

T.C.
UŞAK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

***GİNKGO BİLOBA* BİTKİSİNİN YAPRAKLARINDAN TOPLAM FENOLİKLERİN
VE TOPLAM FLAVONOİDLERİN EKSTRAKSİYON KOŞULLARININ
OPTİMİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MESUT YILMAZ KARAHAN

AĞUSTOS 2017

UŞAK

Mesut yılmaz KARAHAN tarafından hazırlanan “*Ginkgo Biloba Yapraklarından Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoid Madde Ekstraksiyonunun Optimizasyonu* ” adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Yrd.Doç. Dr. İbrahim BULDUK

Tez danışmanı Kimya Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Anabilim Dalında Yüksek Lisans olarak kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Nevin ÇANKAYA

Kimya Anabilim Dalı Uşak Üniversitesi

Yrd.Doç. Dr. İbrahim BULDUK

Kimya Anabilim Dalı Uşak Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Yasemin SUNUCU KARAFAKIOGLU

Fen Bilgisi Öğretmenliği Uşak Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Ahmet HELVACI

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı Afyon Kocatepe Üniversitesi

Yrd.Doç. Dr. Ayşen Melda ÇOLAK

Bahçe Bitkileri Uşak Üniversitesi

Tarih:01/08/2017

Bu tez ile U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. İsa YEŞİLYURT

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

**GİNGKO BİLOBA BİTKİSİNİN YAPRAKLARINDAN TOPLAM FENOLİKLERİN
VE TOPLAM FLAVONOİDLERİN EKSTRAKSİYON KOŞULLARININ**

OPTİMİZASYONU

(Yüksek Lisans Tezi)

Mesut Yılmaz KARAHAN

**UŞAK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Ağustos 2017

ÖZET

Son yıllarda tüketicilerin doğal ürünlere olan ilgisinin artması ve yapay antioksidanların sağlık üzerine olumsuz etkileri nedeniyle kullanımlarının sınırlandırılması ile oksidatif bozulmayı engellemek üzere bitkisel kaynaklardan elde edilen doğal antioksidanların gıdalarda koruyucu olarak kullanılmasına yönelik araştırmalar artmıştır. Serbest radikaller gıdalarda neden oldukları bozunma reaksiyonlarının dışında, canlı hücre ve organ sistemleri üzerinde kanserojen, erken yaşlanma, kalp damar hastalıkları gibi önemli sağlık sorunları sebep olmaktadır. Bu doğrultuda serbest radikallerin neden oldukları olumsuz sağlık sorunları yavaşlatmak ve durdurmak için antioksidan içeriği yüksek olan gıdaların tüketilmesi gerektiğinden bu ürünlere ilgi ve talep artmıştır. *Ginkgo biloba* bitkisinde bunlardan bir tanesidir. *Ginkgo biloba* bitkisinin antioksidan içeriği bu çalışma kapsamında araştırılmıştır. Fenolik ve Flavonoidler antioksidan etkili, farklı biyokimyasal faydalar sağlayan ve birçok tıbbi bitkide bulunan bileşiklerdir. Doğal fenolik ve flavonoidin ginkgoace ailesinden olan *Ginkgo biloba* yapraklarından ekstraksiyonu için çevre ve insan sağlığını olumsuz etkileyecek toksik kimyasalların kullanıldığı bazı yöntemler yerine kısa ekstraksiyon zamanı, minimum organik solvent tüketimi olan yüksek verime sahip Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon (UAE) yöntemi geliştirilmiştir. Bu çalışmada ekstraksiyon verimi üzerine etanol konsantrasyonu, ekstraksiyon zamanı ve sıcaklık gibi parametrelerin etkileri araştırılmıştır. Optimizasyon için

Yüzey Yanıt Metodolojisi (RSM) kullanılmıştır. Bunun için, ekstraksiyon verimi üzerine deneysel koşullar: etanol konsantrasyonu (% 25-100), katı/solvent oranı (100 mg/30-70 ml numune), ekstraksiyon süresi (15-60 dakika), sıcaklık (30-70 °C) olarak belirlenmiştir. Bu parametrelerin en iyi kombinasyonları RSM ile oluşturulmuştur. Çalışmanın sonucunda en iyi ekstraksiyon verimi için işletme koşulları etanol konsantrasyonu: % 75, ekstraksiyon zamanı: 45 dakika, sıcaklık: 50 °C olarak bulunmuştur. Fenolik madde miktarı için elde edilen optimizasyon sonuçları: Ekstraksiyon zamanı: 31,220, Ekstraksiyon sıcaklığı: 54,119, Etanol konsantrasyonu: 57,944 olduğu anlaşılmıştır. Flavonoid madde miktarı için optimizasyon sonuçları: Ekstraksiyon zamanı: 47,883 dk. Ekstraksiyon sıcaklığı: 36,336 °C Etanol konsantrasyonu : % 69,512 olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca *Ginkgo biloba* Yapraklarının antibakteriyel etkisi Disk Difüzyon Test metodu kullanılarak araştırılmış ve *S. aureus* bakterisine karşı antibakteriyel özellik gösterdiği belirlenmiştir.

Bilim Kodu : Kimya Anabilim Dalı

Anahtar Kelimeler : *Ginkgo biloba*, fenolik, flavonoid, ekstraksiyon, optimizasyon

Sayfa Adedi : 93

Tez Yöneticisi : Yrd. Doç. Dr. İbrahim BULDUK

**TOTAL PHENOLICS AND TOTAL FLAVONOIDS IN *GINKGO BİLOBA* LEAVES
OF THE PLANT OPTIMIZATION OF THE EXTRACTION CONDITIONS**

(M.Sc.Thesis)

Mesut Yılmaz KARAHAN

**USAK UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**

August 2017

ABSTRACT

In recent years, due to the increased interest of consumers for natural products and artificial antioxidants, the negative effects on health, the limitation of its use to prevent oxidative degradation of natural antioxidants and as a preservative in foods obtained from plant sources research has increased. Free radicals in foods and why they are decomposition reactions outside of living cells and organ systems, carcinogens, premature aging, cardiovascular diseases as major causes of such health effects. In this direction, slow down or stop the adverse health effects that are caused by free radicals that are high in antioxidant content foods should be consumed, since the interest and demand for these products has increased. Due to the high antioxidant properties some plants has been the subject of numerous investigations in recent years Bitkisi *Ginkgo biloba* is one of them. In this study, the antioxidant content of the plant *Ginkgo biloba* were investigated. Phenolics and flavonoids that have an antioxidant effect, provides benefits and many different biochemical compounds in medicinal plants are. Natural plant leaves for the extraction of phenolic and flavonoids that can adversely affect environmental and human health from toxic chemicals used in some methods instead of short extraction time, minimum organic solvent consumption with high efficiency of ultrasonic-Assisted Extraction (UAE) method has been developed. In this study, the ethanol concentration on extraction yield, extraction parameters such as the effects of time

and temperature were investigated. For optimization response surface methodology (RSM) was used.

