$$

$$\text{TEAK}_{\text{gallik asit}} = 1,89$$

3.2.5. Yaprak Ekstraktlarının Analizi

3.2.5.1. Folin-Ciocalteu Yöntemi ile Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini

Folin-Ciocalteu yöntemi ile toplam fenolik madde miktarının tespit edilmesinde standart madde olarak gallik asit kullanılmıştır. Standart grafiğinin hazırlanmasında kullanılmak üzere stok gallik asit çözeltisi (100 mg/L) hazırlanmıştır. Standart kalibrasyon grafiği için 5 (beş) farklı konsantrasyonda (1, 3, 5, 7, 9 mg/L) gallik asit çalışma çözeltileri hazırlanmıştır.

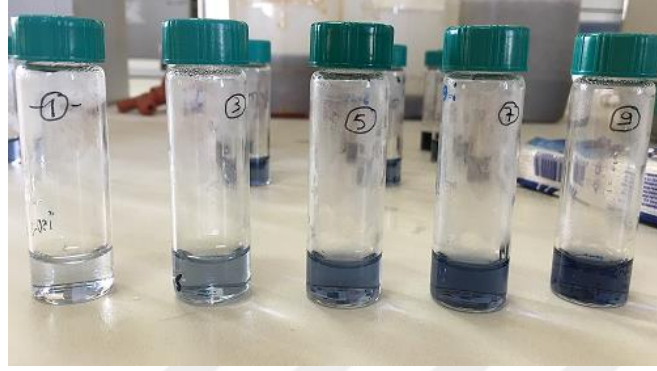
Tablo 3.17.'de hazırlanışı ayrıntılı olarak verilen gallik asit çalışma çözeltilerinden her bir derişim için tablodaki miktarlarda alındıktan sonra 250 µL'e tamamlayacak şekilde saf su eklenmiş, üzerlerine (1:5) oranında seyreltilmiş Folin-Ciocalteu reaktifinden 250 µL ve 2 mL Na₂CO₃ çözeltisinden eklenerek su banyosunda 50°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda absorbans değerleri 750 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçülmüştür. Sıfırlama işlemi (250 µL su+ 250 µL Folin Ciocalteu reaktifi+ 2 mL Na₂CO₃) ile yapılmıştır.

Örneklerin toplam fenolik madde miktarı Singleton ve ark. tarafından önerilen [80] şekilde Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak saptanmış ve sonuçlar gallik asit eşdeğeri olacak şekilde ifade edilmiştir. Yöntem fenolik bileşiklerin bazik ortamda Folin-Ciocalteu reaktifi indirgeyip kendilerinin oksitlendiği redoks reaksiyonu sonucunda oluşan mavi renkli kompleksin spektrofotometrik ölçümüne dayanmaktadır.

Tablo 3.17. Folin-Ciocalteu yönteminde hazırlanan gallik asit standart çalışma çözeltileri

| Gallik asit çalışma çözeltileri (mg/L) | 100 mg/L Gallik asit stok çözeltisinden alınan miktar(µL) | Eklenen saf su miktar (µL) | Folin-Ciocalteu Reaktifi (µL) | Na ₂ CO ₃ (mL) | Toplam hacim (mL) |
|--|---|----------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|-------------------|
| 1 | 25 | 225 | 250 | 2 | 2,5 |

| | | | | | |
|---|-----|-----|-----|---|-----|
| 3 | 75 | 175 | 250 | 2 | 2,5 |
| 5 | 125 | 125 | 250 | 2 | 2,5 |
| 7 | 175 | 75 | 250 | 2 | 2,5 |
| 9 | 225 | 25 | 250 | 2 | 2,5 |



Şekil 3.10. Folin-Ciocalteu yönteminde kalibrasyon grafiği için hazırlanan gallik asit çalışma çözeltilerinin renk skalası

Yapılan ön denemelerde elde edilen sonuçlar doğrultusunda toplam fenolik madde miktarı tayini için örnek ekstraktlarından 50, 100, 150 μL ' lik üç farklı örnek hacmi üzerine 250 μL Folin-Ciocalteu reaktifi, 2 mL Na_2CO_3 çözeltisi ve son hacim 2,5 mL olacak şekilde çözücüsü (yaprakların ekstraksiyonunda kullanılan çözücü) ile tamamlandıktan sonra su banyosunda 50°C 'de 2 saat inkübe edilmiştir. Belirlenen süre sonunda örnek absorbansı 750 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunmuştur. Spektrofotometrede sıfırlama işlemi (250 μL su+ 250 μL Folin-Ciocalteu reaktifi+ 2 mL Na_2CO_3) ile yapılmıştır. Örneklerin toplam fenolik madde miktarları mg gallik asit eşdeğeri (mg GAE/g örnek) olarak ifade edilmiştir.

3.2.5.2. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Yöntemiyle Radikal Giderme Kapasitesinin Tayini

DPPH yöntemi ile radikal giderme kapasitesi tayininde troloks standart maddesi kullanılmıştır. Standart kalibrasyon grafiği için 5 farklı konsantrasyonda (1, 3, 5, 7, 9 mg/L) troloks çalışma çözeltileri hazırlanmıştır. Çalışma çözeltileri 100 mg/L troloks stok çözeltisinden (0,0025 g troloks/25 mL metanol) hazırlanmıştır.

Tablo 3.18.'de görüldüğü gibi her bir derişim için tablodaki miktarlar alınarak, metanol ile 1000 μL 'ye tamamlanmış ve üzerlerine 1 mL (1:3) oranında

seyreltilmiş DPPH çözeltisi ilave edilerek farklı konsantrasyonlarda troloks çalışma çözeltileri elde edilmiştir.

Tablo 3.18. DPPH yönteminde troloks standart çözeltilerinin hazırlanışı

| Troloks çalışma çözeltileri (mg/L) | 100 mg/L Troloks stok çözeltisinden alınan miktar (μL) | Eklenen metanol miktar (μL) | Eklenen DPPH miktarı(mL) | Toplam hacim (mL) |
|------------------------------------|---|--|--------------------------|-------------------|
| 1 | 20 | 980 | 1 | 2 |
| 3 | 60 | 940 | 1 | 2 |
| 5 | 100 | 900 | 1 | 2 |
| 7 | 140 | 860 | 1 | 2 |
| 9 | 180 | 820 | 1 | 2 |



Şekil 3.11. DPPH yönteminde kalibrasyon grafiği için hazırlanan troloks çalışma çözeltilerinin renk skalası

Örneklerin radikal giderme kapasiteleri mg Troloks eşdeğeri/ g örnek olarak ifade edilmiştir. Yöntem mor renkli DPPH radikalinin, antioksidan madde ile girdiği reaksiyon sonucunda radikal tutucunun oksijen atomu ile DPPH-H'ye indirgenmesi ile meydana gelen renk değişiminin 517 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümünü temel alır.

Yapılan ön denemelerde elde edilen sonuçlar doğrultusunda radikal giderme kapasitesi tayini için örnek ekstraktlarından 40, 80, 120 μL 'lik üç farklı hacimdeki örnek üzerine 1 mL (1:3) oranında seyreltilmiş stok DPPH ($5,00 \times 10^{-4}$ M

konsantrasyonda % 99,9'luk metanolde hazırlanmış stok DPPH çözeltisi) çözeltisi eklendikten sonra son hacim 2 mL olacak şekilde çözücü (yaprakların ekstraksiyonunda kullanılan çözücü) ilave edilerek karanlık ortamda 20 dakika inkübe edilerek kullanılmıştır. Bu süre sonunda örnek absorbansı 517 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunmuştur. Spektrofotometrede sıfırlama işlemi metanol ile yapılmıştır.

% inhibisyon aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ inhibisyon} = (Ab_{S_{\text{kontrol}}} - Ab_{S_{\text{örnek}}}) / Ab_{S_{\text{kontrol}}} \times 100$$

$Ab_{S_{\text{kontrol}}}$: 1 mL MeOH+ 1 mL DPPH çözeltisi absorbansı

$Ab_{S_{\text{örnek}}}$: 20. Dakikalık inkübasyon sonrası örnek absorbansı

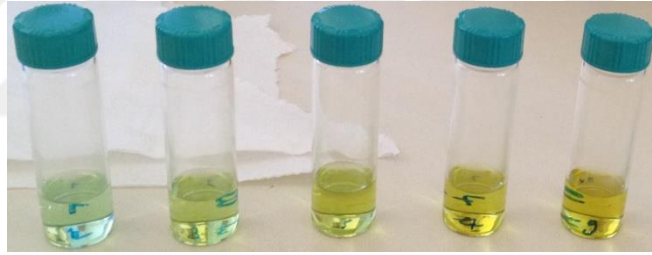
3.2.5.3. Cu-II İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi (CUPRAC) Yöntemiyle Toplam Antioksidan Kapasitesi Tayini

CUPRAC (Bakır(II) İndirgeyici Antioksidan Kapasitesi) yöntemi ile toplam antioksidan kapasitesinin tayin edilmesinde standart madde olarak troloks kullanılmıştır. Standart grafiğinin hazırlanmasında kullanılmak üzere stok troloks çözeltisi (100 mg/L) hazırlanmıştır. Standart kalibrasyon grafiği için 5 (beş) farklı konsantrasyonda (1, 3, 5, 7, 9 mg/L) troloks çalışma çözeltileri hazırlanmıştır.

