



T.C.
BATMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GÜNEYDOĞU ANADOLU BÖLGESİNDE
YETİŞEN FARKLI *NICOTIANA* SPP.
TIPLERİNİN YAĞ ASİDİ, FENOLİK
FLAVONOİD VE NİKOTİN İÇERİKLERİNİN
BELİRLENEREK KEMOMETRİK YÖNDEN
İNCELENMESİ**

Feride Merve KILIÇOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Temmuz-2018
BATMAN
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

FERİDE MERVE KILIÇOĞLU tarafından hazırlanan “Güneydoğu Anadolu Bölgesinde yetişen farklı Nicotiana spp. tiplerinin yağ asidi, fenolik, flavonoid ve nikotin içeriklerinin belirlenerek kemometrik yönden incelenmesi” adlı tez çalışması 27/07/2018 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Batman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan
Prof. Dr. Ahmet ONAY

Danışman
Prof. Dr. Engin TILKAT

Üye
Doç. Dr. Filiz AKBAŞ

Eş Danışman
Doç. Dr. Abduselam ERTAŞ

İmza



Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Doç. Dr. Babattin IŞCAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü



TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

İmza

Feride Merve KILIÇOĞLU

27.07.2018

ÖZET

GÜNEYDOĞU ANADOLU BÖLGESİNDE YETİŞEN FARKLI *NICOTIANA* SPP. TİPLERİNİN YAĞ ASİDİ, FENOLİK FLAVONOİD VE NİKOTİN İÇERİKLERİNİN BELİRLENEREK KEMOMETRİK YÖNDEDEN İNCELENMESİ

Feride Merve KILIÇOĞLU
Batman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Engin TILKAT

2018, 110 Sayfa

Jüri

Prof. Dr. Ahmet ONAY
Prof. Dr. Engin TILKAT
Doç. Dr. Abdulselem ERTAŞ
Doç. Dr. Filiz AKBAŞ

Tütün yaprakları bir çok alkaloid içerir, bunlar başta nikotin olmak üzere, nikotinin, anatabine, anatabiline ve nornikotinedir. Yapraklar aynı zamanda yüksek oranda glukozitler, tahasinin, tahasilin ve izokerkitrin, 1-kinik, klorojenik, kafeik ve oksalik asitleri de içerir. Bu tez kapsamında daha çok ülkemizin doğu illerinden *Nicotiana tabacum* türüne ait örnekler toplanmış gölgede kurutulmuş ve petrol eteri ile etanol ekstraktları hazırlanmıştır. Hazırlanan petrol eteri ekstraktının yağ asidi içeriği GC-MS/MS ile, etanol ekstraktlarının fenolik bileşikler bakımından kimyasal içeriği ise LC-MS/MS ile belirlenmiştir. Nicotine, Nicotinamide ve Nicotinic acid bileşiklerinden oluşan bir metot geliştirilerek bu metoda ait tüm analitik parametreler ortaya konmuştur. Etanol ekstraktlarının bu bileşikler bakımından içerik analizi bu metoda göre LC-MS/MS ile yapılmış ve tüm kimyasal sonuçlar kemometrik olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca etanol ekstraktlarının total fenolik içeriği, antioksidan kapasitesi (CUPRAC, DPPH serbest radikali giderim aktivitesi ve ABTS kation radikali giderim aktivitesi yöntemleri), antikolinesteraz enzim aktivitesi (Asetil ve butiril kolinesteraz), antiüreaz ve antitirozinaz enzim aktiviteleri incelenmiştir.

Genel olarak GC-MS yağ asidi sonuçlarına baktığımızda çalışılan örneklerin özellikle majör bileşenler bakımından farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Farklı lokalitelerden toplanan örneklerin majör bileşenlerinin caproic acid (C6:0), myristic acid (C14:0), palmitic acid (C16:0), oleic acid (C18:1n9c), linoleic acid (C18:2n6c), stearic acid (C18:0) ve pentadecanoic acid (C15:0) olduğu tespit edilmiştir. LC-MS/MS sonuçlarına baktığımızda ise hesperidin, klorojenik asit, malik asit ve rutin majör bileşen olarak tespit edilmiştir. Antioksidan aktivite bakımından baktığımızda ise DPPH yönteminde en yüksek aktiviteyi MTYE ekstraktının, ABTS yönteminde MZY ekstraktının ve CUPRAC yönteminde yine MTYE ekstraktının gösterdiği belirlenmiştir. Tüm örneklerin genel olarak hem asetil hemde butiril kolinesteraz enzim aktivitelerinin düşük olduğu fakat özellikle Adıyaman'dan toplanan örneklerin asetil kolinesteraz enzim aktivitelerinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bazı örneklerin yüksek bazı örneklerin ise hiç antiüreaz enzim aktivitesi göstermediği saptanmıştır. Tirozinaz enzim aktivitesine baktığımızda ise genel olarak örneklerin orta-yüksek bir potansiyele sahip olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak lokalite farklılığının hem kimyasal içerik hem de biyolojik aktivite bakımından oldukça etkili olduğu söylenebilir. Diğer bir değişle iklim ve toprak yapısının tütün örneklerinin kimyasal içeriği ve dolayısıyla biyolojik aktiviteleri üzerinde oldukça etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Nicotiana tabacum* L., Nikotin içeriği, Fenolik içeriği, Antioksidan, Antikolinesteraz, Antiüreaz, Antitirozinaz

ABSTRACT

CHEMOMETRIC STUDY OF PHENOLIC, FLAVONOID, FATTY ACID AND NICOTINE CONTENTS OF DIFFERENT NICOTIANA SPP. TYPES GROWN IN SOUTHEASTERN ANATOLIA REGION OF TURKEY

Feride Merve KILIÇOĞLU

BATMAN UNIVERSITY GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES DEPARTMENT OF BIOLOGY

Advisor: Prof. Dr. Engin TILKAT

2018, 110 Pages

Jury

Prof. Dr. Ahmet ONAY

Prof. Dr. Engin TILKAT

Assoc. Prof. Dr. Abduselam ERTAŞ

Assoc. Prof. Dr. Filiz AKBAŞ

Tobacco leaves contain many alkaloids, mainly nicotine, anatabine, anatabine, anatabine and normnicotine. The leaves also contain high-order glucosides, tahaxinin, tahacillin and isocercitrin, 1-kinic, chlorogenic, caffeic and oxalic acids. In this thesis, samples of *Nicotiana tabacum* from eastern Turkey were collected, dried in the shade, and petroleum ether and ethanol extracts were prepared. Fatty acid content of the prepared petroleum ether extract was determined by GC-MS / MS. On the other hand, the chemical content of phenolic compounds of ethanol extracts prepared was determined by LC-MS / MS. A method consisting of nicotine, nicotinamide and nicotinic acid compounds has been developed and all the analytical parameters of this method have been revealed. Content analysis of ethanol extracts for these compounds was performed by LC-MS / MS according to this method and all chemical results were evaluated chemometrically. In addition, antioxidant capacity (CUPRAC, DPPH free radical scavenging activity and ABTS cation radical scavenging activity methods), anticholinesterase enzyme activity (acetyl and butyrylcholinesterase), antihyperase and antityrosinase enzyme activities of ethanol extracts were determined.

When we look at GC-MS fatty acid results in general, it has been determined that the samples studied differ in particular in terms of major components. The major components of the samples collected from different localities were caproic acid (C6:0), myristic acid (C14:0), palmitic acid (C16:0), oleic acid (C18:1n9c), linoleic acid (C18:2n6c), stearic acid:0) and pentadecanoic acid (C15:0). When we look at LC-MS/MS results, hesperidin, chlorogenic acid, malic acid and routine major component were detected. In terms of antioxidant activity, the highest activity in the DPPH method was determined to be the MYE extract in the ABTS method and the MYE extract in the CUPRAC method. All of the samples in general showed that both acetyl and butyrylcholinesterase enzyme activities were low, but especially acetylcholinesterase enzyme activities of Adiyamanandan collected samples were high. Some of the samples showed high antiurease enzyme activity. When we look at tyrosinase enzyme activity, it is generally determined that the samples have a medium-high potential. As a result, it can be said that the locality difference is very effective both in terms of chemical content and biological activity. In other words, it can be said that climate and soil structure is very effective on the biological activities of tobacco samples because of their chemical content.

Keywords: *Nicotiana tabacum* L., Nicotine content, Phenolic content, Antioxidant, Anticholinesterase, Antihyperase, Antityrosinase

ÖNSÖZ

Tütün üretiminin Türkiye ve Dünya ekonomisinde çok önemli bir yere sahip olduğu söylenebilir. Dünyada yaklaşık 4,3 milyon ha alanda 7,5 milyon ton tütün üretilmekte iken, Türkiye’de ise yaklaşık olarak 110 bin ha alanda 88 bin ton kadar üretilmektedir.

Kemometrik çalışmalarda çok yaygın olarak kullanılan Temel Bileşenler (PCA) ve Hiyerarşik (Aşamalı) Kümeleme (HCA) analizleri yöntemleriyle; Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesinden toplanan tütün örneklerini kimyasal içerik bakımından sınıflandırıldı ve iller arasındaki kemometrik farklılıkları değerlendirildi. Aynı zamanda örneklerin nikotin içerikleri belirlenerek bu örneklerin insan sağlığı açısından zarar dereceleri de ayrıca irdelendi. Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgemizde yetiştirilen *Nicotiana tabacum* L. varyetelerinin fenolik, flavonoid, yağ asidi ve nikotin içeriklerinin kemometrik yönden incelendi. Yaptığımız literatür taramaları ışığında, böyle bir çalışma ilk defa yapılmıştır. Bu nedenle tez önerisinin konusu özgündür.

Bu tez çalışmasının her aşamasında katkı ve görüşlerini eksik etmeyen, değerli önerileri ve yorumları ile beni yönlendiren tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Engin TILKAT’a ve Doç. Dr. Abdulsalam ERTAŞ’a teşekkürü bir borç bilirim. Dicle Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd.Doç.Dr. Mustafa Abdullah YILMAZ’a teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan, beni bu günlere getiren, dualarını hiçbir zaman benden esirgemeyen aileme, öğrenciliğimden beri ve yüksek lisans yaptığım dönemde yetişmemde katkısı olan Lisans Hocam Prof. Dr. Davut BAŞARAN’a (emekli) sonsuz teşekkür ederim.

Feride Merve KILIÇOĞLU
BATMAN-2018

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	7
Çalışılan Tür Hakkında Genel Bilgiler	7
Solanaceae (Patlıcangiller) familyasının genel özellikleri.....	7
<i>Nicotiana</i> cinsi hakkında botanik bilgiler	7
Çalışmada Kullanılan Teknikler	8
LC-MS/MS (Sıvı Kromatografisi Tandem Kütle Spektrometresi).....	8
HPLC teknikleri	10
<i>Nicotiana tabacum</i> İle İlgili Yapılan Önceki Çalışmalar	26
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	30
Materyal	30
Tütün bitkisinin sistematikteki yeri	31
Yöntem.....	31
Kurutulan bitkilerin ekstralarının (analize) hazırlanması	31
Kimyasal standartlar ve çözücüler	32
Kullanılan cihaz ve diğer gereçler	33
Toplam fenolik ve toplam flavonoit içeriklerinin belirlenmesi	33
Antioksidan aktivite testleri	34
Antikolinesteraz aktivite testleri	36
Antiüreaz ve antitrozinaz aktivite testleri	38
Ekstrelerin yağ asidi için analize hazırlanması.....	40
LC-MS/MS Sistemi ile fenolik içerik ve nikotin içeriği analizi	40
Kemometrik analiz.....	45
İstatistiksel işlemler	46
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	47
Çalışılan Tütün Tiplerinin Ekstre Verim Sonuçları ve Tartışma	48
Petrol Eteri Ekstrelerin Yağ Asidi Analiz Sonuçları ve Tartışma	48
Etanol Ekstrelerin Fenolik ve Nikotin İçerik Analiz Sonuçları	54
LC-MS/MS Sonuçlarının Kemometrik Değerlendirilmesi ve Tartışma	60
Biyolojik Aktivite Sonuçları	65
Total fenolik ve antioksidan aktivite sonuçları	65
Enzim aktivite sonuçları ve tartışma	68

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	70
Sonuçlar	70
Öneriler	71
KAYNAKLAR	72
EKLER	78



SİMGELER VE KISALTMALAR

A•	: Antioksidan radikali
ABTS	: 2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)
Ac	: Aseton
AChE	: Asetilkolinesteraz
AH	: Birincil antioksidan
ATP	: Adenozintrifosfat
BChE	: Butirilkolinesteraz
BHA	: Bütillenmişhidroksi anisol
BHT	: Bütillenmişhidroksi toluen
CUPRAC	: Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi
DEPT	: Distortionless enhancement by polarization transfer
Dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DPPH	: 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil
DTNB	: 5,5-Ditiyobis(2-nitro benzoik asit)
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
EI-MS	: Elektron impakt kütle spektroskopisi
ESI-MS	: Elektron spray iyonlaşma kütle spektroskopisi
FCR	: Folin Ciocalteu fenol reaktifi
FDA	: US food and drug administration
FRAP	: Demir (III) indirgeme antioksidan gücü
GC	: Gaz kromatografisi
GC-MS	: Gaz kromatografisi kütle spektroskopisi
GSH	: Glutasyon
•	: Hidroperoksi radikali
H2O2	: Hidrojen peroksit
HClO	: Hipokloröz asit
HPLC	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
HSQC	: Heteronuclear single quantum coherence
MeOH	: Metanol
NaAc	: Sodyum asetat
NADH	: Nikotinamitadeninidinükleotit
NBT	: Nitroblutetrazolyum
NMDA	: N-metil-D-aspartat
NMR	: Nükleer magnetik rezonans
NO+	: Nitrozil katyonu
NO-	: Nitroksi anyonu
NO•	: Azot monoksit radikali
NO2•	: Azot dioksit radikali
NO2+	: Nitronyum katyonu
1O2	: Singlet oksijen
O2•-	: Süperoksit anyon radikali
O2•	: Süperoksit radikali
O3	: Ozon
OH•	: Hidroksil radikali
ONOO-	: Peroksinitrit anyonu
ORAC	: Oksijen radikalini absorplama kapasitesi
PE	: Fikoeritrin
PEs	: Pirokatekole eşdeğer

PG	: Propil gallat
R	: Alkil radikali
RO•	: Alkoksi radikali
ROO•	: Peroksi radikali
ROOH	: Hidroperoksit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
S	: Saat
SOD	: Süperoksit dismutaz
TBHQ	: : <i>t</i> -Bütilhidrokinon
UV	: Ultraviyole spektroskopisi
HMBC	: Heteronuclear multiple bond coherence
Ferrozin	: 3-(2-Piridil)-5,6-bis-(4-fenilsülfonik asit)-1,2,4-triazin monosodyum tuzu
HMQC	: Heteronuclear multiple quantum coherence
AVY :	: Adıyaman Virginia tütünü yaprak
AYCY:	: Adıyaman yerli Çelikhan tütünü yaprak
MUY:	: Mardin Uluköy yaprak
ABT:	: Adıyaman Besni tohum
AKT:	: Adıyaman Kömür tohum
ACT:	: Adıyaman Çelikhan Bölgesi sulu tütün tohumu
MZKT:	: Kahramanmaraş Zeytinlik Ilıca kasabası tohumu
MM1:	: Kahramanmaraş Merkez öğütülmüş tütün 1
BHYBY:	: Bitlis Hizan Yolalan Boztepe tütünü yaprak
AKY:	: Adıyaman Kömür yaprak
MM2:	: Kahramanmaraş Merkez öğütülmüş tütün
ATT:	: Adıyaman Tut bölgesi sulu tütün
MM3:	: Kahramanmaraş Merkez öğütülmüş tütün 3
AKHT:	: Adıyaman Kahta Tohum
MYE:	: Mardin Yüceli yaprak
AOT42:	: Adıyaman Merkez tohum
MTY:	: Mardin Tuzla yaprak
BML2Y:	: Bitlis Mutki (Lokasyon 2) sulu tütün yaprak
AMT:	: Adıyaman Merkez sulu tütün tohum
MMT:	: Kahramanmaraş Merkez tohum
MYEY:	: Mardin Yedi Kardeş yaprak
ACY:	: Adıyaman Çelikhan yaprak
BML2T:	: Bitlis Mutki (Lokasyon 2) sulu tütün tohum
AAKT:	: Adıyaman Akçalı tohum
AYY:	: Adıyaman Yedi Oriental yaprak
AAOTEG:	: Adıyaman Birlik tohum
BBY:	: Bitlis Börlükyazı yaprak
BML1T:	: Bitlis Mutki lokasyon 1 sulu arazi tohum
BML1Y:	: Bitlis Mutki lokasyon 1 merkez sulu tütün yaprak
AAOT19:	: Adıyaman Gölbaşı tohum
MTYE:	: Kahramanmaraş Merkez yaprak
MZY:	: Kahramanmaraş Zeytinlik Ilıcası yaprak
BBT:	: Bitlis Börlükyazı tohum
AYT:	: Adıyaman yerli tütün tohum

1. GİRİŞ

Solanaceae familyası, bir veya çok yıllık, otsu, tırmanıcı, çalı veya ağaç formunda bitkiler içeren bir taksondur. Bu familya bitkilerinden tropan alkaloitleri taşıyanlar eczacılıkta kullanılır ve zehirlidir. Ayrıca sebze olarak kullanılan bitkiler yönünden de önemli bir familyadır. Solanaceae familyasından yeryüzünde 85 cins ve 2200 den fazla tür bulunur. Türkiye’de ise, 9 cins ve 31 tür doğal olarak yetişir. Anayurdu Amerika kıtası olan tütün bitkisi ilk keşfedildiğinde yerliler tarafından kutsal sayılmış ve dini ayinlerde kullanılmıştır (Yılmaz, 2003; Türkiye Yeşilay Cemiyeti 1986). Osmanlı topraklarına ise tütün 17. yüzyılın ilk yarısında İngiliz, Venedik ve İspanyol tacirler tarafından getirilmiştir. Takip eden yıllar içerisinde Osmanlı topraklarında ilk olarak Makedonya, Yenice ve Kırcalı’de tütün yetiştirilmeye başlanmıştır (Bayrak, 2013; Şahin ve Taşlıgil, 2013). Tütün üretiminin en çok olduğu ülkeler arasında Çin, Hindistan, Brezilya, ABD, Türkiye, Zimbabve, Endonezya, İtalya, Yunanistan ve Malawi yer almaktadır (Aarti ve Rakesh, 2013). Ülkemizde tütün, üretiminin yapıldığı bölgelere göre Ege, Marmara-Trakya, Karadeniz ve Doğu-Güneydoğu Anadolu bölgesi olmak üzere dört farklı gruba ayrılmaktadır. Tütün ihracatımızın % 90-95’ini ise Ege bölgesi tütünleri oluşturmaktadır. Kurutma yöntemlerine göre ise:

- 1- Güneşte kurutulan (sun-cured)
- 2- Isı ile kurutulan (flue-cured),
- 3- Ara ara havalandırılabilen kapalı ortamda kurutulan (air-cured)
- 4- Ateşte kurutulan (fire-cured) şeklinde sınıflandırılır (Güzel, 2016).

Ülkemizde yetişen tütünün %98’i güneşte kurutulan tipi olup “oryantal tütün” olarak da adlandırılmaktadır. Ayrıca, ülkemizde %2 oranında yabancı kaynaklı tütün üretimi de yapılmaktadır. Yabancı kaynaklı bu tütünler puroluk tütün, Virginia tütünü, Tömbeki, Hasankeyf ve Burley olarak isimlendirilmektedirler. Özellikle nargile tütünü olarak kullanılan tömbeki tütününün nikotin oranı oldukça yüksektir (Bayrak, 2013; Şahin ve Taşlıgil, 2013).

Tütün yaprakları birçok alkaloid içerir, bunlar başta nikotin olmak üzere, nikotinin, anatabine, anataline ve nornikotine. Yapraklar aynı zamanda yüksek oranda glukozitler, tahasinin, tahasilin ve izokerkitrin, 1-kinik, klorojenik, kafeik ve oksalik asitleri de içerir. Yapraklar ayrıca terpenik ve kanserojen maddeler de içerir (Shaligram

ve ark. 2004). Köklerinden anatabin ve (+) nornikotin izole edilmiştir. Kersetin-3,3'-Dimetil eter ve Kersetin-3-Metil eter çiçeklerden izole edilmiştir. Üç yeni Gibberellin-nicotiana α , β ve γ , Gibberellin A ve GA₃ tepe ve çiçek tomurcuklarından elde edilmiştir. Tohumlar, sikloartanol, sikloartenol 24-daturadiol ve solavetivon içerir. Kolesterol, kolest-7-Enol, 24-metilenkolesterol, kampesterol, stigmasterol, sitosterol, 28- Izofucosterol, lanosterol, 31- Norlanosterol, lanost 8-enol, obtusifoliol, 31-norcycloartenol, cycloeucalenol, Granisterol, sitrostadienol, β -amirin, Lupeol, sikloalkanol ve 24-Metilenikloartanol tohum yağından izole edilmiştir (Bapalal ve ark. 2009).

Anti- nosiseptif (Maxwell ve ark. 2010; Trease ve Evans 1996; Harboume 1991), antifungal (Ponstein ve ark. 1994), anti mikrobial (Adeleye ve ark. 2008), antelmintik (Mehta ve ark. 2008), antialzheimer (Scerri 2005) etkilerinin yanısıra, periferel sinir sistemi (Balfour ve Fagerstrom 1996) merkezi sinir sistemi, kardiovasküler sistem (Francis ve ark. 1999), gasrointestinal sistem (Khalifa 2001) ve eksokrin sistem (Sairam ve ark. 2001) üzerine farmakolojik aktivitesinin olduğu tespit edilmiştir.

Tütün dumanındaki parçacık ya da gaz fazında bulunan maddeler solunum yollarının yapı ve işlevini bozarak çok sayıda solunumsal hastalığa yol açmaktadır. Sigara dumanı solunum yolları, üst sindirim sistemi, pankreas, renalpelvis ve mesane kanseri ile ilişkilenebilir ve sigara içenlerin serviks kanserine yakalanma ihtimalinin daha fazla olduğu belirtilmektedir (USDHHS 1982, IARC 1986). Sigara dumanında birçok kanserojen madde bildirilmiştir. Ancak çeşitli organlarda sigara dumanının kanserojen aktivitesinden sorumlu olan tek bileşik veya kimyasal gruplar henüz gösterilememektedir. Laboratuvar analizlerinde, poli-nükleer aromatik hidrokarbonlar ve N-nitrosaminler sigara içicilerde kanser indüksiyonunda önemli rol oynadıkları ileri sürülmektedir (USDHHS 1988, IARC 1986). Günümüzde farmakolojik özellikleri ve neden olduğu sağlık problemleri iyi bilinmesine rağmen, tütün ürünlerinin yaygın kullanımı ciddi bir sağlık sorunu olarak yerini korumaktadır.

Tohum haricinde bitkinin her bir kısmı nikotin içerir, ancak nikotin konsantrasyonu, genotip, yetiştirildiği arazi tipi, kültür veya hava koşulları gibi değişik faktörler tarafından etkilenir. Nikotin konsantrasyonu, bitki yaşı ile birlikte de artar. Olgun bitkide nikotin dağılımı çok değişkendir. Toplam nikotinin % 64'ü yapraklarda bulunur, bu oran kökte %13 ve çiçeklerde ise % 5 civarındadır (IARC 1986).

Günlük hayatta kullanılan ve bilinen tütün mamulleri; sigara, sigar (puro, sigarillo), pipo, tömbeki, enfiye, çiğneme ve kıyılmış tütün olmak üzere kullanılır. Türkiye de tütün ve tütün ürünleri, Cumhuriyet öncesi ve sonrasında devamlı olarak özel kanunlarla düzenlenen özel bir ürün olmuştur, piyasası devlet tekeli şeklinde devamlı kontrol altında tutulmuştur. 4733 Sayılı Tütün ve Alkol Piyasası Düzenleme Kurumu Teşkilat ve Görevleri Hakkında Kanun’la tütün piyasası serbest hale getirilmesine rağmen kanunun denetim, düzenleme ve gözetimi devam ettirilmiştir. En son üretilen çiğneme tütünüdür. Son yıllarda Türkiye de tütün sektörü köklü değişiklikler yaşamıştır (Adıyaman tütün raporu, 2013).

Üretilen tütünlerin destekleme alımları sona erdirilmiş, pazarlama organizasyonu değişmiş ve bunlara bağlı olarak üretici alanı, üretim sayısı ve üretim miktarında büyük oranda azalmalar yaşamıştır. Bu gelişmelerin yanında Tekel Genel Müdürlüğü yerine yeni kurulan Tütün ve Alkol Piyasası Düzenleme Kurumu (TAPDK) piyasa düzenleme, gözetim ve denetim görevlerini üstlenmiştir.

Tütün, üretimde ekimden başlayıp değerlendirme aşamasına kadar istihdam sağlayan, yüzyıllardır birçok bölgemizde yaygın olarak aile tarımı olarak üretilmekte ve milli gelir açısından da ülkemiz ekonomisinde önemli bir yer işgal etmektedir.

Ülkemizde tütün üretimi, farklı ekoloji ve mikro klimalara bağlı olarak çok çeşitli tipte üretilmektedir. Türkiye’de üretilen tütünlerin %98’i “sun-cured” tipi oriental olup güneşte kurularak elde edilen düşük şeker ve nikotin içeriğine sahip tütünlerdir. Geri kalan %2’lik kısmı ise, genel olarak “darkair-cured” (havalandırma ile kurutulan, çok miktarda şeker ve nikotin içeren “sigara” tütünü), “flue-cured” (doğal olmayan kısa sürede kurutulan tütün yüksek miktar şeker ve orta miktar nikotin içeren “virginia” tütünü) ve “lightair-cured” (havalandırma ile kurutulmuş, az miktarda şeker ve nikotin içeren “burley” tütünü) üretimi şeklinde olmaktadır (Güzel, 2016).

Tütün üretimi yerli olarak, 1994 yılına kadar hızlı bir şekilde artış kaydetmiştir (DPT, 2004). Tütün üretiminin çok fazla olması ve yüksek fiyat politikalarının uygulanmasından dolayı ürün zamanla ekolojik şartlarında üzerine çıkarak taban araziye yerleşerek ve tütün üretimimiz diğer ürünlere göre artış göstererek üretim bölgelerindeki bitki örtüsünün bozulmasına sebep olmuştur.

Bazı yıllarda, stok varlığının yüksek düzeylerde olması maliyetin (bakım masrafları) artmasına sebep olduğundan, zaman zaman ürünün imhası yoluna

gidilmiştir. Türkiye’de tütüne olan rağbet iç ve dış talepte yıllar itibariyle çok büyük değişiklikler göstermemektedir. Türkiye de tütünün iç tüketimi 70–80 bin ton, yıllık ihracatı ise yaklaşık 100–125 bin ton civarındadır. Bu verilere göre, rasyonel tütün üretimimizin stok ihtiyacı ile beraber 200–225 bin ton civarında olması gerektiği sonucuna varılmaktadır (Halistürk ve Tarhan, 2017).

21.yüzyılda özellikle gelişmiş ülkelerde tütün ve tütün sektörü, artan sağlıklı yaşam bilinciyle önemini yitirme eğilimindedir. Ancak bu durum gelişmekte olan ülkelerde geçerli olmamakla birlikte sigara içenlerin sayısı ve oranı giderek artmaktadır. Örneğin 1984 sonrası dönemde sigara tüketimi Türkiye’de % 80 artarken Amerika Birleşik Devletleri’nde %30 azalmıştır. Tütünün geleceği; bir tarafta hızla artan dünya nüfusu ve özellikle gelişmekte olan ülkelerde tütün talebinin artması, diğer tarafta tütün mamullerinin neden olduğu hastalıklar ve bu alandaki sağlık harcamalarının yüksek miktarlarda olması nedeniyle tüketimin azalması arasındaki rekabete bağlıdır. Kısaca, gelecekte tütün tüketimi tütün mamulleri için tahsil edilecek yüksek vergi artışı, fiyat artışı, tütün mamülleri tüketimindeki sınırlandırmalar, tütün kullanımından kaynaklanan sağlık problemleri ve tütün mamulleri satan kuruluş ve şirketlerin yapacakları reklama bağlı olarak kendini gösterecektir (Anonim, 2017).

Tütün üretimine ve önemine değinmek gerekirse, tütünün, Türkiye ve Dünya ekonomisinde çok önemli bir yere sahip olduğu söylenebilir. Dünyada yaklaşık 4,3 milyon ha alanda 7,5 milyon ton tütün üretilmekte iken, Türkiye’de yaklaşık 110 bin ha alanda 88 bin ton kadar üretilmektedir. Türkiye, 70 bin ton tütün ihracatı ile dünyada 7. sırayı alırken, yaklaşık 50 bin ton tütün ithalatı ile 13. sırada yer almaktadır. Tütün, Türkiye ekonomisi için oldukça önemli bir tarımsal ürün olma özelliğini korumakta ve çeşitli bölgelerimizde aile tarımı olarak yaygın bir şekilde üretilmektedir. Ülkemizde yaklaşık 82 bin aile tütün üretimi yapmakta ve bunlara tütün endüstrisinde çalışanlar da (aileleri ile birlikte) dâhil edildiğinde, yaklaşık 500 bin kişiye istihdam sağlamaktadır. Bu rakam Türkiye nüfusunun yaklaşık % 0,7’sine tekabül etmektedir (Anonim, 2013). Türkiye dışında başlıca oriental tip tütün üreten ülkeler Yunanistan, Bulgaristan ve Makedonya’dır. Türkiye, 2011–2013 yılları arasında ortalama 77 bin ton yaprak tütün üretimi gerçekleştirmiştir. Türkiye’de üretilen tütünler iri, orta ve küçük kıtalı olup özellikle Ege, Karadeniz ve Marmara Bölgelerinde üretilen küçük ve orta kıtalı, nitelikli tütünlerin her yaprağının ihraç değeri bulunmaktadır. Ayrıca diğer bölgelerde (Doğu Anadolu, Güneydoğu Anadolu ve Akdeniz) üretilmekte olan kıyılmış sarmalık tütünler

ise iç piyasada tüketilmektedir. Ancak kaliteli tütün yetiştirilmesi amacıyla ekim alanları devlet tarafından sınırlandırılmıştır. Türkiye’de, tütün üretiminde ilk sırayı Ege Bölgesi (Manisa, İzmir, Aydın, Muğla, Denizli ve Uşak çevresi), ikinci sırada Güneydoğu Anadolu Bölgesi ve üçüncü sırada da Karadeniz Bölgesi yer almaktadır (Anonim, 2013).

En yaygın analiz teknikleri kemometrik teknikler, Temel Bileşenler (Principal Component Analysis-PCA) ve Aşamalı Kümeleme (Hierarchical Cluster) analizleridir (HCA). PCA tekniği ile örnekler arasında nasıl bir ilişki olduğu ve değişkenler arasındaki etkileşim konularına cevap aranır. Kümeleme (HCA) tekniği ise örnekler arasındaki sınıflandırma (karakterizasyon) konusunda bilgi verir. Bu teknikler, daha önceden ortaya çıkarılmamış ilişkileri ortaya çıkarma ve sıradan sonuçlar diye nitelenemeyecek tahminler yapmaya izin veren yöntemlerdir (Dıraman ve ark., 2009a,b)

Türkiye’de Ege, Karadeniz, Marmara, Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde gerek morfolojik yapıları, gerekse kimyasal bileşimleri dolayısıyla kalite ve içimleri birbirinden farklı 23-25 kadar tütün çeşidi ya da tipi vardır (Peksüslü, 1998). Tütünün kullanılan kısmı olan yapraklarında bulunan nikotin miktarından dolayı, diğer kültür bitkilerinden farklılık arz etmektedir. Nikotin, bitkinin köklerinde sentezlenen ancak yapraklarında bulunan, düşük dozlarda keyif verici, yüksek dozlarda ise toksik özelliğe sahip bir alkaloiddir (Esental ve ark., 2001). Günümüzde tütün yaprakları genellikle sigara (% 90), puro, pipo, nargile, çiğneme ve enfiye şeklinde kullanılmaktadır. Yetiştirildiği bölgenin iklim ve toprak şartlarına uyum sağlayan tütün tipleri, o bölgelere has çeşitler olarak ortaya çıkmış ve buna bağlı olarak her bölgenin kendine özgü bir tütün üretim şekli de oluşmuştur (Peksüslü, 1998).

Adıyaman tütünü, tek başına, herhangi bir katkı maddesi kullanmadan, içilebilen bir tütün özelliğine sahip olması ile özellikle iç tüketimde sarmalık kıyılmış tütün olarak oldukça geniş bir tüketici kitlesine sahiptir. Bu tüketici talebinin ithal tütün yerine yerli üretim ile karşılanması gerekmektedir. Böylece bu sektörden geçimini sağlayanların korunması temin edilecek, yabancı tütün ve mamülleri için ödenen paranın yurt içinde kalması sağlanacak, döviz kaybı önlenmiş olacaktır. Farklı ekoloji ve mikro klimalara bağlı olarak ülkemizde çok çeşitli tip tütünlerin üretimi yapılmaktadır. Türkiye’de üretilen tütünlerin %98’i “sun-cured” tipi oriental tütünler olup güneşte kurutulan düşük şeker ve nikotin seviyesine sahip tütünlerdir. Tütün vergileri, dünyanın neredeyse tüm devletleri için başlıca gelir kaynaklarından biridir. Örneğin, Sri Lanka’da, kurumlar

vergisi ve tüketim vergisi devlet gelirlerinin %10'unu oluşturmaktadır. Ülkemizde ÖTV gelirleri içinde tütün mamullerinin payı yüzde 27,8 olarak planlanmıştır (Vergi, 2014). Tütün, gıda amaçlı olanlar dışında dünyada en yaygın olarak yetiştirilen tarımsal üründür. Tütün yetiştirmeyi seçen çiftçiler (bunların çoğu gelişmekte olan ülkelerdeki çiftçilerdir), tütünün dayanıklı bir bitki olması, fakir topraklarda ve değişken hava koşullarında iyi büyümesi ve satış fiyatının istikrarlı olması dolayısıyla bu seçimi yapmaktadırlar. Çiftçiler, topraklarının çok küçük bir kısmını tütüne ayırarak büyük gelirler elde edebilirler ve tütünden kazandıklarıyla başka ürünler, örneğin gıda ürünleri yetiştirebilirler. Tütün ülkemiz tarımında her zaman önemli bir yere sahip olmuş üretimi, sanayi ve son yıllarda da tütün mamullerinin toplum sağlığı ve sosyal hayatındaki yeri ile gündemi meşgul etmiştir. Ülkemizde tütün tarımının başlangıcıyla birlikte tüm dünyada “Türk / Şark Tütünü” adıyla tanınır hale gelmesi, yetiştirilişi ile ilgili yapılan yasal düzenlemeler ve söz konusu faaliyetin sağladığı istihdam sayesinde tütün çoğu tarımsal ürün içerisinde özel bir yer edinmiştir. Bu çalışmada önemli tütün yetiştiriciliğinin yapıldığı 4 ilimizdeki farklı lokasyonlardan yetiştirilen tütün çeşitlerinin fenolik, flavonoid, yağ asidi ve nikotin içeriklerinin kemometrik olarak değerlendirilmesi yapılmıştır.

Bu çalışmanın sonucunda, kemometrik çalışmalarda en yaygın biçimde kullanılan Temel Bileşenler (PCA) ve Hiyerarşik (Aşamalı) Kümeleme (HCA) analizleri yöntemleriyle; Kahramanmaraş, Adıyaman, Mardin ve Bitlis illerinden toplanan tütün örneklerini kimyasal içerik bakımından sınıflandırmak ve iller arasındaki kemometrik farklılıkları değerlendirilmiştir. Yaptığımız literatür taramaları ışığında, böyle bir çalışmanın ilk defa yapılacak olması nedeniyle tezin konusunun özgünlüğünü göstermektedir. Aynı zamanda örneklerin nikotin içerikleri belirlenerek bu örneklerin insan sağlığı açısından zarar dereceleri de ayrıca irdelenmiştir. Kısaca ifade etmek gerekirse, bu tez Güneydoğu Anadolu bölgemizde yetiştirilen farklı *Nicotiana tabacum* L.'nin, fenolik, flavonoid, yağ asidi ve nikotin içeriklerinin kemometrik yönden incelenmesidir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Çalışılan Tür Hakkında Genel Bilgiler

Solanaceae (Patlıcangiller) familyasının genel özellikleri

Solanaceae familyası, bir veya çok yıllık, otsu, tırmanıcı, çalı veya ağaç formunda bitkiler içeren bir taksondur. Bu familya bitkilerinden tropan alkoloitleri taşıyanlar eczacılıkta kullanılır ve zehirlidir. Ayrıca sebze olarak kullanılan bitkiler yönünden de önemli bir familyadır. *Solanaceae* familyasından yeryüzünde 85 cins ve 2200 den fazla tür bulunur. Türkiye’de ise, 9 cins ve 31 tür doğal olarak yetişir. Bunların yanında kültürü yapılmakta olan bitkiler de bulunmaktadır. Bu familya daha çok Avustralya, Orta ve Güney Amerika’da yayılış gösterir. Yaprakları boyut ve şekil yönünden çok değişken, basit veya parçalıdır. Çiçekleri hermafrodit, çoğunlukla aktinomorf, bazılarında ise hafif zigomorfitur. Kaliks gamosepal, 5 loblu ve kalıcı; korolla gamopetal tubulat, kampanulat, bazen bilabiata, 5 parçalı. Stamen 5 tane. Ovaryum üst durumlu 2, bazen 4 gözlü 2 carpellidir. Çiçek formülü: K(5) C(5) A5 G(2). Meyva çok tohumlu bakka veya kapsüldür. Gövdedeki iletim demetleri bikollateraldir. *Nicotiana* türleri, Amerika kökenli kültür bitkileridir. Yaprakları basit, çiçekleri tepede salkım durumundadır; meyva küçük ve kapsül tipindedir (Tanker ve ark., 2007).

Solanaceae familyası, tıbbi ve ekonomik yönlerden önemli bir familyadır. Ülkemizin Trakya bölgesini ve İstanbul’un anadolu cephesini içine alan kısmında, bu bölgenin florası ile ilgili çalışmalar sonucunda bu familyada, yerli ve yetiştirilmiş olarak bulunan bitkilerin 10 cins altında toplandığı görülür. Bunlar; *Atropa*, *Datura*, *Hyoscyamus*, *Lycium*, *Physalis*, *Solanum*, *Lycopersicum*, *Capsicum*, *Nicotiana*, *Petunia*’dır (Baytop, 1971).

***Nicotiana* cinsi hakkında botanik bilgiler**

Doğal yayılış alanı Amerika kıtası olan bu bitki şu anda ticari olarak dünyanın birçok yerinde yetiştirilmektedir. *N. tabacum* L., sıcaklığa, hava ve toprak nemine karşı hassas bir bitkidir. Tütün, sıcaklık isteği 20-30 °C, nem oranı % 80-85 aralığında ve azotca zengin topraklarda iyi yetişir. Bitkinin tüm yüzeyi yapışkan glandular tüylerle örtülüdür. Bu tüyler, içerisinde nikotininde bulunduğu sarı renkli bir salgı maddesi üretmektedir (Aarti ve Rakesh, 2013). Yaprığın kimyasal bileşenleri, yanma özelliği, su ve rutubet tutma yeteneği, koku, tat ve rengi tütün bitkisinin kalitesini belirler. Yaprığın su miktarı, tütünün yanmasını, kokusunu ve lezzetini etkiler. Kuru tütün yaprağındaki su miktarı bazik

tütünlerde %10 olup, asidik tütünlerde %10'un altındadır. Bu nedenle kuru sigara dumanı daha tahriş edici iken nemli sigara dumanı daha hafif hissedilir (Azkan, 2002).

Tütün bitkisinin çok fazla sayıda türü olduğu gibi, kültürü yapılan türünde fazla sayıda çeşit, form ve tipleri bulunmaktadır. Bunun doğal sonucuda çok farklı morfolojik yapıların ortaya çıkmasıdır. Tütün bitkisinin tek yıllık otsu yapıda formları olduğu gibi, çok yıllık ağaçsı formları da vardır. Tütün mevsimi olan yerlerde ilkbaharda, mevsimi olmayan yerlerde ise hemen her zaman dikilebilir.

Tütün 80-100 cm yüksekliğinde, yaprağı kurutulularak yararlanılan tek yıllık bir endüstri bitkisidir. Çiçek tipi, erselik, 5'li yaprak koltuğunda, tek veya salkım halindedir. Kaliks; dikenli, yeşil renkte ve birleşiktir. Stamen; sarı renkte, 5-8 adettir. Çiçekleri, dalın ucunda, salkım biçimindedir. Kırmızıdan beyaza kadar çeşitli renklerde olan bu çiçekler, bitkinin iyi beslenmesi için tomurcuklar açılmadan kesilir. Tütün, tohumdan yetiştirilir. Coğrafyasına göre Mart ve Nisan aylarında yetiştirilen fideler 3-3,5 ay içinde fidan haline gelir, yaprakları toplanır. Bu işe kırım, ya da devşirme denir. Tütün yaprağı toplanırken yeşildir. Sarı, ya da kızıla çalan tuğla rengini kuruyup, bayatladıktan sonra alır. Tütünün cinsi, değeri yaprakların yerine göre değişir. Tütün tohumları yağ bakımından zengindir. Yerli tütünlerimizdeki yağ oranı % 35-45 kadardır. Tütün yağlı boya ve sabun sanayiinde kullanılır, zehirli madde taşımaz. Tütün yapraklarında tanen, zambak, nişasta, reçine ve alkaloidler bulunur. Tütün üretimindeki amacı nikotin olmakla birlikte tohumlarından yağ, selüloz ve pektin, saplarından selüloz, çiçeklerinden esans ve kolonya, küllerinden potasyum karbonat elde edilmektedir. Kırık ve döküntü tütünden böcek ilacı olarak kullanılan nikotin sülfat üretilmektedir. Vitamin B kompleksi ve dehidrogenaz enzimi için önemli olan nikotin asidi bazı ilaçların yapımında kullanılmaktadır (Örsel, 2010; Odabaşoğlu, 1994; Taş, 2003).

Çalışmada Kullanılan Teknikler

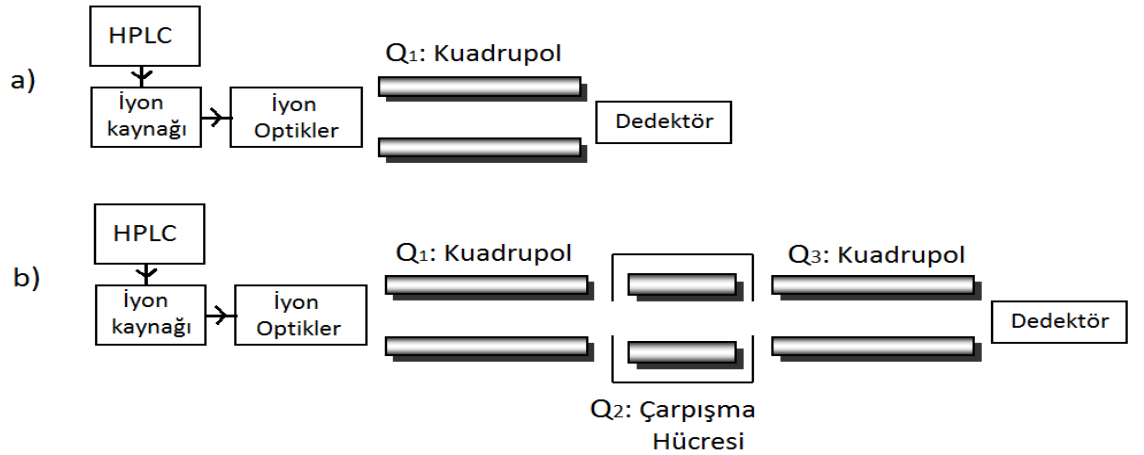
LC-MS/MS (Sıvı Kromatografisi Tandem Kütle Spektrometresi)

Kütle spektrometresi (MS) tekniği yüksek seçiciliğe sahip olmasına rağmen tek başına analizi yapılacak maddeyi aynı numune matrisi içindeki diğer maddelerden ayırmada yetersiz kalmaktadır. Bu noktada maddeleri m/z (kütle/yük) oranlarına göre ayırmak üzere MS sistemine ayırmaya yardımcı olan sıvı kromatografisi (LC) sistemi kombine edilip her iki sistemin ayırt edici özellikleri birleştirilerek Sıvı kromatografi/

Tandem Kütle Spektrometrisi (LC-MS/MS) sistemi tasarlanmış ve kullanılmaya başlanmıştır.

LC-MS (tekli kuadrupol) ve özellikle de LC-MS/MS (üçlü kuadrupol) cihazları bitkilerin sekonder metabolitlerinin nitel ve nicel analizlerinde çok sık tercih edilmektedir. LC-MS cihazı ile HPLC kolonunda belli bir ayırmadan geçen analitlerin ana iyon (parent ion) da denilen moleküler iyonlarını belirleyerek bileşenlerin nicel veya nitel analizleri yapılır. Aynı kütle/yük (m/z) oranına sahip çok sayıda molekül olmasına rağmen doğada aynı parçalanma iyonlarına sahip moleküllerin bulunma olasılığı ancak 1/10000 dir. Bundan dolayı LC/MS/MS tekniği babalık testi kadar spesifik bir testtir. Aynı zamanda bu teknik ile çok küçük derişimlerde nicel analiz hem yüksek duyarlılıkta hem de yüksek kesinlikte yapılabilir Elde edilen sonuçların doğrulanmasına da gerek yoktur. LC-MS/MS tekniği numunede bulunan bileşenlerin yapısını, miktarını ve molekül ağırlığını çok kısa bir sürede tayin edebilir. Küçük farmosötik bileşikler, proteinlerin tayini, polar iyonik, termal kararsız ve uçucu olmayan bileşiklerin analizleri gibi çok yaygın bir alanda kullanılabilir.

Analizi yapılacak maddenin özelliklerinin, maddelerin cihaz üzerinde optimizasyonunun, maddeye özgü fragmentlerin, maddenin yapısına uygun analitik kolonun ve kolon üzerindeki akış ve sıcaklık parametrelerin belirlenmesi LC-MS/MS sistemindeki metodun geliştirilmesindeki en temel basamaklardır (Şekil 2. 1.).



HPLC teknikleri

Yüksek performans, yüksek hız, yüksek ayırıcılık veya yüksek basınçlı sıvı kromatografisi gibi farklı isimlendirmeler yapılabilir. Sıvı kromatografisi, numune bileşenlerinin bir sıvı hareketli faz ve bir katı veya katı destek maddesi üzerine tutturulmuş sıvı durgun faz arasında dağıldığı bir ayırım tekniğidir. Başta yüksek duyarlılığı, kesinliği ve seçiciliğinden dolayı sonrasında ise nicel analizlerde kolaylıkla kullanılabilmesi, uçucu olmayan ya da sıcaklıkla kolaylıkla bozunabilen türlerin ayrılmasına uygun olması ve ilaç, gıda gibi sanayi dallarında uygulanabilirliğinden dolayı çok yaygın kullanılan bir tekniktir.

Sıvı kromatografisinde, hareketli (mobil) faz pompa yardımıyla enjeksiyon birimine oradan da kromatografik kolona gönderilir. Numunenin kolona girmesiyle, analitler durgun fazda farklı oranlarda zaman geçirir ve iki faz arasında farklı oranlarda dağılım gösterirler. Kolonun sonundan ayrılan her bir analit dedektöre ulaşır ve ölçülebilir bir sinyale dönüşür ve sinyaller kaydedici tarafından kaydedilir. Elde edilen sinyalin yoğunluk ve süresi analizi yapılan maddenin yapısı ve miktarı ile ilgilidir. Sinyaller yükseltip entegratör yardımıyla kaydedilir (Perrin ve Dempsey 1974; Snyder ve Kirkland 1997).

2 µm veya daha küçük partikül boyutu ve çok yüksek basınçlarda (1300 bara kadar) çalışan pompa sistemleri ile daha kısa analiz süresi, yüksek pik etkinliği ve yüksek ayırım gibi avantajları beraberinde getiren UHPLC (ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi) son zamanlarda sıklıkla başvurulan bir teknik olmuştur (Zotou, 2012).

HPLC sistemleri pompa, enjektör, kromatografik kolon, termostatlı kolon fırını, dedektör veri toplama sistemi ve atık deposu gibi marka ve modelden bağımsız önemli kısımları içerir.

Bazı önemli HPLC kısımları ve görevleri

Pompa: HPLC sisteminde mobil fazın enjektör, kolon ve detektörden sabit veya değişken bir hızda, belirli bir basınçta geçmesini sağlayan donanımdır.

Enjektör: Görevi analizi yapılacak örneği kolona göndermeden önce onu mobil faza enjekte etmektir.