For this, experimental conditions on the extraction yield: ethanol concentrations (% 25-75), solid/solvent ratio (100 mg/30-70 ml sample), the extraction time (15-60 minutes), temperature (30-70 °C) was determined. Of the best combinations of these parameters by response surface methodology was generated. Operating conditions for Best extraction efficiency, ethanol concentration:75%, extraction time:45 minutes, temperature:50 °C. The optimization results obtained for the amount of phenolic material were: Extraction time: 31,220, Extraction temperature: 54,119, Ethanol concentration: 57,944. Optimization results for the amount of flavonoid substance: Extraction time: 47,883 min. Extraction temperature: 36,336 °C Ethanol concentration: 69,512%. In addition, antibacterial effect of *Ginkgo biloba* Leaves was investigated using Disk Diffusion Test method and it was determined that it showed antibacterial properties against *S. aureos* bacteria.

Code of Science : Department of Chemistry

Keywords : *Ginkgo biloba*, phenolic, flavanoid, extraction, optimization

Number of Page : 93

Adviser : Yrd. Doç.Dr. İbrahim BULDUK

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleŐtirilmesinde, çalıŐmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen saygı değer danıŐman hocam Yrd. Doç. Dr. İbrahim BULDUK, antibakteriyel analizler konusunda yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Safiye Elif KORCAN, alıŐma sũresince tũm zorlukları benimle gũęũsleyen ve hayatımın her safhasında bana destek olan annem Saray KARAHAN, kardeŐim Zehra KARAHAN'a, teknik desteklerinden dolayı arkadaŐım Sũleyman BİLGİ'e, Kimyager Sũleyman Gũkek'e, Aysun ŐAVK'a, Makine Mũhendisi Ergũn ERDOğAN'a ve her zaman destek olan arkadaŐım Özel hareket polisi Mehmet SARI'ya sonsuz teŐekkũrlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	III
ABSTRACT.....	V
TEŞEKKÜR.....	VII
İÇİNDEKİLER	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	XI
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIII
KISALTMALAR	XVI
1.GİRİŞ	1
1.1. <i>Ginkgo Biloba</i> (Mabet Ağacı)	3
1.2. Antioksidanlar	5
1.3. Ekstraksiyon Teknikleri.....	6
1.3.1. Soxhlet Ekstraksiyonu	6
1.3.2. Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonu	7
1.3.3. Ultrasonik Destekli Sıvı Ekstraksiyonu	8
1.3.4 Süperkritik Akışkan Ekstraksiyon Tekniği	10
1.4. UV-VIS Spektrofotometre Sistemleri	11
1.4.1. UV-VIS Spektrofotometresinin Kullanım Alanları	12
1.4.2. Dalga Boyu Seçimi	14
1.4.3. Ultraviyole Alanda Absorpsiyon Ölçme Cihazlarının Başlıca Kısımları	14
1.4.4. Spektrofotometrik Ölçümün Yapılışı.....	17
1.5. Yüzey Yanıt Metodolojisi	18

1.6. Antibakteriyel Aktivite	20
1.7. Kaynak Özetleri	21
2. METARYEL METOD.....	24
2.1. Kullanılan Materyaller.....	24
2.2. Kullanılan Cihazlar.....	25
2.3. Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması	25
2.4. Toplam Fenolik Bileşik Miktarı Belirleme	27
2.4.1. Çözeltilerin Hazırlanması	27
2.4.2. Deneyin Yapılışı	27
2.5. Toplam Flavonoid Bileşik Miktarı Belirleme	28
2.5.1. Çözeltilerin Hazırlanması	28
2.5.2. Deneyin Yapılışı	29
2.6. Ekstraksiyon Ön Çalışmaları	29
2.6.1. Ekstraksiyon Verimi Üzerine Etanol Konsantrasyonunun Etkisi	29
2.6.2. Ekstraksiyon Verimi üzerine Katı/Solvent Oranının Etkisi	30
2.6.3. Ekstraksiyon Verimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	30
2.6.4. Ekstraksiyon Verimi Üzerine Ekstraksiyon Süresinin Etkisi	30
2.7. 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH) Radikal Süpürme Etkisi.....	30
2.8. Disk Difüzyon Testi ile Antibakteriyel Aktivitenin Belirlenmesi.....	32
2.9. İstatistiksel Analizler	32
3. BULGULAR.....	34
3.1. Toplam Fenolik, Flavonoid ve Antioksidan İçerikleri Belirleme Metodlarının Kalibrasyonu.....	34
3.1.1. Toplam Fenolik İçerik Belirleme Metodunun Kalibrasyon Sonuçları	34
3.1.2. Toplam Flavonoid İçerik Belirleme Metodunun Kalibrasyon Sonuçları	34
3.1.3. Toplam Antioksidan İçerik Belirleme Metodunun Kalibrasyon Sonuçları	35

3.2. Ekstraksiyon Ön Çalışma Sonuçları	36
3.2.1. Uygun Solvent Belirleme Sonuçları	36
3.2.2. Ekstraksiyon Verimi Üzerine Katı/Solvent Oranının Etkisi	37
3.2.3. Ekstraksiyon Verimi Üzerine Etanol Konsantrasyonunun Etkisi	40
3.2.4. Ekstraksiyon Verimi Üzerine Ekstraksiyon Süresinin Etkisi	42
3.2.5. Ekstraksiyon Verimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	44
3.3. Toplam Antioksidan Kapasite Sonuçları	46
3.4. Ultrason Destekli Ekstraksiyonda Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoid Madde Miktarlarının Yüzey Yanıt Yöntemi ile Optimizasyonu	47
3.4.1 Toplam Fenolik Madde Miktarı Sonuçları	48
3.4.2. Toplam Flavonoid Madde Miktarı Sonuçları	56
3.5. <i>Ginkgo Biloba</i> Yapraklarının Antibakteriyel Kapasite Sonuçları	62
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	64
KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ	77