Tablo 3.19.'da hazırlanışı ayrıntılı olarak verilen troloks çalışma çözeltilerinden her bir derişim için tablodaki miktarlarda alındıktan sonra 1 mL $CuCl_2$ çözeltisi, 1 mL neokuproin çözeltisi, 1 mL amonyum asetat tamponu (pH=7) eklenerek son hacim metanol ile 4 mL'ye tamamlanarak oda sıcaklığında, karanlık ortamda 30 dakika inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda absorbans değerleri 450 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülmüş ve sıfırlama işlemi (1 mL $CuCl_2$ + 1 mL NH_4Ac tamponu+ 1 mL neokuproin+ 1 mL MeOH) ile yapılmıştır.

Tablo 3.19. CUPRAC yönteminde kalibrasyon grafiği için kullanılan troloks çalışma çözeltileri

| Troloks çalışma çözeltileri (mg/L) | 100 mg/L Troloks stok çözeltilisinden alınan miktar(μ L) | Eklenen metanol miktar (μ L) | Eklenen CuCl_2 miktarı(mL) | Eklenen Neokuproin miktarı(mL) | Eklenen Amonyum asetat tamponu (pH=7) Miktarı(mL) | Toplam hacim (mL) |
|------------------------------------|---|-----------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|---|-------------------|
| 1 | 40 | 960 | 1 | 1 | 1 | 4 |
| 3 | 120 | 880 | 1 | 1 | 1 | 4 |
| 5 | 200 | 800 | 1 | 1 | 1 | 4 |
| 7 | 280 | 720 | 1 | 1 | 1 | 4 |
| 9 | 360 | 640 | 1 | 1 | 1 | 4 |



Şekil 3.12. CUPRAC yönteminde kalibrasyon grafiği için hazırlanan troloks çalışma çözeltilerinin renk skalası

Yapılan ön denemelerde örnek ekstraktlarından elde edilen sonuçlar doğrultusunda toplam antioksidan kapasitesi tayini için; 80, 160, 240 μ L'lik üç farklı örnek hacmi kullanılmıştır. 80, 160, 240 μ L'lik üç farklı hacimdeki örnek üzerine 1 mL ($1,0 \times 10^{-2}$ M) Cu(II) klorür çözeltisi, 1 mL ($7,5 \times 10^{-3}$ M) neokuproin çözeltisi ve 1 mL (1 M) amonyum asetat tampon (pH=7,0) çözeltisi ilave edildikten sonra son hacim 4 mL olacak şekilde çözücü (yaprakların ekstraksiyonunda kullanılan çözücü) ile tamamlanıp oda sıcaklığında karanlık ortamda 30 dakika inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda örnek absorbansı 450 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunmuştur. Numuneler için ölçülen absorbans değerleri ve

troloks için elde edilen ϵ değeri kullanılarak her bir numunenin antioksidan kapasitesi (mg TEAK/ g örnek) olarak ifade edilmiştir

Hesaplama:

$$(\text{mg Troloks eşdeğeri} / \text{g örnek}) = (A / \epsilon_{\text{Troloks}}) \times (V_{\text{toplam}} / V_{\text{örnek}}) \times \text{SF} \times (V_{\text{ekstrakt}} / m_{\text{ekstrakt}}) \times m_{\text{a(troloks)}}$$

A : Cu (II)- neokuproin çözeltisine örnek ilave edildikten sonra ölçülen absorbans ($\lambda = 450 \text{ nm}$)

$\epsilon_{\text{Troloks}}$: Troloksun molar absorpsiyon katsayısı ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$)

V_t : Absorbansın ölçüldüğü son hacim (mL)

$V_{\text{ö}}$: Alınan örnek hacmi (mL)

SF : Seyreltme faktörü

m_{ekstrakt} : Bitki örnek miktarı (g)

V_{ekstrakt} : Ekstrakt hacmi (mL)

$m_{\text{a(troloks)}}$: Troloks'un molekül ağırlığı

3.2.5.4. Dişbudak Ekstraktlarında bulunan antioksidanlar ve miktarları

Bitki ekstraktlarındaki bileşenlerin nitel ve nicel analizi için HPLC ve LC-MS yöntemleri sıklıkla kullanılmaktadır [81]. Bu çalışmada LC-MS yöntemiyle nitel ve nicel analizler gerçekleştirilmiştir. Dişbudak zeytingiller familyasından bir bitki olduğu için Secoiridoid yapılar ana bileşen olarak yer aldığı düşünülmüş ve öncelikle oleuropein tayini amaçlanmıştır.

3.2.5.4.1. Oleuropein tayini

Ekstraktlardaki ana bileşen oleuropein ve bozunma ürünleri tyrosol ve hydroxytyrosol tayini için farklı çözücü ve gradient elüsyon programı uygulanmıştır. Bu amaçla kromatografik ayırmalar Poroshell 120 EC-C18 (4.6mm x 100mm, 2.7 μm) kolonu ile gradient mobil faz A (5mM amonyum asetat) ve mobil faz B (MeOH) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Akış hızı 0.4 mL dk⁻¹, enjeksiyon hacmi 5 μL ve kolon sıcaklığı 25°C'dir.

3.2.5.4.2. Dişbudak ekstraktlarındaki diğer antioksidanların tayini

Oleuropein dişındaki bileşenlerin miktarları daha düşük olduğu düşünülerek farklı bir çözücü bileşimi ve gradient elüsyon programı uygulanmıştır.

Kromatografik ayırmalar Poroshell 120 EC-C18 (4.6mm x 100mm, 2.7µm) kolonu ile gradient mobil faz A (%0.1 formik asit) ve mobil faz B (metanol) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Akış hızı 0.4 mL dk⁻¹, enjeksiyon hacmi 2.0 µL ve kolon sıcaklığı 25°C'dir.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini Deneylerinden Elde Edilen Bulgular

Numunelerin Folin-Ciocalteu yöntemi uygulanarak elde edilen toplam fenolik madde miktarları Tablo 4.1.'de hesaplamalar için hazırlanan kalibrasyon grafikleri ise Şekil 4.1. ve Şekil 4.2.'de gösterilmiştir. Hazırlanan kalibrasyon grafiği için gallik asit kullanılmıştır.

Tablo 4.1. Yerli ve Amerikan Dişbudak ağacı yaprakları örneklerinin toplam fenolik madde miktarları (ortalama değer ± standart sapma)

| Bitki Örnekleri | Toplam fenolik madde miktarı (mg GAE/ g örnek) , n=3 |
|--|--|
| Amerikan Dişbudak (%70'lik Metanol-Su Ekstraksiyonu) | 110,92±4,75 |
| Yerli Dişbudak (%70'lik Metanol-Su Ekstraksiyonu) | 70,21±3,64 |
| Amerikan Dişbudak (infüzyon) | 45,06±5,16 |
| Yerli Dişbudak (infüzyon) | 46,45±4,49 |

Örnek hesaplama:

Amerikan Dişbudak (%70'lik Metanol-Su Ekstraksiyonu) için;

Alınan örnek hacmi= 100 µL

Absorbans= 0,1658

Doğru denklemden hesaplanan örnek miktarı (mg GAE)= (0,1658-0,0179)/0,0876= 1,69 mg gallik asit/ L

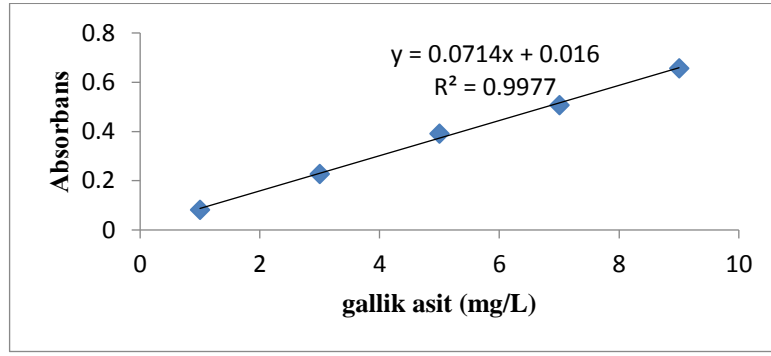
$$\frac{mg \text{ gallik asit eşdeğer}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{\text{Ekstrakt hacmi (mL)}}{\text{Ekstrakt miktarı (g)}} \times \text{Seyrelme Faktörü} \times \frac{\text{Toplam hacim (mL)}}{\text{Örnek hacmi (mL)}}$$

$$= \frac{1,69 \text{ mg GAE}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{50 \text{ mL}}{0,2 \text{ g örnek}} \times 10 \times \frac{2,5 \text{ mL}}{0,1 \text{ mL}} = 105,53 \text{ mg GAE / g örnek}$$