Kolon: HPLC sisteminin en önemli parçasıdır. Analit bileşenlerinin iyi çözünürlükle birbirlerinden ayrılmasını sağlayan durgun fazdır (Bera ve ark., 2006).

HPLC ile beraber kullanılan dedektörler

Dedektör; kolonda ayrımı yapılan maddenin varlığının tespit edildiği ve ona ait bileşenlerin alıkonma zamanlarına (Rf değerlerine göre) göre sırayla içerisinde geçerken nicel analizinin yapıldığı ve bilgisayar ekranına elde edilen verilerle ilgili sinyal gönderen HPLC donanımdır. Literatür.

HPLC cihazına amaca uygun olarak buharlaştırılmalı ışık saçılımlı dedektör (ELSD), Diod-array dedektör (DAD), elektrik iletkenlik dedektörü, elektrokimyasal dedektör, floresan dedektör, kütle spektrometre (MS) dedektörü, refraktif indeks dedektörü (RID) ve UV dedektör gibi farklı tipte dedektörler kullanılabilir (Skoog ve ark. 1998). Literatür.

UV-visible temelli dedektörler (Ultraviolet/Visible dedector-UV/VIS)

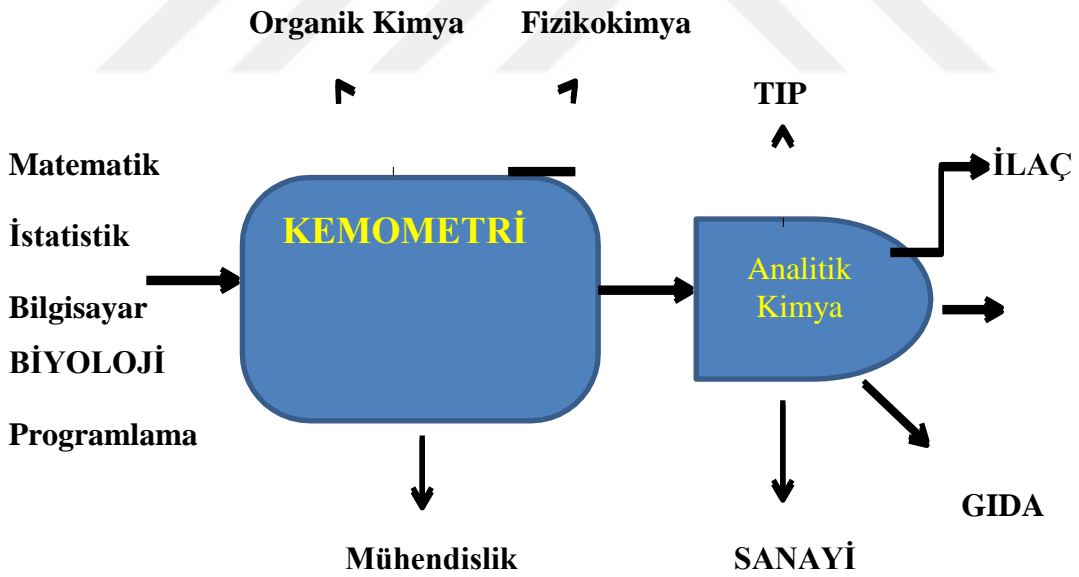
Çalışma prensipleri, ultraviyole veya görünür bölge ışığı absorblama esasına dayanır. Bu dedektörlerin sıklıkla tercih edilmesi sahip olduğu yüksek duyarlılık, geniş ve doğrusal bir aralıkta çalışabilme, küçük sıcaklık değişimlerinden kısmen etkilenmeme ve gradient elüsyon için uygun olma gibi özelliklerine bağlanabilir.

HPLC tekniğinin avantaj ve dezavantajları

Kolon, rejenerasyona ihtiyaç duyulmadan uzun süre kullanılabilir. Yüksek duyarlılığa sahip, nicel analizlere uygundur. Durgun faz değiştirilmeden farklı mobil faz sistemleriyle aynı anda çok fazla sayıda maddenin duyarlı olarak nicel analizi kısa sürede yapılabilir. Tekrarlanabilirliği yüksektir. Kişinin becerilerine daha az bağlıdır. Çok küçük miktarda bile maddelerin analizine olanak sağlar. Biyolojik sıvılardan gerek ilaç etken maddelerinin, gerekse metabolitlerinin analizi için geniş bir kullanım alanına sahiptir. Tüm bu avantajlarının yanında pahalı durgun ve mobil faza ihtiyaç duyulması, tüm cihazla çalışan sistemler gibi yüksek maliyete sahip olması, çözücü içinde bulunabilecek toz ve partiküllerin pompaya ve enjeksiyon sistemine zarar vermemesi yada kolonu tıkamaması için bunları süzecek pahalı membran sistemlerine ihtiyaç duyulması gibi dezavantajlara da sahiptir.

Kemometri

Kemometri, istatistik ve matematik ile birlikte bilgisayar kullanılarak kimyasal verilerin işlenmesi ve değerlendirilmesi bir başka deyişle yazılım, matematik ve istatistiğin kimyaya uygulanmasıdır. Analizlerde, kimyasal verilerden gerçek bilginin ekstraksiyonunu veya gizli bilgilerin elde edilmesini sağlayan güçlü bir araçtır (Dinç 2009). 1972 yılında İsveçli Svante Wold ve Amerikalı Bruce R. Kowalski' nin ortaya attığı kemometri daha sonraları ve özellikle günümüzde analitik, gıda ve çevre kimyası, adli tıp, biyoloji, arkeoloji, sinyal işleme ve çok değişkenli verilerin analizi için fizikokimyacılar ve madde bilimciler, yapı aktivite tayini için organik ve farmasötik kimyacılar tarafından sıkça kullanıldığı görülmektedir (Şekil 2.2). Kemometrik yöntemlerin bu kadar ilgi görmesinin nedeni kimyada özellikle analitik kimyada karmaşık örneklerin analizini hızlı, doğru, kesin ve güvenilir sonuçlarla vermesine, esnek ve çok yönlü çözümler sunmasına, farklı analitik sonuçları tek bir veri seti üzerinde hesaplayarak birden çok analitin aynı anda ölçümüne olanak sağlamasıdır. Aynı zamanda karmaşık veri setlerini yorumlayabilme kapasitesiyle çoğu disiplinde uygulama alanı bulmuştur (Wold ve ark., 1998a,b).



Şekil 2.2. Kemometrinin İlişkili Olduğu Disiplinler ve İlgili Alanları

Kemometri; tanımlayıcı ve açıklayıcı istatistik, sinyal üretme, deneysel tasarım, modelleme, kalibrasyon, optimizasyon, yapı teşhisi, sınıflandırma, yapay akıl metodları, resim üretme, bilgi ve sistem teorisi gibi kavram ve uygulamaları içeriğinde barındırmaktadır.

Kemometrik yöntemlerin gelişmesiyle birlikte çok sayıda etken madde içeren ürünlerin miktarsal tayini hiçbir kimyasal ön ayırma işlemine ve grafik işlemine ihtiyaç duyulmadan hızlı, doğru ve hassas olarak yapılabilmektedir. Bu kemometrinin diğer yöntemlerden daha avantajlı olmasını ve kullanım alanının genişlemesini sağlamıştır (Dinç 2009).

Kemometrik uygulamalar elle veya basit hesap makineleriyle yapılamayacak kadar karmaşık hesaplamalar içerdiğinden genellikle EXCEL, MATLAB, PANORAMA, MİNİTAB, XLSTAT, SOLO ve diğer paket programlar gibi bilgisayar programlarına ihtiyaç duyulmaktadır (Dinç 2009).

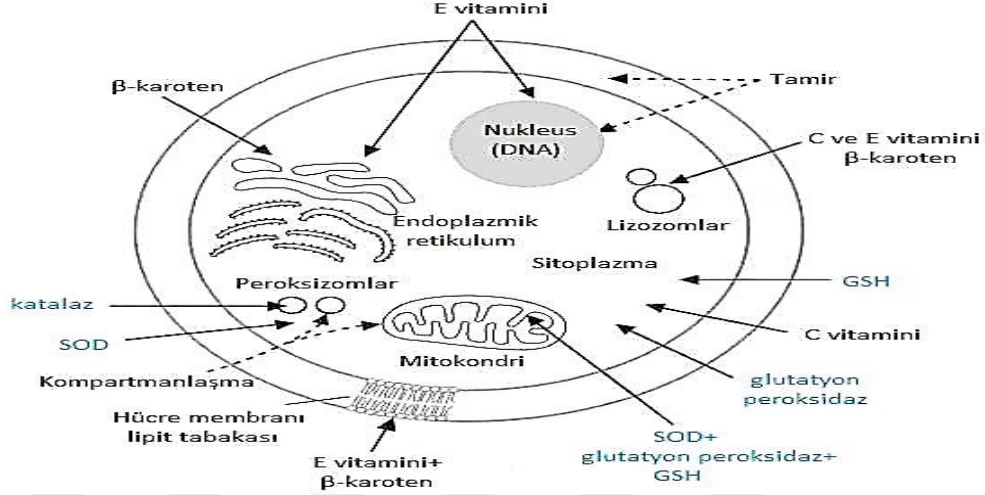
Kemometrik teknikler sınıflama ve kümeleme teknikleri; Temel Bileşenler Analizi (PCA) ve Hiyerarşik Kümeleme Analizi (HCA) ile çok değişkenli kalibrasyon metodları (Klasik En Küçük Kareler Metodu (CLS) ve Kısmi En Küçük Kareler Yöntemi (PLS)) olarak belirtilebilir. En yaygın kemometrik teknikler Temel Bileşenler Analizi (PCA) ve Aşamalı Kümeleme (HCA) analizleridir. PCA bileşenler arasındaki korelasyon şeklini ve değişkenler arasındaki etkileşim konularına cevap ararken aralarında ilişkinin bulunmadığı hallerde verilerin miktarını azaltmak amacıyla kullanılır. Temeli örnekleri tanımlayan esas değişkenlerin ($X_1, X_2 \dots X_n$) liner kombinasyonları ($PC_1, PC_2 \dots PC_n$) şeklindeki temel bileşenleri, T ile gösterilen bir score matrixi ve E ile gösterilen bir hata matrixi bulmaya dayanır (Uyanık 2008). Kümeleme (CA) yönteminde bileşenler arasındaki sınıflandırma konusunda bilgi elde edilebilmektedir. Bu teknikler, daha önceden belirlenmemiş korelasyonları belirleme ve basit sonuçlar olarak tanımlanamayacak tahminler yapmaya izin veren tekniklerdir. Kümeleme ve sınıflandırma amaçlı tekniklerin tümü, çok değişkenli veri analiz tekniği olan temel bileşenler analizine dayalıdır. PCA, incelenen çok sayıdaki değişkeni değişkenler arası korelasyonu engelleyerek; onların doğrusal kombinasyonlarından oluşan daha az sayıda bileşenlere indirgeyen bir methoddur. PCA temelli metodlar, verilen bir örnek sistemi üzerinde çok sayıda değişken değerinden yola çıkarak söz konusu örnekleri çeşitli gruplara kümeleyerek sınıflandırabilir.

Hiyerarşik kümeleme analizi (HCA), verilen bir örnek setindeki örnekleri ve o örnekleri tanımlayan değişkenleri benzerliklere göre sınıflandıran bir tekniktir. HCA doğrudan orijinal değişkenlere uygulanabildiği gibi, değişken sayısının çok fazla olması durumunda PCA analizinden gelen temel bileşenlere de uygulanabilmektedir. HCA analizinde ölçümler Öklit uzaklığına dayanmaktadır.

Antioksidanlar

Canlılığın temeli oksijen bir yandan enerji metabolizması yani solunum için olmazsa olmaz bir elementken diğer taraftan birçok hastalık ve dejeneratif koşulun sebebi olarak görülmektedir. Vücutta protein, yağ ve karbonhidratların oksijen ile tepkimeye girerek parçalanması ve ATP'nin üretilme işlemi sırasında; süperoksit ($O^{\cdot-}$), hidroksil (HO^{\cdot}), peroksil (ROO^{\cdot}), alkoksil (RO^{\cdot}), semiquinon (Q^{\cdot}), nitrik oksit (NO^{\cdot}) kökleri ile hidrojen peroksit (H_2O_2), peroksinitrit ($ONOO^{\cdot}$) ve singlet oksijen (1O_2) gibi genellikle üzerlerinde eşleşmemiş elektron taşıyan serbest radikaller oluşmaktadır. Oksijen temelli moleküller olan serbest radikallerin tek kaynağı oksijen kullanılarak gerçekleşen metabolik tepkimeler değil. Sigara, radyasyon, alkol, ağır metaller, çok yağlı besin tüketimi, herbisitler, pestisitler, çok fazla güneş ışığına maruz kalma, hava kirliliği, endüstriyel kimyasallar, tedavi amacıyla kullanılan birçok ilaç vücutla etkileşerek serbest radikal oluşumuna neden olabilmektedir. Radikaller taşıdıkları eşleşmemiş elektronlarını eşleştirme yönünde istekli olduğundan özellikle zayıf bağlı elektronları koparırlar. Tepkimeye girme istekleri yüksek olan serbest radikaller vücudumuzda zincir reaksiyonlar başlatırlar ve başlattıkları zincir tepkimelerle de hücrelerin zarar görmesine neden olurlar. Bu sistem sayesinde yapılarında eşleşmemiş bir elektron içeren serbest radikallerin oluşumunu kontrol altında tutarak, bu moleküllerin zararlı etkilerine engel olup hücreyi hasarlardan ve hastalıklardan korumuş olurlar. Ancak bazen mevcut antioksidan savunma sisteminin serbest radikallerin etkisini tamamen önleyemediği durumlar da olabilmektedir ve serbest radikallerin artışı nedeniyle oksidatif stres ortaya çıkmaktadır. Oksidatif stres, normal metabolik faaliyetlerin devam ettirilmesi için gerekli olan aktif oksijen -antioksidan dengesini aktif oksijen lehine bozarak; DNA, protein, karbonhidrat ve lipidlerde hasara yol açmakta ve ardından erken yaşlanma, kanser, kalp ve damar hastalıkları gibi sorunlarla tanışıyoruz. (Young ve Woodside 2001) Oksidatif strese sadece oksijenin değil aynı zamanda Azot Oksit (NO^{\cdot}), Azot dioksit (NO_2^{\cdot}), Nitroksi Anyonu (NO^{\cdot}), Diazot tetraoksit (N_2O_4), Peroksinitrit anyonu ($ONOO^{\cdot}$), Nitronyum Katyonu (NO_2^+) gibi azot elementinin reaktif türevleri de neden olabilmektedir. Antioksidanlar, otookside olabilir materyallerin oksidasyon başlangıcını önleyen veya geciktiren ya da oksidasyon hızını azaltan maddelerdir (Nawar 1985). Vücudumuzda hücre tarafından üretilen Glutasyon, nikotinamid, karnozin, metabolik faaliyetler sonucu yan ürün olarak ortaya çıkan ürik asit ve bilirubin gibi antioksidant aktiviteye sahip maddeler mevcuttur. İnsanlarda veya

diğer canlılarda antioksidan bileşiklerin ve antioksidan savunma sisteminin var olmuş olması yaşam için çok önemlidir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Hücredeki antioksidan savunma sistemleri- (Altınışık 2001)'den

Antioksidanların kullanım alanları

Antioksidanlar sağlık alanında, birçok endüstriyel alanda, kozmetik ürünlerinde koruyucu katkı maddesi olarak, yakıtlarda, kauçukta ve petrole bozunumlarını ve polimerizasyonlarını önlemek için dengeleyici olarak kullanılmaktadır. Yağların oksidatif bozulmalarını diğer bir deyişle renk, koku, tat, görünüş ve besin değeri gibi önemli özelliklerinin kaybolmasını önleyerek besinlerin kalitesini korur. Aynı zamanda bakteri ve küflerin neden olduğu gıda bozulmalarına karşı da iyi bir koruyucudurlar. Askorbik asit (AA, E300) ve E vitamini (E306) doğal antioksidanlar arasında sayılabilirken tersiyer butilhidrokinon (TBHQ, E319), bütillenmiş hidroksi anizol (BHA, E320) ve bütillenmiş hidroksi tolien (BHT, E321) petrol kökenli yapay antioksidanlar arasındadır.

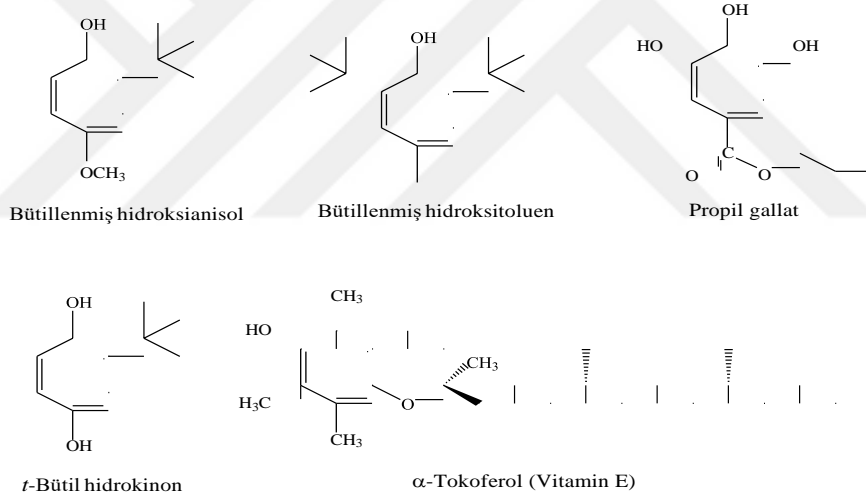
Antioksidanların sınıflandırılması

Temelde gerçekleştirdikleri reaksiyon mekanizmaları baz alınarak birincil ve ikincil antioksidanlar olmak üzere iki genel sınıfa ayrılrsa da bunların yanı sıra çok fonksiyonlu antioksidanlar olarak adlandırılan ve birden çok mekanizma gösterebilen antioksidanlar da vardır (Reische ve ark. 2002).

Birincil antioksidanlar

Birincil antioksidanlar (tip-1 veya zincir kırıcı antioksidanlar) otooksidasyonun başlamasını geciktiren veya önleyen ya da otooksidasyonun ileri aşamasını yarıda kesen serbest radikal alıcılarıdır. Bunlara örnek olarak BHT ve BHA birincil sentetik antioksidanları gösterilebilir (Antolovich ve ark. 2002). Bir lipit (alkil) radikali (R^{\bullet}) oluşturmak için, doymamış yağdan α -metilenik hidrojen ayrıldığında otooksidasyon başlar (Reische ve ark. 2002). Reaksiyon başlangıç (initiation), çoğalma (propagation), ilerleme (branching) ve sonuç (termination) aşamalarından meydana gelir (Antolovich ve ark. 2002).

Aşağıda birincil antioksidanlara örnek olarak bütillenmiş hidroksianisol, bütillenmiş hidroksitoluen, propil gallat, *t*-bütül hidrokinon gibi sentetik antioksidanlar ile α -tokoferol doğal birincil antioksidanları gösterilmiştir (Tokoferoller ve karotenoidler doğal kaynaklı birincil antioksidanlardır) (Şekil 2.4.) (Reische ve ark. 2002).

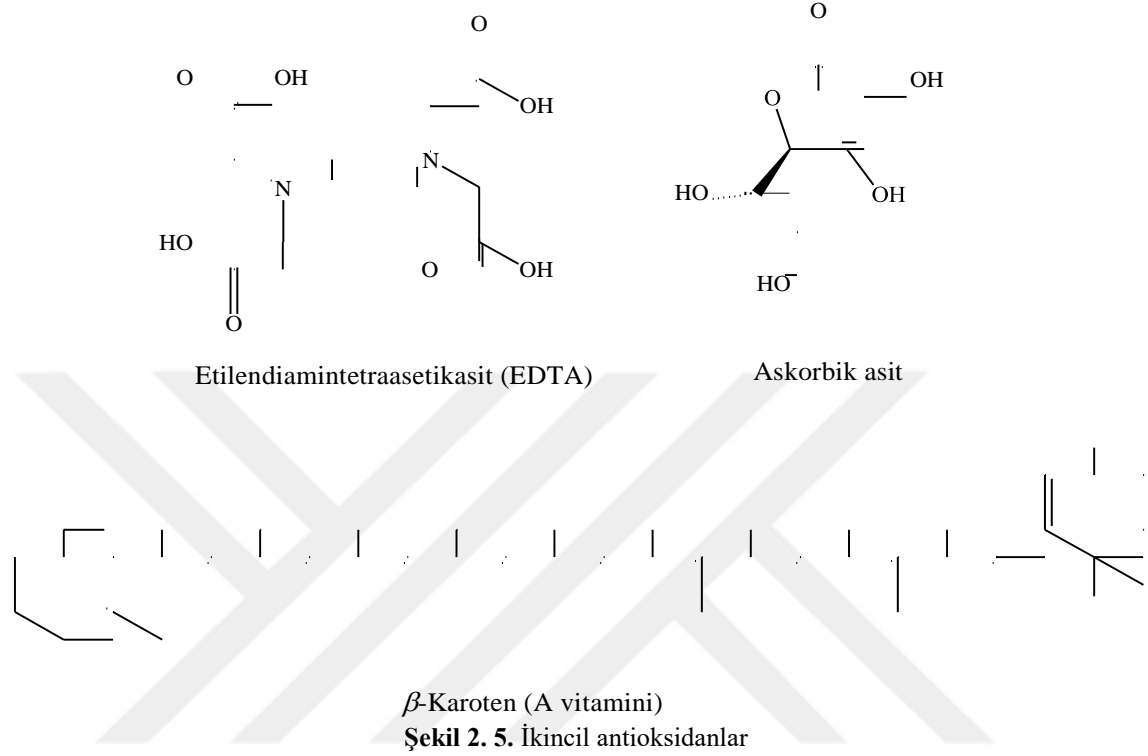


Şekil 2. 4. Yaygın birincil antioksidanlar

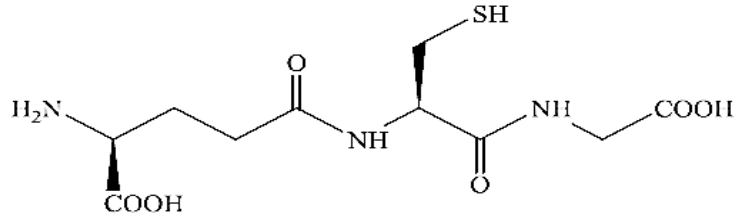
İkincil antioksidanlar

Tip-2 veya koruyucu antioksidanlar olarak adlandırılabilen ikincil antioksidanlar çeşitli mekanizmalarla aktivite gösterebilirler. Singlet oksijeni deaktive edebilir, prooksidan metallere şelat yapabilir, oksidasyonun hızını azaltıp onları deaktive edebilir, hidroksiperoksitlerin radikal olmayan maddelere parçalanmasını sağlayabilir ve ultraviyole radyasyonu absorbe edebilirlerken serbest radikalleri daha kararlı ürünlere dönüştüremezler. Genellikle birincil antioksidanların aktivitesini artırır yeniden üretimini sağlarlar. Askorbik asit, EDTA ve β -karoten ikincil antioksidan

örnekleri olarak gösterilebilirler. Bu tür antioksidanlar etki mekanizmalarının önemi baz alınarak şelat yapıcılar (EDTA gibi), oksijen gidericiler (askorbik asit gibi) ve singlet oksijen gidericiler (β -Karoten, gibi) olarak üç gruba ayrılabilirler (Şekil 2.5) (Reische ve ark. 2002)



Başka bir sınıflandırmaya göre antioksidanlar; enzimler (Katalaz, Glutasyon peroksidaz, Süperoksit Dismutaz (SOD)), doğal kaynaklı ve sentetik antioksidanlar şeklinde sınıflandırılabilirler (Halliwell ve Gutteridge 1989). Katalaz ve glutasyon peroksidaz enzimleri hidrojen peroksidin uzaklaştırılmasında görev alır (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Glutasyon

Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

Antioksidan aktivite tayini için çok sayıda yöntem vardır. Bu yöntemler birbirlerine göre bazen avantajlı bazen dezavantajlı olabilirler. Başvurulan tekniğin kimyasal ve kinetik özelliklerine bağlı olarak, ekstrelerin kimyasal yapısına, bileşenlerin polaritesine, sahip olduğu fonksiyonel gruplara ve kimyasal davranışlarına göre sonuçlar değişebileceğinden antioksidan aktiviteler belirlenirken en uygun yöntem seçilmeli ve daha güvenilir olması açısından birden fazla yöntemle değerlendirilmesi uygun olmaktadır (Öztürk ve ark., 2007). Bunlardan yaygın olarak başvurulanların bazıları şunlardır:

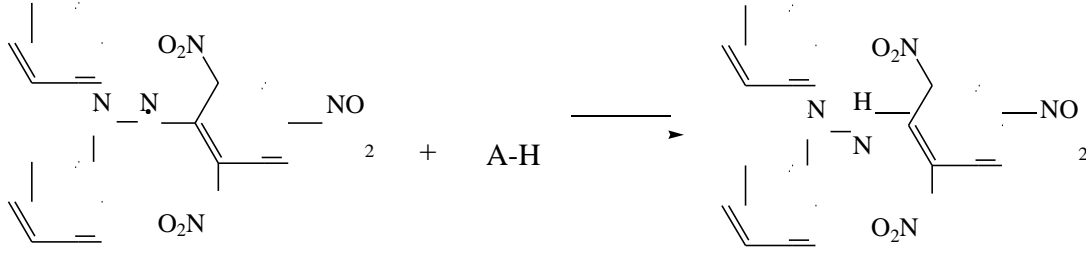
- DPPH serbest radikali giderim aktivitesi yöntemi (Blois, 1958).
- CUPRAC (Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi) yöntemi (Apak ve ark., 2004).
- ABTS katyon radikali giderim aktivitesi yöntemi (Re ve ark., 1999).
- β -Karoten renk açılım yöntemi (Miller, 1971).
- Folin Ciocalteu yöntemi (Singleton ve ark., 1999).
- Süperoksit anyon radikali giderim aktivitesi yöntemi (Liu ve ark., 1997).
- FRAP (Demir (III) iyonu indirgeme antioksidan gücü) yöntemi (Benzie ve Strain, 1996).
- TRAP (Toplam radikal tutma parametresi) yöntemi (Wayner ve ark. 1985).
- DCFH-DA (Diklorofloresin-diasetat) yöntemi (Valkonen ve Kuusi, 1997).
- Fikoeritrin (PE) esaslı yöntemler (Ghiselli ve ark., 1995).
- Krosin yöntemi (Tubaro ve ark., 1998).
- ORAC (Oksijen radikal absorban kapasitesi) yöntemi (Prior ve Cao, 1999).
- TOSC (Toplam oksiradikal süpürme kapasitesi) yöntemi (Winston ve ark., 1998).
- Metal bağlama yöntemi (Dinis ve ark., 1994).

DPPH (Serbest radikal giderim yöntemi)

DPPH (1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil)yöntemi bazı dezavantajlara sahip olmasına rağmen antioksidan kapasite tayini için yaygın olarak başvurulan yöntemler arasındadır. Yöntemde antioksidan aktivite ölçümü için kullanılan DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) kararlı yapıda ve etanol çözeltisi mor renkli olan bir serbest azot radikalidir. Absorbansı 517 nm dalgaboyunda ölçülür. DPPH çözeltisine antioksidanların ilave edilmesiyle antioksidanlar radikallere proton vererek onları indirger. İndirgenme sonucunda çözeltinin karakteristik mor rengi sarıya doğru kayar ve söz konusu dalga boyundaki absorbansta düşüş meydana gelir. Absorbanstaki bu düşüş antioksidanların serbest radikal giderim potansiyellerinin yüksek olduğunu gösterir (Şekil 2.7. ve Şekil 2.8.). Antioksidan aktivite DPPH radikalinin başlangıç konsantrasyonunun % 50'sinin inhibe edilmesi için harcanan antioksidan miktarını ifade eden IC₅₀ (etkin konsantrasyon) değeri ile elde edilir (Brand-Williams ve ark. 1995, Benabadji ve ark. 2004, Gülçin ve ark. 2004).



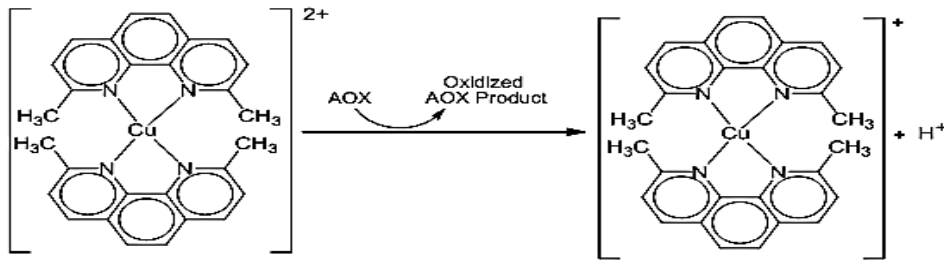
Şekil 2.7. DPPH[•] radikali ve antioksidan (AO-H) tarafından indirgenmesi (Boligon ve ark. 2014)



Şekil 2.8.DPPH molekülünün antioksidan madde ile reaksiyonu

Bakır iyonu indirgeyici antioksidan kapasite tayini (CUPRAC)yöntemi

Apak ve çalışma arkadaşlarının keşfedip 2004 yılında literatüre kazandırdığı CUPRAC tam açılımıyla “Cupric Reducing Antioxidant Capacity” yani “bakır(II) indirgeyici antioksidan kapasite” yöntemiyle meyve ve sebeler, meyve suları, bitkisel çaylar, insan serumu ve bitki ekstraktlarındaki toplam antioksidan seviyesi belirlenebilir. Yöntem temelde indirgen özelliği yüksek olan polifenollerin bakır iyonunu indirgemesi olayını ölçmeye dayanır. Bakır(II) ve neokuprin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) reaktifleri kullanılarak polifenolik bileşiklerin antioksidan kapasitelerinin spektrofotometrik olarak tayin edilmesi esasına dayanır. Antioksidan özelliğe sahip polifenoller, pH=7 (amonyum asetat ile sağlanır) olan ortamda Cu(II)-Nc kompleksini, Cu(I)-Nc kompleksine dönüştürür. Oluşan Cu(I)-Nc kompleksinin maksimum absorpsiyon verdiği 450 nm’de absorpsiyon ölçülmesi ile antioksidan kapasite tayin edilir. (Şekil 2.9).

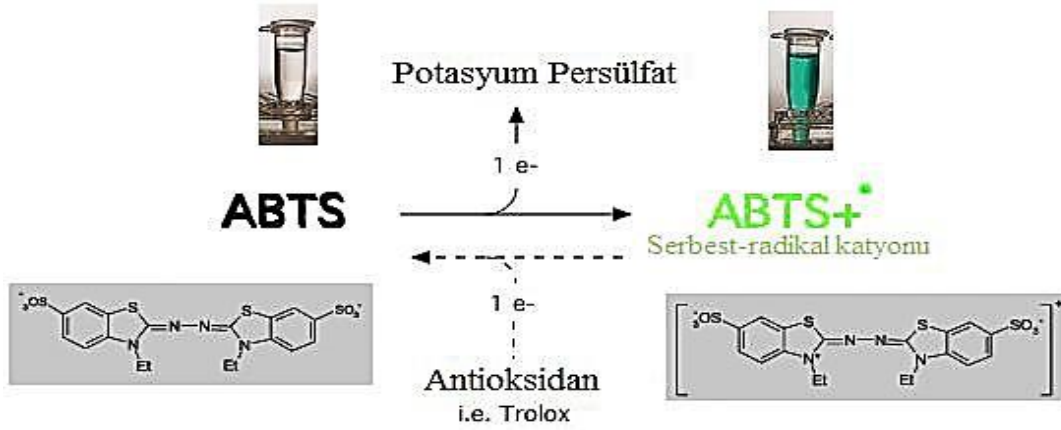


Şekil 2.9. CUPRAC reaksiyonu ve kromoforu: Bis (neokuproin) bakır (I) kelat katyonu (Reaksiyon sırasında açığa çıkan protonlar NH₄Ac tamponu tarafından nötralleştirilir) (Apak ve ark. 2004)

ABTS (Katyon radikali giderim aktivitesi yöntemi)

İlk olarak Miller ve ark.’nın 1993’te kullandıkları yöntem, ABTS (2,2’-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat) radikalinin ABTS⁺ radikal katyonuna K₂S₂O₈ gibi güçlü yükseltgenler yardımıyla yükseltgenmesine dayanan antioksidan kapasite ölçüm yöntemidir (Şekil 2.10.). Oluşan ABTS⁺ radikal katyonu antioksidanlarla reaksiyona

birakıldığında radikalın absorbansında bir düşüş görülmesi antioksidanın aktif olduğunu gösterir. 2 gün oda sıcaklığında ve karanlıkta kararlı olan radikal 660, 734 ve 820 nm dalga boylarında maksimum absorbans verir. Ancak bitki pigmentlerinden gelebilecek olan girişimin en az olduğu 734 nm dalgaboyu sıklıkla tercih edilmektedir. Ayrıca bu yöntemle konjuge çifte bağlı antioksidanların aktivitesi de ölçülebilir (Miller ve ark. 1993, Re ve ark. 1999).



Şekil 2.10. ABTS yöntemi (Boligon ve ark. 2014)

β -Karoten-Lineolik Asit renk açılım yöntemi

Linoleik asit serbest bir radikal olup yükseltgenmesiyle alkil peroksitler oluşur. Oluşan bu radikaller β -karoteni parçalayarak renginin açılmasına neden olurlar. Eğer ortamda antioksidanlar varsa radikalleri söndürerek β -karotenin renginin açılmasını önlerler. 490 nm'de absorbans veren β -karotenin absorbansındaki değişim spektrofotometre yardımıyla ölçülüp antioksidan aktivite tayini yapılabilir. Solvent ve pH etkisinden bağımsız ve çok kısa zamanda gerçekleşir. Yöntem hidrofilik, hidrofobik ve emülsiyonların oksidasyonunu ölçmek için kullanılır (Miller 1971, Benabadji ve ark. 2004, Huang ve ark. 2005).

Folin-Ciocalteu yöntemi ile toplam fenolik bileşik tayini

Singleton ve Rossi'nin 1965 yılında önerdiği yöntemde fosfomolibdat ve fosfotungstat karışımından oluşan Folin-Ciocalteu reaktifi (Folin Fenol Reaktifi veya Folin-Denis reaktifi) kullanılarak antioksidan tayini yapılır. Yöntem sahip olduğu bazı olumsuzluklara rağmen neredeyse tüm antioksidan çalışmalarında toplam fenolik miktar tayini için kullanılan standart bir yöntemdir. Fenolik maddeler bu reaktifle bazik ortamda tepkime verdiklerinden dolayı sodyum karbonatla (Na_2CO_3) pH=10' a ayarlanır. $\text{Mo(VI)} + e^- \longrightarrow \text{Mo(V)}$ indirgenme tepkimesi ortamda fenolik

antioksidanlar varsa gerçekleşir renk sarıdan maviye döner.760 nm dalga boyunda absorbans ölçülür (Slinkard ve Singleton 1977, Singleton ve ark. 1999).

Alzheimer hastalığı ve kolinesterazlar

Alzheimer hastalığı ilk olarak 1907 yılında Alman hekim Alois Alzheimer tarafından klinik ve nöropatolojik özellikleri ile tanımlanmıştır (Alzheimer, 1907;1911). İleri evre Alzheimer hastalığı için kötü bir ifade olan bunama kelimesi kullanılmaktadır. Alzheimer merkezi sinir sisteminin bazı kısımlarında nöron ve sinaps kaybıyla ortaya çıkan; bilişsel işlevlerde azalma, öz bakım yetersizlikleri, nöropsikiyatrik ve davranışsal bozukluklar gibi belirtiler gösteren progresif nörodejeneratif bir hastalıktır (Gilman 1997a,b, Lleó ve ark., 2006).

Alzheimer hastalığında **kolinesteraz inhibitörleri**, nöroprotektif yöntemler, farmakolojik olmayan tedaviler, psikofarmakolojik ajanlar, genel sağlığı korumaya yönelik aktiviteler gibi tedavi yöntemleri var olmasına rağmen alzheimer hastalığının nedeni ve oluşumu net olarak açıklanamadığından kesin tedavisi de yoktur (Cankurtaran ve ark., 2006; Ulger ve Arıoğul, 2005; Yavuz, 2005). Asetilkolin (ACh) beyinin bellek ile ilgili bölgelerinde önemli bir nörotransmitterdir. Alzheimer hastalığında ACh azalması bellek bozukluğu ile ilişkilidir. Alzheimer hastalığında temel sorun kolinerjik sistemdeki azalma ve glutamat toksisite artışı sonucunda nöron kaybı oluşmasıdır. Alzheimer hastalığında meydana gelen kolinerjik kaybın, depresyon, ajitasyon, anksiyete, psikoz gibi çeşitli davranışsal ve psikiyatrik belirtilerin hastalarda gözlenmesine neden olduğu belirtilmiştir (Grossberg, 2002).

Fenolik ve Flavonoid bileşikler

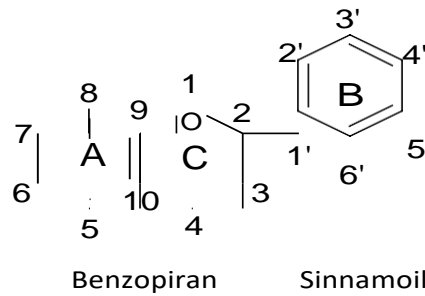
Bitkininin UV radyasyon ve patojenler gibi çevresel koşullara karşı savunma mekanizmasının sonucu oluşan sekonder metabolitlerden olan fenolik bileşikler, bir aromatik halka ve ona bağlı hidroksil gruplarından oluşur. Tek ya da daha fazla sayıda benzen halkasına iki veya daha fazla sayıda fenolik hidroksil (HO⁻) grubunun bağlanmasıyla polifenolik bileşikler meydana gelir. Fenolik bileşiklerin en geniş sınıfını flavonoidler oluştururken onları fenilpropanoidler ve fenolik kinonlar takip eder (Harborne, 1998). Fenolik maddeler serbest radikale kenetlenme, şelat oluşturma ve lipoksijenaz enzimini inhibe etme yoluyla antioksidan aktivite gösteren en aktif doğal antioksidanlar arasındadır. Ana iskeletlerinde bulunan C (karbon) sayısı göz önüne alınarak gruplandırılırlar (**Çizelge 2.1.**)

Çizelge 2.1. Bitkisel fenolik bileşiklerin sınıflandırılması

C atomu	İskelet	Sınıf	Örnek
6	C ₆	Basit fenoller Benzokinonlar	Hidrokinon 2,6- Dimetoksibenzokinon
7	C ₆ -C ₁	Fenolik asitler	Salisilik asit
8	C ₆ -C ₂	Asetofenonlar Fenilasetik asitler	3-Asetil-6-OMe- benzaldehit <i>p</i> -Hidroksifenilasetik asit
9	C ₆ -C ₃	Hidrosisinamik asitler Fenilpropenler Kumarinler İzokumarinler Kromonlar	Kafeik Asit Eugenol Umbelliferon Bergenin Eugenin
12	C ₆ -C ₄	Naftakinonlar	Juglon
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Ksantonlar	Mangiferin
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbenler Antrokinonlar	Lunularik asit Emodin
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoitler	Kersetin
		İzoflavonoitler	Genistein
18	(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanlar	Pinoresinol
30	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonoitler	Amentoflavon
N	(C ₆ -C ₃) _n	Ligninler	
	(C ₆) _n	Kateşol melaninleri	
	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Tanenlerle kondense flavonlar	

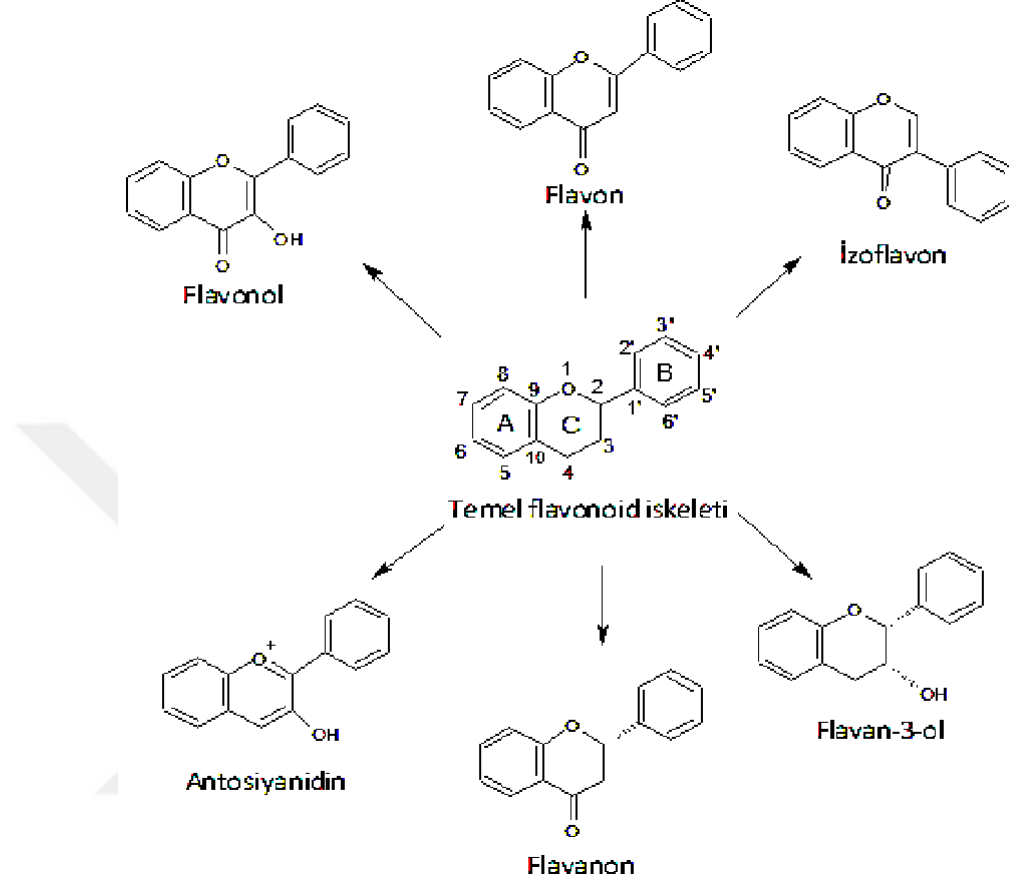
Flavonoidler

Fenolik bileşiklerin en önemli ve sahip olduğu 10' dan fazla alt grupta en kalabalık sınıfı (Acar 1998; Çam ve Hısıl 2003) olup ana iskeleti 2-fenil benzopiran yapısındadır. Bu yapı C₆-C₃-C₆ şeklinde toplamda 15 karbona sahip 2 aromatik ve bir hetero halkadan oluşur (Şekil 2.11.).



Şekil 2.11. Flavonoidlerin Benzopiran (A-C) ve Sınamoil halkası

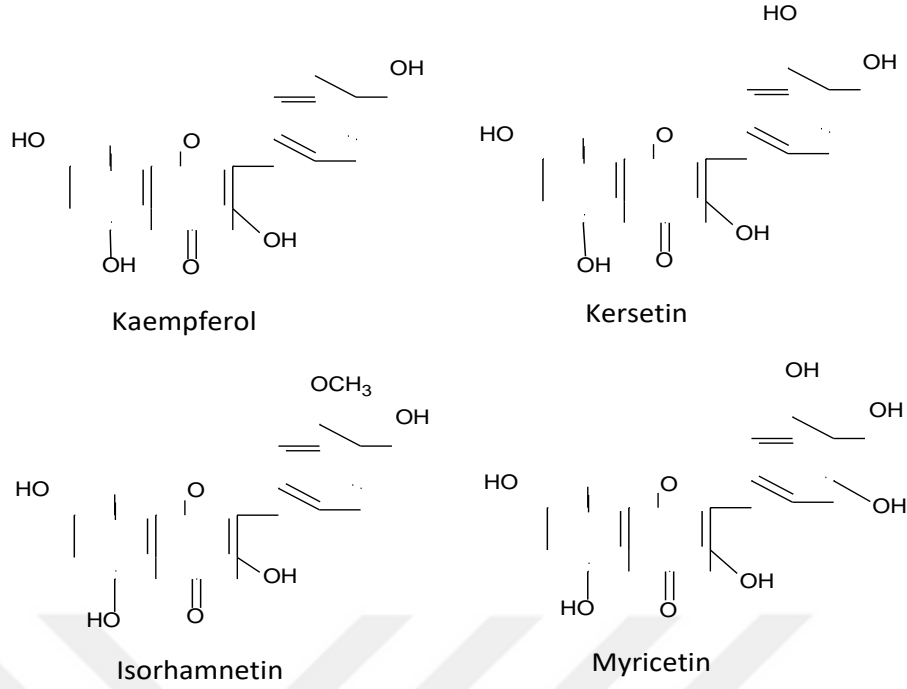
Flavon, flavonol, flavon-3-ol, izoflavon, flavanon ve antosiyanidin majör flavonoid türleri; dihidroflavonol, flavan-3,4-diol, kumarin, kalkon, dihidrokalkon ve auron ise minör flavonoid türleridir (Şekil 2.12).



Şekil 2.12.Majör flavonoid iskeletleri

Flavonoller

Flavonoidlerin en yaygın alt grubudurlar. Bitkilerde özellikle yaprak ve taç yapraklarda yardımcı renk pigmentleri olarak bulunurlar. 200-300 çeşit flavonol aglignundan en yaygın görülenler myricetin, kersetin, isorhamnetin ve kaempferoldür (Şekil 2.13). Çoğunlukla O-glikozitleri halindedirler. Bunların yanında fisetin ve rhamnetin gibi daha az rastlanan flavonol aglikonları da vardır. Glikozidik konjugasyonlar sonucu meydana gelirler. Genelde ana iskeletin C halkasının 3 pozisyonunda konjugasyon olur (Strack ve Wray, 1992; Harborne, 1988). Yapılan çalışmalar flavonollerin polimerizasyon derecelerinin artmasıyla süperoksit giderim aktivitelerinin de arttığı bildirilmektedir (Yamaguchi ve ark., 1999).



Şekil 2.13. Flavonol aglikonları: Kaempferol, Kersetin, İsorhamnetin, Myricetin

Flavonlar

Yapıları flavonollere çok benzeyen flavonlar, bitkilerde serbest ya da glikozitleri şeklinde bulunurlar. Bir karbon karbon bağıyla şekerlere bağlıdır (Harborne, 1988). Hidroksilasyonda görevli olduğu bilinen flavon türleri sadece Luteolin ve apigenindir. Flavonlar A ve C halka sübstitüsyonlarına sahip olduğu halde C3 pozisyonunda hidroksil eksikliği olduğu görülmektedir. Bunun yanı sıra hidroksilasyon, metilasyon, O- ve C- alkilasyonu, glikozilasyon ve bazı türlerinde polimetoksillenme gibi çeşitli sübstitüsyon yapabilirler (Gaitan ve ark., 1989).

Flavan-3-oller

Flavonoidlerin en karmaşık alt sınıfıdır. Flavan-3-ollerin başta antioksidan olmak üzere antikarsinojen, kalp ve sinir koruyucu, antimikrobiyal ve antiviral gibi birçok etkiye sahip oldukları belirlenmiştir. En sık görülen türleri; (-)-Epikateşin, (+)-kateşin, (+)-gallokateşin, (-)-epigallokateşin, (-)-epigallokateşin gallat ve (-)-epikateşin gallattır. Flavan-3-oller, heterosiklik C- halkasında doygun C3 elementini içerdiğinden düzlemsel değildir (Clifford, 1986).

2.3. *Nicotiana tabacum* İle İlgili Yapılan Önceki Çalışmalar

Koiwai ve ark. (1982), 56 *Nicotiana* tohumu ve 62 *Nicotiana* yaprağında yağ asidi analizleri incelemişler ve kuru ağırlık bazında toplam yağ asidi içeriğinin, tohumların% 25 ila 40'ı ve yeşil yaprakların% 2.1 ila% 4'ü arasında değiştiğini. Linolenat'ın, incelenen tüm türlerin yapraklarında baskın yağ asidi olduğu ve toplam yağ asidi içeriğinin % 50-63'ünü oluşturduğunu, tohumlarda ise linoleatın toplam yağ asidi içeriğinin% 69-79'unu oluşturarak baskın yağ asidi olduğunu bildirmişlerdi., *Suaeolentes* seksiyonuna ait 21 türün 14'ü ve *Noctiflora* seksiyonundaki 1 türün nispeten yüksek oranlarda (% 10-38) linolenat içerdiğini tespit etmişlerdir.