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge

Sayfa

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler.....	24
Çizelge 2.2. Central kompozit tasarımıda kullanılan bağımsız değişkenler.....	33
Çizelge 3.1. Fenolik standartlarının konsantrasyonları ve absorbanz sonuçları.....	34
Çizelge 3.2. Flavonoid standartlarının konsantrasyonları ve absorbanz değerleri.....	34
Çizelge 3.3. Farklı DPPH konsantrasyonlarında absorbanz değerleri.....	35
Çizelge 3.4. Farklı solvent türlerinin gallik asit eşdeğerleri.....	37
Çizelge 3.5. Farklı solvent miktarlarında fenolik madde miktarı.....	38
Çizelge 3.6. Farklı solvent miktarlarında flavonoid madde miktarı.....	39
Çizelge 3.7. Farklı etanol konsantrasyonunda fenolik ve flavonoid madde miktarı.....	41
Çizelge 3.8. Farklı ekstraksiyon zamanlarında fenolik ve flavonoid madde miktarı.....	43
Çizelge 3.9. Farklı ekstraksiyon sıcaklığında fenolik ve flavonoid madde miktarı.....	45
Çizelge 3.10. Farklı solventlerin antioksidan aktivite değerleri.....	46
Çizelge 3.11. Toplam fenolik madde miktarının istatistiksel analizi.....	49
Çizelge 3.12. Fenolik için varyans analizleri değerleri.....	49
Çizelge 3.13. Central kompozite tasarımı ve deneysel sonuçlar.....	55

Çizelge 3.14. Farklı solvent türlerinin quarcetin eşdeğerleri.....	56
Çizelge 3.15. Toplam flavonoid madde miktarının istatistiksel analizi.....	58
Çizelge 3.16. Flavonoid için varyans analizleri değerleri.....	58
Çizelge 3.17. <i>Ginkgo biloba</i> yapraklarının antibakteriyel kapasite sonuçları.....	62



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1. <i>Ginkgo biloba</i> bitkisi ve yaprakları.....	3
Şekil 1.2. Soxhlet ekstraksiyon cihazı.....	6
Şekil 1.3. Basınçlı sıvı ekstraksiyon cihazı.....	8
Şekil 1.4. Dinamik ses dalgaları destekli ekstraksiyon sistemi.....	9
Şekil 1.5. Süperkritik ekstraksiyon cihazı.....	10
Şekil 1.6. Bir UV-VIS spektrofotometre cihazı.....	12
Şekil 2.1. Numune ve solventlerin erlenlere alınması.....	26
Şekil 2.2. Ultrasonik banyo ve ekstraksiyon.....	26
Şekil 2.3. Ekstraktın süzülmesi.....	26
Şekil 2.4. Gallik asitin molekül yapısı.....	27
Şekil 2.5. Quarcetin molekül yapısı.....	29
Şekil 2.6. DPPH radikalinin DPPH-H formuna dönüşmesi.....	31
Şekil 3.1. Gallik asit standart solüsyonlarının doğrusallık grafiği.....	34
Şekil 3.2. Quarcetin standart solüsyonlarının doğrusallık grafiği.....	35
Şekil 3.3. DPPH radikalinin kalibrasyon eğrisi.....	36
Şekil 3.4. Farklı tür solventlerdeki toplam fenolik madde miktarları.....	37
Şekil 3.5. Farklı solvent miktralarında yapılan ekstraktlardaki toplam fenolik madde miktarları.....	38

Şekil 3.6. Farklı solvent miktarlarında yapılan ekstraktlardaki toplam flavonoid madde miktarları.....	39
Şekil 3.7. Farklı etanol konsantrasyonlarında yapılan ekstraktlardaki toplam fenolik madde miktarları.....	41
Şekil 3.8. Farklı etanol konsantrasyonlarında yapılan ekstraktlardaki toplam flavonoid madde miktarları.....	42
Şekil 3.9. Farklı ekstraksiyon sürelerinde yapılan ekstraktların toplam fenolik madde miktarları.....	43
Şekil 3.10. Farklı ekstraksiyon sürelerinde yapılan ekstraktların toplam flavonoid madde miktarları.....	44
Şekil 3.11. Farklı ekstraksiyon sıcaklığında yapılan ekstraktların toplam fenolik madde miktarları.....	45
Şekil 3.12. Farklı ekstraksiyon sıcaklığında yapılan ekstraktların toplam flavonoid madde miktarları.....	46
Şekil 3.13. Farklı tür solventlerle yapılan ekstraktların toplam antioksidan miktarları.....	47
Şekil 3.14. Ultrason destekli ekstraksiyonda toplam fenolik madde için deneysel ve tahmini değerlerin doğrusallık grafiği.....	48
Şekil 3.15. Etanol konsantrasyonu ve ekstraksiyon sıcaklığı ile ekstraksiyon veriminin değişimi gösteren yüzey yanıt ve kontur grafikleri.....	51
Şekil 3.16. Ekstraksiyon süresi ve ekstraksiyon sıcaklığı ile ekstraksiyon veriminin değişimi gösteren yüzey yanıt ve kontur grafikleri.....	51
Şekil 3.17. Ekstraksiyon süresi ve etanol konsantrasyonu ile ekstraksiyon veriminin değişimi gösteren yüzey yanıt ve kontur grafikleri.....	52
Şekil 3.18. Farklı solvent türleri ile yapılan ekstraktların quarcetin eşdeğer toplam flavonoid madde miktarları.....	56
Şekil 3.19. Ultrason destekli ekstraksiyonda toplam flavonoid madde için deneysel ve tahmini değerlerin doğrusallık grafiği.....	57

Şekil 3.20. Etanol konsantrasyonu ve ekstraksiyon sıcaklığı ile ekstraksiyon veriminin değişimi gösteren yüzey yanıt ve kontur grafikleri.....59

Şekil 3.21. Ekstraksiyon süresi ve ekstraksiyon sıcaklığı ile ekstraksiyon veriminin değişimi gösteren yüzey yanıt ve kontur grafikleri.....59

Şekil 3.22. Ekstraksiyon süresi ve etanol konsantrasyonu ile ekstraksiyon ve veriminin değişimi gösteren yüzey yanıt ve kontur grafikleri.....60