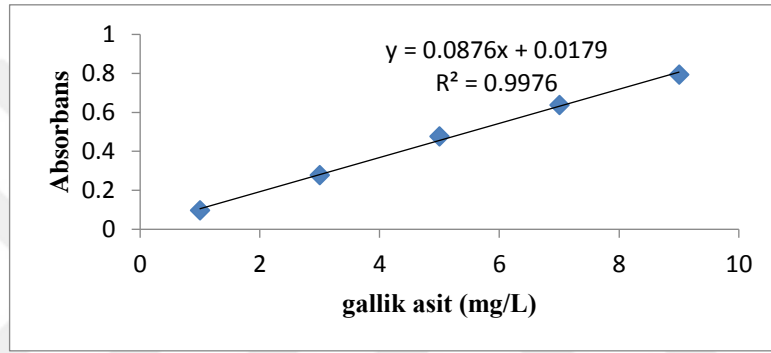
50 µL alınan örnek için hesaplanan toplam fenolik madde miktarı= 114,47 mg GAE / g örnek

150 µL alınan örnek için hesaplanan toplam fenolik madde miktarı= 112,77 mg GAE / g örnek

Ortalama= (114,47+105,53+112,77)/3= 110,92 mg GAE / g örnek

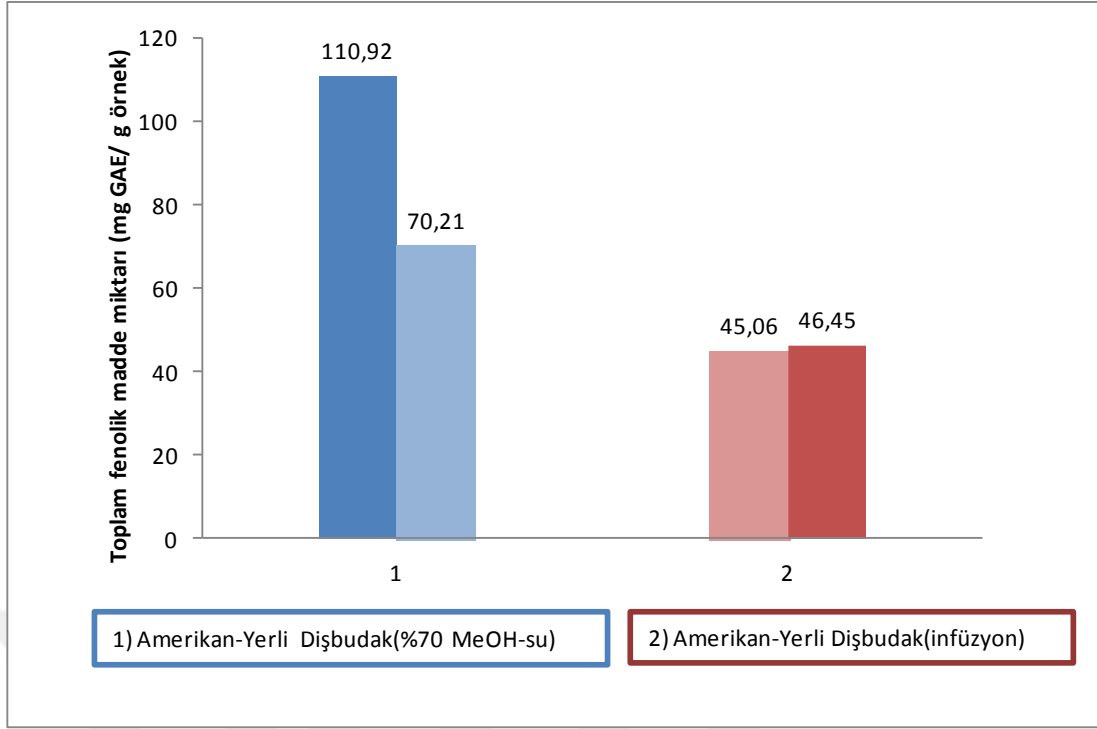


Şekil 4.1. İnfüzyon örnekleri için kullanılan gallik asit kalibrasyon grafiği



Şekil 4.2. %70'lik MeOH-su örnekleri için kullanılan gallik asit kalibrasyon grafiği

Karşılaştırma kolaylığı açısından, Tablo 4.1.'de verilen toplam fenolik madde miktarları sütun grafik haline getirilerek Şekil 4.3.'de verilmiştir.



Şekil 4.3. Toplam fenolik madde miktarı tayininde çözücü olarak %70'lik MeOH-su kullanıldığında elde edilen sonuçlar

%70'lik metanol-su ekstraksiyonu uygulandığında Amerikan Dışbudak için toplam fenolik madde miktarı $110,92 \pm 4,75$ mg GAE/ g örnek, infüzyon işlemi uygulandığında ise $45,06 \pm 5,16$ mg GAE/ g örnek olarak bulunmuştur.

%70'lik metanol-su ekstraksiyonu uygulandığında Yerli Dışbudak için toplam fenolik madde miktarı $70,21 \pm 3,64$ mg GAE/ g örnek, infüzyon işlemi uygulandığında ise $46,45 \pm 4,49$ mg GAE/ g örnek olarak bulunmuştur.

Sonuçlara göre hem Amerikan hem de Yerli Dışbudak yapraklarının metanol-su ekstraktlarında infüzyon örneklerine göre toplam fenolik madde miktarı daha yüksek bulunmuştur. Amerikan Dışbudak'ta metanol-su ekstraktlarında toplam fenolik madde miktarı Yerli Dışbudak ekstraktlarına göre yaklaşık 1,5 (bir buçuk) kat yüksek çıkmıştır. Her iki türe ait yaprakların infüzyonu sonucu elde edilen ekstraktlarında toplam fenolik madde miktarları birbirlerine çok yakın çıkmıştır.

4.2. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Yöntemiyle Radikal Giderme Kapasite Tayini Deneylelerinden Elde Edilen Bulgular

Tablo 4.2. Yerli ve Amerikan Dişbudak ağacı yaprakları örneklerinin radikal giderme kapasite değerleri (ortalama değer ± standart sapma)

| Bitki Örnekleri | Radikal giderme kapasitesi (mg Troloks eşdeğeri/ g örnek) , n=3 |
|--|---|
| Amerikan Dişbudak (%70'lik Metanol-Su Ekstraksiyonu) | 2,21±0,01 |
| Yerli Dişbudak (%70'lik Metanol-Su Ekstraksiyonu) | 2,19±0,04 |
| Amerikan Dişbudak (infüzyon) | 2,08±0,07 |
| Yerli Dişbudak (infüzyon) | 2,08±0,07 |

Örnek hesaplama:

Amerikan Dişbudak (%70'lik Metanol-Su Ekstraksiyonu) için;

80 µL için ortalama absorban= 0,0734

Doğru denklemden hesaplanan örnek miktarı (mg TE)= (0,0734-0,9438)/ (-0,0983)= 8,85 mg TE / L

$$\frac{\text{mg troloks eşdeğer}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{\text{Ekstrakt hacmi (mL)}}{\text{Ekstrakt miktarı (g)}}$$

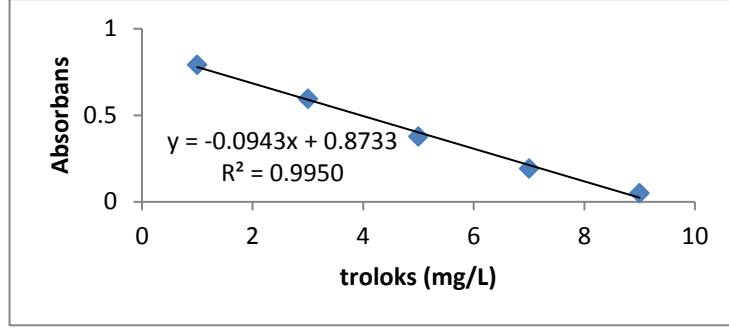
$$= \frac{8,85 \text{ mg}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{50 \text{ mL}}{0,2 \text{ g örnek}}$$

$$= 2,21 \text{ mg Troloks eşdeğeri/ g örnek}$$

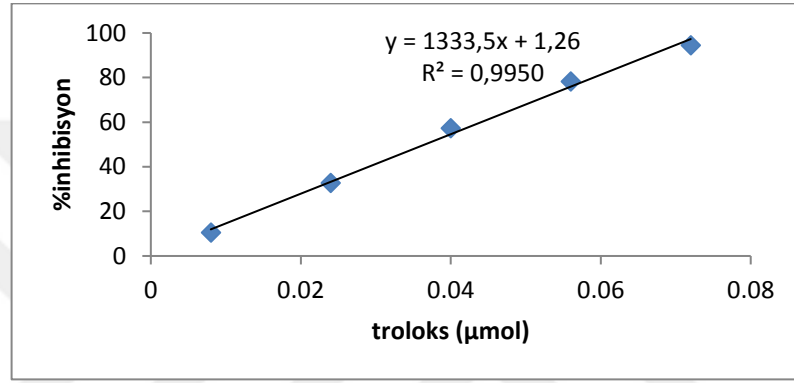
40 µL alınan örnek için hesaplanan DPPH Radikal Giderme Kapasitesi= 2,20 mg Troloks eşdeğeri/ g örnek