Manceau ve ark. (1992), *Nicotiana plumbaginifolia* hücre süspansiyonlarında nikotinin nornikotine biyo-dönüşümünü araştırdıkları çalışmalarında, GC analizi ile %53.2 olarak tahmin edilen biyotransformasyon veriminin, HPLC analizi ile neredeyse % 100'e yakın sonuç verdiğini gözlemlemişlerdir. Ayrıca, HPLC analizinin, bitki organları veya doku kültürleri tarafından üretilen yüksek veya düşük miktarlarda endojen alkaloidlerin değerlendirilmesi için güvenilir olduğunu da bildirmişlerdir.

Vereecke ve ark., (1997), *Nicotiana tabacum* L. 'un *Rhodococcus fascians* ile enfekte edilmesinden sonra yapraklı gallerden elde edilen etanol ve sulu ekstralarını incelediklerinde, enfekte olanların kimyasal bileşiminin kontrol grubuna kıyasla büyük ölçüde değiştiğini gözlemlemişlerdir. Klorojenik asit hem kontrol hem de enfekte olmuş bitkilerde bol miktarda bulunurken, gal ekstralarında kafeik asit ve diğer sinamoil analoglarının yeni oluştuğunu tespit etmişlerdir. Gallerde indüklenen en belirgin metabolitin 7-O-metil-6-O-beta-D-glukopiranosil kumarin (7-metil eskülin) olduğunu ki kumarinin tütünden elde edildiğine dair bu raporun bir ilk olduğunu, ilginç olarak, avirulent *R. fascians* suşlarının mevcudiyetinde 7-metil eskülinin, ne gal ne de diğer bitki kısımlarında birikmediğini bununla birlikte, tütün bitkilerinde *Agrobacterium tumefaciens* tarafından indüklenen gallerde de ortaya çıkmadığını bildirmişlerdir. 7-Metil eskülinin, *R. fascians*'in gelişimini katabolize olmadan etkilediğini, mikroskopik analizlerin, otofloresan bileşiklerin çoğunlukla yapraklı gallerin meristematik bölgelerine daha bol yerleştirildiğini ve 7-metil eskülinin, bitki hücre bölünmesini etkileyebileceğini de rapor etmişlerdir.

Ruiz ve ark. (2003) kalsiyumun farklı uygulama oranlarının tütün bitkilerinde fenolik bileşenlerin sentezini nasıl etkileyebileceğini araştırmışlar ve tütün bitkilerinin yetiştirildiği besin çözeltilisinde artan kalsiyum seviyesinin, fenolik bileşenlerin metabolizmasında yer alan enzimlerin (fenilalanin amonyak-liyaz, polifenol oksidaz ve peroksidaz) aktiviteleri üzerinde olumlu bir etki yaptığını, yüksek dozda uygulanan kalsiyumun (5 mM), bu bileşiklerin sentezinden ziyade daha çok oksidasyon tepkimelerini teşvik ettiğini ve böylece fenoliklerin daha düşük konsantrasyonda sentezlendiğini rapor etmişlerdir.

Jun ve ark. (2010), tütün atıklarındaki polifenollerin kimyasal bileşimini HPLC-PAD-ESI/MS/MS ile tanımlanmış ve 10 çeşit tütün atığında klorojenik asit ve rutin içeriklerini HPLC-UV ile belirlemişlerdir. Bun göre, kurutulmuş tütün atığının metanol ekstraktında 15 polifenolün tanımlandığı, yüksek seviyelerde klorojenik asit (3-CQA, 5-CQA ve 4-CQA) ve rutin tespit edildiği ve 10 tütün çeşidinde bu bileşenlerin sırasıyla 0.116-0.196, 0.686-1.781, 0.094-0.192 ve% 0.413-0.998 seviyesinde olduğunu belirlemişlerdir. Tütün atığının, etnofarmasötik endüstrisinde doğal klorojenik asit ve rutinin yeni bir farmasötik madde olarak kullanılabileceğini rapor etmişlerdir.

Cvetanoska ve ark., (2011), biyo-fizyolojik parametrelerin belirlenmesi için iki tütün çeşidinin (Prilep P-156/1 ve Yaka Yv-125/3) taze yaprak kısımlarının kullanıldığı bir araştırmada. toprak kültürleri dört yoğun metal grubu ile sera şartlarında muamele edilmiş [$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (0.25, 0.5, 1 ve 5 mg/kg toprak), $\text{CdSO}_4 \times 8\text{H}_2\text{O}$ (0.1, 0.2, 0.4 ve 0.8 mg/kg toprak), $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (50, 100 ve 200 mg/kg toprak), Antracol WP-70 (0.2, 0.4, 0.8 ve 1.6 mg/kg toprak)] ve çalışma sonucunda Cu, Cd ve Pb'un Katalaz aktivitesini düşürdüğü, Cd'un yüksek konsantrasyonlarının tüm pigment sistemin, negatif yönde etkilediği, Cu'ın kloroplast konsantrasyonunu arttırdığı, ağır metal stresinin antosiyanin seviyesini arttırdığını tespit etmişlerdir.

Ru ve ark. (2012), tütün (*Nicotiana tabacum* L.) yapraklarından elde edilen flavonoidlerin ve polisakkaridlerin hidroksil ve süperoksit radikalleri ile DPPH ve ABTS antioksidan özelliklerini araştırmışlardır. Flavonoidlerin, serbest radikaller üzerindeki aktivitelerde polisakkaritlerden çok daha iyi aktivite gösterdiğini miştir. Pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında, askorbik asitin, her ikisinde de zayıf antioksidan aktivite gösterdiğini, bununla birlikte, flavonoidlerin, yüksek konsantrasyonda (600 µg/mL) askorbik aside benzer süperoksit anyonu, DPPH ve ABTS radikal süpürücü

aktiviteye sahip olduğunu, flavonoidlerin, belirgin DPPH etkisine sahip olduğu ve polisakaritlerden önemli ölçüde daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. Elde ettiklerin sonuçların, flavonoidlerin serbest radikalleri temizlemede etkili olduğunu ve güçlü antioksidanlar olma potansiyeline sahip olduğunu açıkça gösterdiğini bildirmişler ve bu nedenle, tütün yapraklarının, gıda, farmasötik, kozmetik veya nutrasötik endüstriler için potansiyel bir doğal antioksidan kaynağı olarak düşünülebileceğini rapor etmişlerdir.

Torras-Claveria ve ark (2012), Tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS) analitik yöntemiyle ile tütün bitkilerinde (*Nicotiana tabacum* L. cv. Wisconsin) 20 fenolik bileşiğin tanımlanması ve iki ayrı deney halinde fenilpropanoid profillerindeki farklılıkları incelemişlerdir. Birincisinde, bitkilerin senesense uğramış ve uğramamış çiçek kısımları, ikincisinde ise sulanan ile su stresine maruz bırakılan genç fideleri karşılaştırmışlardır. Belirlenen 20 fenolik bileşiği, yedi hidroksisinnaminoilkinik asit, yedi hidroksisinnamik asit glikozit, bir salisilik asit glikozit, disakkaritlere sahip iki konjuge flavonol ve putresinin üç hidroksisinnamik asit amidi (HCAA) olarak tespit etmişlerdir. Genel olarak, fenilpropanoid bileşiklerinin seviyelerinin, her iki deneyde de yani senesense uğramış çiçeklerde ve su stresi koşulları altında arttığını, kaempferol-7-O-neohesperidoside'in ilk defa tüm tütün örneklerinde tanımlandığını, farklı fizyolojik ve/veya çevresel durumlara yanıt olarak metabolit profili varyasyonlarının meydana geldiğini rapor etmişlerdir.

Majdi ve ark. (2012), tohumları önemli miktarda yağ içeren tütün (*Nicotiana tabacum* L.) bitkisinin yağ asidi profilini araştırmışlardır. Ekstreleri hazırlanan 5 çeşidin yağ asidi profilini gaz kromatografisi ile belirlemişler ve sonuç olarak; Laurik (C12: 0), miristik (C14: 0), palmitik (C16: 0), palmitoleik (C16: 1), stearik (C18: 0), oleik (C18: 1), linoleik (C18: 2), linolenik (C18: 3) ve ekosanoik (C20: 0) gibi çeşitli doymuş ve doymamış yağ asitlerini gözlemlemişlerdir.

Badr ve ark. (2012), *Nicotiana tabacum*'un ana alkaloid bileşiği olan nikotinin kantitatif ölçümünü heksan: CH₂Cl₂: MeOH (2: 8: 1.5) kullanarak, ince tabaka kromatografisi belirlemişlerdir. İncelenen dokuz sigara markasından 3. ve 8. örneklerin diğer numunelere kıyasla neredeyse 2 kat daha yüksek miktarda nikotin içerdiğini belirlemişlerdir.

Nacoulma ve ark., (2012), *Rhodococcus fascians* tarafından indüklenen *Nicotiana tabacum* gallerine ait metanol sulu kloroform ve heksan ekstraktlarını, fenolik ve

flavonoid içeriği ve DPPH gibi antioksidan, anti-enflamatuar aktivitelerini araştırdıkları deneyde *R. fascians* enfeksiyonunun, *N. tabacum*'un fitokimyasal profilini ve biyolojik özelliklerini önemli ölçüde değiştirdiğini, toplam polifenolik içeriğin (% 120-307) arttığını ancak flavonoid seviyesinin (% 20-42,5) azaldığını tespit etmişlerdir. Sonuç olarak, *R. fascians* tarafından enfeksiyonun *N. tabacum*'da anti-enflamatuar ve antioksidan bileşiklerin üretimini desteklediğini bildirmişlerdir.

Li ve ark. (2014), yaptıkları çalışmada iki aşamalı bir öncü iyon tarama bazlı tandem kütle spektrometresi yöntemi ile tütün çiçeklerinde ve yapraklarında (*Nicotiana tabacum*) flavonoidlerin yapısını aydınlatmak için kullanmışlardır. Yunyan 97 tütün çeşidinde 17 flavonoid tespit etmişler, tütün çiçek ve/veya yapraklarında bulunan 17 flavonoidten 9'unun mevcut referanslara dayanarak ilk kez tespit edildiğini de bildirmişlerdir.

Sharma ve ark. (2016), *Nicotiana tabacum* gövdesinin etanol ekstraktlarında polifenolik flavonoidlerin antioksidan aktivitesini araştırmışlardır. Flavonoid ve fenolik içeriği, etanol ekstraktında sırasıyla, 12.5 ± 0.1322 mg QE gG1 ve 1133.25 ± 0.02 mg QE gG1 olarak hesaplanmıştır. 0.4 mg/mL etanol ekstraktının en yüksek SOD, GST, GSH ve MDA içeriğine sahip olduğunu, ekstraktların HPLC analizi sonucunda standart (kuersetin) ile karşılaştırıldığında, flavonoidleri de içerdiğini tespit etmişlerdir. *Nicotiana tabacum*'un etanol ekstresinin polifenolik flavonoidlerin varlığı ve antioksidan seviyesi bakımından geleneksel tıpta bitkisel ilaç olarak kullanılabileceğini de rapor etmişlerdir.

Hariram ve Gowtham Rajan (2016), GC-MS, FT-IR ve NMR tekniğiyle tütün bitkisinde kemometrik analiz araştırmaları yapmışlardır. Çalışma sonucunda, tütün yağı biyodizelinde farklı yağ asitlerinin varlığını ve yağ asitleri arasında bulunan major bileşenin linoleik asit olduğunu tespit etmişlerdir. FT-IR ile, tütün tohum yağı biyodizelinde metil ester gruplarının varlığını belirtmişlerdir.

Wang ve ark., (2017), yaptıkları çalışmada, *Nicotiana tabacum* L. yapraklarındaki polifenoller ve antioksidan aktivitesi üzerine farklı yükseklik (70 m- 2100 m) ve enlemlerin (23.26° - 34.61° kuzey) etkisini araştırmışlardır. Sonuçlar klorojenik asitlerin (3-CQA, 4-CQA ve 5-CQA dahil olmak üzere CQA'lar) rutin ve miktar fenolik bileşiklerin (CQA ve rutin) ayrıca TPC ve TFC'nin de rakım ile yüksek derecede pozitif korelasyon gösterdiğini, bununla birlikte enlem ile ilgili sonuçların hemen hemen hiçbir

korelasyon göstermediği, sadece TPC'nin enlem ile negatif korelasyon gösterdiği, ayrıca yüksek irtifanın tütünde daha güçlü antioksidan kapasiteye yol açtığını rapor etmişlerdir.

Popova ve ark. (2018), üç tütün türüne ait (*N. alata* Link& Otto'nun iki genotipi, *N. rustica* ve *N. tabacum*) tütün tohumu yağını incelemiştir. Gliserit tohumu yağı içeriğini, *N. alata*'nın iki genotipi için % 37.6 ve % 40.9, *N. rustica* için % 37.5 ve *N. tabacum* için % 30.9 olarak tespit etmişlerdir. Genel olarak, yağlarda fosfolipit içeriğini % 0.2-0.3 civarında, yağlardaki toplam sterol miktarını ise % 0.35-0.48 civarında bulmuşlardır. Ana bileşen olarak beta-sitosterolü, *N. alata*'nın beyaz yapraklarında kolesterol ve Delta (5)-avenasterol; *N. alata*'nın pembe taç yapraklarında kolesterol ve kampesterol (*N. rustica*'da kampesterol ve Delta (5)-avenasterol ve *N. tabacum*'da ise kampesterol ve stigmasterolün izlediğini tespit etmişlerdir. Genel olarak, üç *Nicotiana* türünde de ana yağ asitlerinin (FA), linoleik (% 61.7-67.6 aralığı), oleik (% 15.5-19.0) ve palmitik (% 9.1-12.5) olduğunu belirlemişlerdir. *N. rustica*'da en yüksek toplam nitrojen ve protein içeriğini, sırasıyla % 5.5 ve % 34.1 olarak ve *N. alata*'da en yüksek selüloz içeriğini tespit etmişlerdir. Aspartik asit, arginin ve treoninin *N. alata*'da, ve arginin, aspartik asit ve histidinin ise *N. rustica*'da dominant amino asit bileşenleri olduğunu tespit etmişlerdir. Sonuçlara bakıldığında, tütün tohumunun tüketici insan sağlığı ürünleri için hammadde olabileceğini de rapor etmişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Çalışmada materyal kaynağı olarak, Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinin farklı noktalarında (Mardin, Adıyaman, Bitlis ve Kahramanmaraş) doğal olarak yetişen tütün bitkilerinden elde edilen tohumlar ile bu bitkilere ait yapraklar kullanıldı. 34 farklı tütün tipine ait tohumlar ile bu tohumların bir kısmının araziye ekim çalışmaları (**Şekil 3.1.**) sonrasında elde edilen sürgün (**Şekil 3.2.**) ve yapraklar doğal şartlar altında kurutularak, laboratuvarında ekstraksiyon çalışmaları yapılmaya kadar kuru kaplar içinde +4°C'de buzdolabında muhafaza edildi.



Şekil 3.1. *Nicotiana tabacum* L. 'nin tohumlarının araziye ekim çalışmaları



Şekil 3.2 *Nicotiana tabacum* L. 'nin tohumlarından gelişen sürgünlerin genel görünüşü

Tütün bitkisinin sistematikteki yeri

Tütün bitkisinin sistematığı ise aşağıdaki gibidir.

Takım	Tubiflorales
Familya	Solanaceae (Patlıcangiller)
Cins	Nicotiana
Tür	<i>Nicotiana tabacum</i> L.

Yöntem

Kurutulan bitkilerin ekstralarının (analize) hazırlanması

Kurutulan bitkilerin yaprak ve tohum kısımları, petrol eteri ve etanol ekstraları hazırlandı. Analizler için kullanılan ekstralar hazırlanırken her bitkiden 10'ar gram

alınarak 50 ml petrol eterinde 24 saat bekletildi Bu işlem 3 kez tekrar edildi. Daha sonra tütün posları aynı şekilde etanol ile muamele edildi. Süzme ve çözücü buharlaştırma işlemlerinden sonra elde edilen ham ekstratlar etanolde çözülerek 4000 mg/kg derişimde 4'er ml çözeltiler hazırlandı (Şekil 3.3)



Şekil 3.3. *Nicotiana tabacum* L. 'nin gelişen sürgünlerin ekstraksiyon için hazırlanışı

Kimyasal standartlar ve çözücüler

Antioksidan aktivite tayininde kullanılan kimyasallar

Pirokatekol, sodyum karbonat (Na_2CO_3), Folin-Ciocalteu reaktifi (Fosfotungstik-fosfomolibdik asit + CuSO_4 (FCR)), kersetin, potasyum asetat (CH_3COOK), alüminyum nitrat ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3$), Sodyumbikarbonat, potasyum asetat, %80'lik etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), BHT (bütillenmiş hidroksi toluen), α - tokoferol, DPPH (1,1'-Difenil-2-pikrilhidrazil), bakır (II) klorür dihidrat ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin), amonyum asetat ($\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$), ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat) ve potasyum peroksi disülfat ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$). Kullanılan kimyasal maddeler ve tüm çözücüler analitik saflıktadır.

Antialzheimer aktivite tayininde kullanılan kimyasallar

Asetiltiyokolin iyodür (ACI), bütiriltiyokolin iyodür (BuI), asetilkolin esteraz (AChE), bütirilkolin esteraz (BChE), sodyum hidrojen fosfat dihidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), sodyum dihidrojen fosfat dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), sodyum bikarbonat (NaHCO_3), DTNB (5,5'-ditiyo-bis (2-nitrobenzoik asit)) ve galantamin. Kullanılan kimyasal maddeler ve tüm çözücüler analitik saflıktadır.

Antiürez ve antitrazinaz aktivite tayininde kullanılan kimyasallar

Ürez enzimi, Trozinaz enzimi, sodyum hidrojen fosfat dihidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), sodyum dihidrojen fosfat dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), sodyum hidroksit (NaOH), sodyumhipoklorit (NaOCl), fenol, sodyumnitropruside, L-DOPA, üre, tiyoüre, ve kojik asit. Kullanılan kimyasal maddeler ve tüm çözücüler analitik saflıktadır.

Kullanılan cihaz ve diğer gereçler

- ✓ LC-MS/MS (Shimadzu Marka 8040 Model)
- ✓ Eliza Okuyucu (Biotech EON Marka Microplate Reader)
- ✓ Ultra saf su cihazı (Elga marka)
- ✓ Etüv (Nüve marka)
- ✓ pH metre (Metler Toledo marka)
- ✓ Hassas terazi (Metler Toledo marka)
- ✓ -20 Derin dondurucu (Uğur Marka)
- ✓ IKA RV10 Model Evaporatör (Buchi V850 model vakum kontrol ünitesi ve Lauda RA8 model soğutucu ile birlikte)
- ✓ Çalkalayıcı (VWR marka)
- ✓ Ultrasonik banyo
- ✓ Blender
- ✓ Rotaevaporator (Büchi, İsviçre)
- ✓ Otomatik tekli ve çoklu pipetler (10-100 μL , 100-1000 μL , 500-5000 μL) (Eppendorf marka)

Toplam fenolik ve toplam flavonoit içeriklerinin belirlenmesi

Toplam fenolik miktar tayininde kullanılan çözeltiler

% 2'lik Sodyum karbonat çözeltisinin hazırlanması: 5 g Na_2CO_3 250 mL'lik balon jöjeye konuldu ve bir miktar ultra saf su ile çözüldü. Çözünme işleminden sonra ultra saf su ile toplam hacim 250 mL'ye tamamlandı.

Folin-Ciocalteu Fenol Reaktifi (Fosfotungistik-fosfomolibdik asit + CuSO_4) satın alındığı şekilde kullanıldı.

100 ppm'lik Pirokatekol çözeltisi: 1 mg pirokatekol tartılıp 10 mL'lik balon jöjeye alındı ve hacmi ultra saf su ile tamamlanarak hazırlandı.

Toplam fenolik miktar tayin yöntemi

Ekstrelerin toplam fenolik içerikleri Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak pirokatekole eşdeğer olarak belirlendi (Slinkard ve Singleton 1977). 100 ppm'lik

pirokatekol çözeltisi hazırlandı ve bu çözeltiden 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ve 8 µL alınarak hacimleri distile su ile 184 µL'ye tamamlandı. Hypericum türlerinin etanol ekstralarının 1000 ppm konsantrasyonda çözeltileri hazırlandı. Bir miligram ekstre içeren örnek çözeltilerinden 4 µL alındı, ultra saf su ile 184 µL' ye tamamlandı. Pirokatekol çözeltileri ve örneklere 4 µL Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ve 3 dk sonra %2'lik Na₂CO₃ çözeltisinden 12 µL ilave edildi. Karışım 2 saat süresince oda sıcaklığında bekletildi ve örneklerin absorbansları 760 nm'de okundu. Ekstrelerin toplam fenolik içerikleri standart pirokatekol grafiğinden elde edilen aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlendi:

Ölçüm hatalarını en aza indirmek için her bir numuneden üç paralel çalışma yapıldı.

$$\text{Absorbans} = 0,0498(\mu\text{g}) + 0,0434 (R^2 = 0,9918)$$

Antioksidan aktivite testleri

Antioksidan testler için kullanılan reaktifler ve hazırlanışları

DPPH serbest radikali giderim aktivitesi yönteminde kullanılan çözelti

0.1 mM DPPH çözeltisinin hazırlanması: 10 mg DPPH tartılarak 250 mL etil alkolde çözüldü.

ABTS katyon radikali giderim aktivitesi yönteminde kullanılan çözelti

7 mM ABTS katyon radikalinin hazırlanması: 19.2 mg ABTS tartılarak 5 mL suda çözüldü. Üzerine toz halinde 3.3 mg potasyum peroksi disülfat (K₂S₂O₈) eklenip karıştırıldı. Karanlıkta oda sıcaklığında 12-16 saat beklendi. Bekleme süresi sonunda çözelti kullanılmaya başlamadan önce absorpsiyonu ~ 0.70 olacak şekilde seyreltildi.

CUPRAC yönteminde kullanılan çözeltiler

10 mM Bakır (II) klorür dihidrat çözeltisinin hazırlanması: 42.62 mg CuCl₂.2H₂O tartılarak 25 mL suda çözüldü.

1 M Amonyum asetat tamponunun hazırlanması: 1.927 g NH₄OAc tartılarak 25 mL suda çözüldü, pH= 7'ye ayarlandı.

7,5 mM Neokuproin çözeltisinin hazırlanması: 76.6 mg neokuproin tartılarak 50 mL % 96'lık alkolde çözüldü.

Antioksidan testleri için standart çözeltilerinin hazırlanması

1000 ppm BHT (2,6-di-t-bütil-1-hidroksitoluen) çözeltisinin hazırlanması: 10 mg BHT 10 mL etanol içinde çözülerek 1000 ppm'lik BHT çözeltisi hazırlandı.

1000 ppm α -Tokoferol çözeltisinin hazırlanması: % 97'lik 10.31 mg α -tokoferol 10 mL etanolde çözülerek 1000 ppm'lik α -tokoferol çözeltisi hazırlandı.

Antioksidan tayin yöntemleri

Antioksidan aktivite tayini için çalışılan *Hypericum* türlerinin etanol ekstralarının, DPPH serbest radikal giderim, ABTS katyon radikal giderim ve CUPRAC yöntemleri ile aktiviteleri tayin edildi. Bütün yöntemlerin grafiklerindeki konsantrasyonlar reaksiyon karışımındaki son konsantrasyonlardır.

DPPH (1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil) serbest radikal giderim yöntemi

Ekstrelerin serbest radikal giderim aktiviteleri 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikali kullanılarak belirlendi (Blois 1958). *Hypericum* türlerinin etanol ekstralarının 10 mg'ı 10 mL etanolde çözülerek stok çözeltileri hazırlandı. Bu stok çözeltilerden 2, 5, 10 ve 20 μ L alınarak etanol ile hacimleri 40 μ L'ye tamamlandı ve üzerlerine 0.1 mM DPPH çözeltisinden 160 μ L ilave edildi. Hazırlanan çözeltilerin oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika inkübasyondan sonra 517 nm'de absorbansları ölçüldü. Elde edilen bu absorbans değerlerinden % inhibisyon değerleri hesaplandı. Örneklerin absorbans değerleri kontrole karşı değerlendirildi. Serbest radikal giderim aktivitesi (% inhibisyon) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}} \times 100$$

A: Absorbans

Her bir örnekten üç paralel çalışma yapıldı. Standart olarak BHT ve α -Toc kullanıldı.

ABTS katyon radikali giderim aktivitesi

Ekstrelerin ABTS katyon radikal giderim aktiviteleri 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) kullanılarak belirlendi (Re ve ark. 1999). *Hypericum* türlerinin etanol ekstralarının 10 mg'ı 10 mL etanolde çözülerek stok çözeltileri hazırlandı. Bu stok çözeltilerden 2, 5, 10 ve 20 μ L alınarak etanol ile hacimleri 40 μ L'ye tamamlandı ve üzerlerine 7 mM ABTS katyon radikali çözeltisinden 160 μ L ilave edildi. Reaksiyon karanlıkta 6 dakika bekletildikten sonra 734 nm'de absorbansları ölçüldü. Örneklerin absorbans değerleri kontrole karşı değerlendirildi. ABTS katyon radikal giderim aktivitesi (% inhibisyon) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}} \times 100$$

Her bir örnekten üç paralel çalışma yapıldı. Standart olarak α -Toc ve BHT kullanıldı.

CUPRAC yöntemi

CUPRAC yönteminde, örneklerdeki antioksidan bileşikler varlığında Cu(II)-Neokuproin (Nc) kompleksi, renkli Cu(I)-Nc kelatına indirgenir ve bu kelatın 450 nm'de absorbansı ölçülür. Hazırlanan örnekler ve standartların üzerine, son konsantrasyonları 10, 25, 50, 100 μ g/mL olacak şekilde Cu (II), neokuproin ve NH_4OAc tamponu ilave edildi ve 1 saat sonra 450 nm'de absorbans ölçüldü (Apak ve ark. 2004). Örneklerin absorbans değerleri standartlara karşı değerlendirildi. Her bir örnekten üç paralel çalışma yapıldı. Standart olarak BHT, ve α -Toc kullanıldı.

Antikolinesteraz aktivite testleri Antikolinesteraz

aktivite tayininde kullanılan çözeltiler

0,1 M NaH_2PO_4 çözeltisinin hazırlanması: 1.56 g NaH_2PO_4 tartılıp 100 mL distile suda çözüldü.

0,1 M Na_2HPO_4 çözeltisinin hazırlanması: 3.56 g Na_2HPO_4 tartılıp 200 mL distile suda çözüldü.

0,1 M pH=8 tampon çözeltisinin hazırlanması: 94.7 mL Na_2HPO_4 ve 5.3 mL NaH_2PO_4 çözeltilerinden alındıktan sonra 100 mL distile su eklenerek hazırlandı.

0,1 M pH=7 Tampon çözeltisinin hazırlanması: 3.9 mL NaH_2PO_4 ve 6.1 mL Na_2HPO_4 çözeltilerinden alınarak 10 mL distile su eklenerek hazırlandı.

5 mM DTNB Çözeltisinin hazırlanması: 16 mg 5,5-ditiyobis (2-nitro benzoik asit) (DTNB) 1 mL pH=7 tampon çözeltisinde ve 7.5 mg NaHCO_3 1 mL pH=7 tampon çözeltisinde çözüldükten sonra iki çözelti karıştırıldı. Hazırlanan bu çözelti karışımı, 2 mL pH=7 tampon çözeltisi ile 4 mL'ye tamamlandı. Kullanma aşamasında 4 mL pH=8 tampon çözeltisi ilave edildi. .

7.1 mM Asetiltiyokolin iyodür (AcI): 32.8 mg AcI alınarak, 8 mL distile su eklendi. Kullanma aşamasında 8 mL pH=8 tamponu ile hacmi 16 mL'ye tamamlandı.

0,79 mM Butiriltiyokolin iyodür (BuI): 4 mg BuI alınarak, 8 mL distile su eklendi. Kullanma aşamasında 8 mL pH=8 tamponu ile hacmi 16 mL'ye tamamlandı.

Asetilkolinesteraz enziminin hazırlanması: 1.17 mg (498.3498 U) AChE enzimi alınarak 5 mL pH=8 tampon çözeltisinde çözüldü ve 1'er mL'lik beş bölüme ayrıldı.

Her biri için 99.66996 U/mL'lik konsantrasyon sağlanmış oldu ve 1 mL'lik stoklar da 125 µL'lik 8 eşit bölüme ayrıldı (0,09966996 U/µL). 125 µL'lik enzim çözeltisine 460 µL pH=8 tampon çözeltisi eklendi (0.021297 U/µL) . 585 µL çözelti 25 µL'ik 23 tane küçük eppendorf tüplere doldurularak daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuda bekletildi. Stok çözeltiler kullanılmadan önce pH=8 tampon çözeltisiyle 2150 µL'ye tamamlanır ($2,476 \times 10^{-4}$ U/µL).

Butirikolinesteraz enziminin hazırlanması: 1 mg (11.4 U) BChE enzimi alınarak 5 mL pH=8 tampon çözeltisinde çözüldü (2.28 U/mL). Bu çözeltiden 300 µL'lik stoklar oluşturulup küçük şişelere dolduruldu ve daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuda bekletildi (0.00228 U/µL). Stok çözeltiler kullanılmadan önce 1850 µL pH=8 tampon çözeltisinden eklenerek kullanıma hazır hale getirilir (3.1813×10^{-4} U/µL).

4000 µM standart Galantamin çözeltisinin hazırlanması: 2.3 mg galantamin 2 mL etanolde çözülerek galantamin çözeltisi hazırlanmış olur.

Antikolinesteraz aktivite tayin yöntemi

Asetilkolinin AChE tarafından tiyokoline parçalandıktan sonra, tiyokolinin sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoat anyonunu vermek üzere 5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ile reaksiyon verdiği kolorimetrik bir yöntem olan Ellman metodu, 96 kuyucuklu mikropalakalarda gerçekleştirildi (Ellman ve ark., 1961).

AChE aktivite testi

Asetilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi için enzim olarak asetilkolinesteraz enzimi, substrat olarak ise asetiltiyokolin iyodür kullanılmaktadır. Sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoat anyonunun konsantrasyonu 412 nm'de mikropalaka reader ile ölçülmektedir. Mikropalakadaki kuyucuklara 130 µL fosfat tamponu (pH =8), ekstrelerin etanol içinde 4000 ppm konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerinden 10 µL ve enzim çözeltisinden 20 µL koyuldu. Bu çözelti 10 dakika süre ile 25°C de inkübe edildi. 10 dakika sonra 20 µL DTNB reaktifi ve substrat (asetiltiyokolin iyodür) ilave edildi. Standart olarak galantamin kullanıldı. Mikropalaka ELISA okuyucuya yerleştirilerek 412 nm dalga boyunda absorbans okundu. AChE aktivitesi (% inhibisyon) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı. Her bir örnekten üç paralel çalışma yapıldı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}} \times 100$$

BChE aktivite testi

AChE aktivite testinde uygulanan yöntem kullanıldı. Farklı olarak butirilkinesteraz inhibisyon aktivitesi için enzim olarak at serumundan elde edilen butirilkinesteraz enzimi, substrat olarak ise butiriltiyokolin iyodür kullanıldı. BChE aktivitesi (% inhibisyon) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı. Her bir örnekten üç paralel çalışma yapıldı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}} \times 100$$

Antiürez ve antitrozinaz aktivite testleri

Antiürez ve antitrozinaz aktivite tayininde kullanılan çözeltiler

0,1 M NaH₂PO₄ Çözeltisinin hazırlanması: 1.56 g NaH₂PO₄ tartılıp 100 mL distile suda çözüldü.

0,1 M Na₂HPO₄ Çözeltisinin hazırlanması: 3.556 g Na₂HPO₄ tartılıp 200 mL distile suda çözüldü.

0,01 M NaH₂PO₄ Çözeltisinin hazırlanması: 0.156 g NaH₂PO₄ tartılıp 100 mL distile suda çözüldü.

0,01 M Na₂HPO₄ Çözeltisinin hazırlanması: 0,356 g Na₂HPO₄ tartılıp 200 mL distile suda çözüldü.

0,01 M pH=8,2 Tampon çözeltisinin hazırlanması: 96 mL Na₂HPO₄ ve 4 mL NaH₂PO₄ çözeltilerinden alındıktan sonra 100 mL distile su eklenerek hazırlandı.

0,05 M pH=6,8 Tampon çözeltisinin hazırlanması: 51 mL NaH₂PO₄ ve 49 mL Na₂HPO₄ çözeltilerinden alınarak 100 mL distile su eklenerek hazırlandı. Daha sonra çözelti yarı yarıya seyreltilerek pH kontrol edilir ve kullanılır.

Fenol reaktifinin hazırlanması: % 1'lik Fenol reaktifi + % 0,005'lik sodyumnitroprusside karışımını hazırlamak için 200 mg fenol 10 mL ultra saf suda ve 1 mg sodyumnitroprusside 10 mL ultra saf suda ayrı ayrı çözüldü ve daha sonra iki çözelti karıştırıldı.

Alkali reaktifinin hazırlanması: % 0,5'lik NaOH + %0,1'lik NaOCl karışımını hazırlamak için 100 mg fenol 10 mL ultra saf suda ve 0,1105-0,1658 mL NaOCl (%10-15) 10 mL ultra saf suda ayrı ayrı çözüldü ve daha sonra iki çözelti karıştırıldı.

0,1M Üre: 60 mg üre alınarak bir miktar distile suda çözüldü sonra pH=8,2 tamponu ile hacmi 10 mL'ye tamamlandı.

L-DOPA çözeltisinin hazırlanması: 8.4 mg L-DOPA alınarak, 5 mL distile suda çözüldü.

Üreaz enziminin hazırlanması: 1 mg (21 U) Üreaz enzimi alınarak 1 mL pH=8,2 tampon çözeltisinde çözüldü ve 50 µL'lik 20 eşit bölüme ayrıldı ve daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuda bekletildi. Stok çözeltiler kullanılmadan önce pH=8,2 tampon çözeltisiyle 2000-3000 µL'ye tamamlandı.

Trozinaz enziminin hazırlanması: 1 mg Trozinaz enzimi alınarak 0,25 mL pH=6,8 tampon çözeltisinde çözüldü ve 50 µL'lik 5 eşit bölüme ayrıldı ve daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuda bekletildi. Stok çözeltiler kullanılmadan önce pH=6,8 tampon çözeltisiyle 2000-3000 µL'ye tamamlandı.

Antiüreaz aktivite testi

Üreaz inhibisyon aktivitesi için enzim olarak üreaz enzimi, substrat olarak ise üre kullanılmaktadır. Mikroplakadaki kuyucuklara önce etanol içinde 4000 ppm konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerinden 10 µL ve enzim çözeltisinden 25 µL konuldu daha sonra 50 µL substrat (üre) ilave edildi. Mikroplaka ELISA okuyucuya yerleştirilerek 630 nm dalga boyunda ilk absorbans okundu. Bu çözelti 15 dakika süre ile 30°C de inkübe edildi. 15 dakika sonra bu çözeltinin üzerine 45 µL fenol reaktifi ve 20 µL alkali reaktif konuldu. 20 dk inkübasyondan sonra 630 nm dalga boyunda son okuma yapıldı ve absorbans okundu. Standart olarak Tiyöüre kullanıldı. Üreaz aktivitesi (% inhibisyon) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}} \times 100$$

Her bir örnekten üç paralel çalışma yapıldı.

Antitrozinaz aktivite testi

Trozinaz inhibisyon aktivitesi için enzim olarak trozinaz enzimi, substrat olarak ise L-DOPA kullanılmaktadır. Mikroplakadaki kuyucuklara 150 µL fosfat tamponu (pH =6,8), ekstrelerin etanol içinde 4000 ppm konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerinden 10 µL ve enzim çözeltisinden 20 µL konuldu. Mikroplaka ELISA okuyucuya yerleştirilerek 3 dk karıştırıldı 475 nm dalga boyunda ilk absorbans okundu. Bu çözelti 10 dakika süre ile 37°C de inkübe edildi. 10 dakika sonra 20 µL substrat (L-DOPA) ilave edildi. 10 dk inkübasyondan sonra 475 nm dalga boyunda son okuma yapıldı ve absorbans okundu. Trozinaz aktivitesi (% inhibisyon) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı. Standart olarak kojik asit kullanıldı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}} \times 100$$

Ekstrelerin yağ asidi için analize hazırlanması

100 mg yağ örneği, 0.1M KOH çözeltisi ve metanol (2 mL) içinde 1 saat geri çeviren soğutucuda tutulup çözelti soğutulduktan sonra 5 mL su ilave edildi. Sulu karışım, 0.5 mL HCl çözeltisi ile nötralize edilip ve hekzan/dietil eter (1/1; 3-5 mL) karışımı ile ekstre edildi. Organik tabaka ayrılarak ve su ile yıkanarak (10 mL), daha sonra susuz Na₂SO₄ üzerinde kurutuldu. Organik çözücü rota evaporatörde uçurularak yağ asidi esterleri elde edildi (Kılıç ve ark., 2007).

GC-MS ile yağ asidi analizi çalışma şartları

GC-MS analizi apolar Phenomenex DB-5 kolonunda (30 m- 0.32 mm, 0.25 µm film kalınlığı) helyum gazı (1 mL/dak ve 20 psi) ile yapıp GC fırın sıcaklığı 40 °C'de 5 dakika tutulup, 280 °C'ye 5 °C/dakika hızla çıkarıldı ve bu sıcaklıkta (280 °C) 10 dakika sabit tutuldu. Split oranı 1:20 olarak ayarlanarak injeksiyon hacmi 0.1 µL'dir. Kütle spektrometresi (EI/MS) 70 eV iyonizasyon enerjisine ayarlandı. Kütle spektrometresi tarama aralığı m/z 35-450 atomik kütle birimi (amu) aralığına ayarlandı. NIST ve Wiley GC-MS kütüphaneleri bileşenlerin belirlenmesinde kullanıldı. Ayrılan bileşenlerin relatif yüzde miktarı, computerized integratörle toplam iyon kromatografisinden hesaplandı.

LC-MS/MS Sistemi ile fenolik içerik ve nikotin içeriği analizi

Nikotin ve fenolik içerik analizi için LC-MS/MS sistemi

Çalışılan örneklerdeki nikotin, nikotinamid ve nikotinic asit miktarları LC-MS/MS sistemi ile analiz edilmiştir. Analiz metoduna ait analitik parametreler (alınma zamanı (RT), ana (parent) iyonlar: standard bileşiklerin moleküler iyonları (m/z oranı), parçalanma iyonları, kalibrasyon eğrisine ait denklemler, belirleme katsayısı (R²), ve kalibrasyon aralığı **Çizelge 3.1**'de verilmiştir.

Nikotin, nikotinamid ve nikotinic asit bileşiklerinin kalitatif ve kantitatif analizinde kullanılan LC-MS/MS sistemi; Shimadzu Neexera model UHPLC cihazı ile Shimadzu LCMS 8040 model üçlü kuadropol kütle spektrometre cihazının birleşiminden oluşmaktadır. Kullanılan sıvı kromatografi sistemi LC-30 AD model gradient pompa, DGU-20A3R model degazer, CTO-10ASvp model kolon fırını ve SIL-30AC model oto örnekleyiciden oluşmaktadır. Kromatografik ayırım, Restek Ultra AQ C18 (100 mm×2,1 mm, 3µm) kolonda gerçekleştirilmiştir. Analiz sırasında kolon fırını

35 °C'ye ayarlanmıştır. Elüsyon gradiyentinde hareketli faz A için ultrasaf su ve hareketli faz B için metanol kullanılmıştır. Ayrıca, daha iyi bir kromatografik ayırım ve iyonlaştırmayı kolaylaştırmak için her iki mobil faza da 5 mM amonyum format eklenmiştir. Analitlerin optimum ayırımının gerçekleşmesi için yapılan pek çok denemenin ardından en uygun UHPLC gradiyent profili 10-90 % B (0-10 dk), 90% B (10-13 dk), 10% B (13-17 dk) şeklinde optimize edilmiştir. Hareketli faz akış hızı 0,5 mL/dk ve enjeksiyon hacmi 1 µL olarak belirlenmiştir.

#	Analitler	İyonlaşma Modu	Ana iyon (m/z)	Parçalanma iyonları (m/z)	Alıkonma Zamanı	Denklem	R ²	Doğrusallık (ppb)
1	Nikotik asit	Pozitif	124,20	80,2/78,2/53,1	4,158	y=1126,44x+519254	0,9915	100-6400
2	Nikotinamid	Pozitif	123,20	80,2/78,2/53,1	5,590	y=3536,48x+1035540	0,9900	100-6400
3	Nikotin	Pozitif	163,20	132,2/130,2/117,1	6,676	y=6727,11x+80042	0,9996	100-6400

Fenolik içerik analizi için LC-MS/MS sistemi

Çalışılan tütün örneklerinin fenolik bileşen içerikleri önceden geliştirilip valide edilmiş olan bir LC-MS/MS metoduna göre yapılmıştır (Yılmaz, 2015; Yılmaz ve ark., 2018).

LC-MS/MS analiz metoduna ait analitik parametreler (alıkonma zamanı (RT), ana (parent) iyonlar: standard bileşiklerin moleküler iyonları (m/z oranı), belirleme katsayısı (R²), bağıl standart sapma (RSD), belirleme ve tayin alt sınırları (LOD/LOQ (µg/L)), 95% güven seviyesinde bağıl standart belirsizlik (k=2) (U (%)) **Çizelge 3.2'**de verilmiştir.

LC-MS/MS metodunda kullanılan kimyasallar ve sınıfları şunlardır:

Fenolik asitler (15 adet): p-kumarik asit, o-kumarik asit, gallik asit, kafeik asit, vanilik asit, salisilik asit, 4-hidroksi benzoik asit, ferulik asit, klorojenik asit, rozmarinik asit, protokateşik asit, sinnamik asit, sinapinik asit, sirinjik asit, pirokatekol.

Flavonoitler (17 adet): Fisetin, hesperetin, naringenin, rutin, kersetin, kamferol, mirisetin, kersitrin, luteolin, apigenin, krisin, hesperidin, likiritigenin, izokersitrin, apigetrin, roifolin, nikotiflorin.

Fenolik olmayan organik asitler (3 adet): Kinik asit, malik asit, fumarik asit.

Fenolik aldehit (1 adet): Vanilin.

Benzopiran (1 adet): Kumarin.

37 fitokimyasalın kalitatif ve kantitatif analizinde kullanılan LC-MS/MS sistemi; Shimadzu Neexera model UHPLC cihazı ile Shimadzu LCMS 8040 model üçlü

kuadropol kütle spektrometre cihazının birleşiminden oluşmaktadır. Kullanılan sıvı kromatografi sistemi LC-30 AD model gradient pompa, DGU-20A3R model degazer, CTO-10ASvp model kolon fırını ve SIL-30AC model oto örnekleyiciden oluşmaktadır. Kromatografik ayırım, Inertsil ODS-4 model C18 (100 mm×2,1 mm, 2 μ m) kolonda gerçekleştirilmiştir. Analiz sırasında kolon fırını 35 °C'ye ayarlanmıştır. Elüsyon gradiyentinde hareketli faz A için ultrasaf su ve hareketli faz B için asetonitril kullanılmıştır. Ayrıca, daha iyi bir kromatografik ayırım ve iyonlaştırmayı kolaylaştırmak için su fazına 10 mM amonyum format ve % 0,1 formik asit eklenmiştir. Analitlerin optimum ayırımının gerçekleşmesi için yapılan pek çok denemenin ardından en uygun UHPLC gradiyent profili 5-20% B (0-10 dk), 20% B (10-22 dk), 20-50% B (22-36 dk), 95% B (36-40), 5% B (40-50 dk) şeklinde optimize edilmiştir. Hareketli faz akış hızı 0,25 mL/dk ve enjeksiyon hacmi 4 μ L olarak belirlenmiştir.

Üçlü kuadropol kütle spektrometresi hem negatif hem de pozitif modda çalışan bir ESI (elektrosprey iyonlaştırma) kaynağı ile donanımlıdır. LC-ESI-MS/MS verileri cihazda kayıtlı olan by LabSolutions (Shimadzu, Kyoto, Japonya) yazılımı ile toplanarak işlenmiştir. Analitlerin miktarsal tayini için cihaz ile MRM (multiple reaction monitoring) modunda çalışılmış ve moleküler (parent) iyonlar bir veya iki parçalanma ürünü (product ions) (ilki kantitatif amaçlı diğeri kalitatif amaçlı kullanılmıştır) ile kombine edilmiştir. Kütle spektrometresinde optimize edilen diğere parametreler şunlardır: ara yüz (interface) sıcaklığı; 350 °C, DL sıcaklığı; 250 °C, heat block sıcaklığı; 400 °C, nebulizer gaz (N₂) akışı; 3 L/dk ve kurutma gazı (N₂) sıcaklığı; 15 L/dk.