Şekil 3.23. *S.aureus* zon bölgesi.....63



KISALTMALAR

ANOVA	Varyans Analizi
DW	Kuru Baz
GB	Görünür Bölge
GAE	Gallik Asid Eşdeğerliği
UAE	Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon
UV-VIS	Ultraviyole Görünür Morötesi Spektroskopi
RSM	Response Surface Metodolojisi
TPC	Toplam Fenolik Konsantrasyonu
TFC	Toplam Flavonoid Konsantrasyonu
QE	Quercetine Eşdeğerliği

1. GİRİŞ

Eski çağlardan beri birçok bitki tıbbi amaçlarla kullanılmıştır. Tıbbi bitkiler ve onların kullanımları ile ilgili kayıtlar Çin, Mısır ve Yunan tarihinden gelmekte, Anadolu'da ise Hititler döneminde bazı bitkilerin kullanıldığı bilinmektedir.

Günümüzde ise 5000 bitkinin yaygın şekilde kullanıldığı, yaklaşık 500 kadarının ise ticari olduğu biliniyor. Ülkemizde ise tıbbi amaçlı kullanılan bitki sayısı 600 civarındadır [1]. Dünya Sağlık Örgütü'nün araştırmaları sonucunda, dünya nüfusunun %80'ninin bitkisel ilaçlarla tedavi edildiği belirlenmiştir [2]. Bir araştırmaya göre de, kullanılan ilaçların gelişmiş ülkelerde % 25'i, gelişmekte olan ülkelerde ise % 75'i bitkilerden elde edilmektedir [3].

Doğal antioksidanlar aslında yüzyıllardan beri süregelen tüm medeniyetlerin hastalıklardan korunma ve tedavide başvurduğu temel maddelerdir. Bu nedenle özellikle bitkilerin ilaç olarak kullanımı yüzyıllardan beri bilinmektedir. Çin ve Hindistan'da antik metinlerde bitkisel kaynaklı ilaçların kullanımına ilişkin reçete niteliğinde ayrıntılı bilgiler verilmektedir. Günümüzde de bitkiler, özellikle gelişmekte olan ülkelerde dünya nüfusunun büyük bir çoğunluğu için temel beslenme kaynağı ve hastalıklardan korunma yoludur [4].

20. yüzyılın başlarında teknolojinin gelişmesiyle birlikte farmasötik endüstri adı altında pek çok sentetik ilaç geliştirilmiştir. Bu sektör tıp ve farmakolojide oldukça aktif hale gelmiş ve insanların ilgisini yüksek oranda çektiği için ülkelere ekonomik olarak büyük bir kaynak sağlamıştır. Buna bağlı olarak bitkilerden alınan doğal antioksidanların kullanımında azalma görülmüştür [5]. Ancak zamanla tüm bu sentetik ilaçların yan etkilerinin yanında toksisiteye ve bazı hastalıklara neden olduğu anlaşılınca tekrar doğal antioksidanlara dönüş olmuş ve bitkisel tedaviler yeniden kullanılmaya başlanmıştır. Bu amaçla özellikle tıbbi aromatik bitkilerden ilaç üretimine başlanmış ve bu tüm dünyada büyük oranda kabul görmüştür [6].

Fazla tüketildiğinde kanda glikoz, kolesterol seviyesinde aşırı düşümlere, tansiyon yükselmesine ya da çeşitli toksik etkilere neden olabilmektedirler. Bu nedenle kullanılan bitkilerin kimyasal bileşimlerinin kalitatif ve kantitatif olarak tanımlanmaları ve ticari olarak üretilen bitkisel kaynaklı ekstraktların validasyonlarının yapılması gerekmektedir [7]. Ancak şimdiye kadar literatürlerde bitkilerin ihtiva ettiği 6500'den fazla fenolik yapıli antioksidan madde tanımlandığı düşünülürse her bir antioksidan maddenin spektroskopik ve kromatografik yöntemlerle tanımlanması zaman alıcı ve maliyetlidir. Bu nedenle yüksek miktarda fenolik ve flavonoid madde içerdığı düşünülen bitkilerin öncelikle antioksidan aktiviteleri belirlenmektedir. Buna bağılı olarak bitkilerin biyokimyasal yapıları tanımlanmaktadır [8].

Bitkilerin ihtiva ettiği fenolik maddeler bitkilerin kök, gövde, yaprak, çiçek ve meyve gibi organlarında farklı dağılım göstermektedir. Bununla birlikte aynı bitki türü, iklim değışiklikleri, ekim şartları, büyüme ortamı ve çevresel koşulların etkisiyle metabolizmalarında sentezlenen fenolik ve flavonoid yapılarında farklılık göstermekte ve buna bağılı olarak antioksidan aktiviteleri değışmektedir. Çünkü bitkilerin ikincil metabolitleri olarak adlandırılan bu fenolik yapıların sentezi bitkilerin genomik yapılarına bağılıdır. Özellikle aynı bitkinin farklı türlerindeki antioksidan aktivite ve fenolik yapı dağılımındaki farklılık bitki genomuna bağılı olarak sentezlenen ve fenolik maddelerin sentezinde rol oynayan enzimlerin sentezine bağılıdır [9]. Bir bitkide sentezlenen enzim bir diğesinde sentezlenmeyebilir. Yine farklı ülke ya da aynı ülkenin farklı bölgelerinde yetişen aynı tür bitkiler biyokimyasal bileşim ve antioksidan aktivite bakımından farklılık göstermektedir. İklimle bağılı olarak bitki genomunda meydana gelen mutasyonlar ya da adaptasyon bunun en büyük sebebidir. Sonuç olarak fenolik ve flavonoid maddenin hücrede farklı miktarda sentezi bile antioksidan aktivite bakımından önemlidir [10].

Ginkgo biloba ginkgo ailesinin son kalan üyesi olarak yaşayan bir fossildir. Onun kökeni 25 milyon yıl öncesine dayanır. *Ginkgo biloba* yaşlılar arasında hafıza attırıcı kaynak olarak bilinir. Ayrıca kalp ve omurga hastalıklarında da kullanırdı. *Ginkgo biloba*'nın tıbbi

etkisinin ana nedeni birkaç kanser türü, yaşlanma, diyabet, kalp hastalıkları üzerine koruyucu etki sağlayan fotokimyasallar içermesidir [11].