120 µL alınan örnek için hesaplanan DPPH Radikal Giderme Kapasitesi= 2,21 mg Troloks eşdeğeri/ g örnek

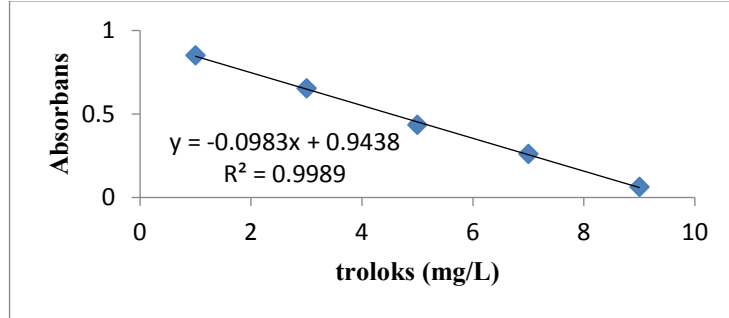
Ortalama= (2,21+2,21+2,20)/3= 2,21 mg Troloks eşdeğeri/ g örnek



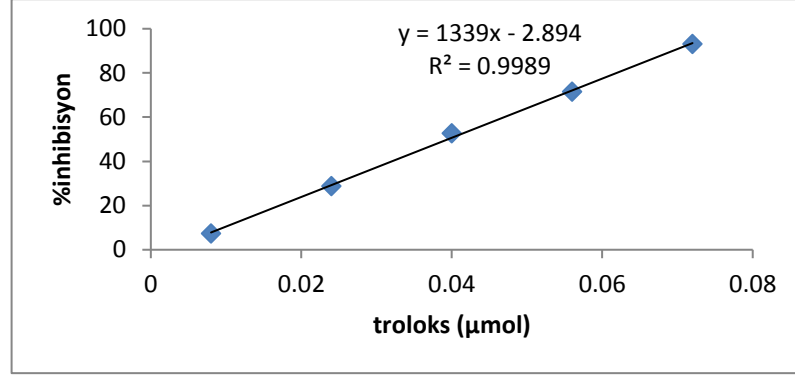
Şekil 4.4. İnfüzyon örnekleri için kullanılan troloks kalibrasyon grafiği



Şekil 4.5. İnfüzyon örnekleri için kullanılan troloks konsantrasyonuna karşı %inhibisyon grafiği



Şekil 4.6. %70'lik MeOH-su örnekleri için kullanılan troloks kalibrasyon grafiği



Şekil 4.7. %70'lik MeOH-su örnekleri için kullanılan troloks konsantrasyonuna karşı %inhibisyon grafiği

%70'lik metanol-su ekstraksiyonu uygulandığında Amerikan Dişbudak için radikal giderme kapasitesi $2,21 \pm 0,01$ mg troloks eşdeğeri/ g örnek , infüzyon işlemi uygulandığında ise $2,08 \pm 0,07$ mg troloks eşdeğeri/ g örnek olarak bulunmuştur.

%70'lik metanol-su ekstraksiyonu uygulandığında Yerli Dişbudak için radikal giderme kapasitesi $2,19 \pm 0,04$ mg troloks eşdeğeri/ g örnek , infüzyon işlemi uygulandığında ise $2,08 \pm 0,07$ mg troloks eşdeğeri/ g örnek olarak bulunmuştur.

Sonuçlara göre hem Amerikan hem de Yerli Dişbudak yapraklarının metanol-su ekstraktlarında infüzyon örneklerine göre radikal giderme kapasitesi daha yüksek bulunmuştur. Her iki türe ait yaprakların infüzyonu sonucu elde edilen ekstraktlarda radikal giderme kapasitesi yaklaşık olarak birbirleriyle aynı çıkmıştır.

4.3. Cu-II İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi Yöntemiyle (CUPRAC) Toplam Antioksidan Kapasite Tayini Deneylerinden Elde Edilen Bulgular

Amerikan Dişbudak (*Fraxinus Americana*) ve Yerli Dişbudak (*Fraxinus Excelsior*) bitkilerine ait ekstraktların Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi (CUPRAC) tayini testlerinden elde edilen sonuçlar Tablo 4.3. ve Şekil 4.9'da verilmiştir. Kalibrasyon grafiği (Şekil 4.8.) troloksun metanollü çözeltileri kullanılarak hazırlanmıştır.

Tablo 4.3. Yerli ve Amerikan Dişbudak ağacı yaprakları örneklerinin toplam antioksidan kapasite içerikleri (ortalama değer ± standart sapma)

| Bitki Örnekleri | Toplam antioksidan kapasite (mg Troloks eşdeğeri/ g örnek) , n=3 |
|---|---|
| Amerikan Dişbudak (%70'lik Metanol-Su Ekstraksiyonu) | 238,38±6,74 |
| Yerli Dişbudak (%70'lik Metanol-Su Ekstraksiyonu) | 138,45±5,07 |
| Amerikan Dişbudak (infüzyon) | 76,74±3,31 |
| Yerli Dişbudak (infüzyon) | 91,42±2,66 |

Örnek hesaplama:

Amerikan Dişbudak (%70'lik Metanol-Su Ekstraksiyonu) için;

Alınan örnek hacmi= 80 µL

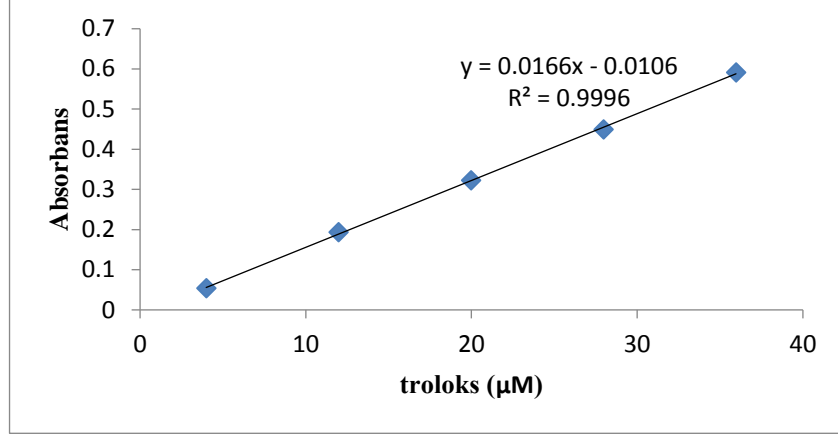
Absorbans= 0,0836

$$= \frac{0,0836}{1,66 \times 10^4} \times \frac{4,0 \text{ mL}}{0,08 \text{ mL}} \times 15 \times \frac{50 \text{ mL}}{0,2 \text{ g örnek}} \times 250,29 \text{ g troloks}$$
$$= 236,25 \text{ mg Troloks eşdeğeri/ g örnek}$$