Çizelge 3.2. LC-MS/MS analiz metoduna ait analitik parametreler (Yılmaz, 2015; Yılmaz ve ark., 2018)

No	Analitler	RT ^a	Ana İyon(m/z) ^b	Parçalanma İyonları	İyon Modu	Kalibrasyon Denklemi	R ^{2c}	RSD% ^d		Lineerite Aralığı (µg/L)	LOD/LOQ (µg/L) ^e	Geri Kazanım (%)		U ^f
								Aynı Gün	Farklı Günler			Aynı Gün	Farklı Günler	
1	Kumarin	17.40	147.05	91.0-103.2	Poz	y=33.64×-89700	0.994	0.01306	0.01239	1000-20000	208.4/228.4	0.99947	1.00081	0.0237
2	Hesperidin	12.67	610.90	303.1-465.1	Poz	y=1340.27×-43769	0.998	0.00945	0.01126	25-1000	3.4/4.2	1.01733	1.01263	0.0262
3	p-Kumarik asit	11.53	162.95	119.3-93.3	Neg	y=3199.20×+13002	0.992	0.01820	0.01727	25-1000	7.3/9.1	1.00617	1.01224	0.0516
4	o-kumarik asit	15.45	162.95	119.4-93.3	Neg	y=1219.34×-10915	0.999	0.02730	0.02566	25-1000	24.4/31.1	0.98344	0.99061	0.0513
5	Gallik asit	3.00	168.85	125.2-79.2	Neg	y=226.76×+38152	0.998	0.01601	0.01443	250-10000	95.5/106.9	1.00004	1.00454	0.0282
6	Kafeik asit	8.80	178.95	135.2-134.3	Neg	y=3963.32×+178156	0.998	0.01454	0.01469	25-1000	18.4/22.4	1.00917	0.98826	0.0354
7	Vanilik asit	8.57	166.90	152.3-108.3	Neg	y=35.84×-12097	0.999	0.00528	0.00619	1000-20000	122.2/139.7	1.00093	1.04095	0.0508
8	Salisilik asit	11.16	136.95	93.3-65.3	Neg	y=5286.26×+309192	0.989	0.01016	0.01242	25-1000	5.0/6.5	1.00989	0.99013	0.0329
9	Kinik asit	1.13	190.95	85.3-93.3	Neg	y=41.06×+10671	0.996	0.00259	0.00274	250-10000	75.8/79.4	1.00288	0.98778	0.0082
10	4-OH-benzoik asit	7.39	136.95	93.3-65.3	Neg	y=409.03×+112079	0.998	0.01284	0.01538	250-10000	33.2/38.1	0.99662	1.00058	0.0289
11	Ferulik asit	12.62	192.95	178.3	Neg	y=80.45×-31782	0.997	0.00708	0.00619	250-10000	36.6/42.0	0.99987	1.00289	0.0494
12	Klorojenik asit	7.13	353.15	191.2	Neg	y=781.36×-18697	0.998	0.00058	0.00076	25-1000	6.2/8.1	1.00806	0.99965	0.0069
13	Rozmarinik asit	14.54	359.00	161.2-197.2	Neg	y=909.67×-201692	0.994	0.02014	0.01751	100-5000	6.6/8.8	0.99206	1.03431	0.0713
14	Protokateşik asit	4.93	152.95	108.3	Neg	y=297.75×+30590	0.995	0.01236	0.01296	100-5000	28.2/31.4	0.99404	1.01070	0.0411
15	Sinamik asit	25.61	147.00	103.15-77.3	Neg	y=9.06×-12403	0.996	0.00648	0.00816	5000-20000	821.8/859.7	1.00051	0.99927	0.0143
16	Sinapinik asit	12.66	222.95	208.3-149.2	Neg	y=141.96×-73294	0.992	0.01446	0.01517	250-10000	78.7/86.1	1.00164	0.99962	0.0281
17	Fumarik asit	1.48	115.00	71.4	Neg	y=64.99×-11592	0.997	0.00536	0.00460	100-5000	28.1/34.5	0.99748	0.99867	0.0124
18	Vanilin	10.87	151.00	136.3-92.2	Neg	y=446.10×+70934	0.998	0.00696	0.00793	250-10000	44.3/53.1	0.99679	0.99611	0.0280

(^aRT: Alıkonma zamanı, ^bAna iyon(m/z):Standard bileşiklerin moleküler iyonları (m/z oranı), ^cR²: Belirleme katsayısı, ^dRSD:Bağlı standart sapma, ^eLOD/LOQ (µg/L): Belirleme sınırı/Tayin sınırı, ^fU (%): 95% güven seviyesinde bağlı standart belirsizlik (k=2))

Çizelge 3.2. LC-MS/MS Analiz Metoduna Ait Analitik Parametreler (Devam)

No	Analitler	RT ^a	Ana İyon(m/z) ^b	Parçalanma İyonları	İyon Modu	Kalibrasyon Denklemi	R ^{2c}	RSD% ^d		Lineerite Aralığı (µg/L)	LOD/LOQ (µg/L) ^e	Geri Kazanım (%)		U ^f
								Aynı Gün	Farklı Günler			Aynı Gün	Farklı Günler	
19	Pirokatekol	6.48	109.00	108.35-91.3	Neg	y=30.61x+14735	0.996	0.01313	0.01339	1000-20000	261.1/278.4	0.99987	0.99936	0.0235
20	Malik asit	1.23	133.00	115.2-71.3	Neg	y=316.95x-42041	0.999	0.00477	0.00527	250-10000	55.3/67.5	1.01266	0.99836	0.0113
21	Sirinjik asit	9.02	196.95	182.2-167.3	Neg	y=42.33x-52547	0.996	0.01049	0.01345	1000-20000	212.5/233.3	0.99922	0.99977	0.0238
22	Hesperetin	31.76	300.95	164.2-136.2	Neg	y=876.67x+48916	0.997	0.03209	0.02605	25-1000	5.6/6.9	0.98850	0.99435	0.0562
23	Naringenin	30.68	270.95	151.2-119.3	Neg	y=4315.1x+178410	0.995	0.02054	0.02019	25-1000	5.4/6.4	0.99883	1.01002	0.0521
24	Rutin	12.61	609.05	300.1-271.1	Neg	y=561.91x-16879	0.997	0.00473	0.00624	25-1000	5.5/6.5	1.00994	0.98017	0.0159
25	Kersetin	28.17	300.90	151.2-179.2	Neg	y=1198.48x+480562	0.990	0.01589	0.01360	100-5000	23.3/28.9	0.98470	1.00103	0.0543
26	Kersitrin	16.41	447.15	301.1-255.1	Neg	y=339.39x+38910	0.999	0.01528	0.02320	100-5000	22.0/25.2	0.99726	1.00620	2.0079
27	Apigenin	31.43	268.95	117.3-151.2	Neg	y=4548.36x+295252	0.990	0.02304	0.02204	25-1000	5.4/6.3	1.01444	1.01331	0.0650
28	Krisin	36.65	252.95	143.3-119.4	Neg	y=2032.13x+95593	0.993	0.00490	0.00630	25-1000	5.4/6.2	1.00338	1.00437	2.0083
29	Likiritigenin	25.62	254.95	119.3-135.1	Neg	y=2384.96x+59141	0.996	0.01849	0.01738	25-1000	5.5/6.6	1.00333	0.99957	0.0341
30	İzokersitrin	13.42	463.00	300.1-271.1	Neg	y=803.23x+4981	0.999	0.00682	0.00515	25-1000	5.4/6.3	1.00594	1.00722	0.0133
31	Apigetrin	16.59	431.00	268.2-239.2	Neg	y=1775.55x+91121	0.993	0.01797	0.01607	25-1000	5.4/6.1	1.01394	1.00419	0.0597
32	Roifolin	16.11	577.05	269.2-211.1	Neg	y=237.15x+11887	0.999	0.00747	0.01528	100-5000	23.1/27.9	1.01046	1.01739	0.0941
33	Nikotiflorin	14.68	593.05	285.1-255.2	Neg	y=498.38x+79274	0.991	0.00737	0.00875	100-5000	22.4/25.5	1.02558	1.00970	0.0276
34	Fisetin	19.30	284.95	135.2-121.3	Neg	y=547.46x+274791	0.991	0.00557	0.00820	250-10000	54.4/61.4	0.99877	1.00031	0.0148
35	Luteolin	28.27	284.75	133.2-151.2	Neg	y=3272.65x+150557	0.997	0.00575	0.00696	25-1000	5.4/6.5	1.00772	0.99524	0.0174
36	Mirisetin	18.72	317.00	179.2-151.3	Neg	y=583.55x+205727	0.999	0.00652	0.00711	250-10000	53.2/57.2	0.99982	1.00042	0.0126
37	Kamferol	31.88	284.75	255.1-117.3	Neg	y=26.29x+87558	0.992	0.01436	0.01070	1000-20000	206.6/214.3	0.99971	0.99851	0.0209

(^aRT: Alikonma zamanı, ^bAna iyon(m/z): Standard bileşiklerin moleküler iyonları (m/z oranı), ^cR²: Belirleme katsayısı, ^dRSD:Bağıl standart sapma, ^eLOD/LOQ (µg/L): Belirleme sınırı/Tayın sınırı, ^fU (%): 95% güven seviyesinde bağıl standart belirsizlik (k=2))

Kemometrik analiz

Nicotiana tabacum örneklerinin çoklu değişken analizleri, temel bileşen analizi (PCA) ve hiyerarşik kümeleme analizi (HCA) gibi kemometrik teknikler kullanılarak sınıflandırılmıştır.

Güneydoğu Anadolu Bölgelerinin farklı lokalitelerinden toplanan Tütün tiplerinin ve bu türlere ait yaprak ve tohum kısımlarının kemometrik analizleri çok değişkenli veri analiz yöntemlerinden temel bileşenler analizi (Principal Component Analysis, PCA) ve hiyerarşik kümeleme analizi (Hierarchical Clustering Analysis, HCA) metotları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kümeleme ve sınıflandırma amaçlı metodların tamamı, çok değişkenli bir veri analiz yöntemi olan temel bileşenler analizine dayalıdır. PCA, incelenen çok sayıdaki değişkeni değişkenler arası korelasyonu engelleyerek; onların doğrusal kombinasyonlarından oluşan daha az sayıda bileşenlere indirgeyen bir metottur. PCA temelli metodlar, verilen bir örnek sistemi üzerinde çok sayıda değişken değerinden yola çıkarak söz konusu örnekleri çeşitli guruplara kümeleyerek sınıflandırabilir. PCA modeli, n sayıda örnek (gözlem) ve p sayıda değişkenin ölçüldüğü bir A veri matrisinin ($A_{n \times p}$) eşitlik 1 de verildiği gibi temel bileşenlerine ayrıştırılması ile kurulur.

$$A = T \times B + EA \quad (1)$$

Burada T, $n \times q$ skor matrisi ve B, $q \times p$ yükleme matrisleri olup q sayısı A matrisinin PCA çözümlemesi için gerekli minimum temel bileşen sayısına eşittir. T matrisinin her bir sütun vektörü ile B matrisinin her bir satır vektörü A matrisinin bir temel bileşeni olarak adlandırılır. Eşitlik 1'den de anlaşılacağı gibi, PCA'nın temel prensibi, A matrisini kendisinden daha küçük iki matrise dönüştürülmesi işlemidir. Bu işlem tekil değerli ayrışmaya (Singular Value Decomposition, SVD) dayalı olarak yapılmaktadır. Genellikle birinci ve ikinci temel bileşenler toplam varyansın büyük bir bölümünü kapsadığından T matrisindeki ilk iki sütun vektörünün (ilk iki temel bileşen, PC1 ve PC2) birbirine karşı grafiğe geçirilmesiyle, iki boyutlu düzlemde bütün değişkenlerin etkisi dahilinde örneklerin kümelendirilmesi mümkün olabilmektedir. Eğer sistemdeki değişkenlerin dağılımına göre, bir guruplandırma istenirse bu durumda B matrisinin ilk iki satır vektörü birbirine karşı grafiğe geçirilir.

Hiyerarşik kümeleme analizi (HCA), verilen bir örnek setindeki örnekleri ve o örnekleri tanımlayan değişkenleri sahip oldukları benzerliklere göre sınıflandıran bir metottur. HCA doğrudan orijinal değişkenlere uygulanabildiği gibi, değişken sayısının

çok fazla olması durumunda PCA analizinden gelen temel bileşenlere de uygulanabilmektedir. Kümeleme analizinde örnekler arasında uzaklık ölçütü olarak birçok metot bulunmakla beraber, Öklit uzaklığı ve Mahalanobis uzaklığı metotları en çok bilinenlerdir. Bu yöntemlerin herbirinin kendine has avantaj ve dezavantajları vardır. Örneğin, Mahalanobis metodunun kullanımı analizlenen veri setindeki değişken sayısının toplam örnek sayısından az olmasını gerektirir. Bu nedenle kullanılacak olan uzaklık ölçütü metodunun seçimi analizlenecek olan veri setine ve bu veri setinden elde edilecek bilginin türüne bağlılık gösterir. HCA analizinde uzaklık hesapları yapıldıktan sonra takip eden basamak uygun bir kümeleme algoritmasının seçimidir ve bu aşamada en yaygın olarak kullanılan metot Ward kümeleme metodudur. Bu çalışmada HCA analizi, PCA işleminden elde edilen temel bileşenlere uygulanmış olup; veri setindeki toplam varyansın %89.6'nın açıklandığı sayıdaki temel bileşen seçilerek Öklit uzaklığı ve Ward kümeleme algoritması kullanılarak gerçekleştirilecektir. Bu bağlamda, tütün türlerinin sınıflandırma ve kümeleme analizleri MINITAB İstatistiksel Yazılım programı ile gerçekleştirilmiştir.

İstatistiksel işlemler

Tüm istatistiksel hesaplamalar Minitab 16.2.1. istatistiksel yazılım (MINITAB Inc, 2010) kullanılarak yapılmıştır. Çalışmada *Nicotiana tabacum* L. örneklerinin kimyasal içeriklerinin sonuçları çoklu değişken analizi, temel bileşen analizi (PCA) ve hiyerarşik kümeleme analizi (HCA) teknikleri kullanılarak yapılmıştır.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Tütün sanayii, 150'yi aşkın ülkenin ekonomisine katkıda bulunmakta ve dünya çapında 100 milyon kişiye iş imkânı sağlamaktadır. Ülkemizde ise yaklaşık 500 bin kişiye istihdam sağlamaktadır. Bu rakam Türkiye nüfusunun yaklaşık % 0,7'sine tekabül etmektedir (Anonim, 2013). Tütün vergileri, dünyanın neredeyse tüm devletleri için başlıca gelir kaynaklarından biridir. Örneğin, Sri Lanka'da, kurumlar vergisi ve tüketim vergisi devlet gelirlerinin %10'unu oluşturmaktadır. Ülkemizde ÖTV gelirleri içinde tütün mamullerinin payı yüzde 27,8 olarak planlanmıştır (Vergi, 2014). Tütün ülkemiz tarımında her zaman önemli bir yere sahip olmuş üretimi, sanayi ve son yıllarda da tütün mamullerinin toplum sağlığı ve sosyal hayatındaki yeri ile gündemi meşgul etmiştir. Ülkemizde tütün tarımının başlangıcıyla birlikte tüm dünyada "Türk / Şark Tütünü" adıyla tanınır hale gelmesi, yetiştirilişi ile ilgili yapılan yasal düzenlemeler ve söz konusu faaliyetin sağladığı istihdam sayesinde tütün çoğu tarımsal ürün içerisinde özel bir yer edinmiştir.

Etanol ekstraların total fenolik içerikleri LC-MS/MS sonuçlarında olduğu gibi oldukça değiştiği görülmektedir. Ekstreler içinde BML1T (82,31±4,21 µgPEs/mg ekstrakt) en zengin MYEY (18,97±0,69 µgPEs/mg ekstrakt) ekstresinin ise en fakir olduğu tespit edilmiştir.

Tütün örneklerinin petrol eteri ekstralarının yağ asidi sonuçlarına ayrıntılı baktığımızda en zengin BML2Y, en fakir BML1T olduğu belirlenmiştir.

Tütün örneklerinin etanol ekstralarının fenolik ve nikotin içerik analiz sonuçlarına baktığımızda tüm örneklerin nikotin içeriğinin oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. Nikotin içeriği bakımından özellikle MTYE ve BML1Y oldukça zengin olduğu tespit edilmiştir.

Nikotin amit ve nikotinasit bakımından ise AAKT,MM1 ekstraların daha zengin olduğu belirlenmiştir.

Tütün örneklerinin fenolik içeriğinin kantitatif sonuçlarına baktığımızda hesperidin içeriğinin en fazla MYEY de olduğu belirlenmiştir.

Tütün örneklerinin fenolik içeriklerinin aktivite sonuçları incelendiğinde en fazla BML1T en az MYEY olduğu belirlenmiştir.

Çalışılan Tütün Tiplerinin Ekstre Verim Sonuçları ve Tartışma

Çalışılan örneklerin etanol ekstralarının % verimleri ve örneklerin kodları **Çizelge 4.1.**'de verilmiştir. Tüm örneklerin ekstre verimlerinin oldukça farklılık gösterdiği belirlenmiştir. En yüksek ekstre verimine MTYE (%13,8) ekstresinin sahip olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. *Nicotiana tabacum* türlerinin toplanma yerleri ve verimlerinin sonuçları

Toplanma Yeri	Kod	Verim	Toplanma Yeri	Kod	Verim
Bitlis	BML2T	3,2281	Kahramanmaraş	MTYE	13,8127
Adıyaman	AOT42T	1,3688	Mardin	MUY	12,0770
Adıyaman	AKT	1,9909	Kahramanmaraş	MM2	5,9242
Adıyaman	AAOTEG	2,7927	Adıyaman	ACT	0,9771
Adıyaman	ATT	1,4404	Bitlis	BML1Y	10,4128
Adıyaman	AYY	16,7320	Bitlis	BML1T	0,7062
Adıyaman	ACY	3,1527	Kahramanmaraş	MM3	6,7279
Adıyaman	AVY	1,2080	Adıyaman	AAKT	1,6434
Kahramanmaraş	MMT	2,5922	Adıyaman	AKHT	3,1237
Kahramanmaraş	MM1	8,9088	Adıyaman	AKY	10,1833
Bitlis	BBY	5,9190	Adıyaman	AAOTEG	1,3695
Bitlis	BBT	1,9403	Mardin	MTY	11,0592
Kahramanmaraş	MZKT	1,3030	Bitlis	BHYBY	10,0662
Adıyaman	AYCY	10,1769	Kahramanmaraş	MZY	7,6625
Adıyaman	AMT	1,3387	Mardin	MYEY	1,3610
Adıyaman	AYT	0,9071	Bitlis	BML2Y	20,3576
Adıyaman	ABT	1,8307	Mardin	MYY	13,48

Yapılan literatür taramalarında *Nicotiana tabacum* L. türü üzerine günümüze değin yapılmış herhangi bir % verim çalışması bulunmamaktadır. Bu bağlamda *Nicotiana tabacum* L. 'da % verim ile ilgili bulgularımız bir ilk olduğundan ve bu tez kapsamında bu verilere ilk kez değinilmiştir.

Petrol Eteri Ekstrelerin Yağ Asidi Analiz Sonuçları ve Tartışma

Tütün örneklerinin petrol eteri ekstralarının yağ asidi profili GC-MS ile belirlenmiştir. Bütün ekstraların yağ içeriklerinin % 100'ü olarak belirlenmiştir. (**Çizelge 4.2**). Sonuçlara genel olarak baktığımızda lokalite farklılığının yağ asidi profili üzerinde oldukça etkili olduğu söylenebilir. Sonuçlara ayrıntılı baktığımızda AAKT ekstresi için major bileşenin myristic acid (C14:0) (%39.41), AAOT19 ekstresi için myristoleic acid (C14:1) (%42.96), AAOTEG ekstresi için palmitic acid (C16:0) (%34.19), ABT ekstresi için myristic acid (C14:0) (%16.36), ACT ekstresi için palmitic acid (C16:0) (%19.49), ACY ekstresi için palmitic acid (C16:0) (%27.42), AKHT ekstresi için palmitic acid (C16:0) (%34.56), AKT ekstresi için linoleic acid (C18:2n6c) (%69,79), AKY ekstresi için nervonic acid (C24:1) (%43.22), AMT ekstresi

için palmitic acid (C16:0) (%53.23), AOT42 ekstresi için palmitic acid (C16:0) (%38.05), ATT ekstresi için palmitic acid (C16:0) (%47.87), AVY ekstresi için myristic acid (C14:0) (%39,58), AYC Y ekstresi için myristic acid (C14:0) (%51.63), AYT ekstresi için linoleic acid (C18:2n6c) (%77.26), AYY ekstresi için cis-11,14-eicosadienoic acid (C20:2) (%12.09), BBY ekstresi için palmitic acid (C16:0) (%45,64), BBY ekstresi için myristic acid (C14:0) (%33.38), BHYBY ekstresi için myristic acid (C14:0) (%28.47), BML1T ekstresi için tridecanoic acid (C13:0) (%50.10), BML1Y ekstresi için cis-13,16-docosadienoic acid (C22:2) (%20.62), BML2Y ekstresi için cis-13,16-docosadienoic acid (C22:2) (%26.64), BML2T ekstresi için myristic acid (C14:0) (%85.53), MM1 ekstresi için myristic acid (C14:0) (%23.43), MM2 ekstresi için pentadecanoic acid (C15:0) (%33.53), MM3 ekstresi için myristic acid (C14:0) (%26.01), MMT ekstresi için caproic acid (C6:0) (%47.27), MTY ekstresi için cis-13,16-docosadienoic acid (C22:2) (%29.44), MTYE ekstresi için cis-13,16-docosadienoic acid (C22:2) (%30.37), MUY ekstresi için cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid (C22:6n3) (%28.24), MYEY ekstresi için pentadecanoic acid (C15:0) (%70.83), MYY ekstresi için myristic acid (C14:0) (%68.59), MZKT ekstresi için cis-13,16-docosadienoic acid (C22:2) (%25.52) ve MZY ekstresi için cis-13,16-docosadienoic acid (C22:2) (%36.11) olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. : Petrol eteri ekstralarının yağ asidi içerikleri

#	Yağ asidi	R.T.	AAKT	AAOT19	AAOTEG	ABT	ACT	ACY	AKHT	AKT
1	butyric acid (C4:0)	9939	5,96	-	-	-	-	-	0,19	-
2	caproic acid (C6:0)	10518	20,11	8,28	-	-	1,81	1,99	4,63	0,52
3	caprylic acid (C8:0)	11569	3,50	6,20	-	-	-	0,52	1,62	0,20
4	capric acid (C10:0)	13378	1,33	-	-	-	-	-	0,31	0,21
5	undecanoic acid (C11:0)	14629	-	-	1,43	-	-	0,85	-	-
7	tridecanoic acid (C13:0)	17757	-	10,34	1,21	-	1,98	0,66	0,15	-
8	myristic acid (C14:0)	19543	39,41	-	9,56	16,36	11,55	3,26	0,22	-
9	myristoleic acid (C14:1)	21118	-	42,96	-	-	-	0,42	-	-
10	pentadecanoic acid (C15:0)	21387	18,64	-	3,74	4,32	5,56	0,80	0,79	-
12	palmitic acid (C16:0)	23260	2,46	8,92	34,19	13,39	19,49	27,42	34,56	-
13	palmitoleic acid (C16:1)	24581	-	-	-	-	-	0,34	0,21	0,25
14	heptadecanoic acid (C17:0)	25086	-	-	-	-	-	0,36	0,39	-
15	cis-10-heptadecanoic acid (C17:1)	26390	-	-	-	1,57	-	-	0,17	-
16	stearic acid (C18:0)	26889	-	-	11,72	5,06	10,25	9,70	12,80	3,91
17	elaïdic acid (C18:1n9t)	27647	-	-	-	-	-	1,59	3,07	-
18	oleic acid (C18:1n9c)	28005	-	-	18,87	3,90	12,58	23,58	23,44	11,01
19	linolelaidic acid (C18:2n6t)	28875	-	-	2,19	-	-	2,65	-	-
20	linoleic acid (C18:2n6c)	29662	2,05	-	5,66	14,24	5,66	10,28	3,17	69,79
21	arachidic acid (C20:0)	30320	-	-	1,16	-	-	1,16	0,73	0,42
22	gama-linolenic acid (C18:3n6)	30904	-	-	-	-	-	0,36	-	-
23	cis-11-eicosenoic acid (C20:1)	31372	-	-	-	-	-	-	0,23	-
24	linolenic acid (C18:3n6)	31594	-	-	-	-	-	-	-	1,83
25	heneicosanoic acid (C21:0)	31989	-	-	-	1,98	2,02	0,67	-	0,39
26	cis-11,14-eicosadienoic acid (C20:2)	33025	-	-	1,42	7,74	5,56	2,42	-	0,68
27	behenic acid (C22:0)	33679	-	-	-	-	2,96	1,19	0,32	0,52
28	cis-8,11,14-eicosatrienoic acid (C20:3n6)	34268	-	-	-	1,94	-	0,48	-	0,19
31	arachidonic acid (C20:4n6)	35262	-	-	-	4,67	-	-	-	-
32	tricosanoic acid (C23:0)	35341	-	-	-	-	3,77	-	0,14	0,66
33	cis-13,16-docosadienoic acid (C22:2)	36401	1,64	23,30	2,01	14,61	12,34	5,14	0,24	3,66
34	lignoceric acid (C24:0)	37090	-	-	-	2,23	-	0,31	-	0,20
35	cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid(C20:5n3) EPA	37393	-	-	6,85	5,57	2,08	1,21	-	0,44
36	nervonic acid (C24:1)	38215	3,28	-	-	2,43	2,38	0,53	0,15	0,21
37	cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid (C22:6n3) DHA	42689	1,62	-	-	-	-	0,44	0,18	0,24
TOPLAM										

Çizelge 4.2.' nin devamı

#	Yağ asidi	R.T.	AKY	AMT	AOT42	ATT	AVY	AYCY	AYT	AYY	BBT
1	butyric acid (C4:0)	9939	-	0,22	-	-	-	-	0,23	2,18	1,25
2	caproic acid (C6:0)	10518	0,85	5,70	-	4,49	-	6,06	-	0,54	-
3	caprylic acid (C8:0)	11569	-	3,24	-	0,26	3,24	3,96	0,06	0,77	0,14
4	capric acid (C10:0)	13378	1,27	0,37	-	0,52	1,16	1,67	-	1,25	-
5	undecanoic acid (C11:0)	14629	0,97	0,35	-	0,27	-	-	0,15	0,91	0,70
6	lauric acid (C12:0)	16103	0,90	-	-	-	-	-	0,08	0,74	1,46
7	tridecanoic acid (C13:0)	17757	0,86	-	-	0,32	-	-	0,11	0,92	0,75
8	myristic acid (C14:0)	19543	12,05	-	0,43	1,01	39,58	51,63	3,06	2,04	1,30
9	myristoleic acid (C14:1)	21118	0,93	-	-	0,28	-	-	0,10	0,65	0,52
10	pentadecanoic acid (C15:0)	21387	3,63	-	3,12	0,25	23,68	-	1,61	5,37	5,19
11	cis-10-pentadecanoic acid (C15:1)	22985	0,87	-	-	-	-	-	-	-	-
12	palmitic acid (C16:0)	23260	0,86	53,23	38,05	47,87	9,16	-	9,33	6,64	45,64
13	palmitoleic acid (C16:1)	24581	-	-	-	0,13	-	-	0,05	-	0,52
14	heptadecanoic acid (C17:0)	25086	-	-	0,49	-	-	-	0,06	2,96	0,69
15	cis-10-heptadecanoic acid (C17:1)	26390	3,44	-	0,32	-	-	1,80	0,07	-	-
16	stearic acid (C18:0)	26889	-	23,10	14,91	23,30	2,03	-	4,58	2,91	15,02
17	elaidic acid (C18:1n9t)	27647	1,47	3,37	3,19	-	-	-	0,11	1,06	0,69
18	oleic acid (C18:1n9c)	28005	2,25	-	33,13	1,37	3,24	-	-	16,73	-
19	linolelaidic acid (C18:2n6t)	28875	1,02	-	-	-	-	-	-	-	-
20	linoleic acid (C18:2n6c)	29662	1,06	-	-	4,30	5,39	5,71	77,26	11,39	-
21	arachidic acid (C20:0)	30320	1,62	1,83	-	0,19	-	-	0,42	0,86	2,33
22	gama-linolenic acid (C18:3n6)	30904	-	-	-	0,89	12,51	-	1,42	-	0,74
23	cis-11-eicosenoic acid (C20:1)	31372	-	-	-	0,48	-	-	-	1,26	-
24	linolenic acid (C18:3n6)	31594	-	-	-	-	-	-	-	0,69	-
25	heneicosanoic acid (C21:0)	31989	6,86	-	-	1,58	-	2,91	0,39	5,12	1,02
26	cis-11,14-eicosadienoic acid (C20:2)	33025	16,48	1,68	0,55	5,52	-	6,41	0,11	12,09	0,62
27	behenic acid (C22:0)	33679	-	1,36	0,45	-	-	-	-	1,15	0,38
28	cis-8,11,14-eicosatrienoic acid (C20:3n6)	34268	2,57	0,42	-	1,08	-	4,17	0,20	2,74	0,64
29	erucic acid (C22:1n9)	34723	-	-	-	-	-	-	0,05	-	-
31	arachidonic acid (C20:4n6)	35262	0,83	-	-	-	-	-	0,04	0,70	-
32	tricosanoic acid (C23:0)	35341	10,97	1,09	0,28	-	-	4,46	0,03	10,91	2,03
33	cis-13,16-docosadienoic acid (C22:2)	36401	12,97	2,76	1,18	0,57	-	9,70	0,05	-	5,75
34	lignoceric acid (C24:0)	37090	-	-	-	0,80	-	-	0,12	-	0,99
35	cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid(C20:5n3) EPA	37393	1,14	0,91	0,37	2,60	-	-	0,04	6,57	2,20
36	nervonic acid (C24:1)	38215	43222,00	0,38	-	1,04	-	1,52	0,24	0,14	0,71
37	cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid (C22:6n3) DHA	42689	-	-	-	0,23	-	-	-	10,70	0,59
TOPLAM											

Çizelge 4.2'nin devamı

#	Yağ asidi	R.T.	BBY	BHYBY	BML1T	BML1Y	BML2Y	BML2T	MM1	MM2	MM3
2	caproic acid (C6:0)	10518	5,25	5,36	49,90	5,42	4,11	6,95	5,30	3,89	4,45
3	caprylic acid (C8:0)	11569	2,24	1,98	-	-	1,24	5,16	2,12	1,19	2,01
4	capric acid (C10:0)	13378	-	-	-	2,42	2,02	-	0,95	-	-
5	undecanoic acid (C11:0)	14629	-	-	-	-	1,57	-	-	-	-
6	lauric acid (C12:0)	16103	17,54	14,99	-	16,54	1,37	-	8,30	9,15	6,35
7	tridecanoic acid (C13:0)	17757	-	-	50,10	-	1,75	-	-	-	-
8	myristic acid (C14:0)	19543	33,38	28,47	-	2,96	1,58	85,53	23,49	14,05	26,01
9	myristoleic acid (C14:1)	21118	-	-	-	-	1,64	-	-	-	-
10	pentadecanoic acid (C15:0)	21387	15,39	16,81	-	6,86	3,95	-	22,61	33,53	23,62
11	cis-10-pentadecanoic acid (C15:1)	22985	-	-	-	-	-	-	-	-	4,05
12	palmitic acid (C16:0)	23260	-	3,10	-	14,33	10,90	-	3,98	2,86	3,99
18	oleic acid (C18:1n9c)	28005	-	-	-	4,68	3,94	-	-	-	6,73
19	linolelaidic acid (C18:2n6t)	28875	-	1,54	-	-	-	-	-	-	-
20	linoleic acid (C18:2n6c)	29662	2,04	1,80	-	-	5,87	-	2,68	1,59	2,15
21	arachidic acid (C20:0)	30320	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	gama-linolenic acid (C18:3n6)	30904	-	2,52	-	5,76	1,82	-	7,36	6,88	5,98
23	cis-11-eicosenoic acid (C20:1)	31372	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	linolenic acid (C18:3n6)	31594	-	-	-	-	4,27	-	5,63	3,70	6,18
25	heneicosanoic acid (C21:0)	31989	-	-	-	-	-	-	3,92	3,71	2,70
26	cis-11,14-eicosadienoic acid (C20:2)	33025	3,24	2,51	-	4,12	4,76	-	5,28	4,81	1,66
27	behenic acid (C22:0)	33679	-	-	-	2,65	2,05	-	0,82	0,71	-
28	cis-8,11,14-eicosatrienoic acid (C20:3n6)	34268	1,87	-	-	-	2,42	-	-	0,90	1,51
29	erucic acid (C22:1n9)	34723	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	cis-11,14,17-eicosatrienoic acid (C20:3n3)	34959	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	arachidonic acid (C20:4n6)	35262	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	tricosanoic acid (C23:0)	35341	3,92	3,74	-	5,86	7,23	-	4,68	4,20	-
33	cis-13,16-docosadienoic acid (C22:2)	36401	10,86	12,73	-	20,62	26,64	7,52	1,02	7,95	-
34	lignoceric acid (C24:0)	37090	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid(C20:5n3) EPA	37393	2,39	1,59	-	4,49	4,33	-	-	-	-
36	nervonic aid (C24:1)	38215	1,89	2,87	-	3,30	4,57	-	0,91	0,89	1,36
37	cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid (C22:6n3) DHA	42689	-	-	-	-	-	-	0,93	-	1,26
TOPLAM											

Çizelge 4.2.'nin devamı

#	Yağ asidi	R.T.	MMT	MTY	MTYE	MUY	MYEY	MYY	MZKT	MZY
1	butyric acid (C4:0)	9939	3,41	-	1,79	2,61	-	-	-	-
2	caproic acid (C6:0)	10518	47,27	9,39	2,03	15,88	2,97	7,48	4,61	6,64
3	caprylic acid (C8:0)	11569	0,07	6,71	0,46	2,04	1,11	5,19	1,67	2,63
4	capric acid (C10:0)	13378	0,13	2,09	-	0,84	-	-	-	-
5	undecanoic acid (C11:0)	14629	0,09	-	0,44	-	-	-	-	-
6	lauric acid (C12:0)	16103	0,06	10,08	9,23	4,68	0,71	-	9,89	7,12
7	tridecanoic acid (C13:0)	17757	0,08	-	0,40	-	-	-	-	-
8	myristic acid (C14:0)	19543	-	2,18	-	23,03	13,40	68,59	2,52	25,60
9	myristoleic acid (C14:1)	21118	0,06	-	0,27	-	-	-	-	-
10	pentadecanoic acid (C15:0)	21387	0,79	-	0,54	15,99	70,83	-	-	31,11
11	cis-10-pentadecanoic acid (C15:1)	22985	-	-	-	2,91	-	-	-	-
12	palmitic acid (C16:0)	23260	5,81	3,19	10,51	-	1,86	2,40	3,72	2,77
13	palmitoleic acid (C16:1)	24581	-	-	-	1,10	-	-	-	-
14	heptadecanoic acid (C17:0)	25086	0,11	-	0,44	1,16	-	-	-	-
15	cis-10-heptadecanoic acid (C17:1)	26390	0,06	2,27	1,95	-	-	-	-	-
16	stearic acid (C18:0)	26889	1,88	-	1,81	-	-	-	-	-
17	elaïdic acid (C18:1n9t)	27647	-	-	10,71	-	-	-	-	-
18	oleic acid (C18:1n9c)	28005	-	-	2,09	0,27	-	1,91	1,24	-
19	linolelaïdic acid (C18:2n6t)	28875	-	2,16	-	-	-	-	7,58	-
20	linoleic acid (C18:2n6c)	29662	25,16	-	5,10	3,19	0,97	-	3,59	2,19
21	arachidic acid (C20:0)	30320	-	-	0,77	-	-	-	-	-
22	gama-linolenic acid (C18:3n6)	30904	0,17	3,15	1,10	3,52	2,11	-	4,78	2,96
23	cis-11-eicosenoic acid (C20:1)	31372	-	-	-	-	0,60	-	-	-
24	linolenic acid (C18:3n6)	31594	0,57	-	7,84	11,06	2,64	-	1,17	5,06
25	heneicosanoic acid (C21:0)	31989	0,88	-	1,61	2,03	-	-	-	2,42
26	cis-11,14-eicosadienoic acid (C20:2)	33025	-	5,84	9,08	2,80	-	2,57	5,80	4,66
27	behenic acid (C22:0)	33679	0,72	-	0,36	-	-	-	2,66	-
28	cis-8,11,14-eicosatrienoic acid (C20:3n6)	34268	0,53	2,38	3,19	0,96	-	-	2,09	1,46
29	erucic acid (C22:1n9)	34723	-	-	-	-	-	-	-	-
30	cis-11,14,17-eicosatrienoic acid (C20:3n3)	34959	-	-	-	-	-	-	-	-
31	arachidonic acid (C20:4n6)	35262	-	-	-	-	-	-	-	-
32	tricosanoic acid (C23:0)	35341	1,14	6,95	-	3,13	0,66	2,11	5,91	3,75
33	cis-13,16-docosadienoic acid (C22:2)	36401	-	29,44	30,37	0,32	0,66	2,15	25,52	36,11
34	lignoceric acid (C24:0)	37090	0,23	-	-	-	-	-	1,21	-
35	cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid(C20:5n3) EPA	37393	0,27	8,53	1,04	-	-	5,37	8,93	-
36	nervonic aid (C24:1)	38215	0,34	5,64	6,23	1,02	-	2,24	5,77	-
37	cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid (C22:6n3) DHA	42689	0,06	-	0,64	28,24	1,48	-	1,34	1,48

TOPLAM

Yağ asidi profilinin araştırıldığı bir çalışmada *Nicotiana tabacum* L. tohumlarında çalışma bulgularımıza paralel olarak, Laurik (C12: 0), miristik (C14: 0), palmitik (C16: 0), palmitoleik (C16: 1), stearik (C18: 0), oleik (C18: 1), linoleik (C18: 2), linolenik (C18: 3) ve eikosanoik (arachidic) (C20: 0) asit gibi çeşitli doymuş ve doymamış yağ asitlerini gözlemlemiştir (Majdi ve ark. 2012). Yine başka bir çalışmada Koiwai ve ark. (1982), 56 adet tütün tohumu ile 62 adet tütün yaprağının yağ asidi profile sonucunda hem tohum hem de yapraklarında linoleate yağ asidinin, majör yağ asidi olduğunu rapor etmişlerdir. Ancak çalışma bulgularımızda ifade edildiği üzere major yağ asidinin, çalışılan tütün genotiplerine ve toplandıkları lokalitelerin farklılığına bağlı olarak değişkenlik gösterdiği görülmüştür.

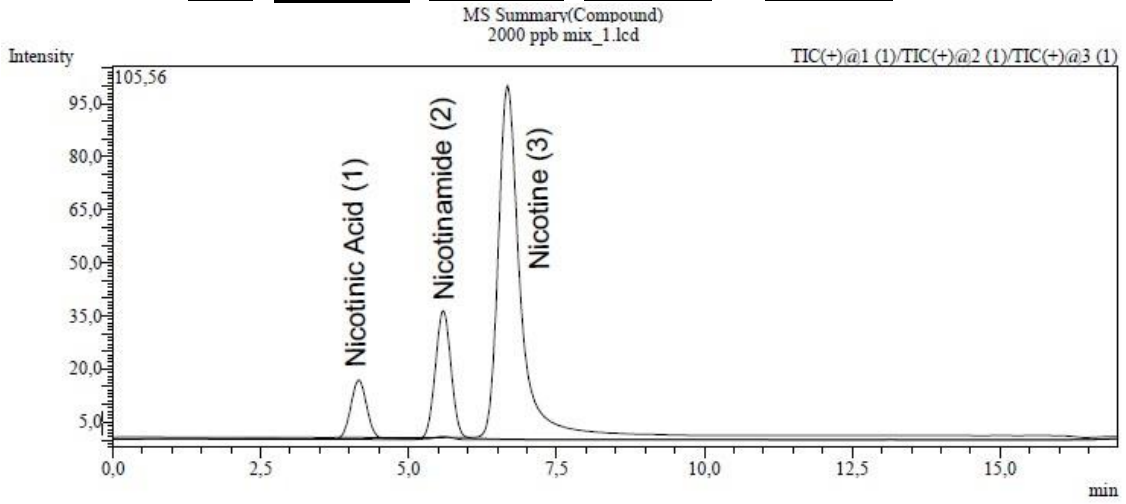
Etanol Ekstrelerin Fenolik ve Nikotin İçerik Analiz Sonuçları

Tütün örneklerinin etanol ekstralarının fenolik ve nikotin profili LC-MS/MS ile belirlenmiştir (**Çizelge 4.3.** ve **Çizelge 4.4.**) (Yılmaz, 2015; Yılmaz ve ark., 2018). Sonuçlara genel olarak baktığımızda lokalite farklılığının yine fenolik içerik ve nikotin içeriği üzerinde oldukça etkili olduğu söylenebilir. Tüm örneklerin Nikotin, Nikotin amit ve Nikotinic asit içeriği LC-MS/MS'te geliştirilen ve valide edilen metot ile belirlenmiştir (**Çizelge 4.3.** ve **Şekil 4.1.**). Tüm örneklerin özellikle nikotin içeriğinin oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. Nikotin içeriği bakımından özellikle Kahramanmaraş'tan toplanan MTYE (356574,55 µg analit/g ekstre) ve Bitlis'ten toplanan BML1Y örneğinin (369423,84 µg analit/g ekstre) oldukça zengin olduğu tespit edilmiştir. Nikotin amit ve nikotinic asit bakımından ise sırasıyla AAKT (599,06 µg analit/g ekstre) ve MM1 (12409,25 µg analit/g ekstre) ekstralarının daha zengin olduğu belirlenmiştir.

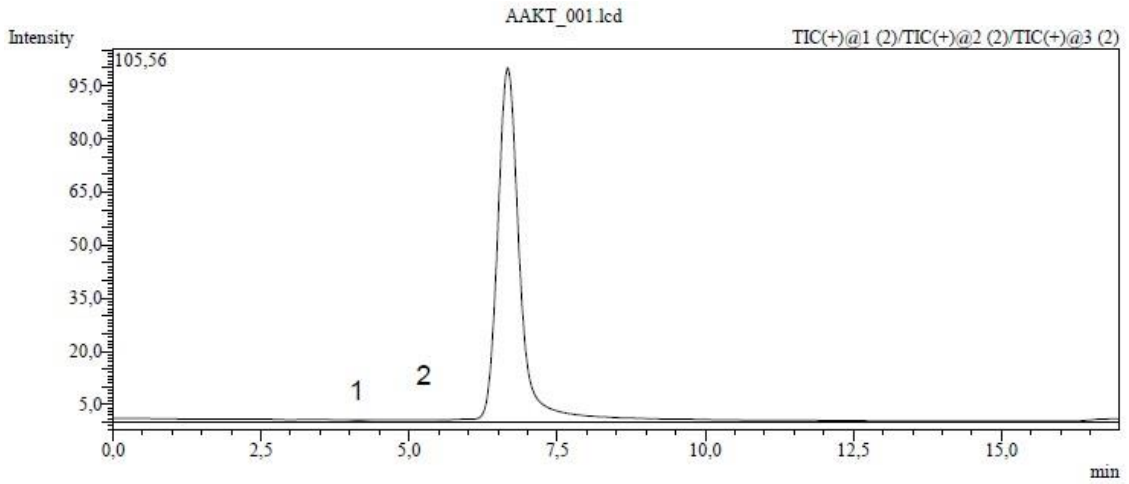
Çizelge 4.3. Tütün örneklerinin nikotin içeriği kantitatif sonuçları (µg analit / g ekstre)

#	Örnek	Nikotin	Nikotin amit	Nikotinic asit
1	MM3	221300,61	212,63	10141,36
2	BML2T	90562,9	263,95	2426,04
3	MTYE	356574,55	287,1	20475,23
4	MUY	79283,51	336,35	13041,97
5	AKY	69969,8	246,07	2718,44
6	AYCY	262012,12	135,63	1110,04
7	BBY	180967,69	75,68	3332,43
8	BML1T	87172,87	187,31	2058,71
9	MM2	240726,05	329,74	9768,5
10	AYY	163574,28	312,93	1351,71
11	BHYBY	176440,28	175,42	1649,23
12	BML2Y	75189,64	69,11	247,13
13	MMT	190735,86	484,78	7928,93
14	MYY	113304,51	238,53	10433,09
15	AAKT	163245,42	599,06	3547,37
16	ACY	111364,41	284,71	3339,73
17	BML1Y	369423,84	192,52	1526,09
18	MZY	320109,42	231,82	10857,7

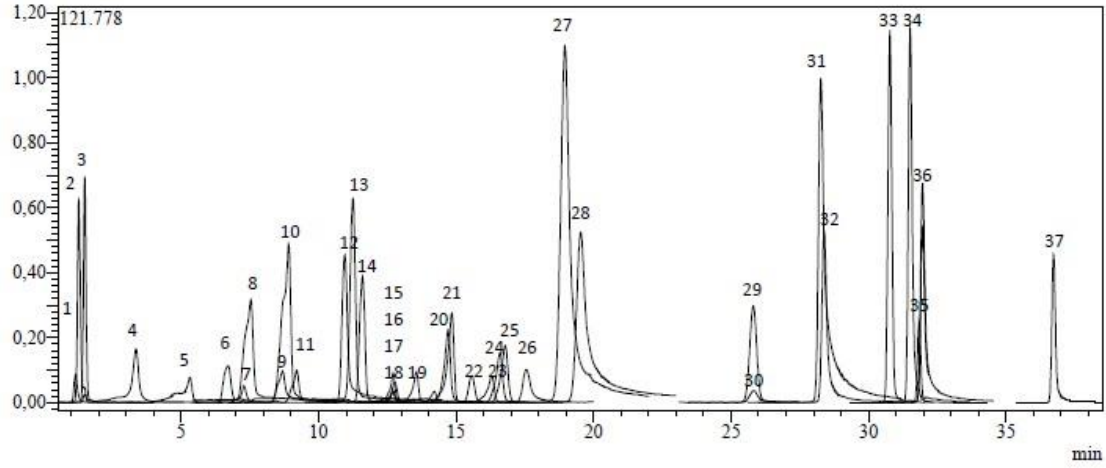
19	MM1	214752,27	346,19	12409,25
20	AKHT	5462,81	97,43	369,42
21	MTY	234,89	30,88	27,9
22	AAOTEG	2061,36	37,02	186,15
23	AKT	35984,5	328,73	2035,77
24	ABT	17130,61	499,36	1301,18
25	AOT42	12663,42	93,42	422,26
26	MYEY	18716,64	56,35	4326,81
27	MZKT	1621,36	182,8	697,1
28	ACT	55054,15	281,11	1198,33
29	AMT	9959,73	102	631,28
30	AYT	23562,54	230,25	764,94
31	AAOT19	7991,49	76,21	314,46
32	ATT	2437,38	71,7	159,35
33	AVY	21502,36	16,55	155,61
34	BBT	55761,82	180,04	1045,98



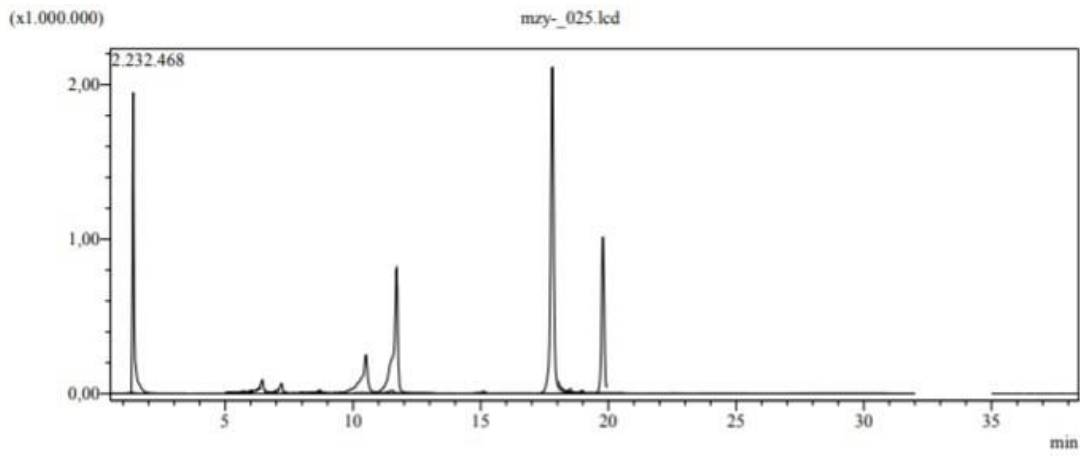
Şekil 4.1. Nikotin, nikotinic asit ve nikotinamid standartlarına ait LC-MS/MS kromatogramı



Şekil 4.2. *Nicotiana tabacum* AAKT Ekstresinin LC-MS/MS Kromatogramı



Şekil 4.3. Fenolik Standart Bileşenlere Ait LC-MS/MS Kromatogramı



Şekil 4.4. *N. tabacum* MZY 'nin ekstresinin fenolik içeriğine ait LC-MS/MS kromatogramı

Tüm ekstraller daha önce valide edilen ve 37 bileşenden oluşan fenolik LC-MS/MS metoduna göre taranmıştır (Çizelge 4.4., Şekil 4.3 ve Şekil 4.4) (Yılmaz, 2015; Yılmaz ve ark., 2018). Tüm örneklerimizde majör bileşenler olarak hesperidin, rutin, malik ve klojenik asitler olduğu tespit edilmiştir. Hesperidin bakımından BML1Y (124289,5 µg analit/g ekstre), klorojenik asit bakımından MYEY (5292,26 µg analit/g ekstre), malik asit bakımından MTYE (23456,59 µg analit/g ekstre) ve rutin bakımından BML1Y (16118,46 µg analit/g ekstre) ekstralarının daha zengin olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.4. Tütün örneklerinin fenolik içeriğinin kantitatif sonuçları (µg analit / g ekstre)

Analyte	Kumarin	Hesperidin	p-Kumarik asit	o-kumarik asit	Gallik asit	Kafeik asit	Vanilik asit	Salisilik asit	Kinik asit	4-OH-benzoik asit	Ferulik asit	Klorojenik asit
AKY	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1,39	N.D.	N.D.	104,27	2,98	1,6	186,3
AYCY	N.D.	25909,9	17,48	N.D.	N.D.	7,78	18,02	N.D.	76,36	3,06	7,18	2093,64
MM1	N.D.	15745,38	3,27	N.D.	N.D.	1,71	51,71	N.D.	78,97	2,43	8,55	678,53
MYY	N.D.	28732,4	44,94	N.D.	N.D.	16,74	86,81	N.D.	82,02	14,57	41,31	1823,88
MTY	N.D.	265,44	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1,46	N.D.	N.D.
ACT	N.D.	27811,23	23,36	N.D.	N.D.	3,16	N.D.	N.D.	143,17	50,03	45,16	1056,01
BHYBY	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	217,32	16,53	25,65	3611,74
MTYE	N.D.	53425,66	163,47	N.D.	18,43	21,76	566,82	N.D.	188,09	69,35	51,79	2773,09
BBT	N.D.	N.D.	55,7	N.D.	N.D.	7,42	114,29	N.D.	50,84	105,2	67,81	373,22
BML2Y	N.D.	63386,73	16,32	N.D.	N.D.	6,8	N.D.	N.D.	17,19	2,34	24,6	1231,38
AYT	N.D.	43034,23	41,72	N.D.	N.D.	9,08	160,74	N.D.	210,73	59,72	52,66	705,65
AKHT	N.D.	1261,93	1,79	N.D.	N.D.	0,42	N.D.	N.D.	6,22	2,26	1,2	13,75
ACY	N.D.	88837,43	120,37	N.D.	N.D.	6,71	92,92	N.D.	222,73	125,71	110,53	1368,08
AAOT19	N.D.	479,94	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	37,4	N.D.	4,13	1,08	2,79	10,06
MYEY	N.D.	94141,11	80,73	N.D.	N.D.	30,06	342,27	N.D.	181,7	89,43	114,15	5292,26
MZKT	N.D.	364,59	2,72	N.D.	N.D.	N.D.	14,72	N.D.	1,87	15,96	N.D.	N.D.
ABT	N.D.	23795,92	32,02	N.D.	N.D.	6,69	180,17	N.D.	38,1	87,78	50,54	328,11
BML1Y	N.D.	124289,5	22,5	N.D.	N.D.	9,06	15,84	N.D.	42,12	8,33	43,3	3786,25
MUY	N.D.	37634,01	7,27	N.D.	N.D.	6,84	43,84	N.D.	340,09	2,4	1,14	1724,35
AMT	N.D.	N.D.	6,53	N.D.	N.D.	3,92	13,4	N.D.	30,12	25,42	1,75	36,4
AOT42	N.D.	N.D.	7,46	N.D.	N.D.	0,25	131,6	N.D.	35,6	27,75	1,14	84,31
MM3	N.D.	19082,88	10,13	N.D.	N.D.	3,38	80,18	N.D.	73,04	2,99	12,3	485,61
AAKT	N.D.	N.D.	9,91	N.D.	N.D.	14,17	146,76	N.D.	136,18	53,44	29,49	569,43
AVY	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1,06	1,36	2,16	16,71
MM2	N.D.	N.D.	17,22	N.D.	N.D.	6,86	66,12	N.D.	56,31	31,86	35,22	72,39
MZY	N.D.	N.D.	90,69	N.D.	N.D.	19,48	307,47	N.D.	225,53	48,18	37,7	4597,34
AAOTEG	N.D.	N.D.	3,78	N.D.	N.D.	0,71	37,86	N.D.	1,18	15,44	N.D.	2,81
BBY	N.D.	N.D.	117,25	N.D.	N.D.	112,22	109,83	N.D.	458,15	29,53	81,01	2433,13
ATT	N.D.	N.D.	3,35	N.D.	N.D.	N.D.	40,93	N.D.	20,93	16,97	N.D.	63,04
AKT	N.D.	N.D.	9,37	N.D.	N.D.	N.D.	139,85	N.D.	168,99	96,77	50,71	15,53
BLML1T	N.D.	N.D.	15,26	N.D.	N.D.	N.D.	79,22	N.D.	335,27	49,47	1,96	807,1
MMT	N.D.	N.D.	4,56	N.D.	N.D.	N.D.	3,25	N.D.	76,29	1,1	2,99	653,99
AYY	N.D.	N.D.	17,29	N.D.	N.D.	7,99	4,23	N.D.	320,37	N.D.	19,34	3095
BML2T	N.D.	N.D.	32,75	N.D.	N.D.	8,51	134,1	N.D.	377,02	84,49	37,72	1121,98