1.1. *Ginkgo Biloba* (Mabet Ağacı)

Ginkgo biloba, yaşayan en eski ağaç türlerinden biridir. 1000 yaşına kadar yaşayabilir Tapınak bölgesinde yetiştirildiği için mabet ağacı adını da alan ağaç, 30-40 metre uzunluğa erişebiliyor [11]. Kökeni Çin'in küçük bir bölgesine dayanan bu ağaç, günümüzde Avrupa ve ABD başta olmak üzere dünyanın pek çok bölgesinde yetiştiriliyor. Türkiye'de ise ginkgo biloba ağacı bazı yerlerde botanikçiler tarafından yetiştirilmektedir. İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi, Bahçeköy Orman İşletme Bahçesi, İstanbul Baltalimanı, İstanbul Üniversitesi Sosyal Tesisleri, İstanbul Üniversitesi Botanik Bahçesi, İstanbul Büyükdere Rus Elçiliği Korusunda ve Ankara, İzmir, Trabzon, Balıkesir ve Yalovadır [12].



Şekil 1.1. *Ginkgo biloba* bitkisi ve yaprakları

Ginkgo biloba ağacıyla ilgili ilginç bir bilgi ise, 1945 yılında Hiroşima'ya atılan atom bombasının düştüğü yerden sadece 1-2 km uzaklıktaki 6 adet *Ginkgo biloba* ağacının patlamadan kurtulan tek canlı varlıklar olmaları ve günümüze kadar ayakta kalabilmeleridir [13].

Ginkgo biloba ağacının yapraklarında 40 farklı bileşen bulunmakla birlikte yaprakların fayda sağlayan etken maddeleri, bitki bazlı antioksidanlar olan flavonoidler ve fenoliklerdir. Antioksidan flavonoidler kalp kasını, sinirleri, retinayı ve damarları serbest radikallerin tahrip

edici etkisinden korunurken diğerk önemli bileşen fenolik damarların genişlemesine yardımcı olarak plak oluşumunu ve damar tıkanıklığını önlemektedir [14].

Fenolik maddeler aromatik halkasında bir veya daha fazla hidroksil grubu içeren bileşiklerdir. Bu bakımdan en basit fenolik maddenin bir tane hidroksil grubu içeren benzen yani fenol olduğu ve diğerk fenolik maddelerin bundan türediğı bilinmektedir [15].

Flavonoidler vücudunuzda üretilen veya dışarıdan gelen serbest radikallerin oksitleyici yani yaşlandırıcı zararlarına engel olan güçlü birer antioksidandır. Flavonoidler (Flavonoids) bilim insanları tarafından en çok incelenen bitkisel besin maddesi grubunun genel adıdır. Flavonoidler 6000'den fazla besin maddesini içerir. En belirgin özelliğı antioksidan ve iltihap karşıtı etkisi olan bu besin maddeleri ayrıca sebze ve meyvelere parlak ve canlı renklerini vermeleri ile de bilinir. Yüksek antioksidan etkisi dolayısı ile kanser ve kalp hastalıklarına karşı en etkili koruyucu olarak kabul edilirler. Normal hücrelerin yanısıra sinir hücrelerini de oksidasyonun ve serbest radikallerin zararlarından korudukları için sağlıklı bir sinir sistemi için de gereklidirler [16].

Ginkgo biloba'nın faydaları; Sağlık sektöründe popülaritesini gün geçtikçe arttıran *Ginkgo biloba*, pek çok hastalığa şifa olduğu gerekçesiyle tüketilmektedir. Düzenli olarak tüketildiğinde bronşları açan bitki, demleme usulü içilirse astım ataklarında azalma sağlar. Hatırlamayı kolaylaştıran bitki, aynı zamanda odak sorununa da çözüm olmaktadır. Özellikle alzheimer hastalığı için önerilen bitki, bu hastalığa yakalanma riskini ciddi oranda azaltmaktadır [17]. *Ginkgo biloba* bitkisinin en etkili olduğu sistemlerden biri sinir sistemidir. Kısa süre içinde etki göstereceğı için özellikle nöbetler şeklinde ortaya çıkan epilepsi, panik atak hastalıklarında kullanılması önerilmemektedir. Uzun vadede olumlu sonuç verdiği bilinen bitki, ataklar esnasında kişilerde ne gibi sorunlara neden olur bilinmemektedir. Genellikle kaygı problemi yaşayan kişiler için önerilen *Ginkgo biloba*, psikiyatri desteğı alınmadan asla kullanılmamalıdır. Hastalık sürecinde antidepresanlarla etkileşime girme ihtimali oldukça yüksektir [18].

1.2. Antioksidanlar

Düşük konsantrasyonlarda serbest radikal nedenli oksidasyonu önleyen bileşiklere *antioksidanlar* denir. Bitkisel kaynaklı oksidanlara doğal antioksidan denir. Bunlardan bazıları askorbik asit α -tokoferol, karotenoidler, fenolik yapıda olan polifenoller ve flavanoidler şeklinde bitkiler tarafından üretilir [19].

Besin endüstrisinde antioksidanların kullanım amacı istenmeyen kokuları ve dejenerasyonu engellemektir. Bu kokular ve dejenerasyon bitkilerdeki enzimatik olmayan peroksidasyon ve lipoksigenaz enzimlerinin aktiviteleri nedeniyle oluşan hidrojen peroksitten dolayı ortaya çıkar [20].

Birden fazla ortak elektron içermeyen atom veya moleküllere serbest radikaller denir. Oksijen içeren süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil gibi serbest oksijen radikalleri kararsız oldukları için kolayca reaksiyona girmektedirler. Radikaller hücrede moleküler değişime ve yapıda mutasyona neden olduklarından dolayı kanser, kalp damar hastalıkları, yapısal hasara ve doku tahribine ve Alzheimer'a yol açarlar. Bu tür hasarları önlemek için birkaç savunma mekanizması vardır. Bunlar kısaca antioksidanlar ya da antioksidan savunma sistemleri mekanizmaları da denir. Bu mekanizmalar süpürme etkisi, söndürme etkisi, zincir reaksiyonu kırma etkisi ve onarma etkisidir. Doğal antioksidanlar tahıl, baklagil, meyvelerde ve bitki kaynaklı içeceklere bulunur. Maliyet nedeniyle doğal antioksidanlar yerine sentetik antioksidanlar uzun zamandan beri kullanılmaktadır. Ancak sentetik antioksidanlar, zehirli olabileceği ve kansere neden olabileceği için bazı ülkelerde kullanılması yasaklanmıştır [21].