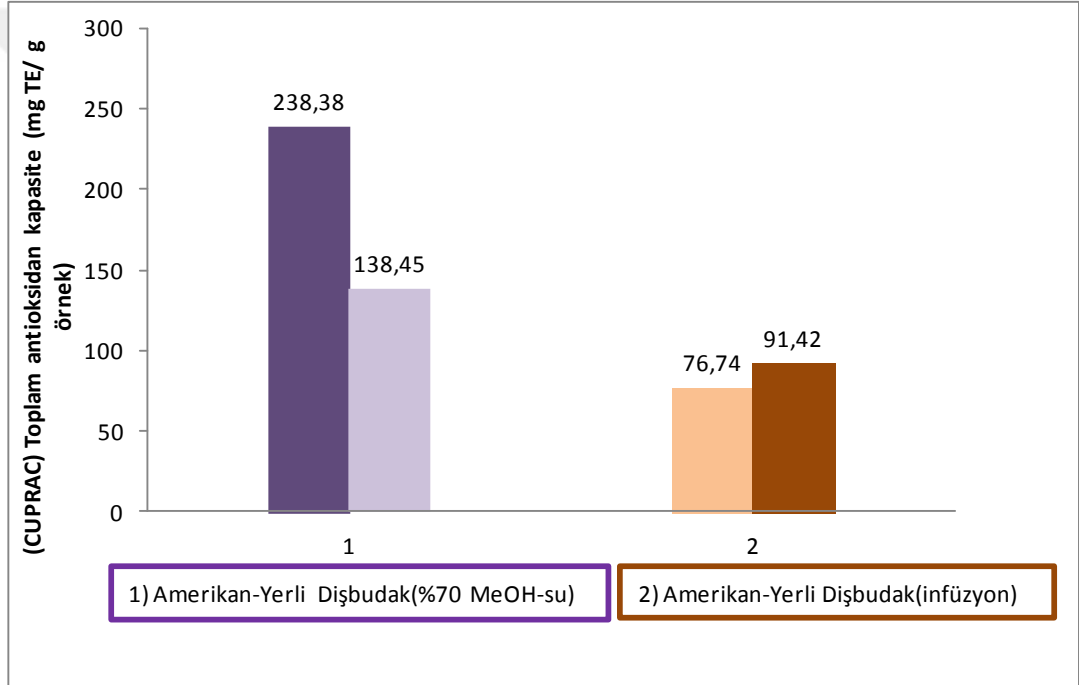
160 µL alınan örnek için hesaplanan toplam antioksidan kapasitesi= 245,94 mg Troloks eşdeğeri/ g örnek

240 µL alınan örnek için hesaplanan toplam antioksidan kapasitesi= 232,97 mg Troloks eşdeğeri/ g örnek

Ortalama= (236,25+245,94+232,97)/3= **238,38** mg Troloks eşdeğeri/ g örnek



Şekil 4.8. CUPRAC deneylerinde kullanılan ve troloks standardı ile elde edilen kalibrasyon grafiği



Şekil 4.9. Bakır-II iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi (CUPRAC) deneylerinde çözücü olarak %70'lik MeOH-su kullanıldığında elde edilen sonuçlar

%70'lik metanol-su ekstraksiyonu uygulandığında Amerikan Dışbudak için toplam antioksidan kapasite $238,38 \pm 6,74$ mg troloks eşdeğeri/ g örnek , infüzyon işlemi uygulandığında ise $76,74 \pm 3,31$ mg troloks eşdeğeri/ g örnek olarak bulunmuştur.

%70'lik metanol-su ekstraksiyonu uygulandığında Yerli Dışbudak için toplam antioksidan kapasite $138,45 \pm 5,07$ mg troloks eşdeğeri/ g örnek , infüzyon işlemi uygulandığında ise $91,42 \pm 2,66$ mg troloks eşdeğeri/ g örnek olarak bulunmuştur.

Sonuçlara göre hem Amerikan hem de Yerli Dişbudak yapraklarının metanol-su ekstraktlarında infüzyon örneklerine göre toplam antioksidan kapasitesi daha yüksek bulunmuştur. Amerikan Dişbudağı metanol-su ekstraktlarında toplam antioksidan kapasitesi Yerli Dişbudak ekstraktlarındakine göre yaklaşık 1,5 (bir buçuk) kat yüksek çıkmıştır. Her iki türe ait yaprakların infüzyonu sonucu elde edilen ekstraktlarında toplam antioksidan kapasiteleri birbirlerine yakın çıkmıştır.



4.4. LC-MS/MS İle Elde Edilen Bulgular

Tablo 4.4. Ekstraktlardaki analizi yapılan fenolik bileşikler ve miktarları (ortalama değer \pm standart sapma)

| Fenolik Bileşik | Yerli Dişbudak infüzyon ($\mu\text{g/g}$), n=3 | Amerikan Dişbudak infüzyon ($\mu\text{g/g}$), n=3 | Yerli Dişbudak %70'lik MeOH-su ($\mu\text{g/g}$), n=3 | Amerikan Dişbudak %70'lik MeOH-su ($\mu\text{g/g}$), n=3 |
|-------------------------------------|--|---|---|--|
| Oleuropein | 29442,74 \pm 2060,99 | 17298,65 \pm 1210,91 | 55192,12 \pm 3863,45 | 27085,27 \pm 1895,97 |
| 2-(4-hidroksifenil)etanol (tirozol) | 405,89 \pm 27,35 | 362,79 \pm 25,39 | 153,37 \pm 12,27 | 119,49 \pm 16,30 |
| 3-hidroksitirozol (hidroksitirozol) | 392,11 \pm 26,15 | 496,33 \pm 27,35 | 118,40 \pm 15,25 | 161,45 \pm 19,37 |
| Gallik asit | 2,30 \pm 0,47 | 1,01 \pm 0,05 | < b.s | < b.s |
| Protokateşuik asit | 61,34 \pm 4,37 | 12,76 \pm 0,93 | 3,94 \pm 0,21 | 54,35 \pm 0,99 |
| 3,4-Dihidroksifenil asetik asit | 1,63 \pm 0,06 | 0,37 \pm 0,03 | < b.s | < b.s |
| (+)-Kateşin | < b.s | < b.s | < b.s | < b.s |
| Pirokateşol | < b.s | < b.s | < b.s | < b.s |
| Klorogenik asit | 153,44 \pm 17,49 | 963,49 \pm 51,64 | 1764,67 \pm 24,63 | 265,47 \pm 15,87 |
| 2,5-Dihidroksibenzoik asit | 4,94 \pm 0,31 | 1,60 \pm 0,21 | 2,26 \pm 0,01 | 5,34 \pm 0,06 |
| 4-Hidroksibenzoik asit | 2,31 \pm 0,14 | 3,52 \pm 0,02 | 2,97 \pm 0,10 | 1,74 \pm 0,13 |
| (-)-Epikateşin | < b.s | < b.s | < b.s | < b.s |
| Vanilik asit | 3,14 \pm 0,61 | 4,57 \pm 1,03 | 4,02 \pm 0,31 | 3,64 \pm 0,65 |
| Kafeik asit | 22,99 \pm 0,66 | 33,03 \pm 1,25 | 6,86 \pm 0,61 | 2,89 \pm 0,18 |
| Siringik asit | < b.s | < b.s | < b.s | < b.s |
| 3-Hidroksibenzoik asit | < b.s | < b.s | < b.s | < b.s |
| Vanilin | < b.s | < b.s | < b.s | < b.s |
| Verbaskosid | 6850,13 \pm 968,07 | 846,60 \pm 133,88 | 2809,06 \pm 78,63 | 18585,06 \pm 265,43 |
| Taksifolin | < b.s | < b.s | < b.s | < b.s |
| Sinapik asit | < b.s | < b.s | < b.s | < b.s |

| | | | | |
|-------------------------|------------------|--------------------|--------------------|-------------------|
| p-Kumarik asit | 9,53 ± 0,56 | 10,91 ± 0,29 | 4,86 ± 0,27 | 5,32 ± 0,25 |
| Ferulik asit | 4,49 ± 0,32 | 11,40 ± 0,75 | 9,00 ± 0,42 | 2,86 ± 0,04 |
| Luteolin 7-glukozid | 304,21 ± 11,98 | 0,59 ± 0,10 | 0,77 ± 0,05 | 983,58 ± 30,38 |
| Hesperidin | 7091,47 ± 305,54 | 11086,24 ± 1131,70 | 23691,29 ± 1147,36 | 14369,23 ± 238,02 |
| Hiperosid | 329,28 ± 25,04 | 316,81 ± 15,63 | 804,78 ± 52,82 | 792,67 ± 7,82 |
| Rosmarinik asit | < b.s | < b.s | < b.s | < b.s |
| Apigenin 7-glukosid | 156,26 ± 17,71 | 0,75 ± 0,07 | 1,00 ± 0,09 | 371,73 ± 51,09 |
| 2-Hidroksisinnamik asit | < b.s | < b.s | < b.s | < b.s |
| Pinoresinol | 7,46 ± 1,55 | 56,58 ± 2,48 | 58,78 ± 7,42 | 5,14 ± 0,33 |
| Eriodiktiol | < b.s | < b.s | < b.s | < b.s |
| Kuersetin | < b.s | < b.s | 0,88 ± 0,02 | 0,81 ± 0,05 |
| Luteolin | 3,13 ± 0,20 | < b.s | < b.s | 17,03 ± 1,33 |
| Kaempferol | < b.s | < b.s | < b.s | < b.s |
| Apigenin | 1,63 ± 0,22 | < b.s | < b.s | 7,78 ± 0,48 |