Çizelge 4.4. 'ün Devamı

Analyte	Sinnamik						Sirinjik					
	Rozmarinik asit	Protokatesik asit	asit	Sinapinik asit	Fumarik asit	Vanilin	Pirokatekol	Malik asit	asit	Hesperetin	Naringenin	Rutin
AKY	N.D.	11,4	10,07	N.D.	4,07	2,86	N.D.	2342,84	2,54	1,57	N.D.	N.D.
AYCY	N.D.	4,27	4,57	N.D.	3,56	1,87	N.D.	3558,68	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
MM1	N.D.	1,21	5,04	N.D.	5,51	N.D.	N.D.	13172,8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
MYY	N.D.	9,04	6,89	5,66	7,44	1,12	N.D.	7974,51	1,61	N.D.	N.D.	4560,25
MTY	N.D.	N.D.	8,44	N.D.	2,29	N.D.	N.D.	3,51	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ACT	N.D.	6,99	2,93	5,93	5,35	26,9	N.D.	3478,77	N.D.	N.D.	N.D.	4173,79
BHYBY	N.D.	5,47	3,71	0,31	4,41	N.D.	N.D.	5851,65	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
MTYE	N.D.	29,12	2,99	0,93	14,16	2,62	N.D.	23456,59	3,84	N.D.	N.D.	N.D.
BBT	N.D.	12,88	3,32	11,59	4,96	38,38	N.D.	1195	1,3	N.D.	13,57	4994,9
BML2Y	N.D.	N.D.	3,36	12,71	N.D.	0,47	N.D.	786,93	1,3	N.D.	N.D.	8703,06
AYT	N.D.	22,84	8,96	24,44	4,12	93,82	N.D.	1087,5	1,62	N.D.	3,47	6230,37
AKHT	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1,02	32,6	N.D.	51,14	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ACY	N.D.	17,45	4,68	6,11	6,78	2,07	3,34	5511,3	3,65	N.D.	27,66	14655,52
AAOT19	N.D.	0,15	4,39	N.D.	0,94	14,41	N.D.	42,42	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
MYEY	N.D.	20,97	5,72	1,77	12,36	1,56	N.D.	16578,85	10,94	N.D.	1,83	7067,44
MZKT	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2,27	11,02	N.D.	10,71	N.D.	N.D.	N.D.	17,42
ABT	N.D.	17,17	N.D.	4,26	3,36	94,78	N.D.	656,39	3,69	N.D.	6,37	3079,99
BML1Y	N.D.	8,14	N.D.	79,43	1,97	2,54	N.D.	1749,86	N.D.	N.D.	2,33	16118,46
MUY	N.D.	2,9	2,8	1,85	13,18	2,72	N.D.	16898,04	N.D.	N.D.	N.D.	5146,76
AMT	N.D.	4,71	4,19	2,67	N.D.	29,8	N.D.	35,81	N.D.	N.D.	N.D.	282,09
AOT42	N.D.	5,88	4,45	1,78	4,18	80,69	N.D.	671,15	N.D.	N.D.	2	2168,89
MM3	N.D.	2,91	N.D.	1,17	10,05	3,45	N.D.	10585,67	N.D.	N.D.	N.D.	2593,86
AAKT	N.D.	14,29	N.D.	3,55	4,28	50,48	N.D.	1724,89	N.D.	N.D.	5,79	1099,29
AVY	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,95	2,87	N.D.	193,22	N.D.	N.D.	N.D.	56,28
MM2	N.D.	8,66	N.D.	2,71	7,56	7,46	N.D.	5546,57	N.D.	N.D.	N.D.	2014,03
MZY	N.D.	16,75	4,31	27,03	7,13	2,98	N.D.	21701,21	1,54	N.D.	1,11	13159,48
AAOTEG	N.D.	N.D.	N.D.	1,94	N.D.	42,19	N.D.	0,35	N.D.	N.D.	N.D.	159,2
BBY	N.D.	22,77	N.D.	3,02	8,05	N.D.	N.D.	7885,09	N.D.	N.D.	N.D.	5979,07
ATT	N.D.	N.D.	N.D.	1,17	1,66	1,46	N.D.	163,79	N.D.	N.D.	1,28	583,36
AKT	N.D.	7,38	3,07	1,47	1,38	7,73	N.D.	3032,54	N.D.	N.D.	3,88	246,75
BLML1T	N.D.	7,44	N.D.	1,72	3,83	17,88	N.D.	4155,17	N.D.	N.D.	3,13	3262,02
MMT	N.D.	N.D.	5,24	0,43	8,63	3,64	2,5	10763,87	1,4	N.D.	N.D.	2965,37
AYY	N.D.	4,44	N.D.	1,48	2,63	N.D.	N.D.	5165,59	N.D.	N.D.	N.D.	4188,98
BML2T	N.D.	19,73	4,6	2,81	4,24	48,52	3,64	2915,86	1,69	N.D.	8,66	4924,42

Çizelge4.4.'ün Devamı

Analyte	Kersetin	Kersitrin	Apigenin	Krisin	Likiritigenin	İzokersitrin	Apigetrin	Roifolin	Nikotiflorin	Fisetin	Luteolin	Mirisetin	Kamferol 1
AKY	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
AYCY	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1,71	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
MM1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1,04	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
MYY	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	58,02	N.D.	N.D.	30,91	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
MTY	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ACT	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	63,37	N.D.	N.D.	100,26	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
BHYBY	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
MTYE	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
BBT	1,35	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	70,19	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
BML2Y	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	29,72	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
AYT	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	62,96	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
AKHT	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ACY	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	194,16	N.D.	N.D.	550,45	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
AAOT19	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
MYEY	1,72	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
MZKT	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ABT	5,66	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	57,91	N.D.	N.D.	280,17	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
BML1Y	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
MUY	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	30,47	N.D.	N.D.	4,76	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
AMT	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	5,78	N.D.	N.D.	10,5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
AOT42	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	23,26	N.D.	N.D.	2091,45	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
MM3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	15,65	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
AAKT	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	22,84	N.D.	N.D.	1447,09	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
AVY	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,34	N.D.	N.D.	10,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
MM2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	21,2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
MZY	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	118,3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
AAOTEG	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3,04	N.D.	N.D.	161,55	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
BBY	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	46,87	N.D.	N.D.	3454,94	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ATT	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	6,36	N.D.	N.D.	382,68	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
AKT	1,89	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	5,12	N.D.	N.D.	378,87	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
BLML1T	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	31,65	N.D.	N.D.	3023,02	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
MMT	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	14,58	N.D.	N.D.	259,68	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
AYY	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	25,71	N.D.	N.D.	1569,38	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
BML2T	12,66	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	49,66	N.D.	N.D.	5883,91	N.D.	N.D.	N.D.	1,72

Çalışma bulgularımıza benzer şekilde klorojenik asit ve rutin gibi fenolik bileşiklerinin *Nicotiana tabacum* L. türünde major bileşen olduğu yönünde çalışmalar mevcuttur. Tütün bitkisinin *Rhodococcus fascians* ile enfekte edilmesi üzerine yapılan bir araştırmada, hem kontrol hem de enfekte olmuş bitkilerde klorojenik asitin major bileşen olarak bulunduğu (Vereecke ve ark., 1997), yine kurutulmuş tütün atığının metanol ekstraktında 15 polifenol bileşiğin tanımlandığı ancak klorojenik asit ve rutin bileşiklerinin yine major bileşen olarak yer aldığı bildirilmiştir (Jun ve ark., 2010). Farklı yükseklik (70 m- 2100 m) ve enlemlerin (23.26 ° - 34.61 ° kuzey) etkisinin araştırıldığı bir çalışma sonucunda klorojenik asit ve rutin gibi fenolik bileşiklerin yüksekliğe bağlı olarak pozitif korelasyon gösterdiği sonucu, lokalite farklılığının fenolik bileşen içeriğini etkilediğini belirttiğimiz çalışma bulgularımızı da desteklemektedir (Wang ve ark., 2017). Keza, yine lokalite farklılığından etkilendiğini ve MTYE başta olmak üzere sırasıyla BML1Y, AAKT ve MM1 ekstrelerinin nikotin içeriğinin daha zengin olduğunu belirttiğimiz bulgularımız da, nikotin içeriği araştırılan dokuz sigara markasından 3. ve 8. örneklerin diğer örneklerden 2 kat daha fazla olduğu bildirilen çalışma ile benzer sonuçlar göstermektedir (Badr ve ark., 2012).

LC-MS/MS Sonuçlarının Kemometrik Değerlendirilmesi ve Tartışma

Çizelge 4.5.. Tütün örneklerine ait temel bileşenlerin Loading, Eigenvalue, Varyans ve Kümülatif Varyans değerleri

Değişken	PC1	PC2	PC3
Klorojenik Asit	0,416	0,478	-0,117
Malik Asit	0,511	-0,105	-0,354
Rutin	0,269	0,586	0,498
Nikotin	0,474	-0,008	0,108
Nikotinamid	0,228	-0,514	0,729
Nikotinic asit	0,465	-0,391	-0,263
Eigenvalue	3,0917	1,3186	0,8257
Varyans %	51.5	22.0	13.8
Toplam	51.5	73.5	87.3

Çizelge 4.5'te farklı bölgelerden toplanan tütün örneklerinin klorojenik asit, malik asit, rutin, nikotin, nikotinamid, nikotinic asit ile yapılan temel bileşen analizi (PCA) sonuçları verilmektedir. 6 değişkenin temel bileşen analiz sonucunda, bu veri setinde eigenvalue değeri 1'den büyük olan 2 temel bileşen belirlendi. Tütün örneklerinin PCA sonucuna göre ilk 2 temel bileşenin toplam varyansın % 73,5 ini açıklamaktadır. 1. temel bileşen (PC1) varyansın %51,5'ini, 2. temel bileşen (PC2) ise %22,0'sini açıklamaktadır. Çizelge 4.5'te koyu renkle gösterilen değerler temel bileşenleri açıklamada diğerlerinden daha etkindir. 1. temel bileşen, veri setinde en yüksek varyansı göstermektedir. 1. temel bileşen için malik asit, nikotin,

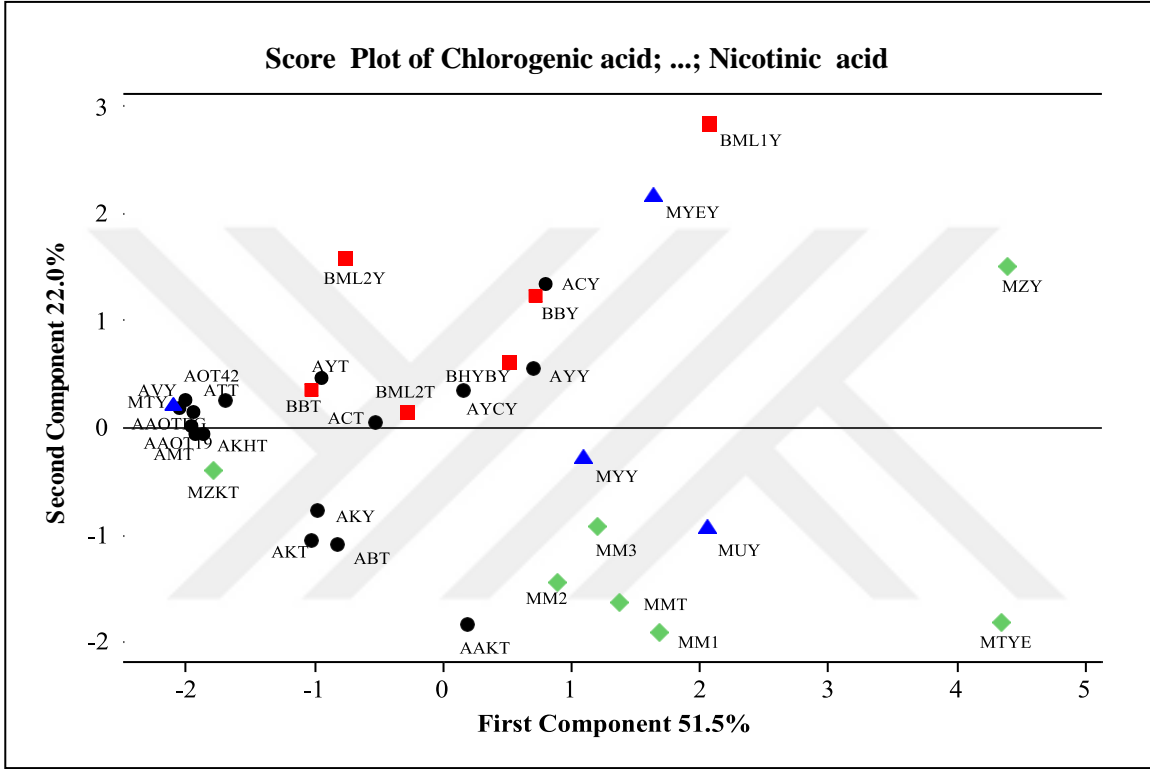
nikotinic asit; 2. temel bileşen için rutin ve klorojenik asit, negatif yönde ise nikotinamid baskın değişkenlerdir.

Çizelge 4.6. Tütün örneklerine ait temel bileşenlerin skor değerleri

Analyte	Bölge	PC1	PC2	PC3
AKY	Adıyaman	-0,9790	-0,7689	0,0270
AYCY	Adıyaman	0,1516	0,3418	-0,4839
MM1	Kahramanmaraş	1,6867	-1,9096	-0,4542
MYY	Mardin	1,0942	-0,2944	-0,2918
MTY	Mardin	-2,1058	0,2010	-0,8598
ACT	Adıyaman	-0,5361	0,0469	0,6149
BHYBY	Bitlis	0,5084	0,6185	-0,6379
MTYE	Kahramanmaraş	4,3447	-1,8198	-1,7659
BBT	Bitlis	-1,0307	0,3482	0,3782
BML2Y	Bitlis	-0,7603	1,5914	0,2472
AYT	Adıyaman	-0,9524	0,4664	0,7382
AKHT	Adıyaman	-1,9393	-0,0644	-0,5353
ACY	Adıyaman	0,8015	1,3359	1,6338
AAOT19	Adıyaman	-1,9693	0,0152	-0,6377
MYEY	Mardin	1,6410	2,1698	-1,4540
MZKT	Kahramanmaraş	-1,7931	-0,3978	-0,1153
ABT	Adıyaman	-0,8335	-1,0834	1,7757
BML1Y	Bitlis	2,0696	2,8341	1,6871
MUY	Mardin	2,0539	-0,9455	-0,3706
AMT	Adıyaman	-1,8662	-0,0569	-0,4908
AOT42	Adıyaman	-1,7084	0,2482	-0,3446
MM3	Kahramanmaraş	1,1925	-0,9259	-0,5619
AAKT	Adıyaman	0,1898	-1,8324	2,0082
AVY	Adıyaman	-2,0050	0,2484	-0,9244
MM2	Kahramanmaraş	0,8815	-1,4516	0,3161
MZY	Kahramanmaraş	4,3965	1,5148	-0,1331
AAOTEG	Adıyaman	-2,0643	0,1870	-0,8172
BBY	Bitlis	0,7172	1,2314	-0,5684
ATT	Adıyaman	-1,9546	0,1367	-0,6031
AKT	Adıyaman	-1,0348	-1,0458	0,4562
MMT	Kahramanmaraş	1,3771	-1,6314	0,9360
AYY	Adıyaman	0,7035	0,5501	0,6233
BML2T	Bitlis	-0,2771	0,1417	0,6080

Çizelge 4.6. ilk üç temel bileşen için her örneğe ait skor değerlerini göstermektedir. 1. temel bileşenin loading değerlerinden malik asit, nikotin, nikotinic asit bileşenlerinin baskın

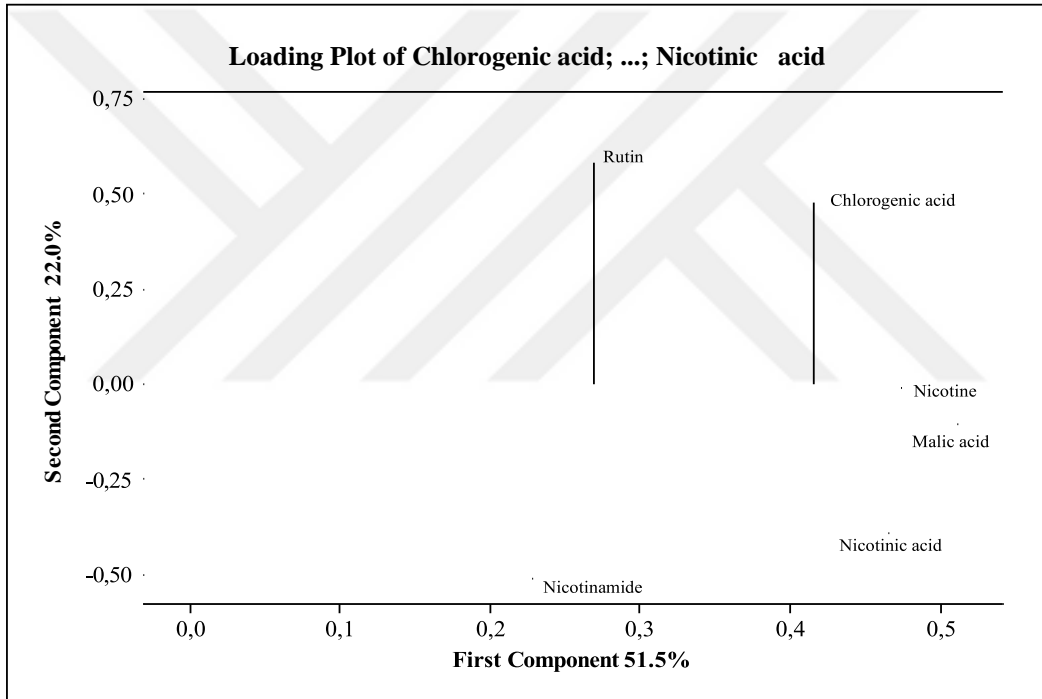
olduğu ve bu bileşenlerin **Çizelge 4.6.**'da koyu renkle verilen MZY ve MTYE örneklerini daha açıkladığı belirlendi. 2. temel bileşen için rutin ve klorojenik asit gibi fenolik bileşenlerin BML1Y ve MYEY örneklerinde daha baskın olarak bulunduğunu söylemek mümkündür. Negatif açıdan ele alındığında MM1, MTYE ve AAKT örneklerinde rutin ve klorojenik asit konsantrasyonlarının diğer örneklerden daha az olduğu saptandı. Ayrıca bu örneklerin nikotinamid konsantrasyonunun ise diğer örneklerden daha fazla olduğu görüldü.



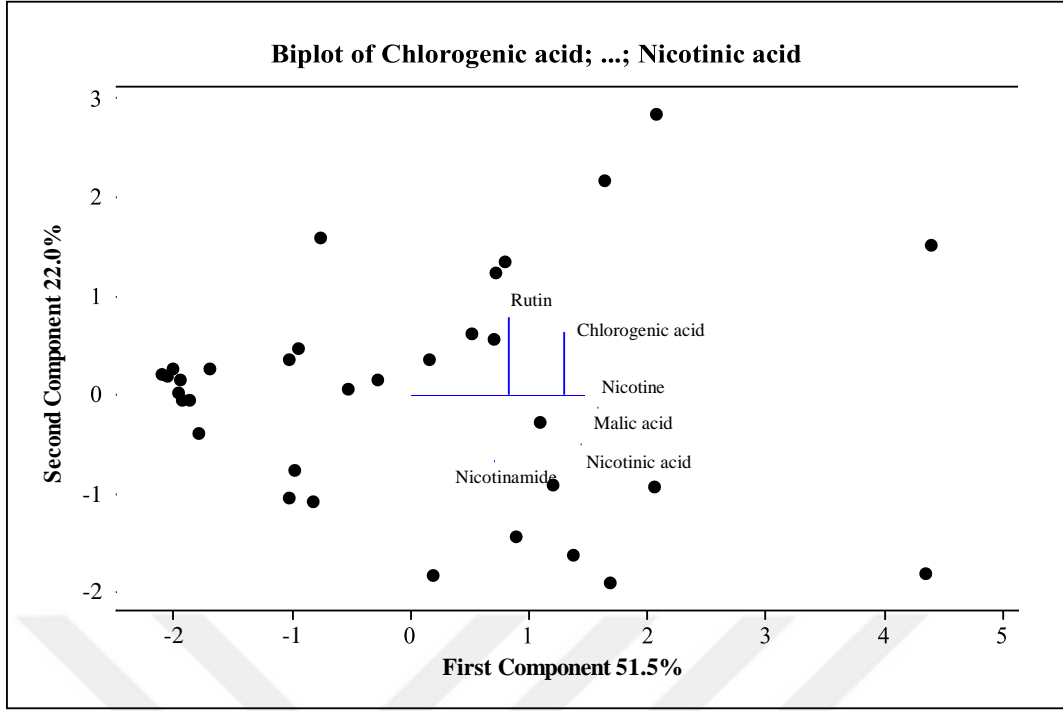
Şekil 4.5. Tütün örneklerinde PC1 ve PC2 Skor Grafiği • Adıyaman, ■ Bitlis, ◆ Kahramanmaraş, ▲Mardin

Şekil 4.5.'de tütün örneklerinin PC1 ve PC2 skor grafiği ve **Şekil 4.6.**' da ise loading grafiği yer almaktadır. Skor grafiğinde 34 tütün örneğinin 6 değişkene karşı analizi görülmektedir. **Şekil 4.7.**'de ise her iki grafiğin birleştirildiği biplot grafiği yer almaktadır. MZKT örneği haricinde tüm Kahramanmaraş örnekleri **Şekil 4.5**'de verilen skor grafiğini sağ kısmında yer almakta olup, **Şekil 4.6.**'daki loading grafiği ile birlikte değerlendirildiğinde bu örneklerdeki (MM2, MM3, MMT, MM1, MTYE, MZY) nikotin, malik asit ve nikotinic asit değerlerinin diğer örneklerden belirgin bir şekilde farklılaştığı görülmektedir. Aynı zamanda bu örneklere Mardin ilinden toplanan MYY, MUY örnekleri ile ve AAKT örnekleri de dahil olmuştur. (Başka bir deyişle MYY, MUY örnekleri ile ve AAKT örneklerindeki nikotin, malik asit ve nikotinic asit değerlerinin de diğer örneklerden daha yüksek olduğunu söylenebilir). **Şekil 4.5.** ve **Şekil 4.6**'nın birlikte yorumlanması ile Bitlis'den alınan BML1Y

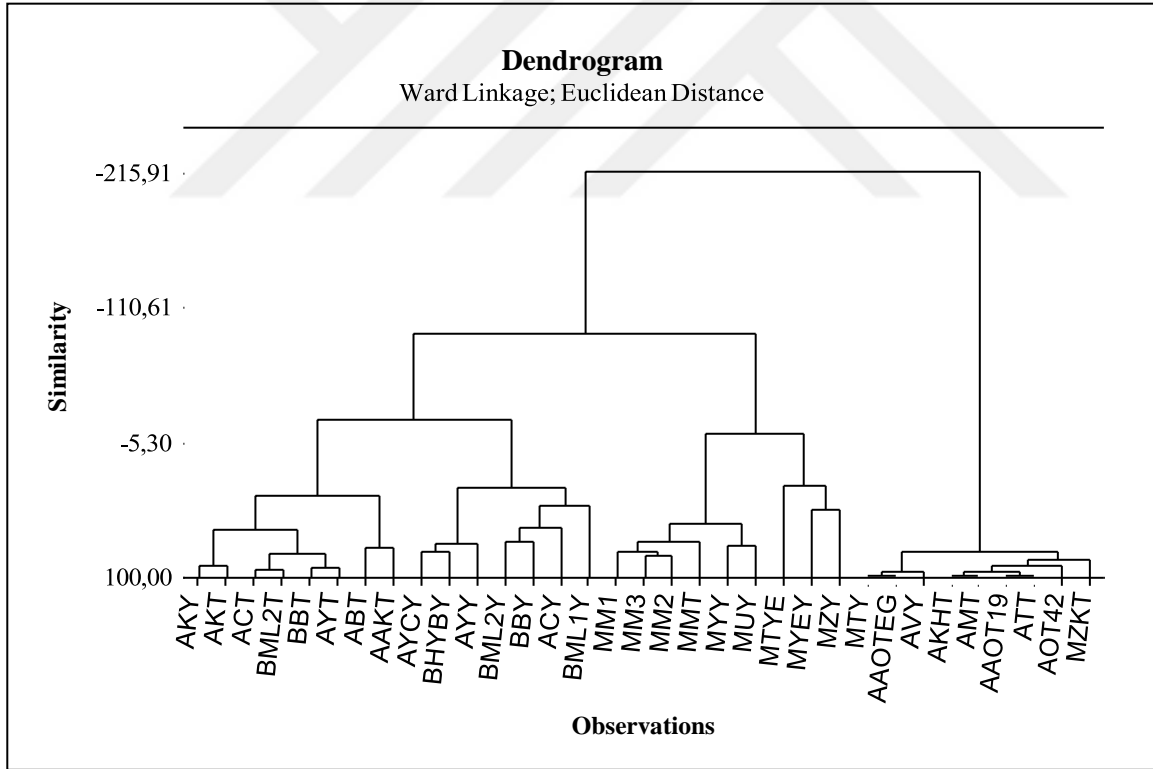
ve Mardin'den alınan MYEY örneklerindeki rutin ve klorojenik asit konsantrasyonunun diğer örneklerinden daha fazla olduğu görülmektedir. Ayrıca bu örneklere Kahramanmaraş'tan MZY, Bitlis'ten BBY ve BHYBY, Adıyaman'dan ACY, AYY ve AYC Y örnekleri de rutin ve klorojenik asit konsantrasyonları bakımından dâhil olmuştur. **MZY** örneği, başta klorojenik asit ve nikotin olmak üzere tüm bileşenler yönünden zengindir. AAKT, ACY, AYY ve AYC Y örnekleri hariç Adıyaman örneklerinde malik asit, nikotin, nikotinik asit, nikotinamit, klorojenik asit ve rutin konsantrasyonları ise daha düşüktür. Mardin örnekleri karşılaştırıldığında MYY ve MUY örneklerinde nikotin, nikotinik asit ve malik asit, MYEY örneğinde ise rutin ve klorojenik asit baskın özellik göstermiştir. Bunun aksine MTY örneğinde tüm değişkenlerin konsantrasyonu daha düşüktür.



Şekil 4.6. Tütün örneklerinde PC1 ve PC2 loading grafiği



Şekil 4.7. PCA Biplot grafiği (PC1 ve PC2 loading ve skor grafiklerinin birleştirilmiş halidir)



Şekil 4.8. Euclidean uzaklığı (Distance) ve Ward Linkage metodu ile elde edilen dendrogram sonuçları

Şekil 4.8’de tütün örneklerinin benzerlik veya farklılıklarını belirlemek amacıyla yapılan kümeleme analizi (HCA) sonuçları verilmektedir. Her bir örneğin bölgesel farklılığının değerlendirilmesi için de PCA analizine ilaveten HCA analizi uygulanmıştır. Kümeleme analizi tütün örneklerinde Klorojenik asit, malik asit, rutin, nicotin, nicotinamid,

nicotinic asit gibi 6 değişkene ait analiz sonuçlarına uygulanmıştır. Ölçümler squared Euclidean distance'a dayanmaktadır. Sınıflandırma metodu olarak ise Ward metodu kullanılmıştır. HCA analizi sonucunda beş küme oluştuğu izlendi (Similaritre = 5,30).

KÜME 1: AKY, AKT, ACT, BML2T, BBT, AYT, ABT, AAKT

KÜME 2: AYC, BHYBY, AYY, BML2Y, BBY, ACY, BML1Y

KÜME 3: MM1, MM2, MM3, MMT, MYY, MUY

KÜME 4: MTYE, MYEY, MZY

KÜME 5: MTY, AAOTEG, AVY, AKHT, AMT, AAOT1, ATT, AOT42, MZKT

HCA analiz sonucu PCA analiz sonucuna benzer özellik gösterse de bölgesel bir kümelene söz konusu değildir. Küme 3 te yer alan örnekler Kahramanmaraş ve Mardin örnekleridir. Tüm kümelerde farklı bölgelerden örnekler söz konusudur.

Nicotiana tabacum L. üzerine LC-MS/MS tekniğiyle detaylı bir kemotrik çalışma ilk kez bu tez kapsamında verilmiş olup 34 farklı lokaliteden toplanan örnekler üzerinden değerlendirme yapılmıştır. Günümüze değin kemotrik analiz ile ilgili olarak tütün bitkisinde yapılmış çok az sayıda makale mevcuttur. Hariram ve Gowtham Rajan (2016), GC-MS, FT-IR ve NMR tekniklerini kullanarak tütün bitkisinde bir kemotrik analiz çalışması gerçekleştirmiş ve tohum yağ asitleri içinde major bileşenin linoleik asit olduğunu belirtmişlerdir. FT-IR tekniği ile de, tütün tohum yağı biyodizeline ise metil ester gruplarının varlığını bildirmişlerdir. Oysa ki çalışma bulgularımızda malik asit, nikotin, nicotinic asit bileşenlerinin MZY ve MTYE örneklerinde, rutin ve klorojenik asit gibi fenolik bileşenlerin de BML1Y ve MYEY örneklerinde daha baskın olarak bulunduğu tespit edilmiştir. MZY'nin klorojenik asit ve nikotin olmak üzere tüm bileşenler bakımından zengin bir çeşit olduğu sonucuna varılmıştır. Keza kümeleme analizi (HCA) ilk kez bu tez kapsamında değerlendirilmeye alınmış olup 34 farklı lokaliteden toplanan tütün çeşitlerinde bölgesel bir kümelenemenin olmadığı belirlenmiştir.

Biyolojik Aktivite Sonuçları

Total fenolik ve antioksidan aktivite sonuçları

Tüm ekstraların toplam fenolik miktarları pirokatekol eşdeğer olarak belirlendi (**Çizelge 4.7**). Ekstrelerin total fenolik içeriklerinin oldukça değiştii görülmektedir. Ekstreler içinde BML1T (82,31±4,21 µgPEs/mg ekstrakt) en zengin MYEY (18,97±0,69 µgPEs/mg ekstrakt) ekstrelerinin ise en fakir olduğu tespit edilmiştir. Ekstrelerin antioksidan aktivitesine genel olarak baktığımızda yine kimyasal içerikte olduğu gibi lokalite farklılığının oldukça

etkili olduğu görülmektedir (Çizelge 4.8). DPPH Serbest Radikali Giderim aktivitesinde MTYE (IC₅₀:29,72±6,19), ABTS Katyon Radikali Giderim aktivitesinde MZY (IC₅₀: 19,85±9,19) ve CUPRAC aktivitesinde ise yine MTYE (absorbans: 1,79±0,68) ekstresin en yüksek aktiviteyi gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.8. ve 4.9).

Çizelge 4.7. *Nicotiana tabacum* türlerinin fenolik içeriklerinin aktivite sonuçları

Bitki İsimleri	Fenolik İçeriği (µgPEs/mg ekstrakt) ^b	Bitki İsimleri	Fenolik İçeriği (µgPEs/mg ekstrakt) ^b
BML2T	42,35 ±0,60	MTYE	75,94±3,61
AOT42	51,28 ±2,41	MUY	24,91±0,00
AKT	48,72 ±8,42	MM2	53,40±0,60
AAOT19	39,80 ±3,01	ACT	47,02±2,41
ATT	54,68 ±0,00	BML1Y	41,92±0,00
AYY	44,47 ±2,41	BML1T	82,31±4,21
ACY	58,93 ±2,25	MM3	63,18±7,22
AVY	53,40 ±3,01	AAKT	44,90±5,41
MMT	50,43 ±2,41	AKHT	40,65±0,60
MM1	71,68 ±14,43	AKY	28,28±0,49
BBY	56,66±0,98	AAOTEG	26,21±1,46
BBT	51,28±2,41	MTY	73,45±5,85
MZKT	45,32±0,00	BHYBY	52,41±6,34
AYCY	33,42±7,22	MZY	26,55±2,39
AMT	43,20±4,21	MYEY	18,97±0,69
AYT	44,90±0,60	BML2Y	25,86±1,95
ABT	47,45±3,01	MYY	23,56±2,11

a: Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.
b: Pirokatekole eşdeğer fenolik içerik ($y = 0,0498(\mu\text{g}) + 0,0434 (R2: 0,9918)$).

Çizelge 4.8 *Nicotiana tabacum* türlerinin DPPH ve ABTS aktivite sonuçları

Örnekler	DPPH Serbest Radikali	ABTS Katyon Radikali	Örnekler	DPPH Serbest Radikali	ABTS Katyon Radikali
BML2T	63,98±140,74	131,95±23,98	MTYE	29,72±6,19	75,87±12,97
AOT42	>1000	391,34±129,58	MUY	85,38±68,75	181,12±34,87
AKT	>1000	178,37±44,30	MM2	726,12±567,60	45,89±10,87
AAOT19	>1000	308,13±125,03	ACT	405,13±459,74	290,64±171,04
ATT	>1000	134,88±20,41	BML1Y	287,93±133,21	75,89±13,87
AYY	308,41±36,88	121,16±15,57	BML1T	110,23±70,94	58,98±19,98
ACY	464,64±225,02	108,72±29,52	MM3	974,48±1031,29	55,56±11,87
AVY	569,51±333,64	>1000	AAKT	167,82±137,58	101,54±25,32
MMT	>1000	>1000	AKHT	170,56±88,72	225,77±46,00
MM1	>1000	225,40±45,76	AKY	150±95,21	26,72±13,82
BBY	257,90±68,58	107,5±20,77	AAOTEG	167,40±128,37	142,60±50,60
BBT	>1000	146,1±25,78	MTY	>1000	>1000
MZKT	>1000	224,91±34,97	BHYBY	110,43±68,64	>1000
AYCY	75,88±28,42	115,32±25,22	MZY	125,78±98,31	19,85±9,19
AMT	>1000	149,06±13,43	MYEY	115,222±87,54	69,28±13,99
AYT	45,61±12,72	146,72±34,82	BML2Y	>1000	115,12±29,44
ABT	>1000	55,46±6,22	MYY	395,05±248,44	102,98±27,45

a: Sonuçlar IC₅₀ değerleri olarak verilmiştir.

b: Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

Çizelge 4.9. *Nicotiana tabacum* türlerinin CUPRAC aktivite sonuçları

Örnekler	10 (µg/mL)	25 (µg/mL)	50 (µg/mL)	100 (µg/mL)
BML2T	0,179±0,0105	0,229±0,0015	0,269±0,0165	0,403±0,008
AOT42	0,176±0,005	0,435±0,0295	0,274±0,102	0,436±0,0542
AKT	0,135±0,0560	0,1685±0,0820	0,177±0,0914	0,222±0,146
AAOT19	0,114±0,0569	0,1375±0,0824	0,147±0,090	0,22±0,150
ATT	0,216±0,064	0,224±0,0733	0,25757±0,086	0,571±0,1916
AYY	0,1723±0,055	0,228±0,0764	0,4485±0,1459	0,6345±0,2040
ACY	0,275±0,105	0,45±0,094	0,4525±0,2075	1,2585±0,0295
AVY	0,209±0,008	0,17955±0,0085	0,4385±0,0075	0,577±0,05
MMT	0,1970,±0,0874	0,2385±0,15328	0,377±0,14803	0,862±0,4379
MM1	0,33±0,08687	0,314±0,11297	0,2855±0,1657	0,7745±0,2644
BBY	0,2573±0,0822	0,324±0,128388	0,5705±0,16823	0,735±0,371359
BBT	0,161±0,005	0,311±0,019	0,518±0,008	0,920±0,012
MZKT	0,229±0,026	0,2695±0,0775	0,3805±0,0035	0,815±0,075
AYCY	0,1619±0,025	0,171±0,016	0,3415±0,0255	0,4595±0,0745
AMT	0,175±0,0738	0,204±0,08183	0,241±0,1272	0,5175±0,27194
AYT	0,224±0,0701	0,285±0,105862	0,236±0,1142	0,5385±0,18089
ABT	0,215±0,06905	0,269±0,082022	0,376±0,12465	0,817±0,262971
MTYE	0,482±0,15728	0,63±0,22906	0,921±0,33547	1,788±0,678618
MUY	0,292±0,001	0,274±0,005	0,628±0,074	0,9845±0,1555
ACT	0,1835±0,1046	0,262±0,1016	0,307±0,2242	0,526±0,3359
BML1Y	0,293±0,968	0,338±0,1714	0,439±0,1717	0,6496±0,3537
BML1T	0,1895±0,8624	0,264±0,0906	0,2965±0,1872	0,392±0,2995
MM3	0,2133±0,0818	0,476±0,1573	0,476±0,1573	0,375±0,3329
AAKT	0,2235±0,0195	0,0945±0,0005	0,378±0,003	0,5465±0,0125
AKHT	0,1243±0,0102	0,249±0,009	0,31±0,017	0,3635±0,0095
AKY	0,187±0,0736	0,2445±0,0987	0,45±0,017	0,737±0,2566
AAOTEG	0,2283±0,7785	0,354±0,125	0,4575±0,1157	0,605±0,2299
MTY	0,2436±0,0740	0,4315±0,156	0,732±0,238	0,6225±0,2237
BHYBY	0,2466±0,0789	0,3495±0,1176	0,5623±0,1795	0,648±0,2267
MZY	0,4325±0,0395	0,4565±0,0145	0,7615±0,1105	0,9185±0,0445
MYEY	0,6126±0,1569	0,5705±0,4305	0,876±0,1196	0,8375±0,0345
BML2Y	0,2046±0,1580	0,249±0,1680	0,216±0,3153	0,3915±0,3582
MYY	0,2145±0,2468	0,486±0,254	0,427±0,3086	0,349±0,3236
BML2T	0,179±0,0105	0,229±0,0015	0,269±0,0165	0,403±0,008

a: Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

Tütün bitkisi üzerine yapılmış antioksidan çalışmalara bakıldığında, gerek içerdiği fenolik bileşenler (Jun ve ark. 2010; Ru ve ark. 2012; Torras-Claveria ve ark., 2012; Nacoulma ve ark., 2012; Li ve ark., 2014; Sharma ve ark., 2016; Wang ve ark., 2017), gerekse de DPPH, ABTS ve CUPRAC aktivitesi yüksek bir tür olduğu (Ru ve ark. 2012; Nasr ve ark., 2014; Cvetanovska ve ark., 2017) yönünde çalışmalar mevcuttur. Keza bu tez kapsamında 34 farklı lokaliteden toplanan tütün örneklerinin de yukarıda verilen literatür sonuçları ile benzerlik gösterdiği söylenebilir. Tütün bitkisi içerdiği fenolik bileşikler ve alkolodler gibi sekonder metabolitler bakımından tıbbi bir bitki olmasının yanında ekonomik öneme sahip bir bitkidir.

Çalışmamızda BML1T'in en yüksek fenolik bileşen içeriğine, MTYE'nin en yüksek DPPH aktivitesine, MZY'nin en yüksek ABTS aktivitesine ve yine MTYE'nin ise en yüksek CUPRAC aktivitesine sahip tütün örnekleri olduğu belirlenmiştir.

Enzim aktivite sonuçları ve tartışma

Hazırlanan etanol ekstralarının antikolinesteraz enzim aktiviteleri asetil ve butiril kolinesteraz enzimlerine karşı tespit edilmiştir (Çizelge 4.10.). Genel olarak Adıyaman ilinden toplanan örnekler hariç tüm ekstraların asetilkolinesteraz enzim aktivitelerinin düşük-orta düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Adıyaman ilinden toplanan örneklerin ise kayda değer asetilkolinesteraz enzim aktivitesi gösterdikleri görülmektedir. Özellikle AYT örneğinin (İnhibisyon: %93,72±2,09) oldukça yüksek bir aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Tüm ekstraların butirilkolinesteraz enzim aktivitesinde ise düşük etkili olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.10. *Nicotiana tabacum* türlerinin AChE ve BChE aktivite sonuçları

Tür İsimleri	AChE (%İnhibisyon)	BChE (%İnhibisyon)	Tür İsimleri	AChE (%İnhibisyon)	BChE (%İnhibisyon)
BML2T	A.D.	A.D.	MTYE	54,72±1,31	7,94±0,06
AOT42	30,70±5,49	A.D.	MUY	18,69±2,61	4,51±0,01
AKT	A.D.	A.D.	MM2	70,80±1,57	17,53±0,33
AAOT1	A.D.	A.D.	ACT	25,34±1,05	A.D.
9					
ATT	A.D.	A.D.	BML1Y	6,30±1,31	21,13±0,87
AYY	A.D.	A.D.	BML1T	24,41±1,31	19,64±0,24
ACY	7,97±4,70	A.D.	MM3	A.D.	23,86±0,75
AVY	23,31±0,26	22,36±0,87	AAKT	A.D.	23,15±0,25
MMT	A.D.	5,39±0,02	AKHT	44,37	A.D.
MM1	27,00±8,62	34,76±1,98	AKY	A.D.	A.D.
BBY	22,01±1,57	22,04±1,67	AAOTEG	A.D.	A.D.
BBT	39,20±9,15	23,24±0,62	MTY	A.D.	A.D.
MZKT	13,88±7,84	22,39±0,76	BHYBY	A.D.	A.D.
AYCY	65,44±2,35	A.D.	MZY	A.D.	A.D.
AMT	68,95±2,61	10,73±0,29	MYEY	A.D.	A.D.
AYT	93,72±2,09	10,23±0,23	BML2Y	A.D.	A.D.
ABT	10,55±1,57	18,05±0,25	MYY	A.D.	A.D.

Sharma ve ark. (2016), *Nicotiana tabacum* gövdesine ait 0.4 mg/mL etanol ekstraktının en yüksek SOD, GST, GSH ve MDA içeriğine sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Ancak asetil ve butirilkolinesteraz aktivitelerine yönelik günümüze değin yapılmış herhangi bir çalışmaya literatür taramalarında rastlanmamıştır. Bu tez kapsamında 34 farklı lokaliteden alınan tütün örneklerini, asetil ve butirilkolinesteraz enzim aktiviteleri bazında değerlendirecek olursak orta ve düşük dereceli enzim aktivitelerine sahip oldukları ve AYT 'nin diğer tütün örneklerine kıyasla görece daha yüksek aktivite gösterdiği söylenebilmektedir.

Ekstrelerin antiürez enzim aktivitesine baktığımızda ise örnekler arası farklılıklar olduğu göze çarpmaktadır (**Çizelge 4.11.**). MM3 ekstresinin antiürez enzim aktivitesinin (İnhibisyon:% 85,74±0,75) en yüksek olduğu belirlenmiştir. Antitirozinaz enzim aktivitesinde ise MYY ekstresinin en yüksek aktiviteyi (İnhibisyon:% 81,50±3,54) gösterdiği belirlenmiştir. Genel olarak kimyasal içerikte olduğu gibi örneklerin enzim aktiviteleri üzerinde lokalite farklılığının oldukça etkili olduğu söylenebilir.

Çizelge 4.11. *Nicotiana tabacum* türlerinin ürez ve tirozinaz aktivite sonuçları

Tür İsimleri	Ürez (%İnhibisyon)	Tirozinaz (%İnhibisyon)	Tür İsimleri	Ürez (%İnhibisyon)	Tirozinaz (%İnhibisyon)
BML2T	A.D.	32,92±3,81	MTYE	72,54±2,99	75,80±1,50
AOT42	A.D.	46,69±0,15	MUY	69,89±0,75	68,80±0,64
AKT	A.D.	39,03±1,90	MM2	73,06±0,75	65,43±2,23
AAOT19	A.D.	A.D.	ACT	A.D.	59,28±0,11
ATT	A.D.	15,22±2,49	BML1Y	42,96±1,49	54,25±6,58
AYY	48,35±0,00	16,87±3,95	BML1T	A.D.	60,40±4,45
ACY	A.D.	A.D.	MM3	85,74±0,75	48,95±1,50
AVY	15,38±17,09	12,63±48,90	AAKT	A.D.	45,25±0,64
MMT	A.D.	29,30±3,07	AKHT	A.D.	48,03±2,65
MM1	71,98 ±3,89	21,53±1,76	AKY	A.D.	63,55±0,00
BBY	68,13±1,55	38,72±1,1,17	AAOTEG	A.D.	30,03±0,53
BBT	A.D.	A.D.	MTY	A.D.	59,05±3,49
MZKT	A.D.	30,33±1,61	BHYBY	64,61±0,75	53,80±11,88
AYCY	43,41±2,33	A.D.	MZY	80,46±9,71	75,93±2,23
AMT	A.D.	65,58±0,32	MYEY	76,76±0,00	49,68±2,65
AYT	A.D.	34,15±2,31	BML2Y	46,65±0,75	63,70±6,58
ABT	A.D.	67,75±0,42	MYY	75,18±0,75	81,50±3,54

Nicotiana tabacum L. bitkisinin de aralarında bulunduğu 137 tıbbi bitki türünün ürez aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada, tütün bitkisinin de dahil olduğu sadece 37 bitkinin güçlü bir ürez inhibe edici aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir (Nebati ve ark., 2012). Tez kapsamında 34 farklı lokaliteden toplanan tütün örneklerinin antiürez aktivite bakımından, farklı sonuçlar verdikleri görülmüş ve en yüksek aktivitenin MYY'ye ait olduğu belirlenmiştir. Örnekler arasındaki bu farklılığın ise tütün örneklerinin yetiştiği ortama bağlı olabileceği düşünülmüştür. Antitirozinaz aktivite bakımından ise, günümüze değin tütün bitkisinde yapılaş herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Tütün bitkisinin ait antitirozinaz aktivitesine yönelik sonuçlar ilk kez bu tez kapsamında çalışılmış ve sunulmuştur. Çalışma bulgularımız dikkate alındığında antiürez aktivitesinde olduğu gibi, MYY'nin diğer tütün örneklerine kıyasla en yüksek kapasiteye sahip olduğu görülmüş ve yine tütün örnekleri arasındaki bu farklılığın lokalite farklılığından kaynaklanabileceği sonucuna varılmıştır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Sonuçlar

Tez çalışmamız sonucunda önemli tütün yetiştiriciliğinin yapıldığı 4 ilimizdeki farklı lokasyonlarda yetiştirilen farklı tütün tiplerinin fenolik, flavonoid, yağ asidi ve nikotin içeriklerinin kemometrik olarak değerlendirilmesi yapılmış, söz konusu içeriklerin test edilen tüm tiplerde birbirinden bağımsız olarak farklılıklar arz ettiği, özellikle nikotin içeriğinin tütün bitkisinin lokasyonuna, içinde bulunduğu ekolojik şartlara oldukça bağımlı olarak değiştiği sonucuna varılmıştır.

Çalışılan örneklerin etanol ekstrelerinin % verimleri ve örneklerin kodları *Nicotiana tabacum* türlerinin toplanma yerleri ve verimlerinin sonuçları verilmiştir. Tüm örneklerin ekstre verimlerinin oldukça farklılık gösterdiği belirlenmiştir. En yüksek ekstre verimine MTYE (%13,8) ekstresinin sahip olduğu belirlenmiştir.