En az bir aromatik halka ve bu halkada çok miktarda hidroksil grubu bulunduran bileşiklerin tümüne flavonoid bileşikler denir. Fenolik ve Flavonoidler antioksidan etkili, farklı biyokimyasal faydalar sağlayan ve birçok tıbbi bitkide bulunan bileşiklerdir. Flavonoid, rengi sarı olduğu için Latince sarı anlamına gelen "flavus"tan ismini almıştır. Turuncu, sarı, kırmızı, mavi renkli gıdalara rengini veren de flavonoid maddesidir [22].

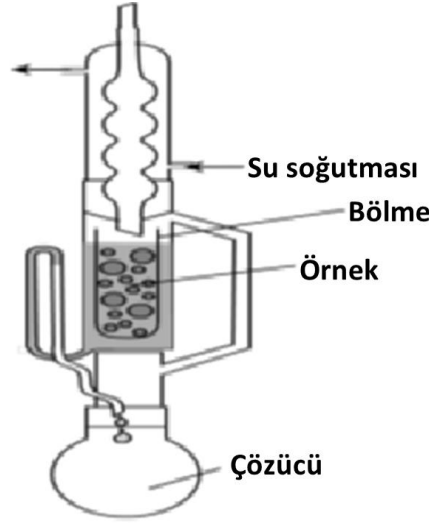
1.3. Ekstraksiyon Teknikleri

Ekstraksiyon, bir çözeltili ya da süspansiyon içindeki organik maddeyi, çözen fakat çözeltili ya da süspansiyondaki çözen ile karışmayan bir başka organik çözen yardımıyla ayırmaktır. Ekstraksiyon çoğu analitik işlemlerin bir parçasıdır. 1879 yılında soxhlet ekstraksiyonu Franz Von Soxhlet tarafından geliştirilmiş günümüzde laboratuvarlarda hala kullanılmaktadır.

Son yıllarda örnek hazırlama maliyetinin düşük olması, laboratuvar kirliliğinin önlenmesi, solvent tüketiminin azalması ve ekstraksiyon zamanının kısalmasından dolayı ileri teknolojik ekstraksiyon yöntemleri talep artırmıştır. Bu yüzden klasik ekstraksiyon türlerinin yerini ultrasonik destekli ekstraksiyon, basınçlı sıvı ekstraksiyonu, süperkritik sıvı ekstraksiyonu, mikrodalga destekli ekstraksiyon teknikleri almıştır [23].

1.3.1. Soxhlet Ekstraksiyonu

Soxhlet ekstraksiyonu özel bir cihaza sahiptir. Katı veya yarı katı örnekler için tasarlanmıştır. En eski ekstraksiyon tekniklerinden biridir. Bu cihaz bir sıvı akış borusu, kondansör, ısıtma sistemi ve bir solvent şişesinden meydana gelir. Katı numune ekstraksiyon bölgesine yerleştirilir. Solvent hemen altta bulunan solvent şişesine doldurulur. Solvent kaynatılır ve kaynayan solventten gelen buhar yoğunlaşmak için kondensatöre hareket eder. Yoğunlaşır ve örnek üzerine damlar. Daha sonra solvent seviyesi sıvı akış borusunun tepesine ulaşır ulaşmaz solvent, numunenin olduğu kısmı boşaltır ve solvent şişesine geri döner [24].



Şekil 1.2. Soxhlet ekstraksiyon cihazı

Soxhlet ekstraksiyonu bazı avantajlara sahiptir. Numune, sürekli olarak taze solvent ile temas halindedir. Böylece numuneden analitin uzaklaştırılması artar. Distilasyon balonuna uygulanan ısıyla ekstraksiyon dengeye ulaştığında sistemin sıcaklığı oda sıcaklığından daha yüksektir. Bundan dolayı sistem, bu yüksek sıcaklıkta değişmeden kalır. Soxhlet ekstraksiyonu diğer ekstraksiyon teknikleriyle karşılaştırıldığında en önemli dezavantajları, uzun süre gerektirmesi ve çok miktarda solvent kullanılmasıdır.

Çok miktarda solventin zararsız hale getirilmesi hem pahalı hem de çevresel problemlerin nedenidir. Numuneler solventin kaynama noktasında uzun süre ekstrakte edilebilir. Bu da termal olarak kararsız olan numunelerin bozunmasına neden olabilir [25].

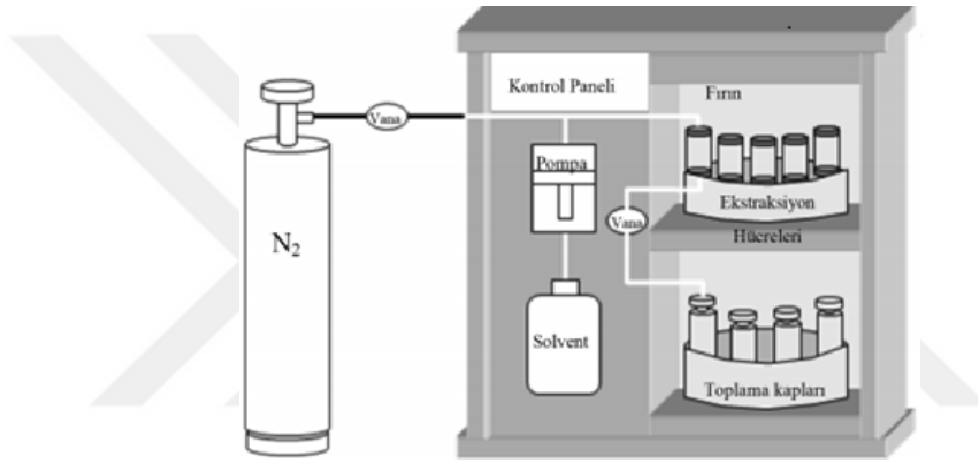
1.3.2. Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonu

Hızlandırılmış solvent ekstraksiyonu olarak da bilinen bu teknik yeni bir ekstraksiyon tekniğidir. Örneği bir yüksek basınç ortamında tutarak, geleneksel solventler için daha yüksek sıcaklıklar kullanılmasına izin veren bir sistemdir. Yüksek basınç, solventin daha yüksek sıcaklıklarda sıvı halde kalmasını sağlar. Bu teknikte verim ve seçiciliği etkileyen önemli faktörlerden biri ekstraksiyon süresi boyunca verilen sıcaklıktır [26].