b.s: Belirtme sınırı

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

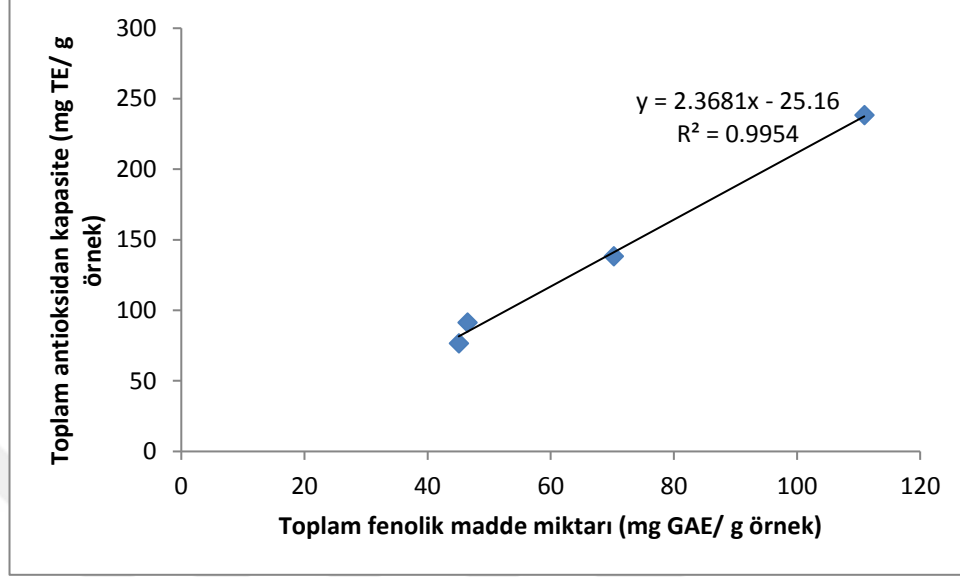
Yerli ve Amerikan Dişbudağının (*Fraxinus Excelsior*, *Fraxinus Americana*) yapraklarındaki toplam fenolik madde miktarı Folin-Ciocalteu, toplam antioksidan kapasitesi CUPRAC ve radikal giderme kapasitesi DPPH yöntemi ile spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Deneyle üç defa tekrarlanmış ve bulunan sonuçların ortalamaları hesaplanarak verilmiştir.

Sonuçlara göre hem Amerikan hem de Yerli Dişbudak yapraklarının metanol-su ekstraktlarında infüzyon örneklerine göre toplam fenolik madde miktarı, toplam antioksidan kapasitesi ve radikal giderme kapasitesi daha yüksek bulunmuştur. Bunun nedeni farklı çözücü ve ekstraksiyon şartlarında çözünen bileşenlerin farklı olmasından (ekstraksiyon sırasında çözücüye geçebilen fenollerin miktarı ve kimyasal yapıları nedeniyle) kaynaklanabilir.

Amerikan Dişbudağı metanol-su ekstraktlarında toplam fenolik madde miktarı ve toplam antioksidan kapasitesi Yerli Dişbudak ekstraktlarındakine göre yaklaşık 1,5 (bir buçuk) kat yüksek çıkarken radikal giderme kapasitesi birbirlerine yakın çıkmıştır. Her iki türe ait yaprakların infüzyonu sonucu elde edilen ekstraktlarda toplam fenolik madde miktarı, toplam antioksidan kapasitesi ve radikal giderme kapasitesi birbirlerine çok yakın çıkmıştır. Bulunan sonuçlar antioksidan kaynağı olarak kullanılan doğal bitki çayları ile karşılaştırıldığında [82] çalışılan parametreler için yakın çıkmıştır. Sonuç olarak her iki tür dişbudak ağacı yapraklarının alternatif bir doğal antioksidan kaynağı olarak kullanılabileceği ifade edilebilir.

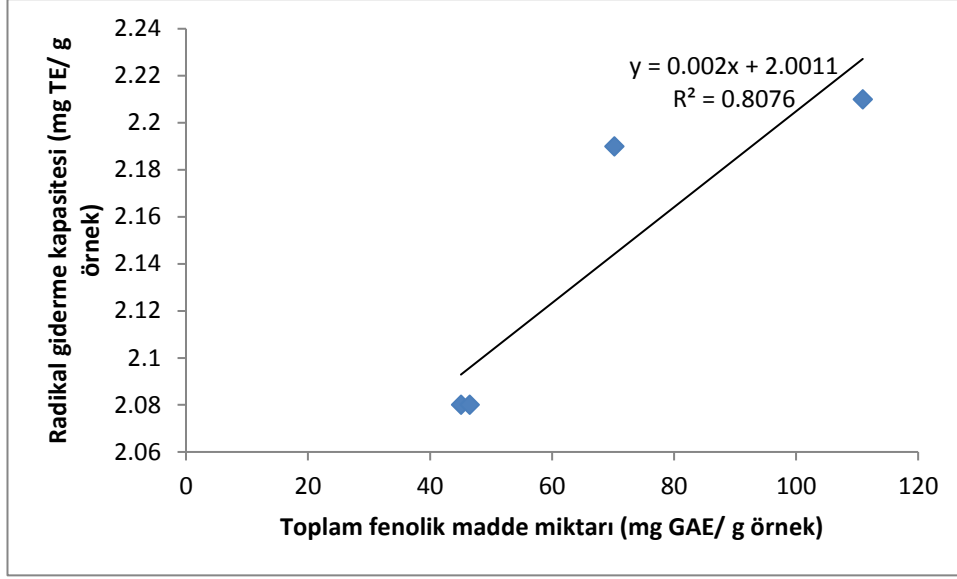
Araştırmacılar toplam fenolik madde miktarı içeriği ile toplam antioksidan kapasite arasındaki ilişkinin önemi üzerinde çalışmıştır. Bir grup araştırmacı toplam fenolik madde miktarı ile antioksidan kapasitesi arasında doğru bir orantının söz konusu olduğunu öne sürerken [83, 84] diğer araştırmacılar ise toplam fenolik madde miktarı ile antioksidan kapasite arasındaki ilişkinin doğrusallıkla açıklanamayacağını ifade ederek düşünülenden daha karmaşık bir mekanizmaya sahip olduklarını öne sürmüşlerdir [85, 86].

Toplam fenolik madde miktarına karşı hem CUPRAC hem de DPPH deneylerinde elde edilen değerler grafiğe geçirilerek bu ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır (Şekil 5.1. ve Şekil 5.2.).



Şekil 5.1. Ekstraktların toplam fenolik madde miktarına karşı CUPRAC değerleri grafiği

Şekil 5.1.'de elde edilen korelasyon incelendiğinde örneklerin fenolik madde miktarı ile antioksidan kapasitesi arasındaki ilişkinin önemli olduğu görülmektedir ($R^2= 0,9954$). Buna göre fenolik madde miktarı yüksek örneklerin yüksek antioksidan kapasiteye sahip oldukları görülmektedir. Bu bulgu bir grup araştırmacı tarafından öne sürülen toplam fenolik madde miktarı ile antioksidan kapasite arasında doğru bir orantının söz konusu olduğu görüşüne uygun düşmektedir.



Şekil 5.2. Toplam fenolik madde miktarına karşı DPPH deneylerinden elde edilen radikal giderme kapasitesi grafiği

Şekil 5.2.'de toplam fenolik madde miktarı ile radikal giderme kapasitesi arasındaki ilişki değerlendirildiğinde ise tam bir korelasyon bulunamadığı görülmüştür ($R^2 = 0,8076$). Bunun nedeni olarak örnek ekstraktında yer alan bileşenlerin radikal giderme kapasitesinin yetersiz veya hızlı bir reaksiyonun olmadığını düşündürmektedir.

Ekstraktlardaki bileşenler ve bunların miktarları LC-MS yöntemi kullanılarak analizlenmiştir. Buna göre zeytingillerden olan Yerli Dişbudak ağacı yapraklarının metanol-su ekstraktları ve infüzyon örneklerinde bu familyanın ana bileşenlerden olan oleuropein miktarı sırasıyla ($55192,12 \pm 3863,45 \mu\text{g/g}$; $29442,74 \pm 2060,99 \mu\text{g/g}$), Amerikan Dişbudak ağacı yapraklarının metanol-su ekstraktları ve infüzyon örneklerinde sırasıyla ($27085,27 \pm 1895,97 \mu\text{g/g}$; $17298,65 \pm 1210,91 \mu\text{g/g}$) olarak bulunup, oleuropeinin bozunma ürünleri olduğu belirtilen tirozol ve hidroksitirozol olduğu Tablo 4.4'de görülmektedir.