Tütün örneklerinin petrol eteri ekstrelerinin yağ asidi profili GC-MS ile belirlenmiştir. Bütün ekstrelerin yağ içeriklerinin % 100'ü olarak belirlenmiştir. Sonuçlara genel olarak baktığımızda lokalite farklılığının yağ asidi profili üzerine tütün örneklerinin etanol ekstrelerinin fenolik ve nikotin profili LC-MS/MS ile belirlenmiştir.

Sonuçlara genel olarak baktığımızda lokalite farklılığının yine fenolik içerik ve nikotin içeriği üzerinde oldukça etkili olduğu söylenebilir. Tüm örneklerin Nicotine, Nicotinamide ve Nicotinic acid içeriği LC-MS/MS'te geliştirilen ve valide edilen metot ile belirlenmiştir (Tablo1 ve Şekil 1-2). Tüm örneklerin özellikle nicotine içeriğinin oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. Nicotine içeriği bakımından özellikle Kahramanmaraş'tan toplanan MTYE (356574,55µg analit/g ekstre) ve Bitlis'ten toplanan BML1Y örneğinin (369423,84µg analit/g ekstre) oldukça zengin olduğu tespit edilmiştir. Nicotin amide ve nicotinic acid bakımından ise sırasıyla AAKT (599,06 µg analit/g ekstre) ve MM1 (12409,25µg analit/g ekstre) ekstrelerinin daha zengin olduğu belirlenmiştir.

Tüm ekstrelerin toplam fenolik miktarları pirokatekol eşdeğer olarak belirlendi. Ekstrelerin total fenolik içerikleri LC-MS/MS sonuçlarında olduğu gibi oldukça değiştiği görülmektedir. Ekstreler içinde BML1T (82,31±4,21µgPEs/mg ekstrakt) en zengin MYEY (18,97±0,69µgPEs/mg ekstrakt) ekstresinin ise en fakir olduğu tespit edilmiştir. Ekstrelerin antioksidan aktivitesine genel olarak baktığımızda yine kimyasal içerikte olduğu gibi lokalite farklılığının oldukça etkili olduğu görülmektedir. DPPH Serbest Radikali Giderim aktivitesinde MTYE (IC₅₀:29,72±6,19), ABTS Katyon Radikali Giderim aktivitesinde MZY

(IC₅₀: 19,85±9,19) ve CUPRAC aktivitesinde ise yine MTYE (absorbans:1,79±0,68) ekstresin en yüksek aktiviteyi gösterdiği tespit edilmiştir.

Tüm ekstrelerin toplam fenolik miktarları pirokatekol eşdeğer olarak belirlendi. Ekstrelerin total fenolik içerikleri LC-MS/MS sonuçlarında olduğu gibi oldukça değiştiği görülmektedir. Ekstreler içinde BML1T (82,31±4,21µgPEs/mg ekstrakt) en zengin MYEY (18,97±0,69µg PEs/mg ekstrakt) ekstresinin ise en fakir olduğu tespit edilmiştir. Ekstrelerin antioksidan aktivitesine genel olarak baktığımızda yine kimyasal içerikte olduğu gibi lokalite farklılığının oldukça etkili olduğu görülmektedir. DPPH Serbest Radikali Giderim aktivitesinde MTYE (IC₅₀:29,72±6,19), ABTS Katyon Radikali Giderim aktivitesinde MZY (IC₅₀: 19,85±9,19) ve CUPRAC aktivitesinde ise yine MTYE (absorbans:1,79±0,68) ekstresin en yüksek aktiviteyi gösterdiği tespit edilmiştir.

İnhibisyon: (%93,72±2,09) oldukça yüksek bir aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Tüm ekstrelerin butirilkolinesteraz enzim aktivitesinde ise düşük etkili olduğu belirlenmiştir.

Öneriler

Tez sonuçlarından elde edilen bilgiler; farmakoloji, parfümeri ve tarımsal alanlarda (allelopati, insektisit) hizmet veren ilgili kuruluşlara kaynak oluşturacaktır. Bu çalışmada önemli tütün yetiştiriciliğinin yapıldığı 4 ilimizdeki farklı lokasyonlardan yetiştirilen tütün tiplerinin fenolik, flavonoid, yağ asidivenikotin içeriklerinin kemometrik olarak değerlendirilmesi yapılmıştır. Çalışma sonucunda elde edilecek verilere dayanılarak yeni projeler üretilebilecek ve bu konuda çalışacak araştırmacılara güncel bilgiler sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Aarti, R., Rakesh, R.M., 2013, Phytochemical Properties and pharmacological Activities of *Nicotiana tabacum*: A Review. *Indian Journal of Pharmaceutical & Biological Research*. 1(2) : 74-82 .
- Acar, J., 1998. Fenolik bileşikler ve doğal renk maddelerinin gıda kimyası. Ed: Saldamlı, İ. *Hacettepe Üniversitesi Yayınları*. 435-452.
- Adeleye, A., Conubogu, C., Ayolabi. C.I., 2008, Screening of crude extracts of twelve medicinal plants and “wondercure” concoction used in Nigeria unorthodox medicine for activity against mycobacterium tuberculosis from tuberculosis patients sputum, *African journal of Biotechnology*, 7(18),3182-3187.
- Adıyaman Tütün Raporu, 2013, İpekyolu Kalkınma Ajansı Adıyaman Yatırım Destek Ofisi, Adıyaman.
- Altınışik, M., 2001, Serbest Oksijen Radikalleri ve Antioksidanlar 2000–2001.Eğitim Öğretim Sunuları Biyokimya anabilim dalı semineri, Erişim: [[http:// www. mustafaaltinisik. org.uk/sunularim.htm](http://www.mustafaaltinisik.org.uk/sunularim.htm) [http://www.mustafaaltinisik.org.uk/soa_Heksoz mono fosfat Yolu.ppt](http://www.mustafaaltinisik.org.uk/soa_Heksoz_mono_fosfat_Yolu.ppt)]
- Alzheimer, A., 1907, U” ber eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde, *Allgemeine Z Psychiatrie Psychisch-Gerichtliche Med.*, 64, 146– 148.
- Alzheimer, A. 1911, U” ber eigenartige Krankheitsfalle des spa”teren Alters, *Z die Gesamte Neurologie Psychiatrie* 4, 456–385.
- Anonim, 2017, Adıyaman Tütün Raporu, Web:<http://investinadiyaman.gov.tr/AdıyamanTutun-Raporu-icerik-241.html>, Erişim Tarihi: 15.04.2017.
- Anonim, 2013, TS-1000, Türk Tütünleri Standardı. (ICS 65. 180 Türk tütünleri Aralık (2013)
- Antolovic, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S., Robards, K., 2002, Methods for testing antioxidant activity, *Analyst* 2002, 127, 183–198.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S. E., 2004, Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamin C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 7970-7981.
- Azkan, N., 2002, Tütün, Özyardımcı, N, (ed). Sigara ve Sağlık, Bursa: 2002:3-21.
- Badr, J.M., Bamane, F.H., El-Shaer, N.S., 2012, Application of High Performance Thin Layer Chromatography for Determination of Nicotine In Different Brands of Cigarettes, *Journal Of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 35 (9), 1213-1221.
- Balfour, DJK., Fagerstrom, KO., 1996, Pharmacology of nicotine and its therapeutic use in smoking cessation and neurodegenerative disorders, 72:51-81.
- Bapalal Viadya, Nighantu Adarsh, Chaukhamba Bharti, 2009, *Academy*, Reprint edition: 2009, 2:146.
- Bayrak, C., 2013, Adıyaman Tütün Raporu, *T.C. İpekyolu Kalkınma Ajansı*, p: 1-12.
- Baytop, A., 1971, Trakya ve İstanbul Çevresi Bitkileri Üzerinde Sistemik Araştırmalar, *II. Solanaceae*, 12-23.
- Benabadji, S.H., Wen, R., Zheng, J-B., Dong, X-C., Yuan, S-G., 2004, Anticarcinogenic and antioxidant activity of diindolylmethane derivatives. *Acta Pharmacol Sin*, 25: 666-671.
- Benzie, I.F.F. and Strain, J.J., 1996, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239: 70-76.
- Blois, M.S., 1958, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, 181: 1199-1200.

- Boligon, A.A., de Freitas, R.B., de Brum, T.F., Waczuk, E.P., Klimaczewski, C.V., de A'vila, D.S., 2014, Anti-ulcerogenic activity of *Scutia buxifolia* on gastric ulcers induced by ethanol in rats. *Acta Pharm Sin B*, 4:358–367.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M., Berset, C., 1995, Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT-Food Science and Technology*, 28 (1): 25-30.
- Clifford, M.N., 1986, Phenol–protein interactions and their possible significance for astringency, In G.G. Birch and M.G. Lindley (eds), *Interaction of Food Components*. Elsevier Applied Science, pp. 143–164. London.
- Cvetanoska, L., Dimeska, G., Srbinska, M., Klincarska-Jovanovska, I., Bozinovska, S. and Cvetanovska, A., 2011, Antioxidant activity of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) in intoxication with heavy metals, *Тютун/Tobacco*, 61(1-6), 22-30.
- Cvetanovska, A., Krstic, M. and Cvetanovska, L., 2017, Content of total phenolic compounds and antioxidant potential of oriental tobacco varieties (*Nicotiana tabacum* L.), *EJPMR*, 4(4), 223-228.
- Çam, M. ve Hışıl, Y., 2003, Gıdalardaki Flavonoidler ve Önemleri. 3. Gıda Mühendisliği Kongresi, Ankara.
- Dıraman, H., Özdemir, D., Hışıl, Y. 2009a, Ayvalık Zeytin Çeşidinden Üretilen Erken Hasat Natürel Zeytinyağlarının Yağ Asitleri Bileşenlerine Göre Kemometrik Karakterizasyonu, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, Cilt: 4, No: 3, (1-11).
- Dıraman, H., Çam, M., Özder, Y. 2009b, Yabancı Ülke Kökenli Natürel Zeytinyağlarının Yağ Asitleri ve Triaçilgliserol Bileşenlerine Göre Kemometrik Sınıflandırılması, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, Cilt: 4, No: 2, (22-34)
- Dinç, E., 2009, Kemometrik İşlem ve Yöntemlerin Analitik Kimyadaki Tipik Uygulamaları, *KemometriYaz Okulu Notları*, 13-17.
- Dinis, T.C.P., Madeira, V.M.C. ve Almeida, L.M., 1994, Action of phenolic derivatives as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 315: 161-169.
- DPT, 2004, Tütün ve Tütün Mamulleri Sanayii Özel İhtisas Komisyonu II. Raporu, Ankara.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochemical Pharmacology*, 7: 88-95.
- Esental, E., Ayan, A.K., Aytaç, S. ve Çamaş, N., 2001, Bafra Populasyonundan Toplanan Tütün Hatlarının Bazı Özelliklerinin Analizi, *Türkiye 4. Tarla Bitkileri Kongresi*, 17-21 Eylül 2001, Tekirdağ (2):267-272.
- Cankurtaran, E.Ş., Ozalp, E., Soygur, H. and Cakir, A., 2006, Clinical experience with risperidone and memantine in the treatment of Huntington's disease. *J Natl Med Assoc*. Aug; 98(8): 1353–1355.
- Francis, P., Palme, A., Snape, M. and Wilcock, G., 1999, The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 1999; 66:137-147.
- Gaitan, E., Lindsay, R.H., Reichert, R.D. 1989 Antithyroidic and gioterogenic effects of millet: role of C-glycosylflavones. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 68: 707–714.
- Ghiselli, A., Serafini, M., Maiani, G., Azzini, E. ve Ferro-Luzzi, A. 1995. A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radical Biology and Medicine*, 18: 29-36.
- Gilman, C. Perkins, From 1997a, “Apropos of Literature,” 1890, Knight pp. 104-5.
- Gilman, C. Perkins, 1997b. From “Coming Changes in Literature,” 1915 Knight, , pp.125-32.
- Grossberg, G.T., 2002, The ABC of Alzheimer's disease: behavioral symptoms and their treatment. *Int Psychogeriatr*; 14 (Suppl 1):27-49.

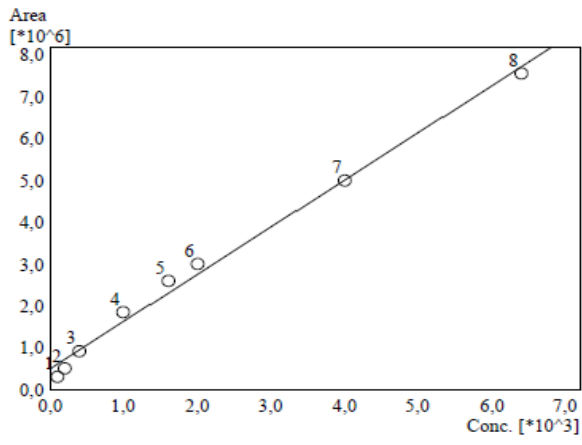
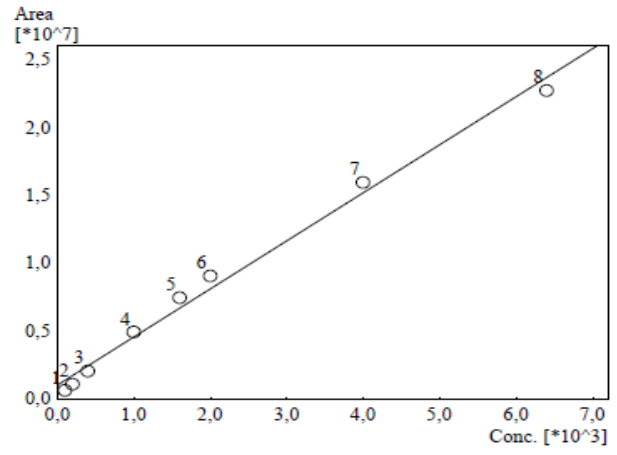
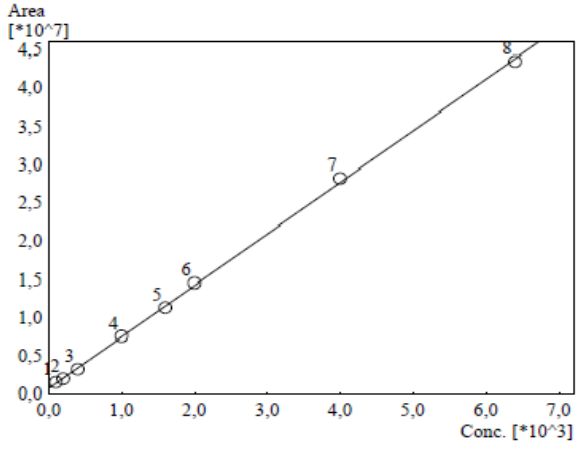
- Gülçin, I., Uguz, M.T., Oktay, M., Beydemirs, K.O.I., 2004, Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of clary sage (*Salvia sclarea* L.) *Turk J Agric For.*, 28:25–33.
- Güzel, A., Tütün Bitkisi ve Farmakolojik Özellikleri; Gerçekten Şeytan Otu Mu? Tobacco Plant and Pharmacological Properties; Is it Really Devil Weed?, *Güncel Göğüs Hastalıkları Serisi* 2016; 4 (1): 22-26.
- Halistürk, C., Tarhan, Ç., 2017, Mobil Teknoloji İle Tütün Süreçlerinde Hız ve Maliyet Kazanımı, *Yönetim Bilişim Sistemleri Dergisi* Cilt:3 Sayı:2 144.
- Halliwell, B., Gutteridge J.M.C., 1989, In free radicals in Biology and Medicine, 2nd Ed.; Oxford University Press, Oxford, UK.
- Harborne, J.B., 1988, Introduction to Ecological Biochemistry 3rd edition Academic Press, London. pp. 10-15.
- Harborne, J.B., 1998, Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis. Chapman and Hall, 3rd ed, London.
- Harboume, J.B., 1991, Phytochemical methods, *A Guide to modern techniques of plant analysis 2nded, chapman and Hall, London.* 1-3, 84-86, 222-236.
- Hariram, V. and Gowtham Rajan, A., 2016, Chemometric analysis of *Nicotiana tabacum* FAME's using GC/MS, FT IR and NMR spectroscopic studies, *International Journal of ChemTech Research*, 9(04), 171-176,
- Huang D., Ou B., Prior R.L., 2005, The chemistry behind antioxidant capacity assays, *J. Agric. Chem.*, 53: 1841-1856.
- IARC, 1986, International Agency for Research on Cancer. Tobacco Smoking. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Volume 38, WHO/IARC.
- Jun, W., Dingqiang, L., Hui, Z., Ben, J., Jiali, W., Xiuquan, L., Hong, C. and Pingkai, O., 2010, Discrimination and classification of tobacco wastes by identification and quantification of polyphenols with LC-MS/MS, *Serb. Chem. Soc.* 75 (7), 875–891.
- Khalifa, A.J.N., 2001. Natural convective heat transfer coefficient: a review, Isolated vertical and horizontal surfaces, *Energy Conversion and Management* 42, 491-504.
- Kılıç, T., Dirmenci, T., Gören, A.C., 2007, Fatty acid composition of seeds of some species of *Nepeta* L., *Natural Product Research*, 21:5, 465-468.
- Li, Y., Pang, T., Shi, J., Lu, X., Deng, J. and Lin, Q., 2014, Liquid chromatography with mass spectrometry method based two-step precursor ion scanning for the structural elucidation of flavonoids, *Journal of Separation Science*, 37 (21), 3067-3073.
- Liu, F., Ooi, V.E., Chang, S.T., 1997, Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts, *Life Sciences*, 60 (10): 763-771.
- Lleó A, Greenberg S.M., Growdon J.H., 2006, Current pharmacotherapy for Alzheimer's disease, *Annu Rev Med.*, 57:513–533.
- Majdi, S., Barzegar, M., Jabbari, A. and Agha-Alikhani, M., 2012, Supercritical Fluid Extraction of Tobacco Seed Oil and its Comparison with Solvent Extraction Methods, *Journal of Agricultural Science and Technology*, 14(5), 1043-1051.
- Manceau, F., Fliniaux, M.A. and Jacquin
chromatographic procedure for the analysis of tobacco alkaloids
evaluation of tobacco alkaloids in plants and cell suspension cultures, *Phytochemical Analysis*, 3 (2), 65-68. -Dubreuil A.,
- -Application
- Maxwell, I.E. and Omeh, S.Y. 2010, Antinociceptive activity of the methanolic leaf of *Nicotiana tabacum* (LINN). *Wilolud J.*, 3, 5-10.
- Mehta, V.P., Sharma A. and Van der Eycken, E., 2008, The First Palladium Catalyzed Desulfitative Sonogashira-Type Cross-Coupling of (Hetero)aryl Thioethers with Terminal Alkynes, *Org. Letters*, 10, 1147–1150.

- Miller, N.J., Rice-Evans, C.A., Davies, M.J., Gopinathan, V., Milner, A., 1993, A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates, *Clin. Sci.*, 84, 407-412.
- Miller, H.E., 1971, A simplified method for the evaluation of antioxidants, *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 48: 91.
- Nacoulma, A.P., Compaore, M., de Lorenzi, M., Kiendrebeogo, M. and Nacoulma, O.G., 2012, *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory activities of extracts from *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae) leafy galls induced by *Rhodococcus fascians*, *Journal of Phytopathology*, 160 (11-12), 617-621.
- Nasr, B.S., Aazza, S., Mnif, W. and Miguel, M., 2014, Phenol content and antioxidant activity of different young and adult plant parts of tobacco from Tunisia, dried at 40 and 70 °C, *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 4 (08), 023-031.
- Nawar, W.W. 1985, "Lipids", *Food Chemistry*, O.R. Fennema (Ed.), p. 139-244. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Odabaşoğlu, M., 1994, Tütün Kimyası Ders Notları. *Samsun: OMÜ Yayınları*,
- Örsel, O., 2010. Tütün İçeriği, Farmakokinetiği ve Tütün Ürünleri, Aytemur ZA, Akçay Ş, Elbek, O., 2010 (eds). *Tütün ve Tütün Kontrolü. İstanbul: Aves Yayıncılık*.;131-40.
- Özgen, M, Reese, R.N., Tulio, A.Z., Miller, A.R., Scheerens, J.C., 2006, Modified 2,2-Azino-bis-3- ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-Diphenyl-1- picrylhydrazyl (DPPH) methods, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 1151-1157.
- Öztürk, M., Aydoğmuş-Öztürk F, Duru ME, Topçu, G., 2007, Antioxidant activity of stem and root extract of Rhubarb (*Rheum ribes*): An edible medicinal plant, *Food Chem.* 103: 623-630.
- Peksüslü, A., 1998, Bazı Türk Tütün Çeşitlerinin İzmir Bornova Koşullarında Agronomik Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri, Doktora Tezi,. *E.Ü. F en Bilimleri Enstitüsü*, Bornova-İzmir.
- Perrin, D.D. and Dempsey, B., 1974, Buffers for pH and Metal Ion Control. Chapman & Hall Ltd., London, 161-162.
- Ponstein, A.S., Bres-Vloemans, S.A., Sela-Buurlage, M.B., van den Elzen, P.J., Melchers, L.S., Cornelissen, B.J., 1994, A novel pathogen- and wound-inducible tobacco (*Nicotiana tabacum*) protein with antifungal activity, *Plant Physiol.*, 104 (1):109–118.
- Popova, V., Petkova, Z., Ivanova, T., Stoyanova, M., Lazarov, L., Stoyanova, A., Hristeva, T., Docheva, M., Nikolova, V., Nikolov, N. and Zheljazkov, V., 2018, Biologically active components in seeds of three *Nicotiana* species, *Industrial Crops and Products*, 117, 375-381.
- Prior, R.L. ve Cao, G., 1999, *In vivo* total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods, *Free Radical Biology & Medicine*, 27: 1173-1181.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. 1999, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical Biology & Medicine*, 26: 1231-1237.
- Reische, D.W., Lillard, D.A. ve Eitenmiller, R.R., 2002, Oxidation, *Food Lipids Chemistry, Nutrition and Biotechnology*, Marcel Dekker Inc., pp. 335-542, New York.
- Ru, Q.M., Wang, L.J., Li, W.M. Wang, J.L. and Ding, Y.T., 2012, *In vitro* antioxidant properties of flavonoids and polysaccharides extract from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves, *Molecules*, 17, 11281-11291.
- Ruiz, J.M., Rivero, R.M., Lopez-Cantarero, I. and Romero, L., 2003, Role of Ca²⁺ in the metabolism of phenolic compounds in tobacco leaves (*Nicotiana tabacum* L.), *Plant Growth Regulation*, 41 (2), 173-177.

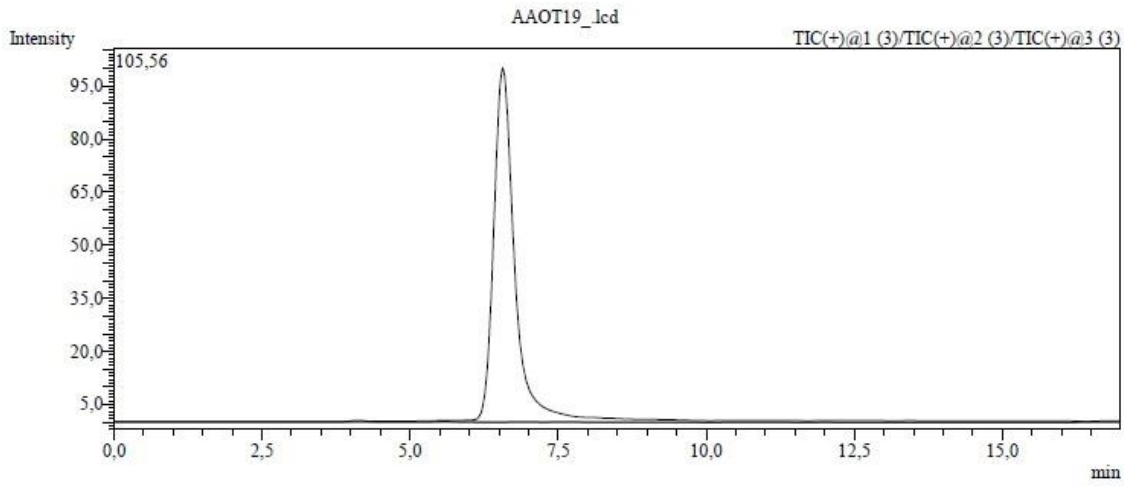
- Sairam, K., Rao, C., and Goel, R. 2001, Effect of *Convolvulus pluricaulis* on gastric ulceration and secretion in rats, *Indian J. Exp. Biol.*39(4),350-354.
- Scerri, E.R., 2005, Response to Barnes's critique of Scerri and Worrall, *Studies in History and Philosophy of Science*, 36A, 813–816.
- Shaligram, V.L., Nighantubhushanam, S., Khemraj, K., 2004, Prakashan Mumbai.4, 908.
- Sharma, Y., Bala, K., Srivastava, N. and Nagar, A., 2016, Antioxidant Activity of Polyphenolic Flavonoid of Stem of *Nicotiana tabacum*, *American Journal of Drug Discovery and Development*, ISSN 2150-427x DOI: 10.3923/ajdd.2016
- Singleton, V.L., Rossi J.A., 1965, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents, *Am J Enol Viticult*, 16: 144-158.
- Singleton, V.L., Orthofer, R. ve Lamuela-Raventos, R.M., 1999, Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Oxidants and Antioxidants*, 299, 152-178.
- Skoog, D.A, Holler, F.J., Niemen, T.A., 1998, Principles of Instrumental Analysis. Orlando: Harcourt Brace & Company, pp. 796-829. Vol. Fifth Edition.
- Slinkard, K. ve Singleton, V.L., 1977, Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods, *American Journal of Enology and Viticulture*, 28: 49–55.
- Snyder, L.R. and Kirkland, J.J., 1997, Introduction to Modern Liquid Chromatography Second Edition. A Wiley-Interscience Publication JOHN WILEY & SONS, INC. New York, Chichester, Brisbane, Toronto.
- Strack, D., Wray V., 1992, Anthocyanins. In J.B. Harborne (ed.), *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*. Chapman & Hall, London, pp. 1–22.
- Şahin, G., Taşlıgil N., 2013, Türkiye’de Tütün (*Nicotiana tabacum* L.) Yetiştiriciliğinin Tarihsel Gelişimi ve Coğrafi Dağılımı, *Doğu Coğrafya Dergisi*, 30: 71-102.
- Tanker, N., Koyuncu, M., Coşkun, M., 2007, Solanacea, Farmasötik Botanik, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara, 296-301.
- Taş, H., 2003, Bursa’da Tütün Ekimi, Hasadı ve Tütünlü İlgili İnanç ve Gelenekler, Gürsoy Naskali F. (ed.), Tütün Kitabı, İstanbul: KİTAPEVİ 195,557-66.
- Torras-Claveria, L., Jauregui, O., Codina, C., Tiburcio, A.F., Bastida, J. and Viladomat, F., 2012, Analysis of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry in senescent and water-stressed tobacco, *Plant Science*, 182, 71-78.
- Trease, W. and Evans, C. 1996, Pharmacology, Bailliere tindall, London, 113th; 89-122, 313-544.
- Tubaro, F., Ghiselli, A., Rapuzzi, P., Maiorino, M., Ursini, F. 1998. Analysis of plasma antioxidant capacity by competition kinetics, *Free Radical Biology & Medicine*, 24: 1228-1234.
- Türkiye Yeşilay Cemiyeti, 1986, A’dan Z’ye SİGARA, 1986, İstanbul: Sönmez Neşriyat Matbaası.
- Ulger, Z., ve Arıoğul, S., 2005, Demans ve tedavisi, *Türkiye Tıp Dergisi Geriatri Özel Sayısı*, 2005.
- USDHHS, 1982, US Department of Health and Human Services, The Health Consequences of Smoking: Cancer A Report of the Surgeon General, Washington: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Office on Smoking and Health; 1982, DHHS Publication No. (PHS) 82–50179.
- USDHHS, 1988, US Department of Health and Human Services, Nicotine addiction. The health consequences of smoking, A report of the Surge on General, 32-33: 601-602.
- Uyanık, A., 2008, Analitik Kimyacılar için İstatistik ve Kemometri, 254-259.
- Valkonen, M. ve Kuusi, T., 1997, Spectrophotometric assay for total peroxy radical-trapping antioxidant potential in human serum, *Journal of Lipid Research*, 38: 823-833.

- Vereecke, D., Messens, E., Klarskov, K., DeBruyn, A., VanMontagu, M. and Goethals, K., 1997, Patterns of phenolic compounds in leafy galls of tobacco, *Planta*, 201(3), 342-348.
- Vergi, 2014, Onuncu Kalkınma Planı 2014-2018. T. C. Kalkınma Bakanlığı Özel İhtisas Komisyonu Raporu Ankara, 2014.
- Wang, X.L., Liu, P.F., Wang, F.H., Fu, B., He, F. and Zhao, M.Q., 2017, Influence of altitudinal and latitudinal variation on the composition and antioxidant activity of polyphenols in *Nicotiana tabacum* L. leaf, *Emirates Journal Of Food And Agriculture*, 29 (5), 359-366.
- Wayner, D.D.M., Burton, G.W., Ingold, K.U. ve Locke, S., 1985, Quantitative measurement of the total peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation, *FEBS Letters*, 187: 33-37.
- Winston, G.W., Regoli, F., Dugas, A.J., Fong, J.H. ve Blanchard, K.A., 1998, A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radical Biology and Medicine*, 24: 480-493.
- Wold, S., Antti, H., Lindgren, F., Öhman, J., 1998a, Orthogonal signal correction of near-infrared spectra. *Chemometrics and Intelligent laboratory systems*, 44 (1-2), 175-185.
- Wold, S., Sjöström, M. 1998b, Chemometrics, present and future success. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, , 44: 3-14.
- Yamaguchi, T.P., Bradley, A., McMahon A.P., Jones, S.A., 1999, Wnt5a pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo, *Development*, Mar; 126(6):1211-23.
- Yavuz, S., 2005, Developing a technology attitude scale for pre-service chemistry teachers, *The Turkish Online Journal of Educational Technology – TOJET*, 4, 1, 17-25.
- Yılmaz, F., 2003, Tütün Üzerine Düşünceler: Batıda ve Bizde, Gürsoy Naskali F. (ed)., *Tütün Kitabı*, İstanbul: KİTAPEVİ 195,3-16.
- Yılmaz, M.A., 2015, Bazı Achillea l. türlerinin LCMS-IT/TOF ve LC-MS/MS ile metabolik profillerinin çıkarılması ve biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi, Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 314 s.
- Yılmaz, M.A., Çakır, O., Arıca, E., Yener, İ., Otludil, B., Alma, M.H., Ertuş, A., 2018, A., Yenilebilir Dört Bitki Türünün Fitokimyasal İçeriğinin Miktaral Tayini için LC-MS/MS Metot Validasyonu, *Iğdır Üni. Fen Bilimleri Enst. Der.* 8(1): 179-187, 2018 DOI: 10.21597/jist.407870
- Young, I.S. and Woodside, J.V., 2001, Antioxidants in Health and Disease, *Journal of Clinical Pathology*, 54, 176-186.
- Zotou, 2012, An overview of recent advances in HPLC instrumentation, June, Volume 10, Issue 3, pp 554–569.

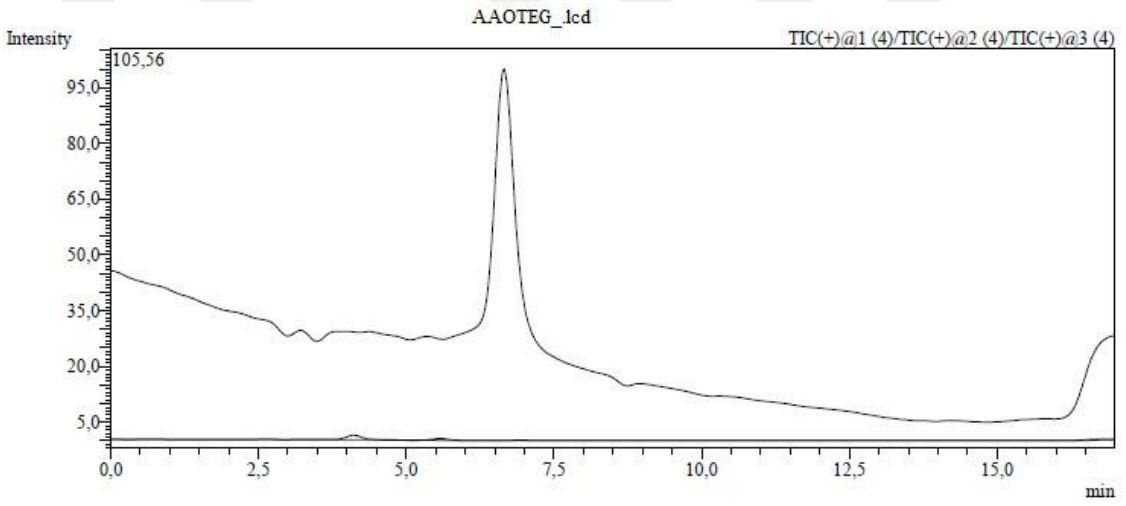
EKLER



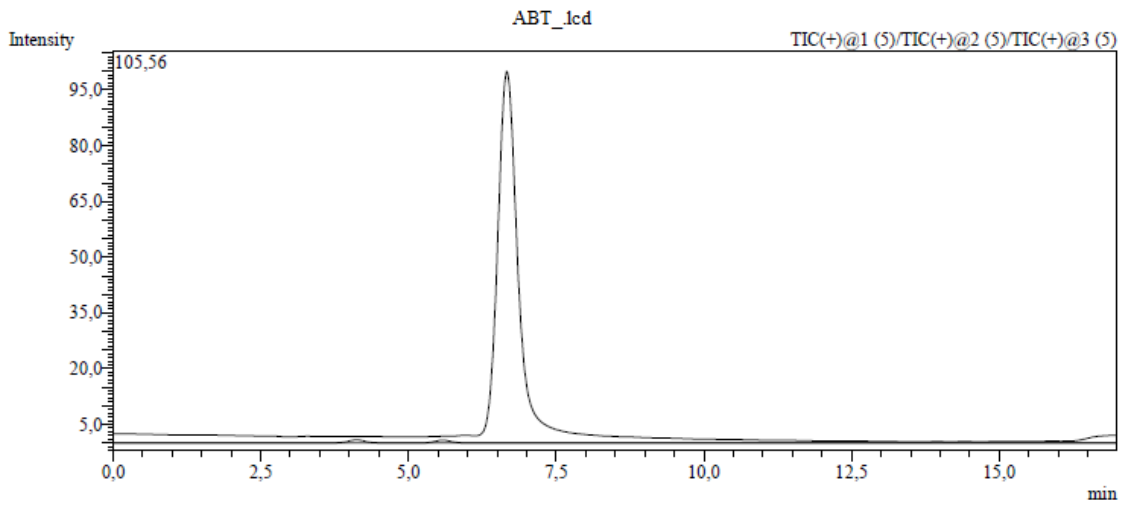
Ek 1. LC-MS/MS Metodundaki Analitlerin Kalibrasyon Grafikleri



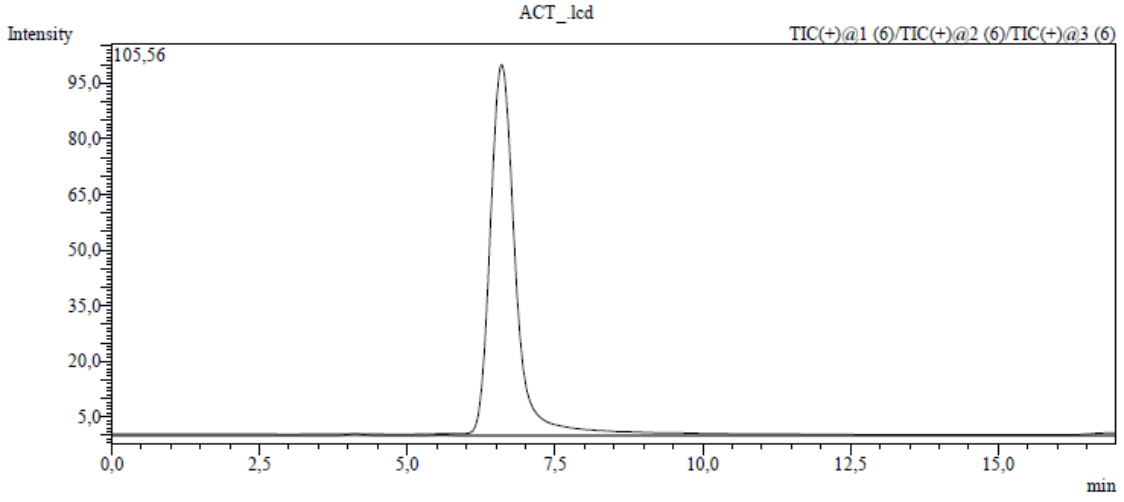
Ek 2. *Nicotiana tabacum* AAOT19 ekstresinin nikotin içeriğine ait LC-MS/MS kromatogramı



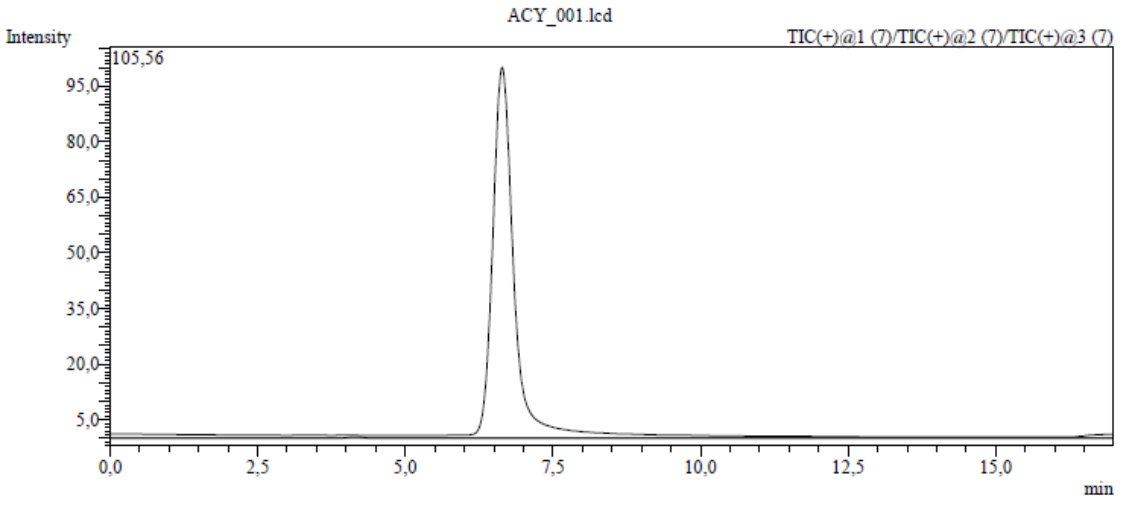
Ek 3. *Nicotiana tabacum* AAOTEG ekstresinin nikotin içeriğine ait LC-MS/MS kromatogramı



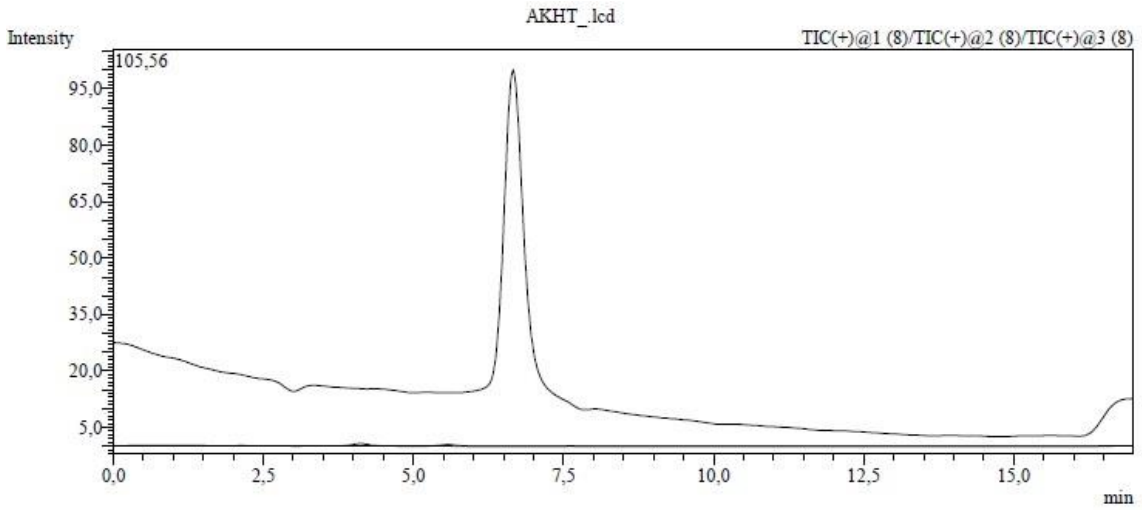
Ek 4. *Nicotiana tabacum* ABT ekstresinin nikotin içeriğine ait LC-MS/MS kromatogramı



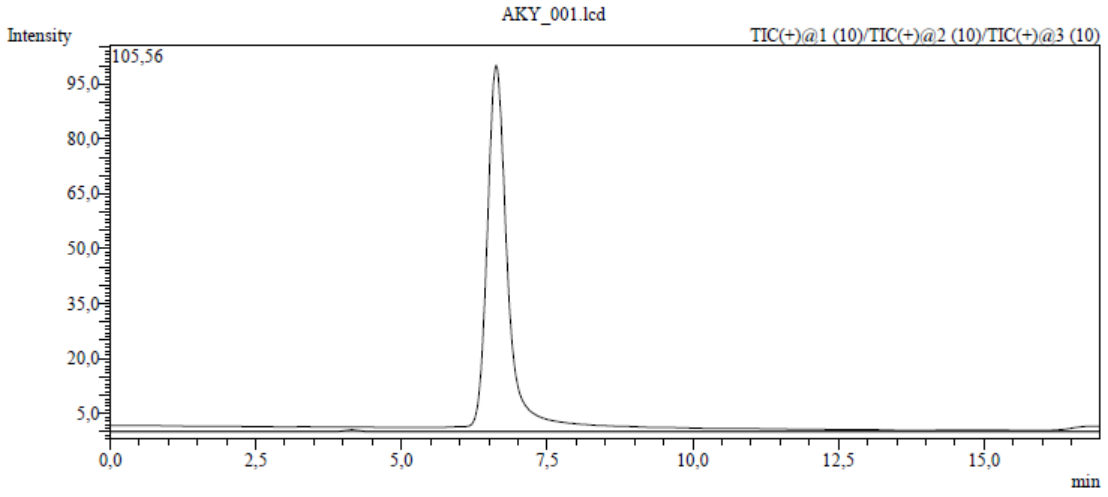
Ek 5. *Nicotiana tabacum* ACT ekstresinin nikotin içeriğine ait LC-MS/MS kromatogramı



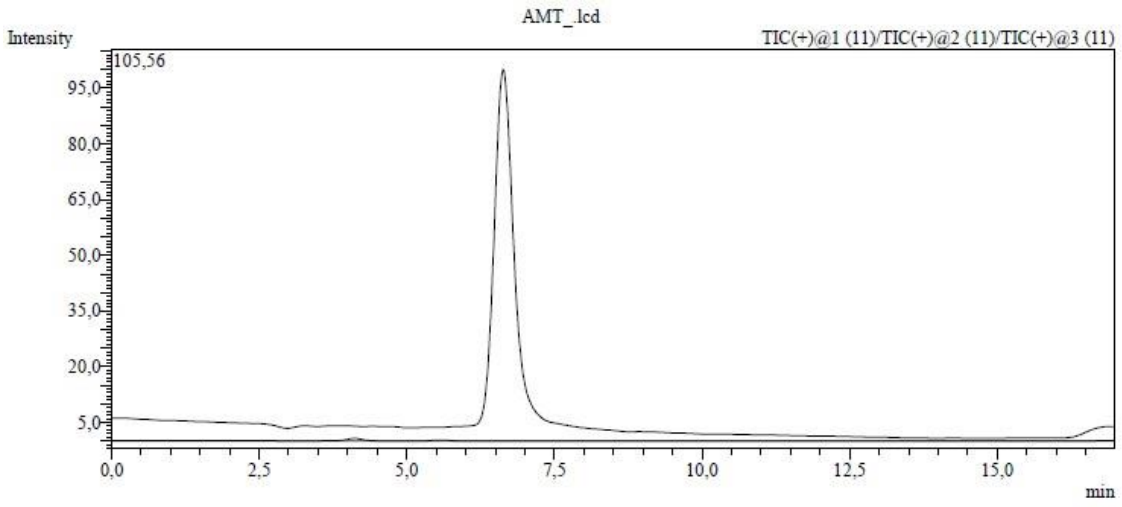
Ek 6. *Nicotiana tabacum* ACY ekstresinin nikotin içeriğine ait LC-MS/MS kromatogramı



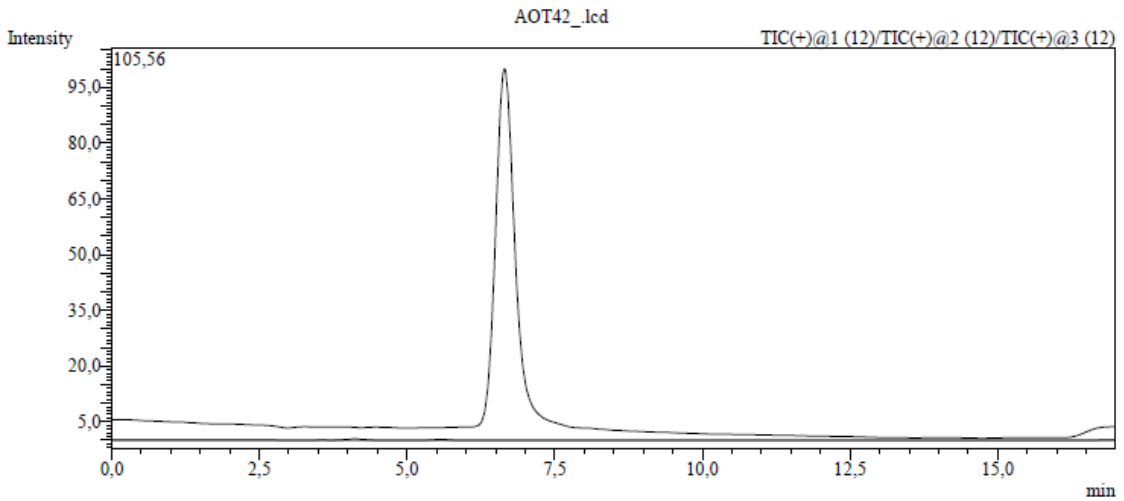
Ek 7. *Nicotiana tabacum* AKHT ekstresinin nikotin içeriğine ait LC-MS/MS kromatogramı



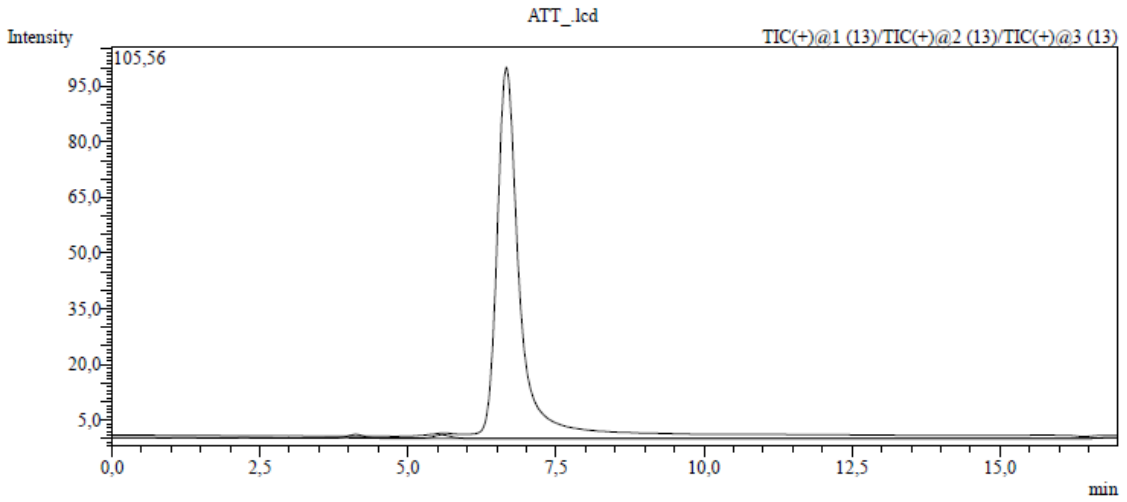
Ek 8. *Nicotiana tabacum* AKY ekstresinin nikotin içeriğine ait LC-MS/MS kromatogramı