Yüksek sıcaklıkta kullanımı, van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağı ve dipol çekim gibi analit-numune matriksi etkileşimlerinin bozulmasına neden olur ve böylece ekstraksiyon verimini artırır. Isı enerjisi kullanımı moleküller arasındaki kohezyon ve farklı moleküller

arasındaki adhezyon kuvvetlerinin kırılmasına yardımcı olur. Bu halde geri bırakma (desorpsiyon) zamanı için gerekli aktivasyon enerjisi azalır. Yüksek sıcaklık solventin, çözünenin ve matriksin yüzey gerilimini düşürür. Bundan dolayı örneğin ıslanması artar. Solvent yüzey geriliminde azalma meydana gelir. Böylece analitlerin solventte daha hızlı çözünmesi sağlanır [27].

Yüksek sıcaklıktan dolayı ekstraksiyon kinetiği de daha hızlıdır. Basınçlı sıvı ekstraksiyonun amacı, yüksek sıcaklık ve basınç kullanarak sıvı ekstraksiyonunu geliştirmektir. Yüksek sıcaklık ve basınç, solventin numune matriksinin içine nüfuz etme yeteneğini artırır. Basınçlı sıvı ekstraksiyonun dezavantajı, ısısız kararlı olmayan örnekler için uygun değildir [28].



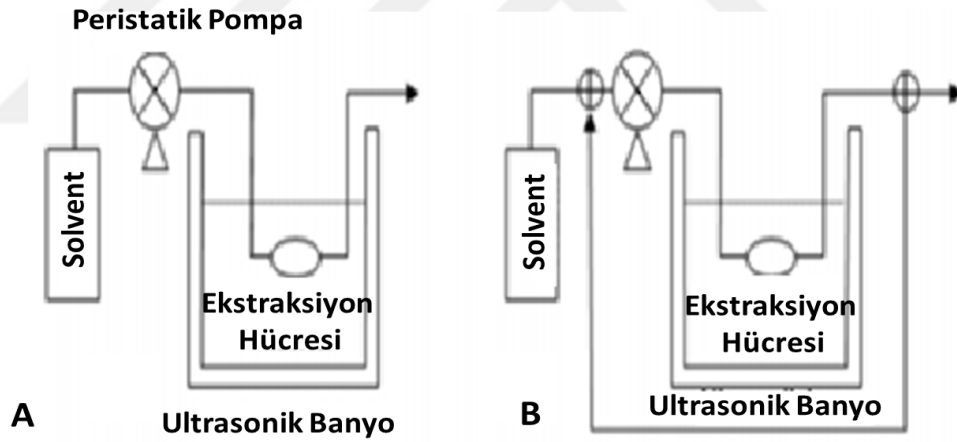
Şekil 1.3. Basınçlı sıvı ekstraksiyon cihazı

1.3.3. Ultrasonik Destekli Sıvı Ekstraksiyonu

Ultrasonik ekstraksiyon, ses dalgaları destekli ekstraksiyon olarak da bilinir. Bu teknikte numuneye 20 kHz üzeri frekanslarla akustik titreşimler uygulanır. Bu titreşimler sıvının içinden geçtiği zaman kavitasyon (boşluk oluşumu) meydana gelir. Ultrasonik enerjinin sebep olduğu boşluk olarak bilinen bu etki, sıvı ortamda çok sayıda küçük kabarcıklar oluşturur ve katıların mekanik olarak sarsılmasından dolayı partiküllerin kopmasını sağlar. Numune analitlerin ekstraksiyonu, su banyosuna ultrasonik radyasyon uygulanmasıyla gerçekleştirilir [29].

Ekstraksiyon verimini artırmak için sıcaklık, sonikasyon genliği, solvent türü, sonikasyon zamanı, numune partikül boyutu, numune miktarı, katı/solvent oranı gibi faktörleri optimize etmek gerekir. Ultrasonik radyasyonun diğer bir uygulaması dinamik ses dalgaları-destekli ekstraksiyondur. Bu teknikte numune ultrasonik su banyosuna yerleştirilmiş bir ekstraksiyon hücresi içine konulur. Bu teknik taze ekstraksiyon solventinin devamlı olarak örneğe pompalandığı, artan analit transferi olan açık bir sistem veya ekstraktın seyrelmesini engelleyen ekstraksiyon solventinin yeniden dolaştığı kapalı bir sistem olarak kullanılabilir [30]. Analitler katı matriksten solvente transfer olur olmaz uzaklaştığından, dinamik ekstraksiyon kullanımı daha avantajlıdır [31].

Diğer bir avantajı ise dinamik sistemde örneğin sürekli olarak taze solvente maruz kalmasıdır. Bu durum analitlerin örnek matriksinden solvente transferini hızlandırır. Ekstraksiyon tipik olarak 20-200 ml solvent gerektirir ve ekstraksiyon zamanı 2 ila 20 dakika aralığındadır.



Şekil 1.4. Dinamik ses dalgaları destekli ekstraksiyon sistemi
A) Açık sistem B) Kapalı sistem

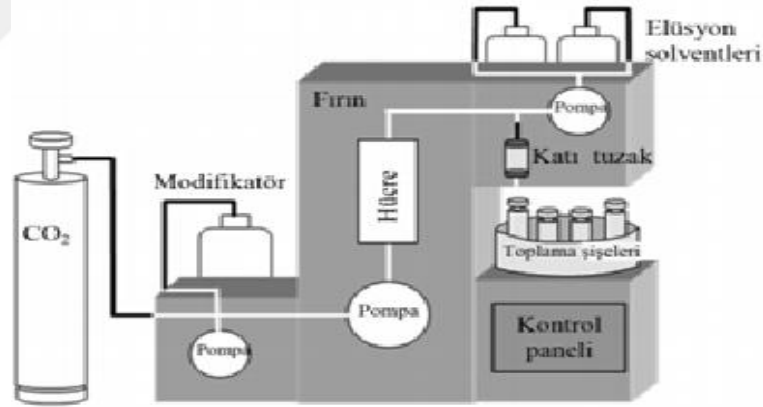
Ultrasonik destekli ekstraksiyon sıvı ve katı numunelerin her ikisi için veya organik ya da inorganik bileşiklerin ekstraksiyonu için kullanımı uygundur. Ses dalgaları organik bileşiklerin yükseltgenmesi veya ayrışmasında yardım için de kullanılabilir [32]. Sánchez-Brunete ve arkadaşları toprakta pestisitlerin tayini için küçük kolonlarda ses dalgaları-destekli

ekstraksiyon olarak adlandırılan küçültülmüş bir teknik geliştirmişlerdir [33]. Şekil 1.4'te toprak ekstraksiyonu şematik olarak gösterilmiştir.