Bunların dışında bütün ekstraktlarda Tablo 4.4'de görüldüğü gibi en yüksek miktarda hesperidin $23691,29 \pm 1147,36 \mu\text{g/g}$ Yerli Dişbudak-%70(h/h)'lık metanol-su; verbaskosid ($18585,06 \pm 265,43 \mu\text{g/g}$ Amerikan Dişbudak-%70(h/h)'lık metanol-su); hiperosid ($329,28 \pm 25,04 \mu\text{g/g}$ Yerli Dişbudak -infüzyon), klorogenik asit ($1764,67 \pm 24,63 \mu\text{g/g}$ Yerli Dişbudak-%70(h/h)'lık metanol-su); luteolin 7-glukosid

(983,58 ± 30,38 µg/g Amerikan Dişbudak-%70(h/h)'lık metanol-su); fenolik bileşiklerinin yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Bulunan bu sonuçlar literatürde yapılan [81] dişbudak yaprakları ekstraktları ile karşılaştırıldığında tirozol ve ferulik asit fenolik bileşikleri için benzer sonuçlar bulunurken oleuropein, hidroksitirozol, verbaskosid, protokateşuik asit, vanilik asit, siringik asit ve vanilin bileşiklerinde önemli farklar göze çarpmaktadır. Bu farklanmanın nedeni; yaprakların farklı zamanlarda toplanmış olması, iklim şartları ve yetiştiği toprağın bileşiminin farklı olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmayla, Batı Anadolu ve Akdeniz Bölgelerinde yetişen ve zeytingiller (Oleaceae) familyasından olan Yerli (*Fraxinus Excelsior*) ve Amerikan Dişbudağı (*Fraxinus Americana*) yapraklarının önemli bir antioksidan kaynağı olduğu tespit edilmiş ve Ülkemiz için ekonomik potansiyeli ortaya konulmuştur.

KAYNAKLAR

- [1] Halliwell, B., Aeschbach, R., Löliger, J., Aruoma, O. I., The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*. 1995, 33, 601-617.
- [2] Kähkönen, M.P., Hopia, A. I., Vuroela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., et al., Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1999, 47 (10), 3954-3962.
- [3] Baytop, T., Türkiye'nin Tıbbi ve Zehirli Bitkileri. İstanbul Üni.Tıp Fak.Yayımları, İstanbul. 1963.
- [4] Kay, C. D., The future of flavonoid research. *Br. J. Nutr.* 2010, 104, 91-95.
- [5] Hooper, L., et al., Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta analysis of randomized controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr.* 2008, 88, 38-50.
- [6] Lee, K.W., Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 6516-6520.
- [7] US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, 2009, USDA National Nutrient Database for Standard Reference, <http://www.ars.usda.gov>
- [8] Akkuş, İ. Serbest Radikaller ve Fizyoterapik Etkileri, Mimoza Yayınları, 1. Baskı, Konya, 1995.
- [9] Prior, R. L., Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables: Diet and health implications. *Horticulture Science*. 2000, 35, 588-592.
- [10] Bankson, D. D., et al., Role of free radicals in cancer and Atherosclerosis. *Clin Lab. Med.* 1993, 13(2), 462-81.
- [11] Bonnefont-Rousselot, D., Beaudeux, J. L., Thérond, P., Peynet, J., Legrand, A., Delattre J., Diabetes mellitus, oxidative stress and advanced glycation endproducts. *Ann Pharm Fr.* 2004, 62(3), 147-57.
- [12] Moe, G. W., Marin-Garcia, J., Konig, A., Goldenthal, M., Lu, X., Feng, Q., In vivo TNF- alpha inhibition ameliorates cardiac mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and apoptosis in experimental heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004, 287(4), 1813-20.
- [13] Ho C. J., Zheng S., Comhair S. A., Erzurum S. C., Differential expression of manganese superoxide dismutase and catalase in lung cancer. *Cancer Res.* 2001, 61(23), 8578-85.
- [14] Gromadzinska, J., Wasowicz, W., Rydzynski, K., Szeszenia-Dabrowska, N., Oxidative-stress markers in blood of lung cancer patients occupationally exposed to carcinogens. *Biol Trace Elem Res.* 2003, 91(3), 203-15.

- [15] Davies K. J., Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*. 2000, 50(4-5), 279–289.
- [16]. Sroka, Z., Cisowski, W., Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food and Chemical Toxicology*. 2003, 41(6), 753-758.
- [17]. Cao, G., Prior, R. L., Comparison of different analytical methods for assesing total antioxidant capacity of human serum. *Clinical Chemistry*. 1998, 44, 1309-1315.
- [18]. Cao, G., Prior R. L., In vivo antioxidant capacity: comperison of different analytical methods. *Free Radical Biology & Medicine*. 1999, 27, 1173-1181.
- [19]. Günaydın, B., Çelebi, H., Genel anesteziğin serbest radikaller ve antioksidanlarla ilişkileri. *Anestezi Dergisi*. 2003, 11, 87-98.
- [20]. Lee, J., Koo, N., and Min, D. B., Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2004, 3, 21-33.
- [21] Memisoğulları, R., Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*. 2005, 3, 30-39.
- [22] Balcı, N., Sürekli gürültüye maruz kalınan bazı iş kollarında çalışan kişilerde serum total sialik asit, ksantin oksidaz, malondialdehit, nitrik oksit, arginaz ve ornitin değerleri. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Kahramanmaraş, 2007, 60 s. (Yüksek Lisans Tezi).
- [23] Turna, G., Ehrlich asit solid tümör modeli oluşturulmuş farelerde thymus sipleus ve taurinin karaciğer MDA, glutatyon, AOPP düzeylerine ve SOD aktivitesine etkileri. Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara, 2008, (Yüksek Lisans Tezi).
- [24] Altıntaş, S., Kahramanmaraş'ta bazı iş kollarında çalışan boya işçilerinde plazma ve eritrosit membranı sialik asit, glutatyon plazma nitrik oksit ve lipid peroksidasyonu düzeylerinin değerlendirilmesi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Kahramanmaraş, 2006, 62 s. (Yüksek Lisans Tezi).
- [25] Altınışık, M., Serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar. www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01s.pdf (20.05.2008), 2000.
- [26] Min, D. B., Boff, J. M., Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2002, 1, 58-72.
- [27] H. Sies, Oxidative stress; oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*. 1997, 82(2), 291-5.
- [28] German, J. B., Food processing and lipid oxidation. *Advances in Experimental*

Medicine and Biology. 1999, 459, 23-50.

[29] Lam, L. K., et al., The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*. 1988, 27, 969–978.

[30] Almes, B. M., Shigena, M. K., Hagen, T. M., Oxidants, antioxidant and the degenerative diseases of ageing. *Proceeding of National Academy of Sciences USA*. 1993, 90, 7915-7922.

[31] Osawa, T., Namiki, M. A., A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of eucalyptus leaves. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1981, 45, 735–739.

[32] Nishina, A., Kubota, K., Kameoka, H., Osawa, T., Antioxidizing component, Musizin, in *Rumex japonicus* Houtt. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 1991, 68, 735-739.

[33] Britton, G., Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB Journal*. 1995, 9 (15), 1551-1558.

[34] Tee, E. S., Carotenoids and Retinoids in Human Nutrition. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 1992, 31 (1/2) 103-163.

[35] Burr, M. L. Antioxidants and cancer. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*. 1994, 7 (6), 409-416.

[36] Gerster, H. Anticarcinogenic Effect of Common Carotenoids. *Int J Vitam Nutr Res*. 1993, 63 (2), 93-121.

[37] Le Marchand, L., Hankin, J. H., Kolonel, L. N., Beecher, G. R., Wilkens, L. R., Zhao, L. P., Intake of specific carotenoids and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1993, 2 (3), 183-7.

[38] Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S., Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 2006, 99 (1), 191-203.

[39] Chun, S. S., Vatter, D. A., Lin, Y. T., Shetty, K., Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochemistry*, 2005, 40 (2), 809-816.

[40] Ranalli, A., Lucera, L., Contento, S., Antioxidizing potency of phenol compounds in olive oil mill wastewater. *J. Agric. Food Chem*. 2003, 51, 7636-7641.

[41] Kampa, M., Hatzoglou, A., Notas, G., Damianaki, A., Bakogeorgou, E., Gemetzi, C., Kouroumalis, E., Martin, P.M., Castanas, E., Wine antioxidant polyphenols inhibit proliferation of human prostate cancer cell lines. *Nutr Cancer*. 2000, 37 (2), 223-233.

[42] Meyer, F., Galan, P., Douville, P., Bairati, I., Kogle, P., Bertrais, S., Antioxidant vitamin and mineral supplementation and prostate cancer prevention in the SU.VI.MAX trial. *International Journal of Cancer*. 2005, 116(2), 182-186.

[43] Bilaloğlu Guliyev V., Harmandar M., Flavonoidler: Moleköl yapıları, kimyasal özellikleri, belirleme teknikleri, biyolojik aktiviteleri, Aktif Yayınevi, İstanbul, 1999, 381 s.