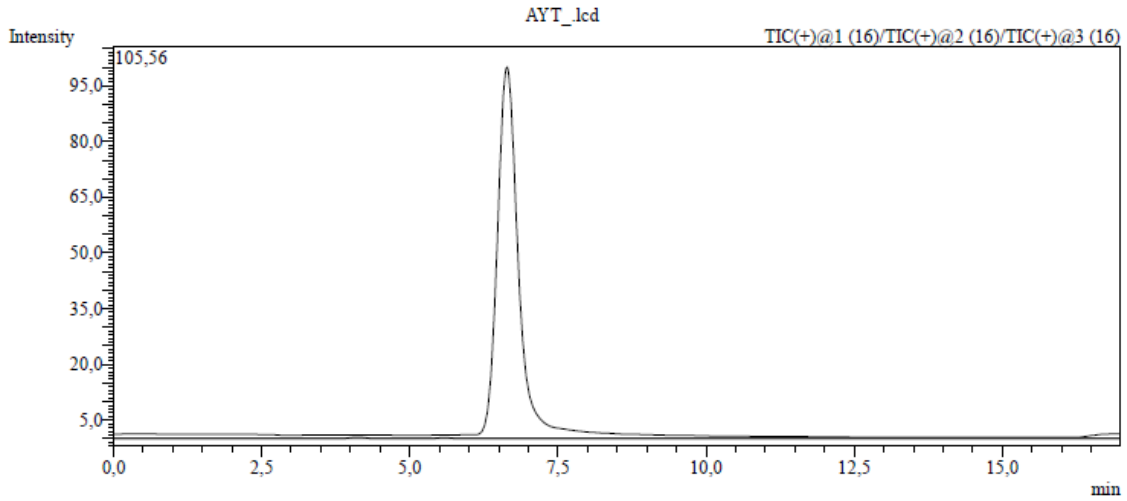
Ek 9. *Nicotiana tabacum* AMT ekstresinin nikotin içeriğine ait LC-MS/MS kromatogramı



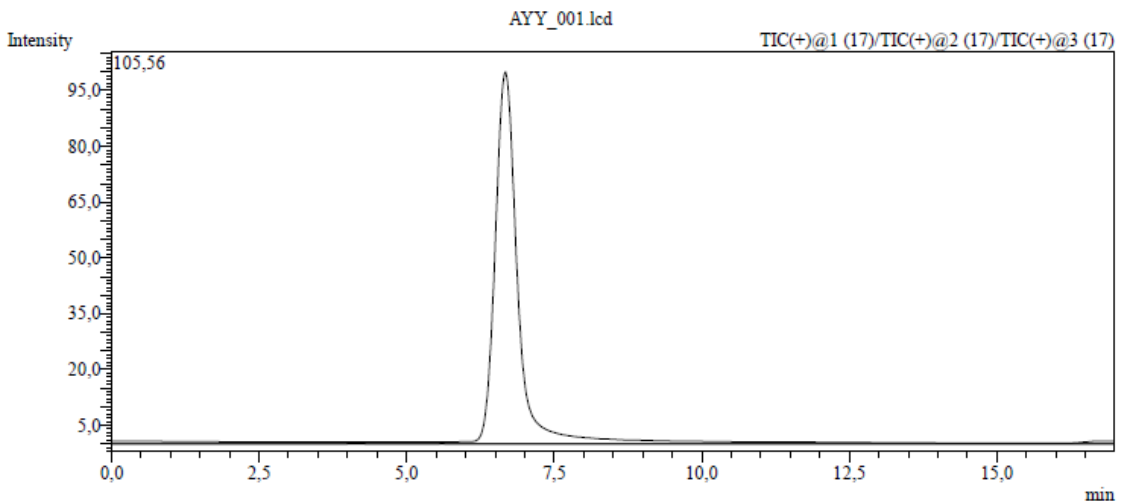
Ek 10. *Nicotiana tabacum* AOT42 ekstresinin nikotin içeriğine ait LC-MS/MS kromatogramı



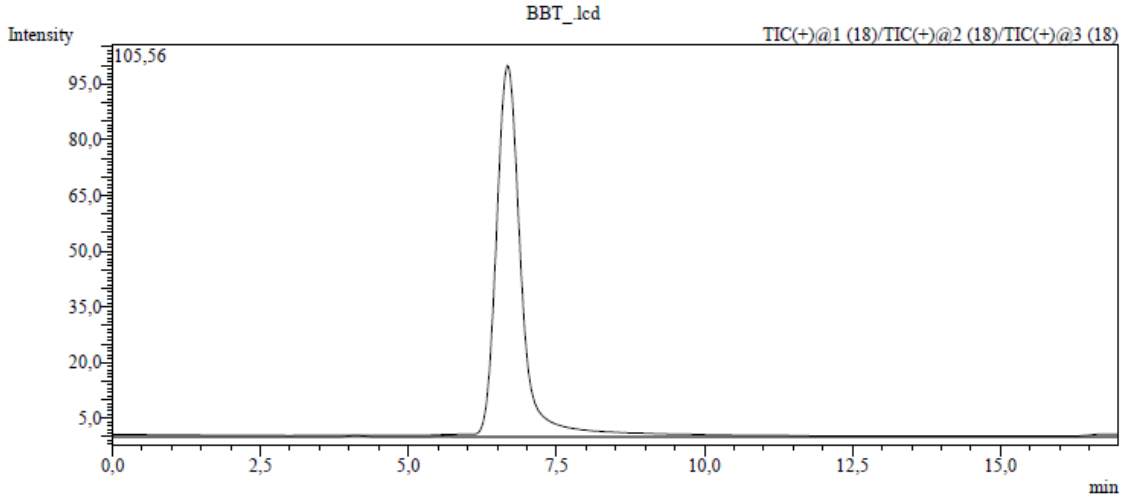
Ek 11. *Nicotiana tabacum* ATT ekstresinin nikotin içeriğine ait LC-MS/MS kromatogramı



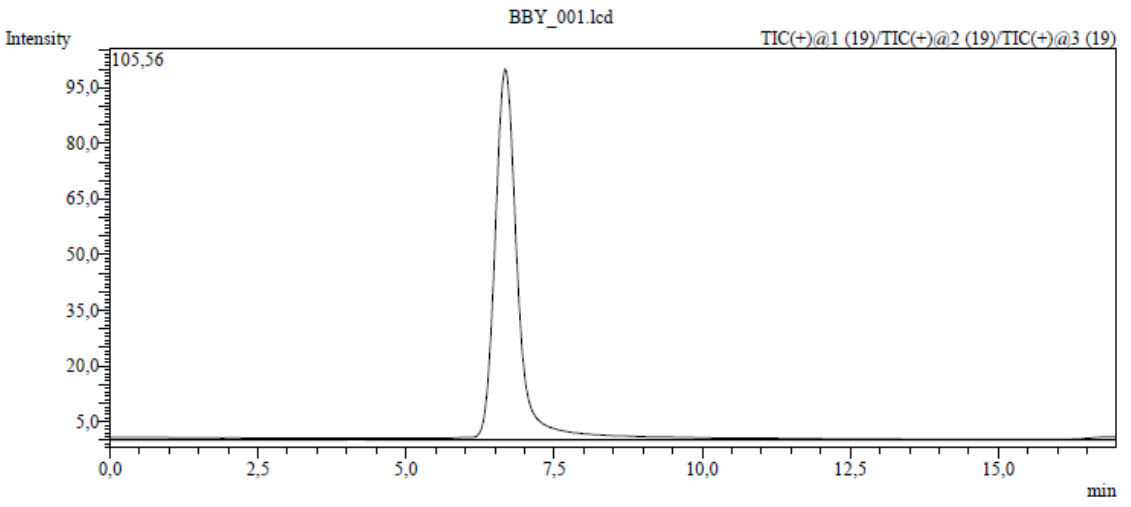
Ek 12. *Nicotiana tabacum* AYT ekstresinin nikotin içeriğine ait LC-MS/MS kromatogramı



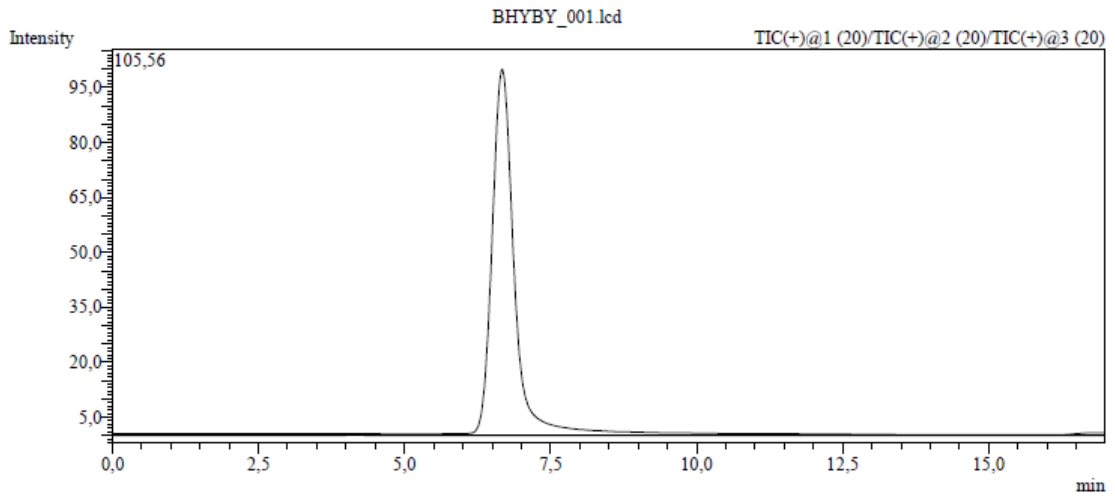
Ek 13. *Nicotiana tabacum* AYY ekstresinin nikotin içeriğine ait LC-MS/MS kromatogramı



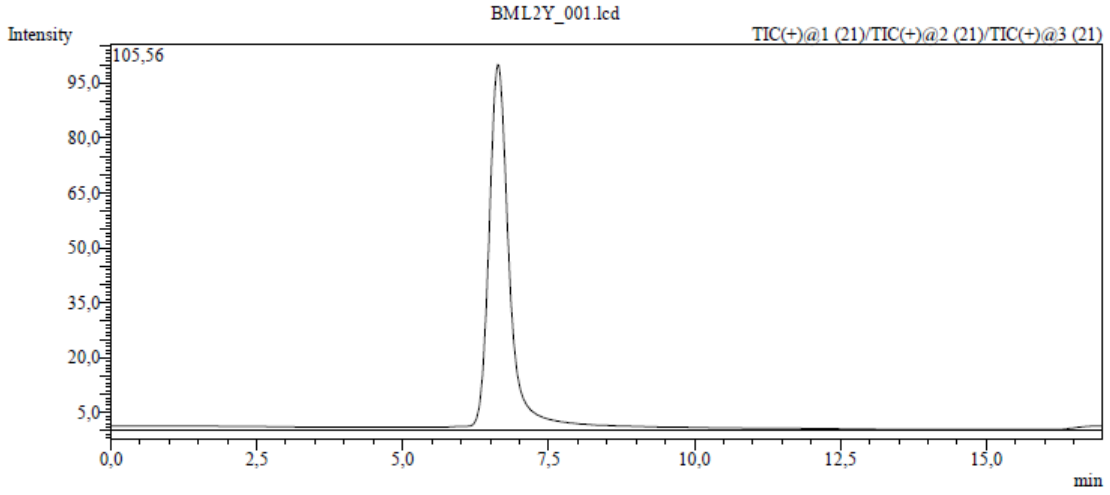
Ek 14. *Nicotiana tabacum* BBT ekstresinin nikotin içeriğine ait LC-MS/MS kromatogramı



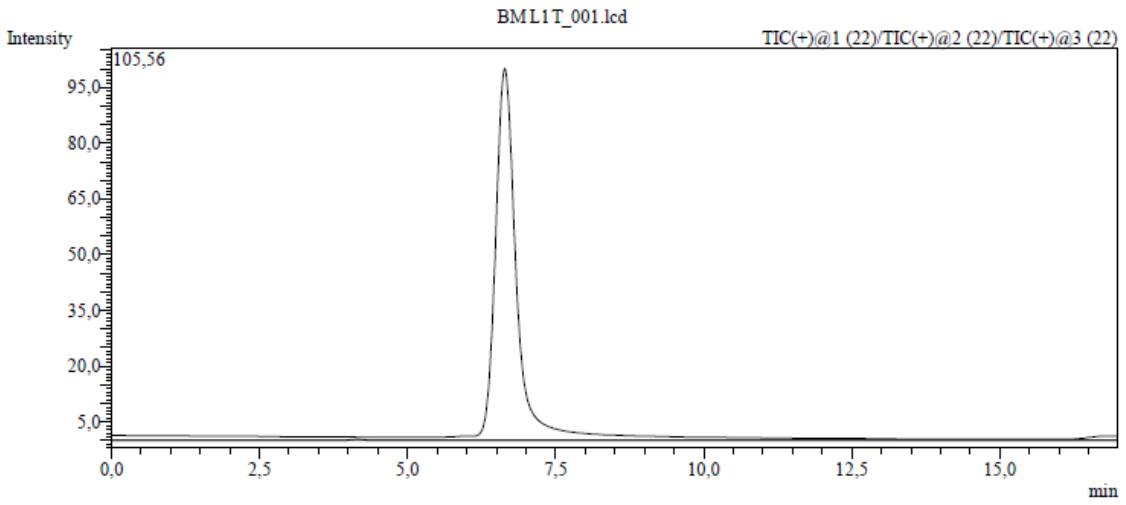
Ek 15. *Nicotiana tabacum* BBY ekstresinin nikotin içeriğine ait LC-MS/MS kromatogramı



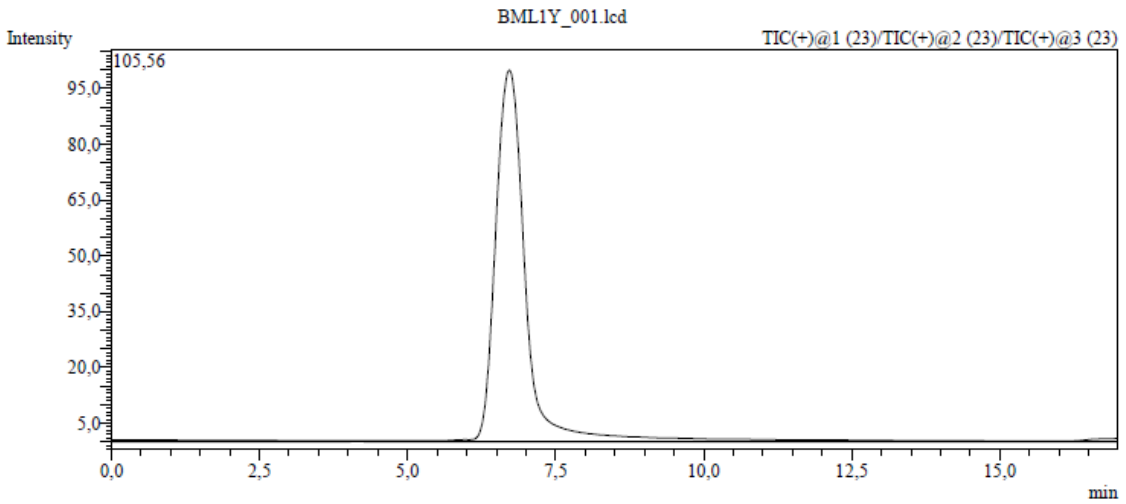
Ek 16. *Nicotiana tabacum* BHYBY ekstresinin nikotin içeriğine ait LC-MS/MS kromatogramı



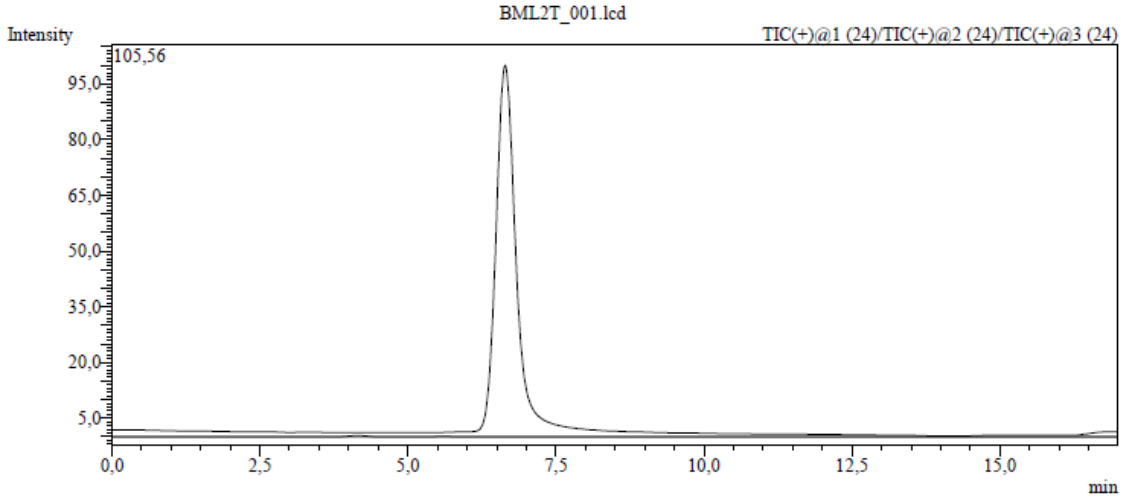
Ek 17. *Nicotiana tabacum* BML2Y ekstresinin nikotin içeriğine ait LC-MS/MS kromatogramı



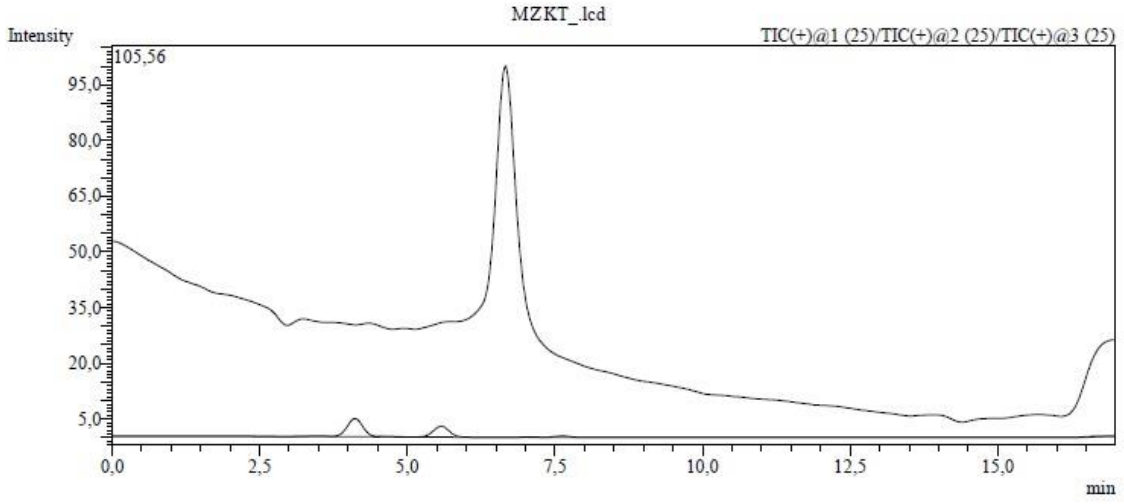
Ek 18. *Nicotiana tabacum* BML1T ekstresinin nikotin içeriğine ait LC-MS/MS kromatogramı



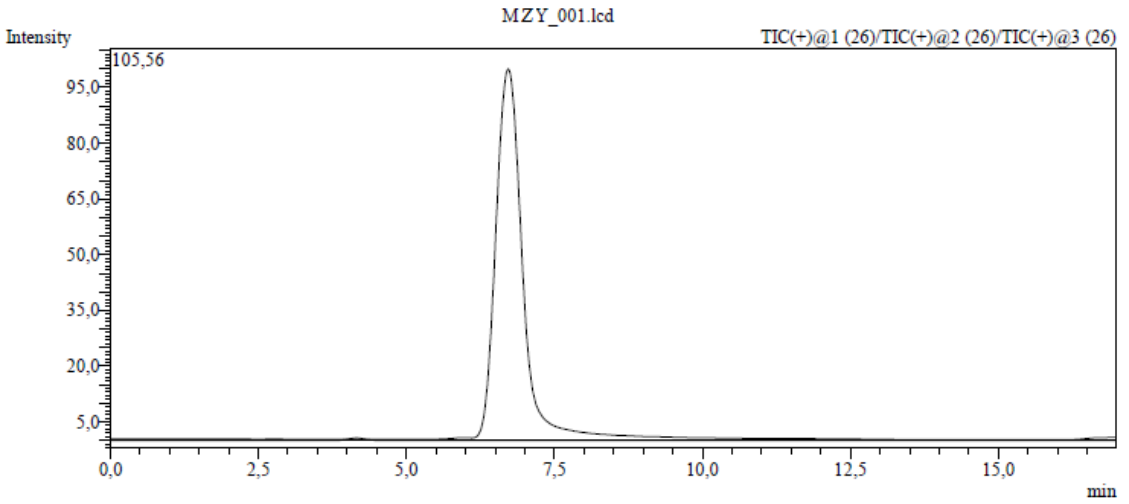
Ek 19. *Nicotiana tabacum* BML1Y ekstresinin nikotin içeriğine ait LC-MS/MS kromatogramı



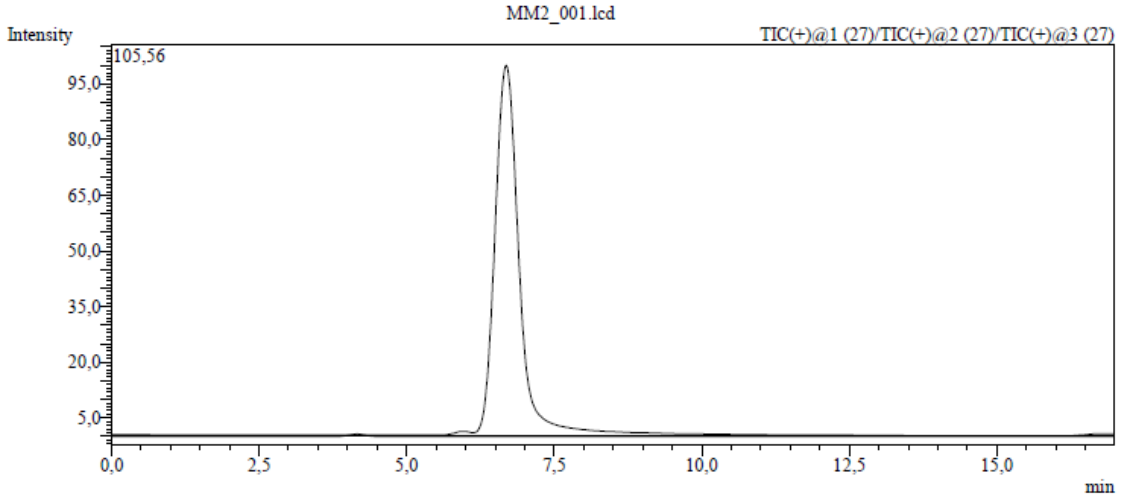
Ek 20. *Nicotiana tabacum* BML2T ekstresinin nikotin içeriğine ait LC-MS/MS kromatogramı



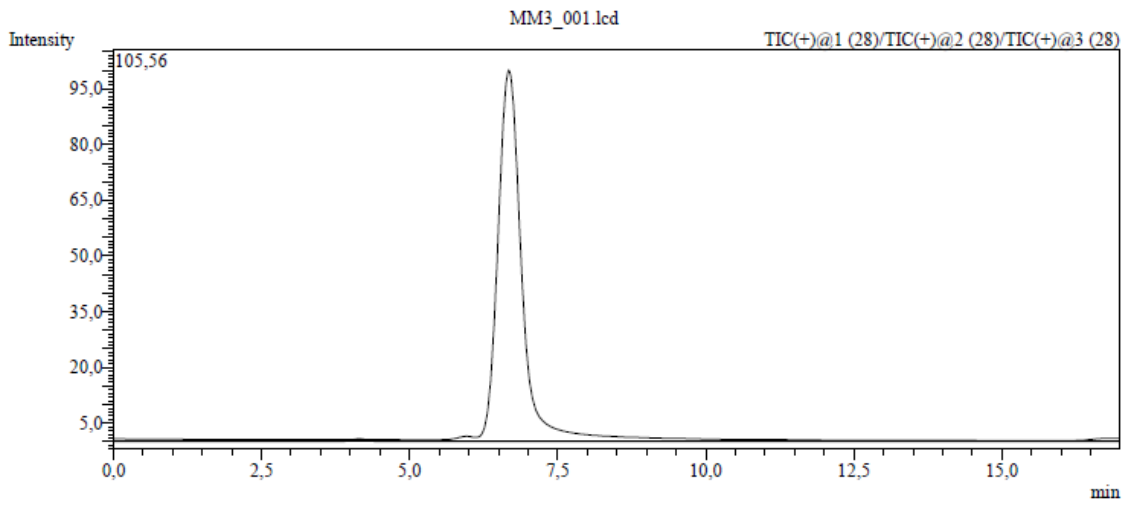
Ek 21. *Nicotiana tabacum* MZKT ekstresinin nikotin içeriğine ait LC-MS/MS kromatogramı



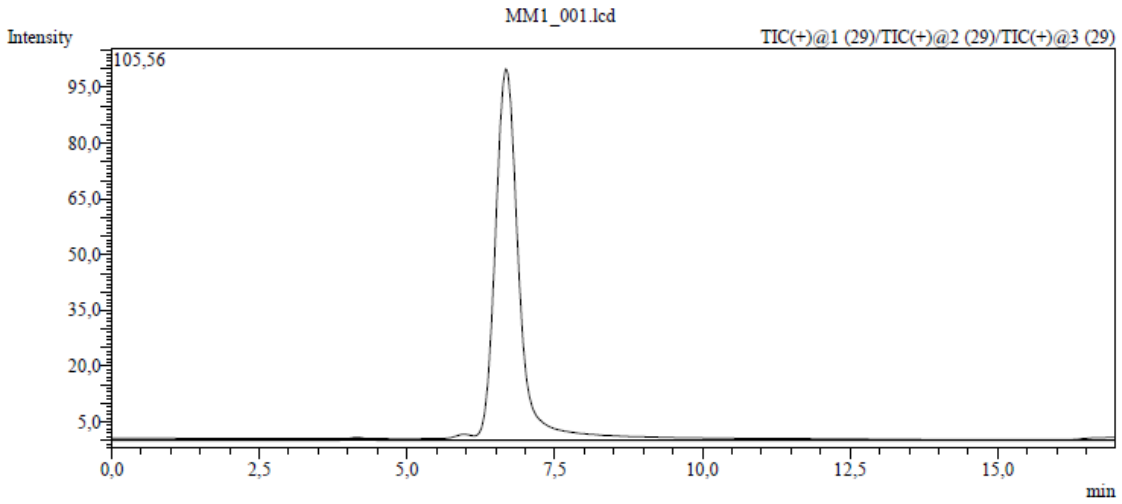
Ek 22. *Nicotiana tabacum* MZY ekstresinin nikotin içeriğine ait LC-MS/MS kromatogramı



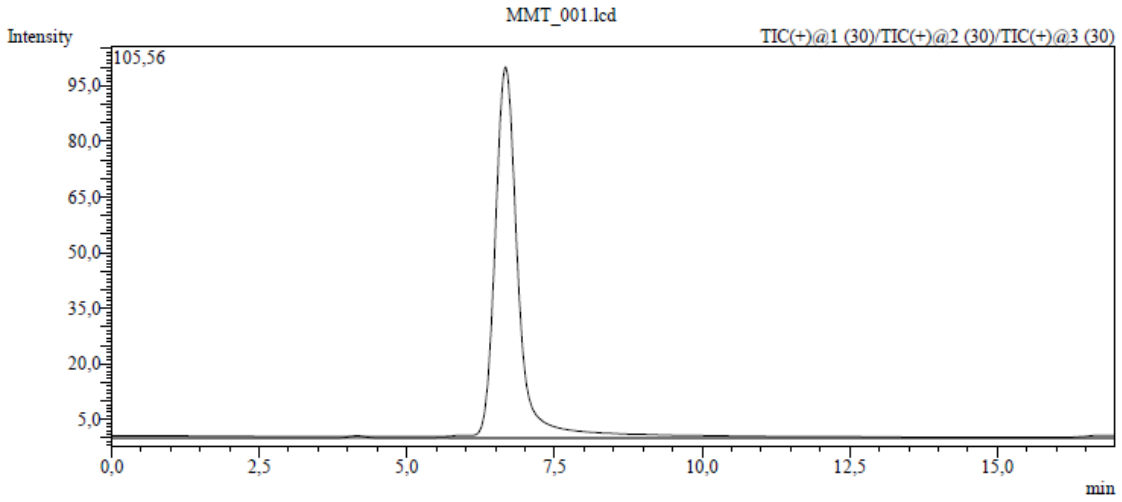
Ek 23. *Nicotiana tabacum* MM2 ekstresinin nikotin içeriğine ait LC-MS/MS kromatogramı



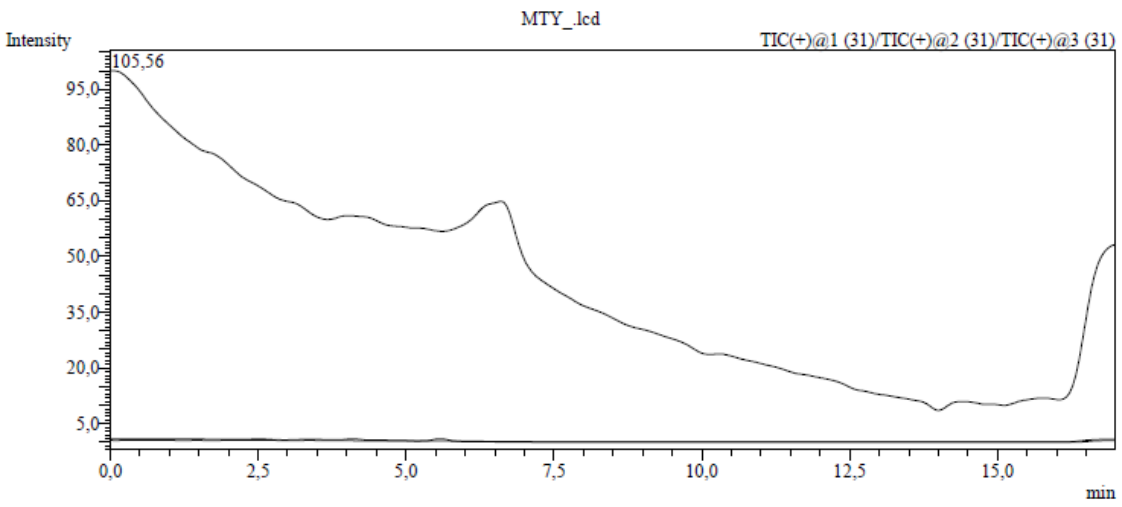
Ek 24. *Nicotiana tabacum* MM3 ekstresinin nikotin içeriğine ait LC-MS/MS kromatogramı



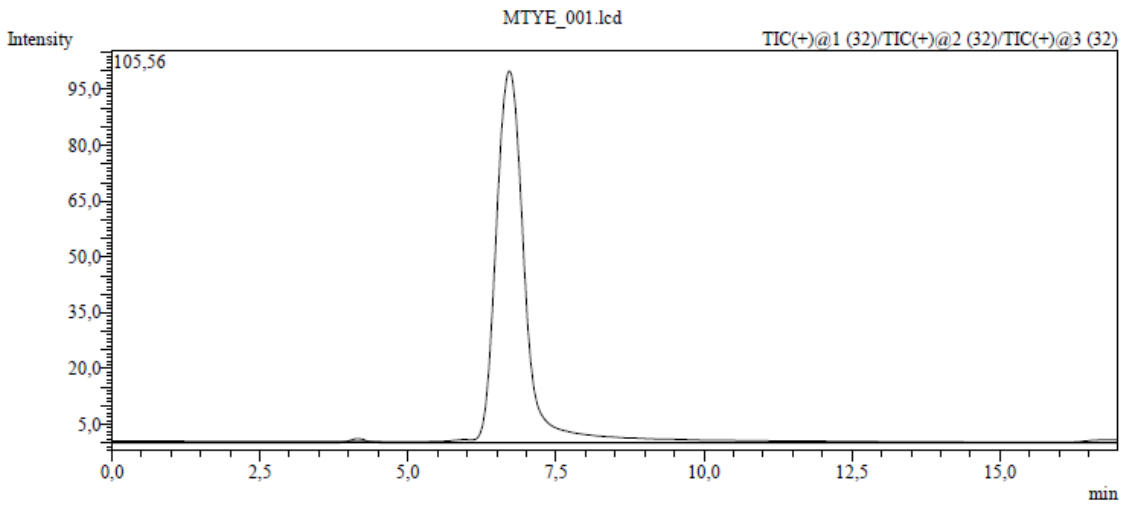
Ek 25. *Nicotiana tabacum* MM1 ekstresinin nikotin içeriğine ait LC-MS/MS kromatogramı



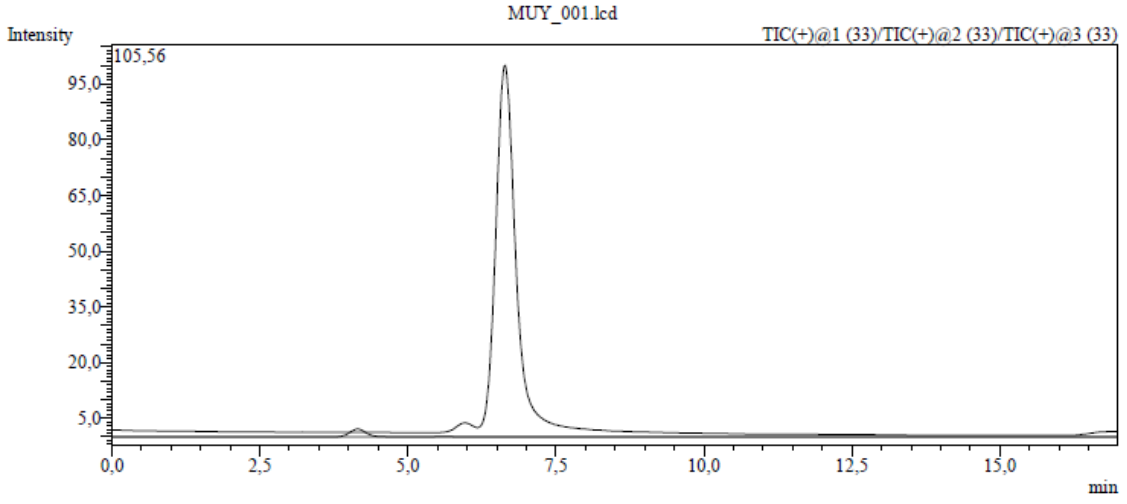
Ek 26. *Nicotiana tabacum* MMT ekstresinin nikotin içeriğine ait LC-MS/MS kromatogramı



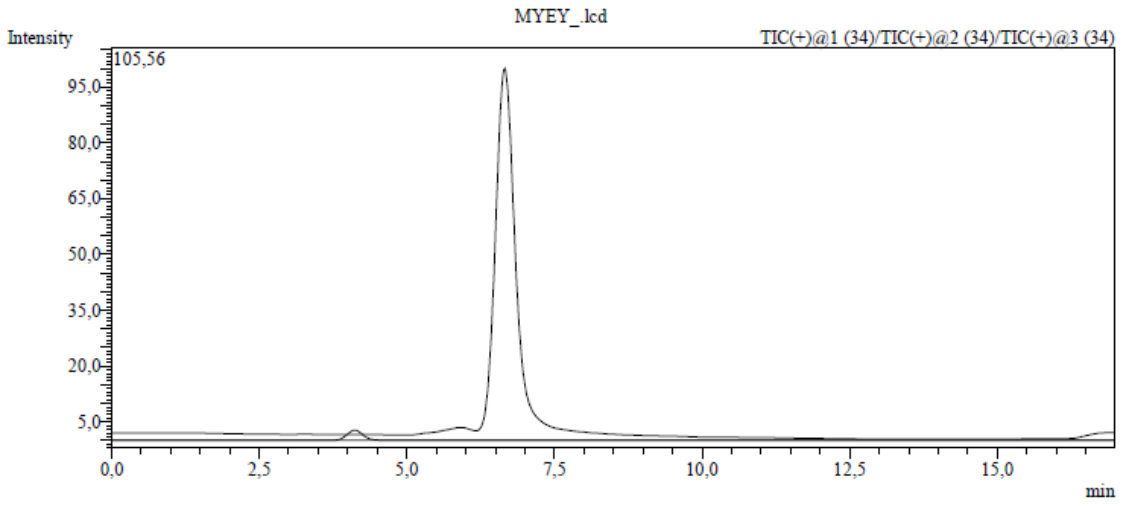
Ek 27. *Nicotiana tabacum* MTY ekstresinin nikotin içeriğine ait LC-MS/MS kromatogramı



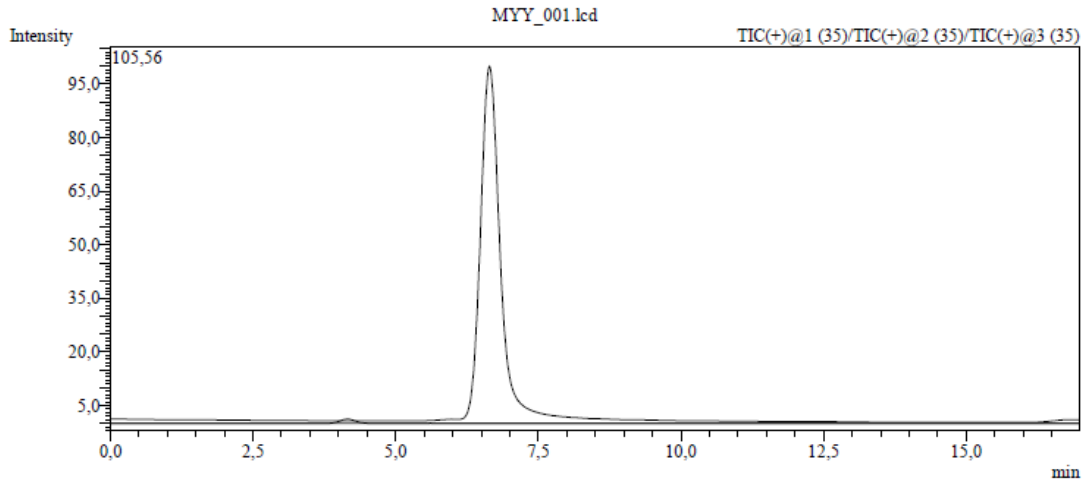
Ek 28. *Nicotiana tabacum* MTYE ekstresinin nikotin içeriğine ait LC-MS/MS kromatogramı



Ek 29. *Nicotiana tabacum* MUY ekstresinin nikotin içeriğine ait LC-MS/MS kromatogramı



Ek 30. *Nicotiana tabacum* MYEY ekstresinin nikotin içeriğine ait LC-MS/MS kromatogramı



Ek 31. *Nicotiana tabacum* MYY ekstresinin nikotin içeriğine ait LC-MS/MS kromatogramı

Ek 32. HPLC Değişim Derecesi Programı 11

Zaman (dk)	% Mobil Faz B
Başlama	10
0-10	10-90
10-13	90
13,01-17	10

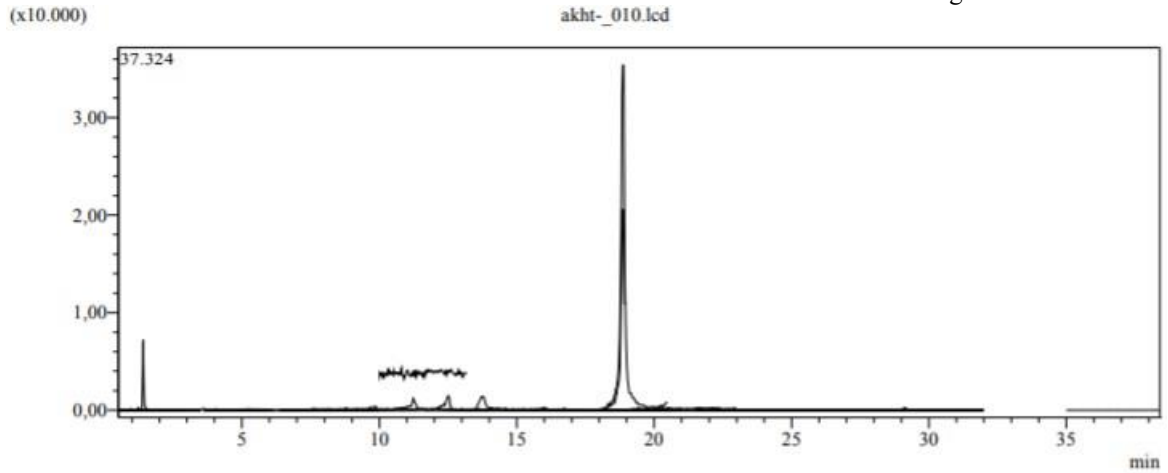
Ek 33. Cihaz Parametreleri-1

#	Analyte'ler	İyonizasyon Modu	Ana İyon (m/z)	Parçalanmış İyonlar (m/z)	RT	Conc Seviye 1	Conc Seviye 2	Conc Seviye 3	Conc Seviye 4	Conc Seviye 5	Conc Seviye 6	Conc Seviye 7	Conc Seviye 8
1	Nicotinic asit	Pozitif	124,20	80,2/78,2/53,1	4,158	100	200	400	1000	1600	2000	4000	6400
2	Nicotinamide	Pozitif	123,20	80,2/78,2/53,1	5,590	100	200	400	1000	1600	2000	4000	6400
3	Nicotine	Pozitif	163,20	132,2/130,2/117,1	6,676	100	200	400	1000	1600	2000	4000	6400

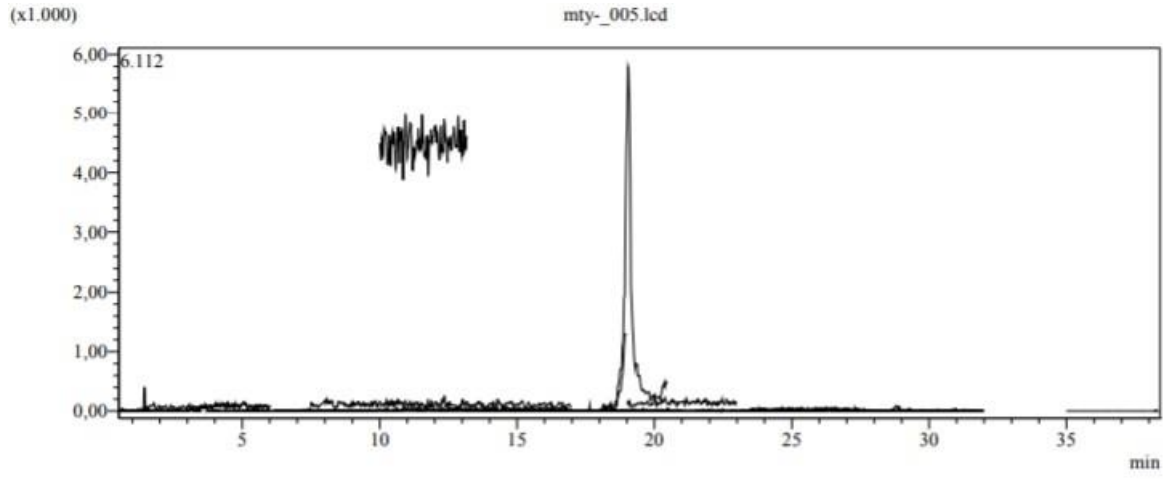
Ek 34. Cihaz Parametreleri-2

#	Analyte'ler	İyonizasyon Modu	Ana İyon (m/z)	Parçalanmış İyonlar (m/z)	RT	Denklem	R ²	Doğrusallık (ppb)
1	Nicotinic asit	Pozitif	124,20	80,2/78,2/53,1	4,158	y=1126,44x+519254	0,9915	100-6400
2	Nicotinamide	Pozitif	123,20	80,2/78,2/53,1	5,590	y=3536,48x+1,03554e+006	0,9900	100-6400
3	Nicotine	Pozitif	163,20	132,2/130,2/117,1	6,676	y=6727,11x+80042	0,9996	100-6400

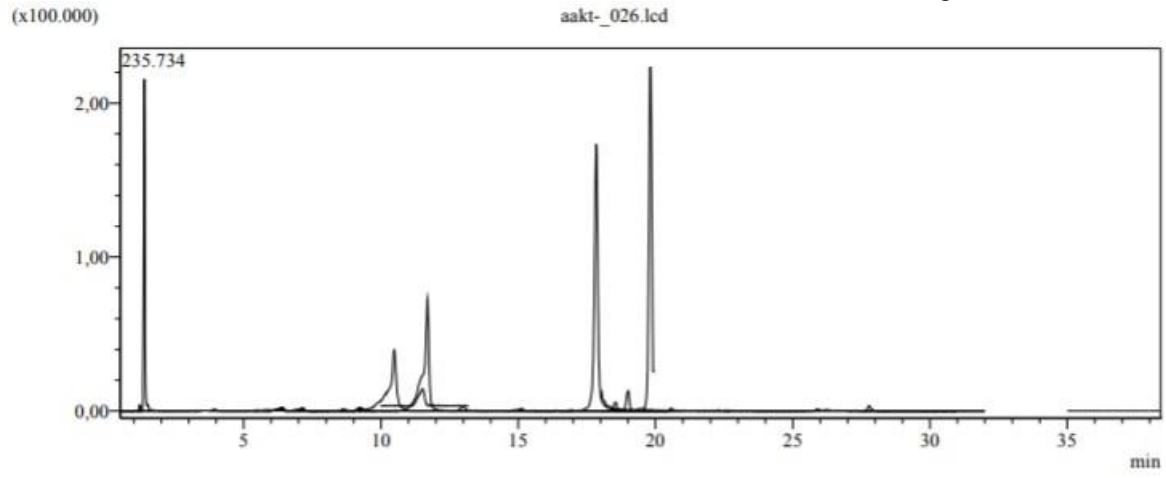
Ek 35. *N.tabacum* AKTH 'nin metanol ekstresinin LC-MS/MS kromatogramları



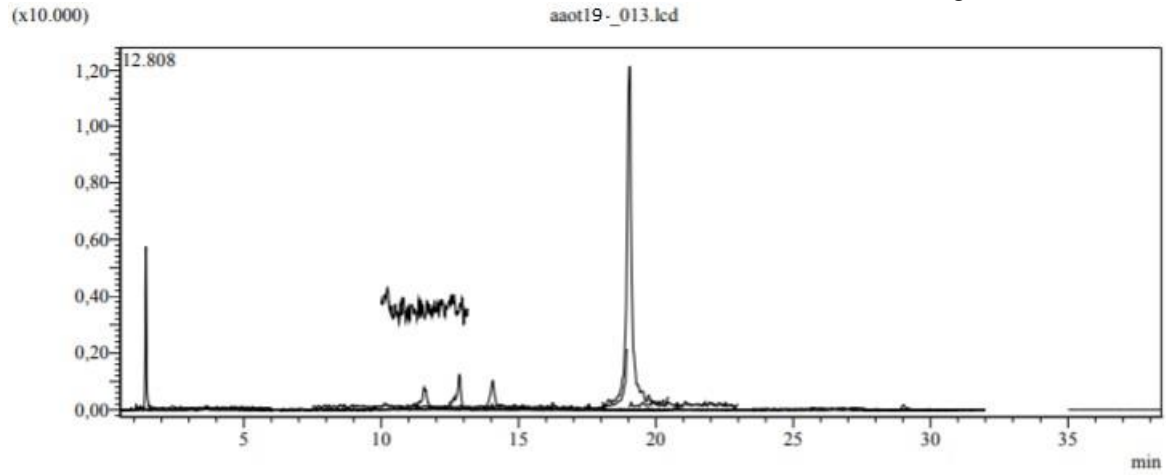
Ek 36. *N.tabacum* mty 'nin metanol ekstresinin LC-MS/MS kromatogramları