[44] Miller N. J., Luiz-Larrea M. B., Flavonoids and other plant phenols in the diet: Their significance as antioxidants. *Journal of Nutritional and Environmental Medicine*. 2002, 12, 39-51.

[45] Ross J. A., Kasum C. M., Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review of Nutrition*. 2002, 22, 19-34.

[46] Rice-Evans C., Screening of phenolics and flavonoids for antioxidant activity. Chapter 16, p.239-253, In: *Antioxidant Food Supplements in Human Health*, Ed: Packer L., Hiramatsu M., Yoshikawa T., Elsevier Inc. 1999, 511.

[47] Cotelte N., Bernier J. L., Catteau J. P., Pommery J., Wallet J. C., Gaydou E. M., Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Radical Biology and Medicine*. 1996, 20(1), 35-43.

[48] Çimen M. B. Y., Flavonoidler ve antioksidan özellikleri. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*. 1999, 19 (5), 296-304.

[49] Nizamlıoğlu, N. M., Nas, S., Meyve ve sebzelerde bulunan fenolik bileşikler; yapıları ve önemleri. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*. 2010, 5, 20-35.

[50] Hudson, B. J. F., *Food Antioxidants*. Elsevier Applied Science. USA, 1990, 173-188.

[51] Mavi, A., İnsan eritrosit ve lökositlerinden süperoksit dismutaz enziminin saflaştırılması ve bazı ilaçların enzim üzerine etkilerinin incelenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Erzurum, 2005, 52–53 s, (Doktora Tezi).

[52] Branen, A. L., Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *Journal of the American oil chemists Society*. 1975, 52, 59-63.

[53] Imaida, K., Fukushima, S., Shivai, T., Ohtani, M., Nakanishi, K., Ito, N., Promoting activities of buthylated hydroxyanisole and buthylated hydroxytoluene on 2-stage urinary bladder carcinogenesis and inhibition of γ -glutamyl trans peptidasepositive foci development in the liver of rats. *Carcinogenesis*. 1983, 4, 969–978.

[54] Ito, N., Fukushima, S., Hasegawa, A., Shibata, M., Ogiso, T., Carcinogenicity of buthylated hydroxianisole in F344 rats. *Journal of the National Cancer Institute*. 1983, 70, 343-347.

- [55] Gülçin, İ., The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (*Piper nigrum*) seeds. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2005, 56, 491-499.
- [56] Halliwell, B., Gutteridge, J., *Free Radicals in Biology and Medicine* (2nded). 1996, 11- 21.
- [57] Decker, E. A., Wagner, K., Richards, M. P., Shahidi, F., Measuring antioxidant effectiveness in food. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 4303-4310.
- [58] Somogyi, A., Rosta, K., Pusztai, P., Tulassay, Z., Nagy, G., Antioxidant measurements. *Physiol Meas.* 2007, 28 (4), 41–55.
- [59] Cao, G., Prior, R. L., Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin. Chem.* 1998, 44, 1309–1315.
- [60] 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.
- [61] Huang, D., Ou, B., Prior, R. L., The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 1841-1856.
- [62] Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Res. Int.* 2006, 39, 791–800.
- [63] Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K., Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 4290- 4302.
- [64] Lussignoli, S., Fraccaroli, M., Andrioli, G., Brocco, G. and Bellavite, P., A microplate-based colorimetric assay of the total peroxyl radical trapping capability of human plasma. *Anal. Biochem.* 1999, 269 (1), 38–44.
- [65] Tomer, P. D., McLeman, L. D., Ohmine, S., Scherer, P. M., Murray, B. K., O'Neill, K.L., Comparison of the total oxyradical scavenging capacity and oxygen radical absorbance capacity antioxidant assays. *J. Med. Food.* 2007, 10 (2), 337-344.
- [66] Lichtenthaler, R., Marx, F., Kind, O. M., Determination of antioxidative capacities using an enhanced total oxidant scavenging capacity (TOSC) assay. *Eur. Food Res. Technol.* 2003, 216, 166–173.
- [67] Valkonen, M., Kuusi, T., Spectrophotometric assay for total radical-trapping antioxidant potential in human serum. *Journal of Lipid Research.* 1997, 38, 823-833.
- [68] Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., Milner, A., A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* 1993, 84, 407–412.

- [69] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 1999, 26, 1231–1237.
- [70] Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Res. Int.* 2006, 39, 791–800.
- [71] Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., Lima, J.L.F.C., Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Anal. Chim. Acta.* 2008, 613, 1–19.
- [72] 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2004, 52 (26), 7970-7981.
- [73] Scalzo, R. L., Organic acids influence on DPPH scavenging by ascorbic acid. *Food Chem.* 2008, 107, 40–43.
- [74] Frankel, E. N., Meyer, A. S., The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 2000, 80, 1925-1941.
- [75] Okan, O. T., Varlıbaş H., Öz, M., Deniz, İ., Antioksidan analiz yöntemleri ve doğu karadeniz bölgesinde antioksidan kaynağı olarak kullanılabilir odun dışı bazı bitkisel ürünler. *Kastamonu Üni., Orman Fakültesi Dergisi.* 2013, 13 (1), 48-59.
- [76] Orwa, C., Mutua, A., Kindt R., Jamnadass, R., Simons, A., *Agroforestry Database: a tree reference and selection guide, version 4.0*, World Agroforestry Centre, Kenya, 2009.
- [77] Forestry Commission, <http://www.forestry.gov.uk/>
- [78] Rodríguez Cid de León, G. I., Hernández, M. G., Domínguez y Ramírez, A. M., López, J. R. M., Alarcón-Ángeles, G., Pérez, A. M., Adaptation of DPPH method for antioxidant determination. *Ecs Transaction.* 2011, 36 (1), 401-411.
- [79] Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, Çelik, S. E., “Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay”, *Microchim Acta*, 160, 413–419, 2008.
- [80] Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. M., Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology.* 1999, 299, 152-178.
- [81] Sanz, M., Fernández de Simón, B., Cadahía, E., Esteruelas E., Muñoz, A. M., Hernández, T., Estrellac, I., Pinto, E., LC-DAD/ESI-MS/MS study of phenolic

compounds in ash (*Fraxinus excelsior* L. and *F. americana* L.) heartwood. Effect of toasting intensity at cooperage. *Journal of Mass Spectrometry*. 2012, 47, 905-918.

[82] El, S.N., Türkiye’de sıklıkla tüketilen bazı gıdaların toplam fenolik madde içerikleri ve antioksidan aktiviteleri. 10. Gıda Kongresi, 21-23 Mayıs, 2008, Erzurum (Bildiri Özetleri Kitabı, 45-48 s.).

[83] Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N., Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*. 2006, 97 (4), 654–660.

[84] De Oliveira, A. M. F., Pinheiro, L. S., Pereira, C. K. S., Matias, W. N., Gomes, R. A., Chaves, O. S., De Souza, M. F. V., De Almeida, R. N., De Assis, T. S., Total phenolic content and antioxidant activity of some malvaceae family species. 2012, 1, 33-43.

[85] Muchuweti, M., Nyamukonda, L., Chagonda, L. S., Ndhala, A. R., Mupure, C., Benhura, M., Total phenolic content and antioxidant activity in selected medicinal plants of Zimbabwe. *International Journal of Food Science & Technology*. 2006, 41 (1), 33-8.

[86] Kaur, S., Mondal, P., Study of total phenolic and flavonoid content, antioxidant activity and antimicrobial properties of medicinal plants. *Journal of Microbiology & Experimentation*. 2014, 1 (1), 00005.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Buse AYDOĞAN

Doğum Yeri ve Yılı : İzmir, 1992

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : buseaydogan@hotmail.com

Eğitim Durumu

Lise : Gazeteci Çetin Altan Anadolu Teknik Lisesi, 2006-2010

Lisans : Celal Bayar Üniversitesi, Kimya Bölümü, 2010-2014

Yüksek Lisans : Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Kimya Bölümü, 2014-...

Ulusal Bildiriler

Aydoğan, B., Dost, K., Çelik, A., Dişbudak ağacı yapraklarındaki toplam fenolik bileşikler ve antioksidan kapasitelerinin tayini, 4. Eser Analiz Kongresi, 19-22 Mayıs 2016, SAÜ, Sakarya (Poster).

Ödüller

Aydoğan, B., Tarzan. G., Çelik, A., "Modifiye edilmiş pirina ile sulu ortamdan Arsenik(III) iyonlarının giderilmesi" adlı çalışma ile 13-16 Mayıs 2014'te Manisa CBÜ'de düzenlenen 21. Bilim ve Bahar Şenliği yarışmasında Temel Bilimler Proje yarışması 1.'lik ödülü.