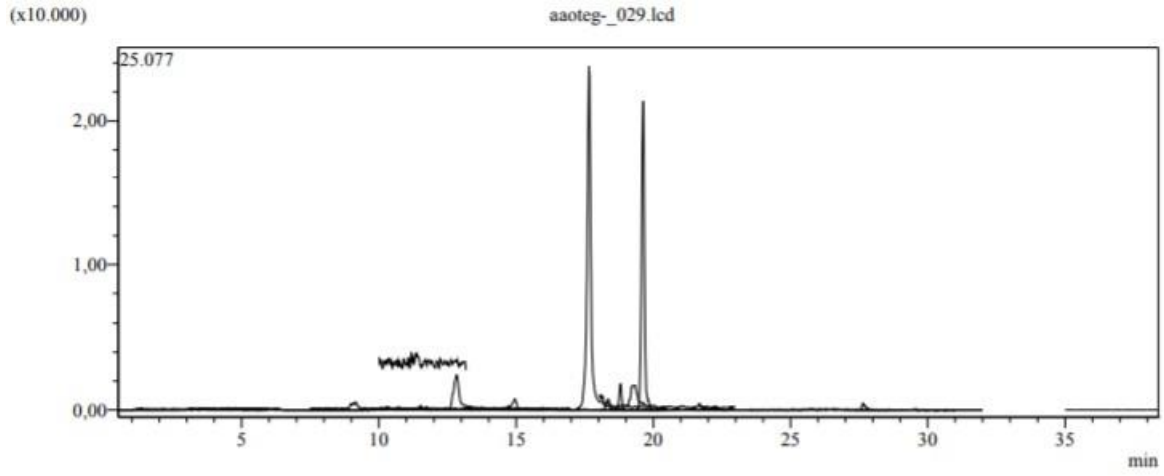
Ek 37. *N.tabacum* aakt 'nin metanol ekstresinin LC-MS/MS kromatogramları



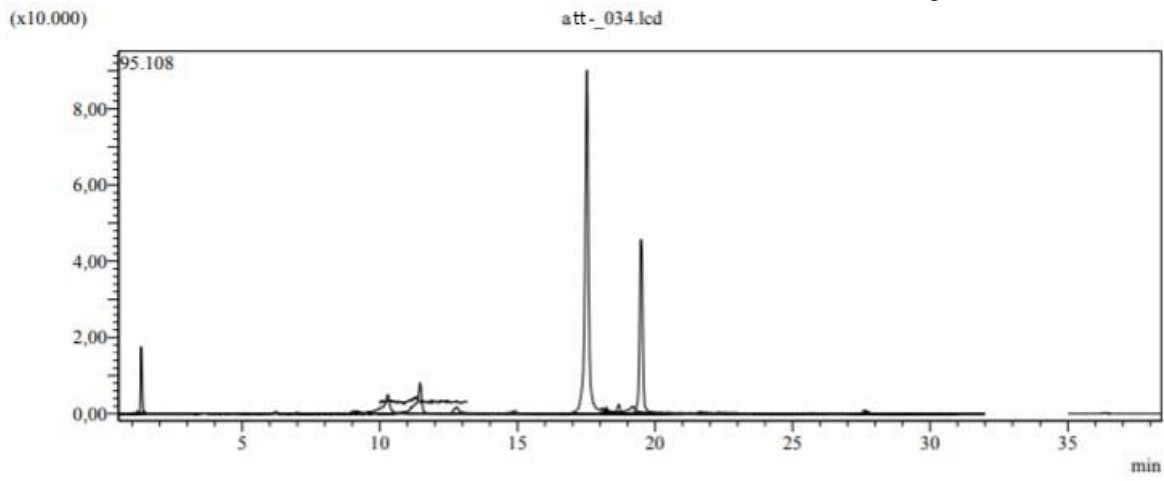
Ek 38. *N.tabacum* aoot19 'nin metanol ekstresinin LC-MS/MS kromatogramları



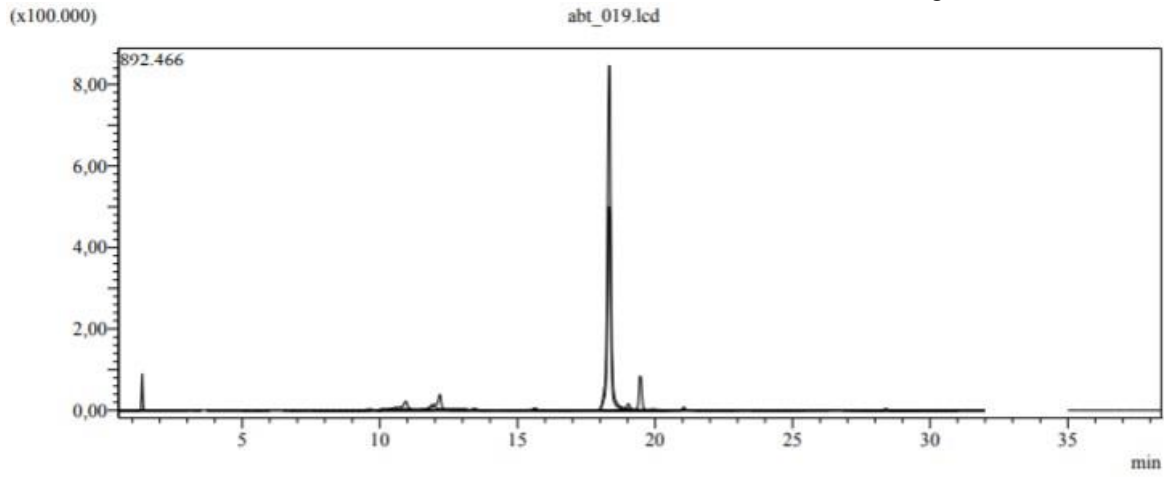
Ek 39. *N.tabacum* aooteg 'nin metanol ekstresinin LC-MS/MS kromatogramları



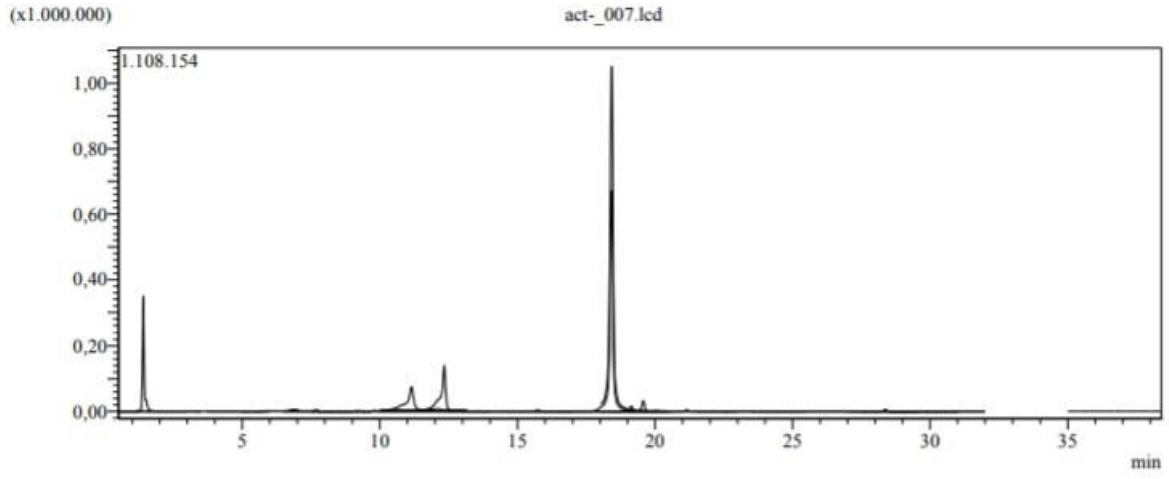
Ek 40. *N. tabacum* att 'nin metanol ekstresinin LC-MS/MS kromatogramları



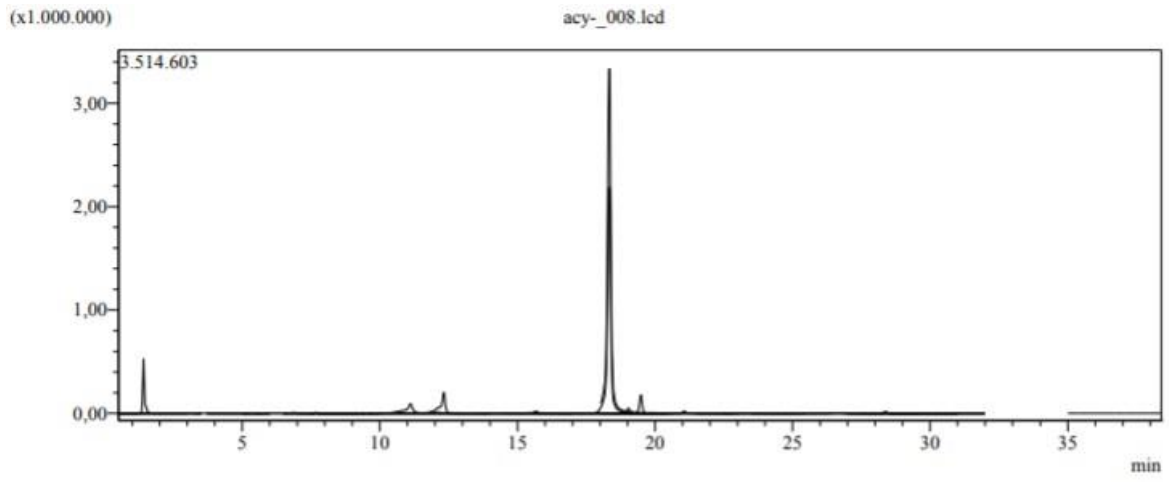
Ek 41. *N. tabacum* abt 'nin metanol ekstresinin LC-MS/MS kromatogramları



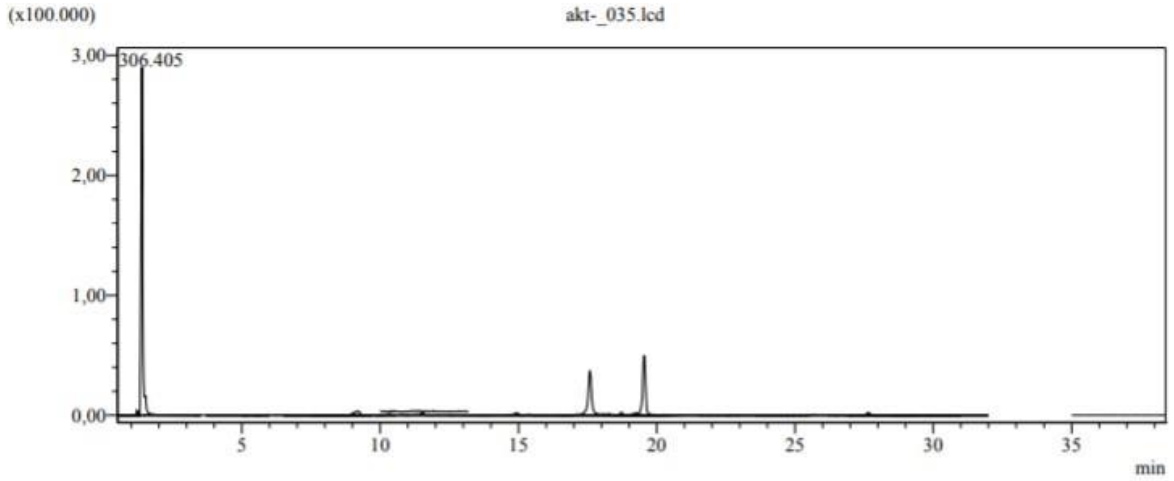
Ek 42. *N. tabacum* act 'nin metanol ekstresinin LC-MS/MS kromatogramları



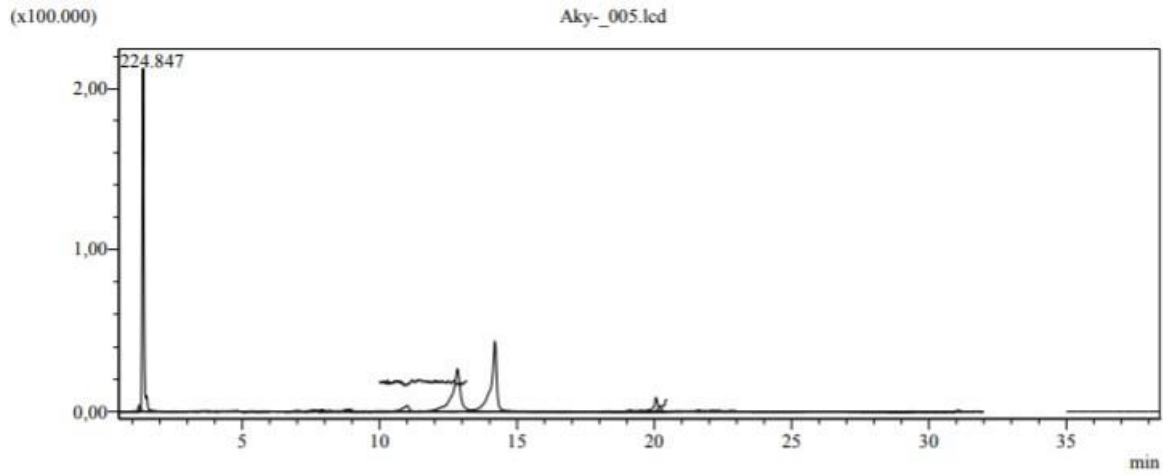
Ek 43. *N.tabacum* acy 'nin metanol ekstresinin LC-MS/MS kromatogramları



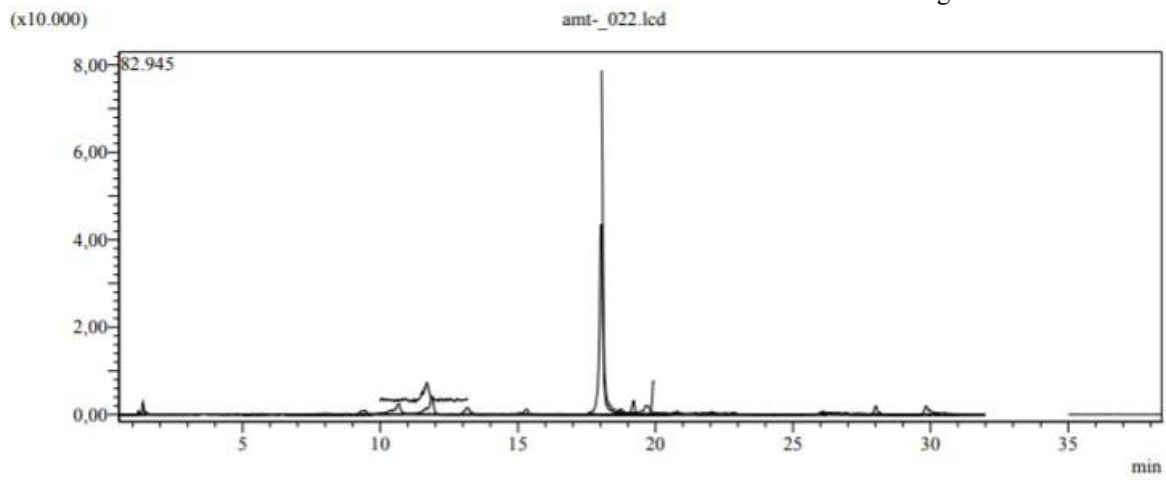
Ek 44. *N.tabacum* akt 'nin metanol ekstresinin LC-MS/MS kromatogramları



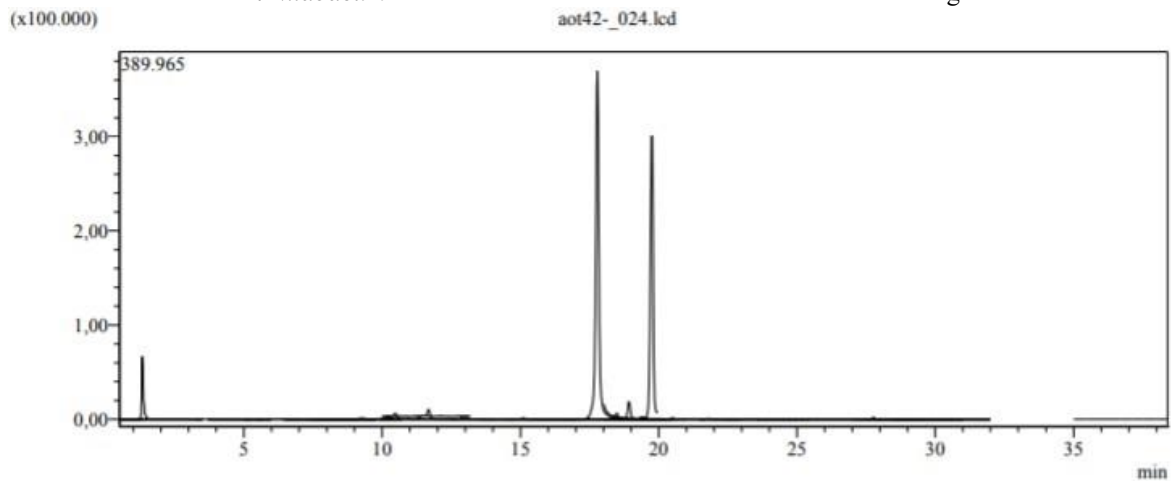
Ek 45. *N.tabacum* aky 'nin metanol ekstresinin LC-MS/MS kromatogramları



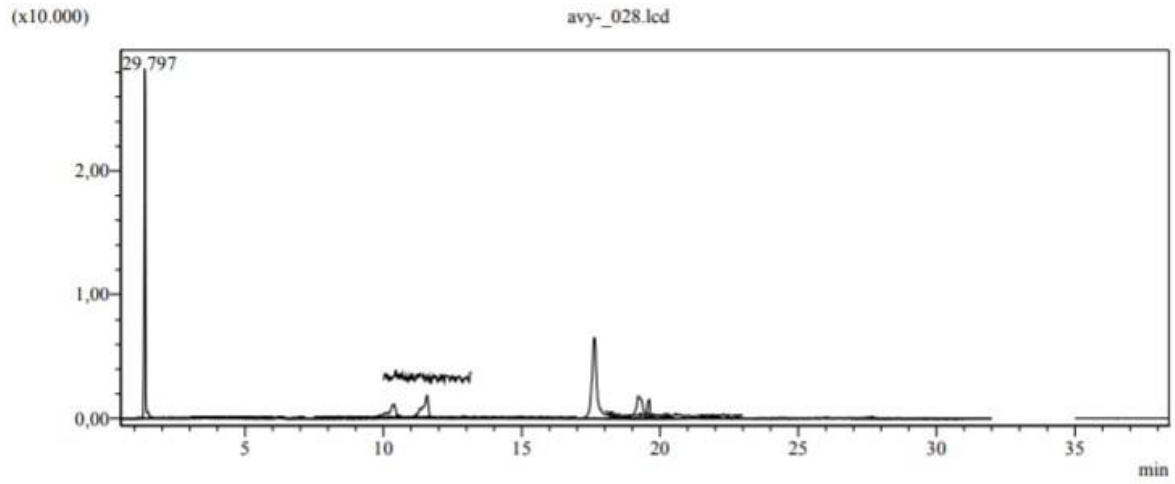
Ek 46. *N.tabacum* amt 'nin metanol ekstresinin LC-MS/MS kromatogramları



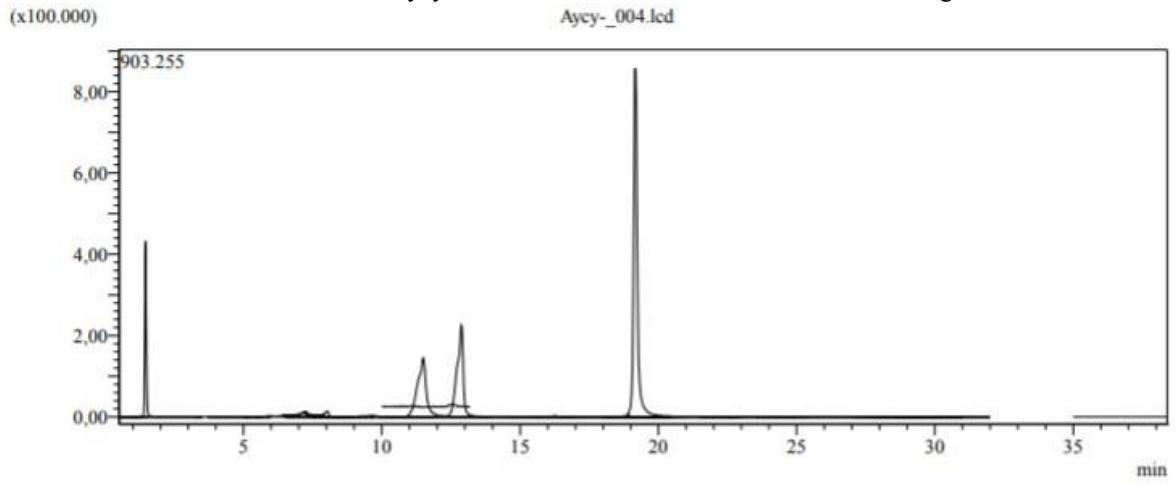
Ek 47. *N.tabacum* aot42 'nin metanol ekstresinin LC-MS/MS kromatogramları



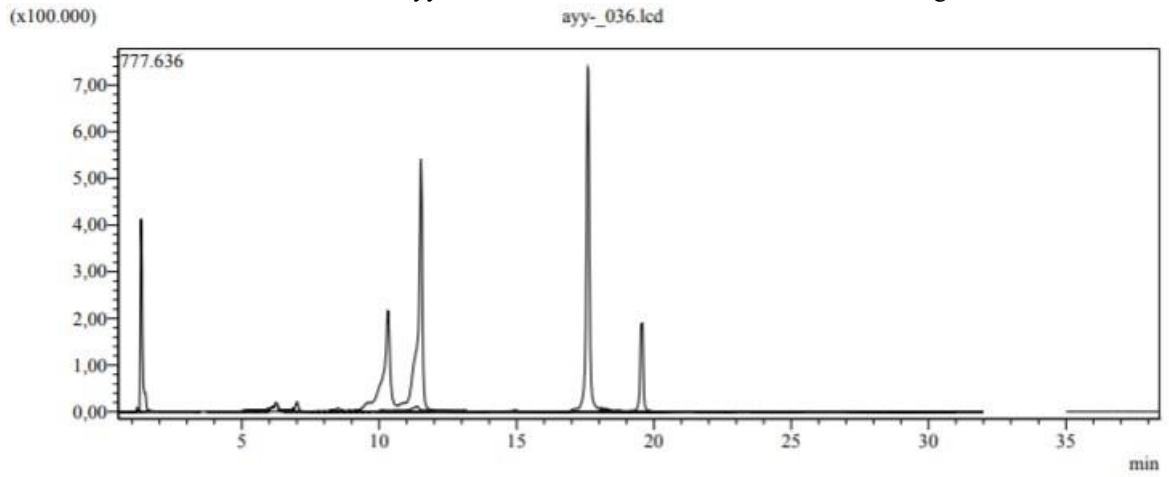
Ek 48. *N.tabacum* avy 'nin metanol ekstresinin LC-MS/MS kromatogramları



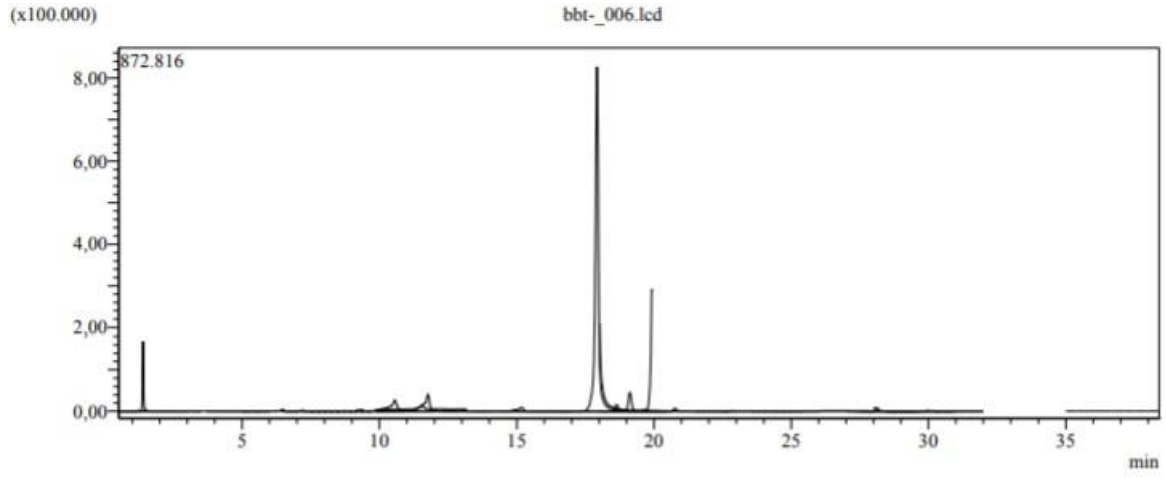
Ek 49. *N.tabacum* aycy 'nin metanol ekstresinin LC-MS/MS kromatogramları



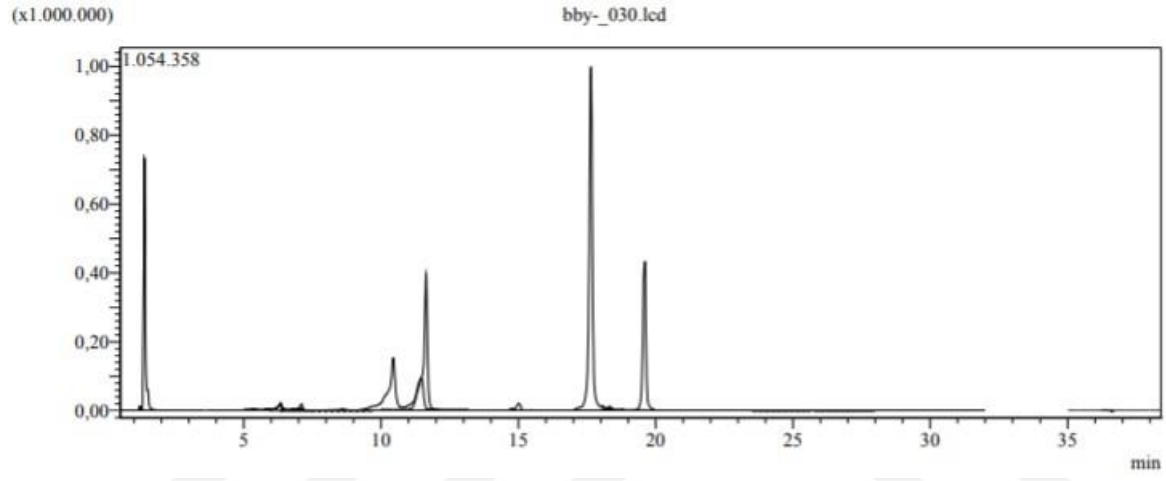
Ek 50. *N.tabacum* ayy 'nin metanol ekstresinin LC-MS/MS kromatogramları



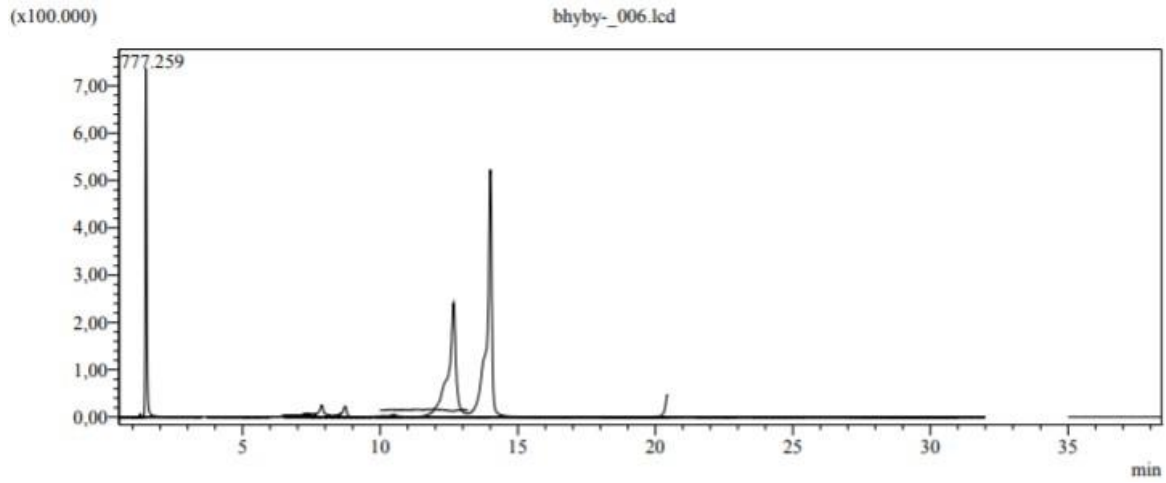
Ek 51. *N.tabacum* bbt 'nin metanol ekstresinin LC-MS/MS kromatogramları



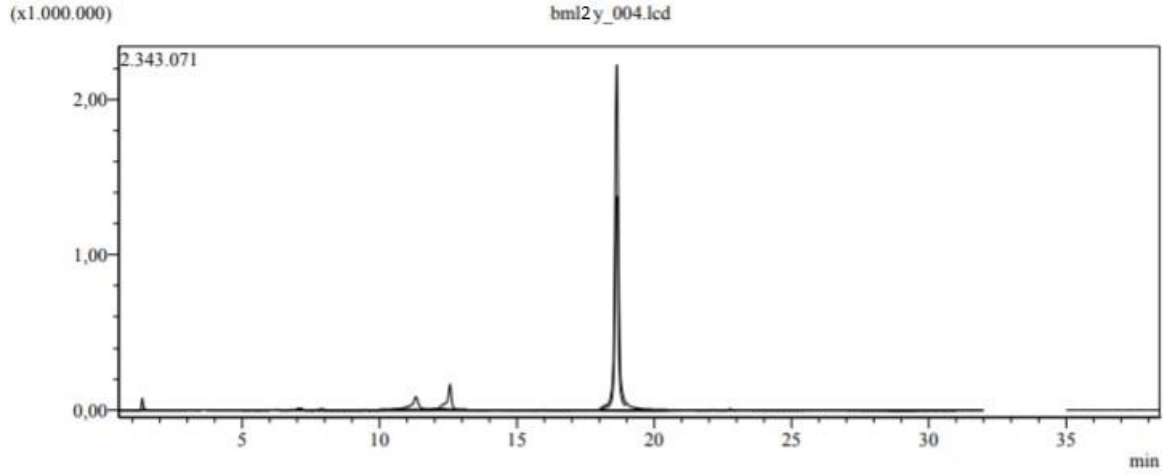
Ek 52. *N.tabacum* bby 'nin metanol ekstresinin LC-MS/MS kromatogramları



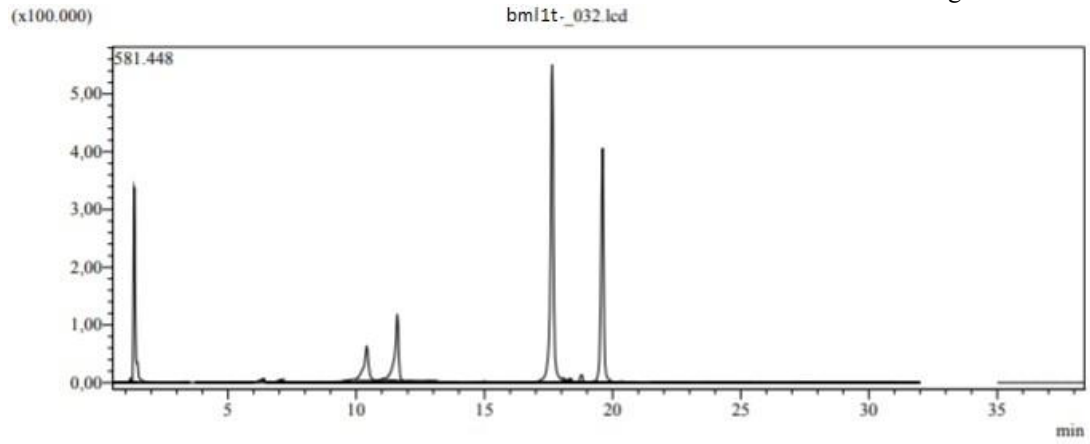
Ek 53. *N.tabacum* bbyby 'nin metanol ekstresinin LC-MS/MS kromatogramları



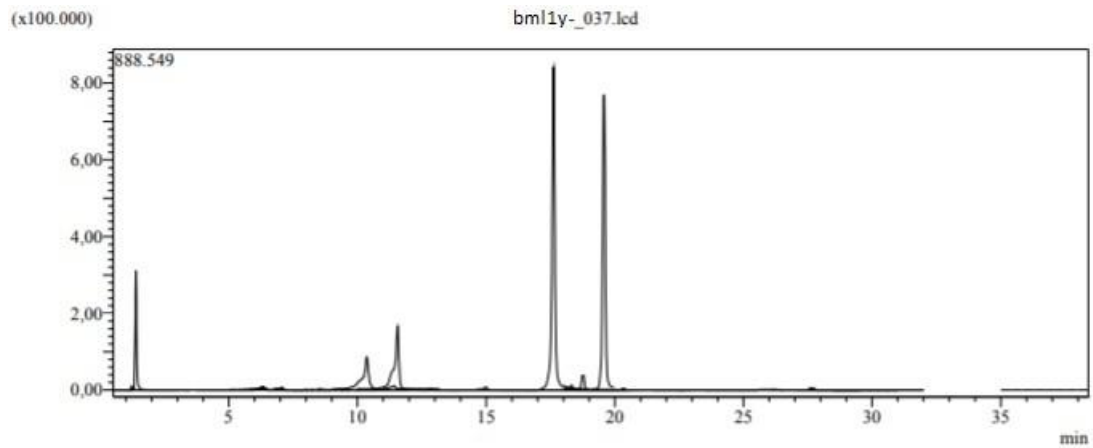
Ek 54. *N.tabacum* bml2y 'nin metanol ekstresinin LC-MS/MS kromatogramları



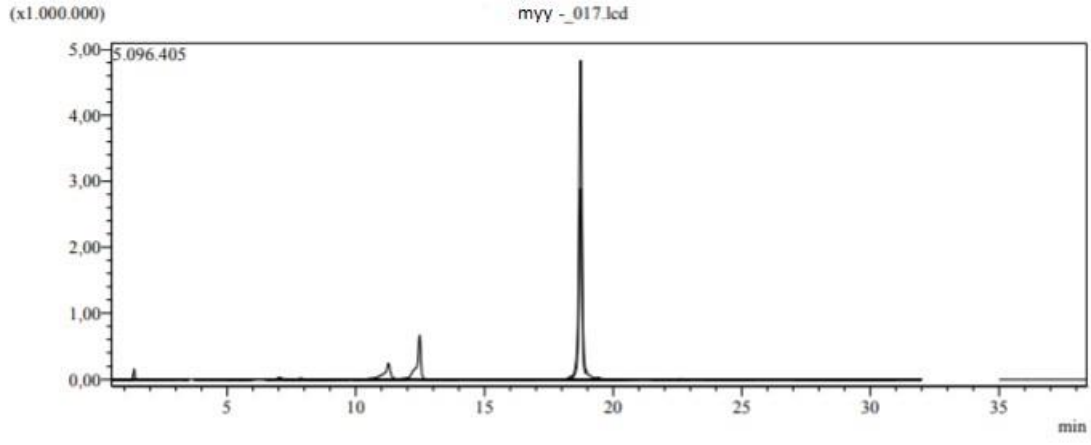
Ek 55. *N.tabacum* bml1t 'nin metanol ekstresinin LC-MS/MS kromatogramları



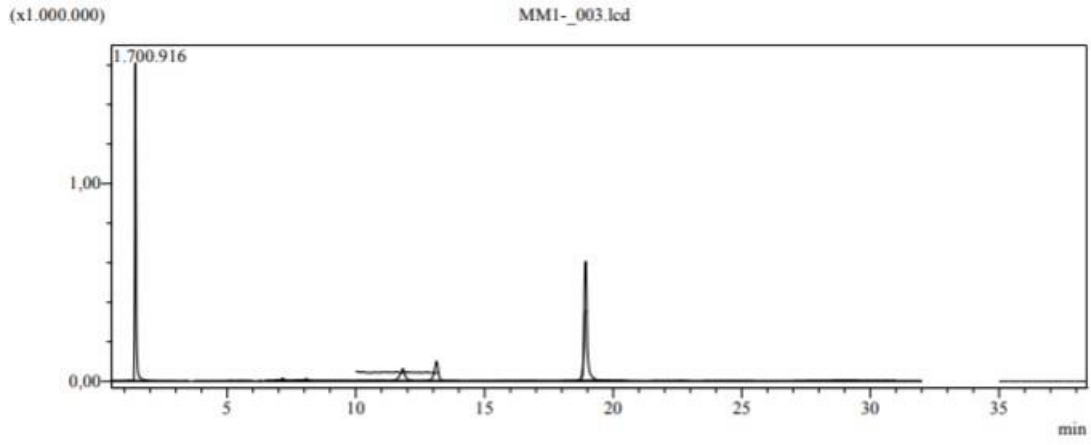
Ek 56. *N.tabacum* bml1y 'nin metanol ekstresinin LC-MS/MS kromatogramları



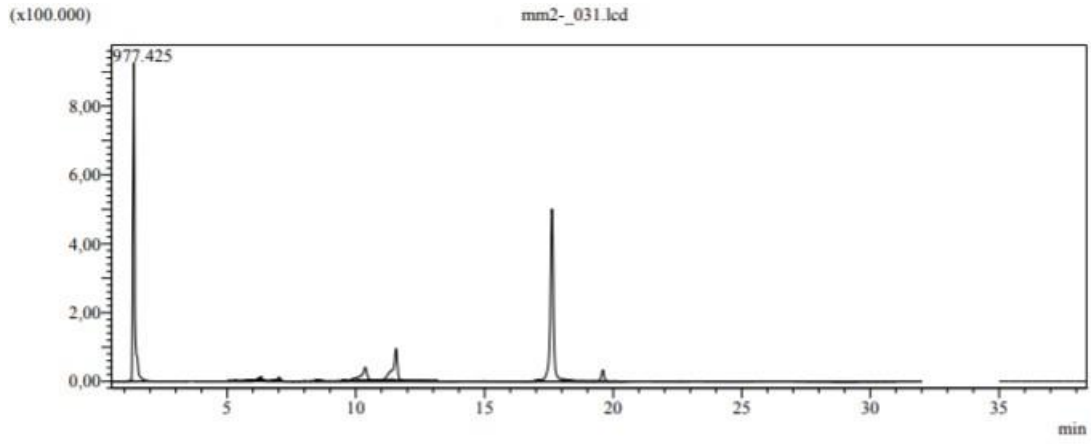
Ek 57. *N.tabacum* myy 'nin metanol ekstresinin LC-MS/MS kromatogramları



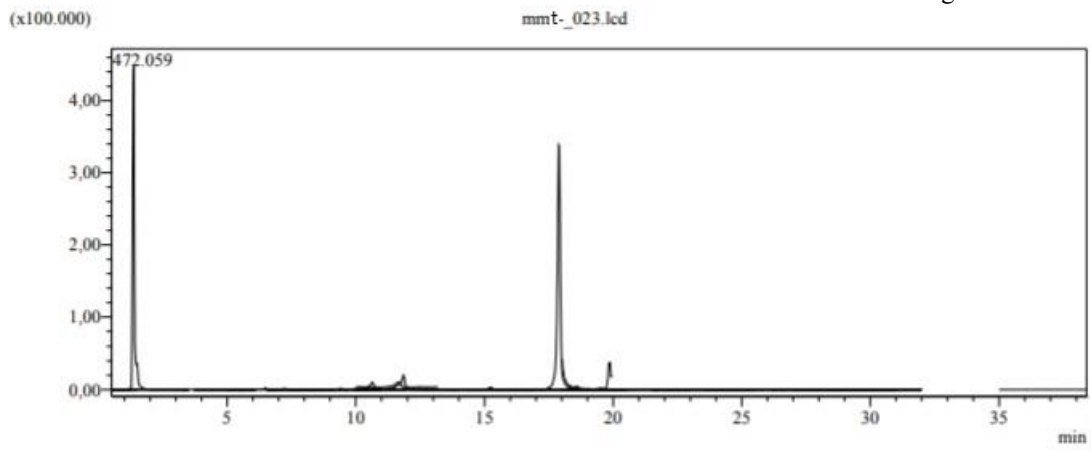
Ek 58. *N.tabacum* MM1 'in metanol ekstresinin LC-MS/MS kromatogramları



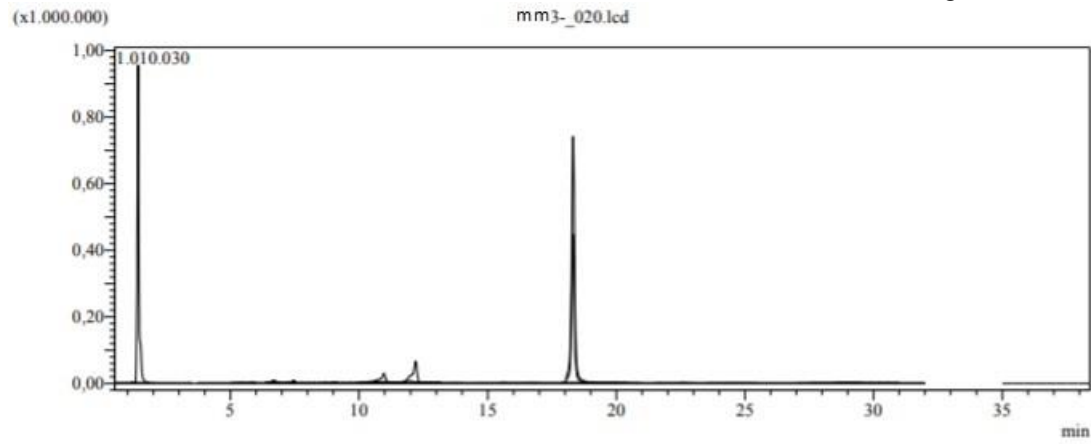
Ek 59. *N.tabacum* mm2 'nin metanol ekstresinin LC-MS/MS kromatogramları



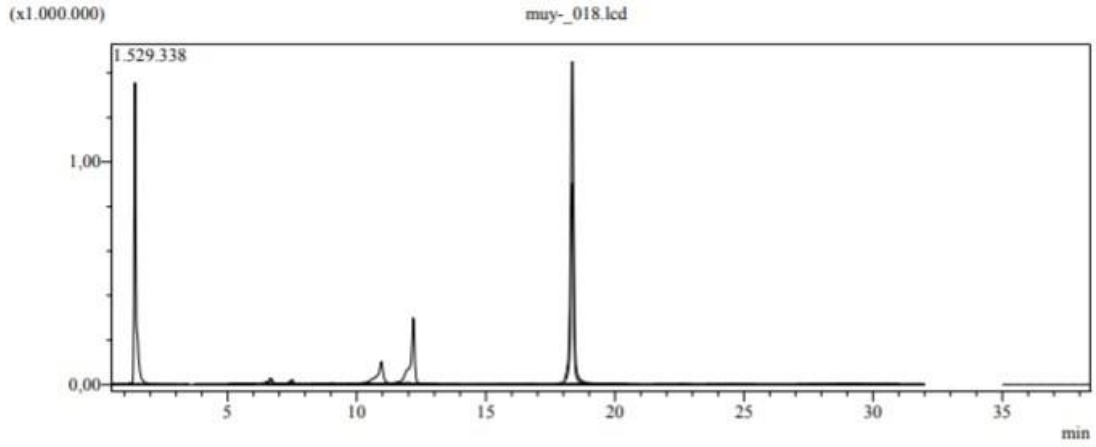
Ek 60. *N. tabacum* mmt 'nin metanol ekstresinin LC-MS/MS kromatogramları



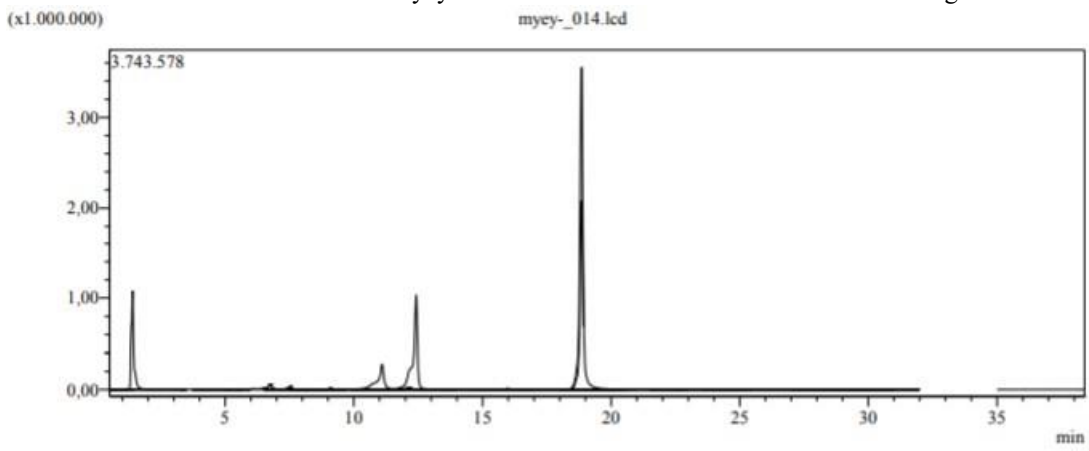
Ek 61. *N. tabacum* mm3 'nin metanol ekstresinin LC-MS/MS kromatogramları



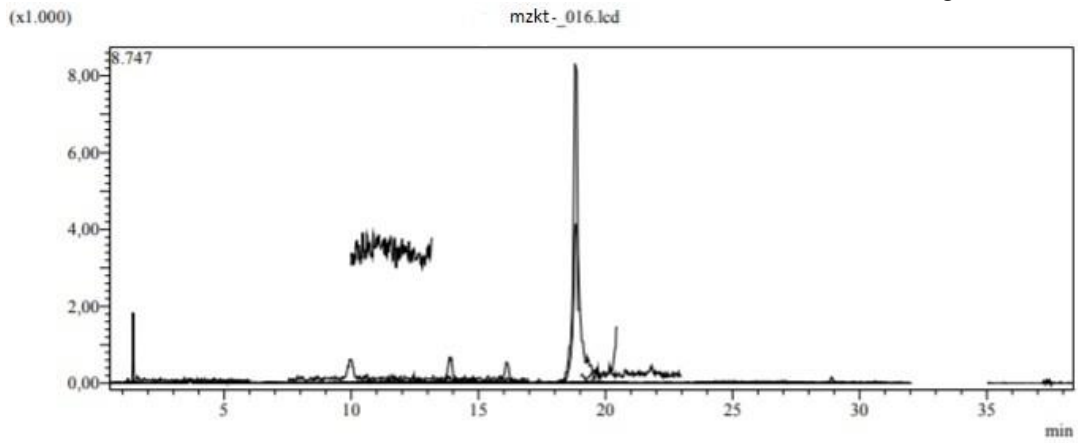
Ek 62. *N. tabacum* muy 'nin metanol ekstresinin LC-MS/MS kromatogramları



Ek 63. *N.tabacum* mycy 'nin metanol ekstresinin LC-MS/MS kromatogramları



Ek 64. *N.tabacum* mzkt 'nin metanol ekstresinin LC-MS/MS kromatogramları



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Feride Merve KILIÇOĞLU

Doğum Yeri : Diyarbakır

Doğum Tarihi : 04.10.1989

Medeni Hali : Bekâr

Yabancı Dili : İngilizce

EĞİTİM DURUMU

Önlisans : İstanbul Aydın Üniversitesi Diş Protez Teknolojisi / 04.07.2014

Lisans : Batman Üniversitesi Fen /Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü /2009-2015

Yüksek Lisans: Batman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü/2018

SERTİFİKALAR:

- 1) 06.07.2015 Pedagojik Formasyon Sertifikası
- 2) 29-31 Ekim 2015 Greatıst 2015 Uluslar Arası Diş Hekimliği Kongresi Kapsamında Düzenlenen 6.Asident Ağız Diş Sağlığı Yardımcı Personel Sempozyumu
- 3)16.09.2013 İstanbul Aydın Üniversitesi'nde Gerçekleştirilen Uygulamalı Girişimcilik Eğitimi
- 4) 29-31 Ekim 2015 Greatıst 2015 Uluslararası Diş Hekimliği Kongresi Kapsamında Düzenlenen 5. Dental Labor Diş Teknisyenliği Sempozyumu
- 5) 31 Mart 2015 Anterior Estetik Kompozit Restorasyonlar Konulu Kurs
- 6) 31.Ekim.2011kariyer Hedefleri Ve Kariyer Planlama
- 7) 31.Ekim.2011 Gelecek Bugünden Başlar
- 8) 31.Ekim.2011mülakatta Başarı
- 9) 31.Ekim.2011 Gönüllülükle Mülakatta Bir Adım Önde
- 10) 1.Kasım.2011 İlaç Sektöründen Pazarlamaya Bakış
- 11) 2.Kasım.2011 Kişisel Davranış Modelleri İle İlişkiler
- 12) 25-27 Ocak 2017 Dicle Üniversitesinde Yapılan Dübtaam Uygulamalı Moleküler Teknikler Workshop I: Western Blot Ve Hücre Kültürü Uygulamaları
- 13) Eğitim Öğretimim Sırasında Pek Çok Sayıda Bilgisayar Dersi Aldım (Bu Dersler Aynı Zamanda M.E.B Bilgisayar İşletmeni Sertifasına Denk Gelmektedir)