1.3.4 Süperkritik Akışkan Ekstraksiyon Tekniği

Kendi kritik sıcaklığı üzerinde ısıtılan ve kendi kritik basıncı üzerinde basınç uygulanan bir element, madde veya karışım olarak tanımlamaya süperkritik akışkan denir. Bir süperkritik akışkan tek bir faz halinde bulunur (ne gaz ne de sıvıdır) basınçla veya sıcaklıkla sıvılaştırılmaz veya buharlaştırılmaz. Bundan dolayı süperkritik akışkan, bir gaz ve bir sıvı arasındaki maddenin ara formunu gösterir. Sıvınıniki gibi yüksek yoğunluk ve çözme gücü, gazıniki gibi düşük viskozite, sıfır yüzey gerilimi ve analitler için yüksek difüzyon hızına sahiptir. Daha yüksek difüzyon katsayıları ve düşük viskoziteleri nedeniyle, süperkritik akışkanların katı gözenekli materyallere nüfuz etmesi çok daha kolaydır.

Çözme ve yayılma gücü sıvılara göre daha fazla olduğu için hızlı reaksiyon kinetiğine sahiptirler [34]. Geleneksel yöntemlerle karşılaştırıldığında belirgin avantajı kısa ekstraksiyon zamanı ve organik solventlerin az kullanılmasıdır [35].



Şekil 1.5. Süperkritik ekstraksiyon cihazı

Süperkritik sıvı ekstraksiyon tekniği, çevresel, farmasötik, polimer ve gıda analizlerinde kullanılmaktadır. Ham sebze yağları gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılır. İstenmeyen bileşiklerin uzaklaştırılması için tüketilmeden önce yağların rafine edilmesi gerekir. Saflaştırma süreci boyunca yağdaki faydalı bileşikler de kaybolabilir. Buğday tanesi

yağında, yeşil kahve yağında, ham palmiye yağında ilgilenilen bileşiklerle zenginleştirilmiş ekstraktlar elde etmek için alternatif bir saflaştırma metodu olarak süperkritik ekstraksiyon yöntemi önerilmiştir [36].

1.4. UV-VIS Spektrofotometre Sistemleri

Görünür bölge ışınlarına dayanan moleküler spektroskopi olan ultraviyole, on binlerce inorganik, organik ve biyokimyasal türün kantitatif analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Örnek küvetlerin özellikle ultraviyole ışık geçirgenlikleri en önemli noktadır. Quartz veya eritilmiş silikadan yapılmış küvetler özellikle ultraviyole ışık geçirgenlikleri sebebiyle UV bölgede tercih edilirken; silikat cam veya plastik yapıları küvetler görünür bölge aralığını da kapsayan 350-2000 nm dalga boyu aralığında kullanılabilir [37].

Ultraviyole ışınlarla yapılan spektrofotometrik ölçmeler bazı kromofor grupların kalitatif tayininde yararlı olur. Çok karmaşık yapıları moleküllerin bile fonksiyonel grupları dışında kalan kısımları, 180 nm'den daha uzun dalga boylarına karşı geçirgendir. Onun için 200-400 nm aralığında bir veya daha çok pik gözleniyorsa bu molekülde doymamış grupların veya kükürt, halojen atomlarının varlığını gösterir. UV spektrofotometreleri yapılarına göre tek ışın demetli ve çift ışın demetli spektrofotometreler olmak üzere ikiye ayrılır [38].

Tek Işın Yollu Spektrofotometreler: Tek ışın yollu fotometrelerde kaynaktan çıkan ışık, bir mercek ile toplanarak monokromatöre gönderilir ve dalga boyu seçiminden sonra bir

aralıktan geçirilerek örnek üzerine düşürülür. Bu bileşenlerin tümünün aynı ışık yoluna yerleştirildiği böyle bir spektrofotometreye tek ışın yollu spektrofotometre adı verilir. Bu cihazlarda tek bir ışın demeti kullanılır. Sıfır ayarı ve ölçüm işlemleri ayrı ayrı yapılır. Tek ışın yollu spektrofotometreler basit ve ucuz olmalarının yanında hassas ölçüm yapabilmeleri nedeniyle de tercih edilir. Kantitatif analizler için oldukça uygun cihazlardır [39].

Çift Işın Yollu Spektrofotometreler: Monokromatörden çıkan ışık, eşit şiddette iki demete bölünerek biri örneğe diğeri sadece çözücünün bulunduğu kaba gönderilir. İkiye ayrılan ışık, iki ayrı dedektörle algılanır ve dedektörlerde oluşan sinyallerin oranı ölçülür. Böylece örnekteki geçirgenlik değeri sürekli olarak çözücününki ile karşılaştırılmış olur. Burada iki dedektörün tam uyumlu olması, yani eşit şiddetteki ışık ile aynı sinyali oluşturması gerekir [40].



Şekil 1.6. Bir UV-VIS spektrofotometre cihazı

UV-VIS Spektrofotometresinin Kullanım Alanları:

- Yapı Analiz
- Kalitatif Analiz
- Kantitatif Analiz
- Geometrik izomerlerin konformasyonlarının bulunması
- Denge sabitlerinin bulunması

- Reaksiyon kinetiği ve reaksiyon ara ürünlerin bulunması
- İçme suyu [41].

1.4.1. UV-VIS Spektrofotometre Cihazının Çalışma Prensibi

Hazırlanan çözeltiden belirli dalga boyunda ışın geçirilmesi ve bu ışının ne kadarının çözelti tarafından tutulduğunun bulunması esasına dayanır. Çözeltinin içerisindeki madde miktarı ne kadar yüksek ise çözelti tarafından tutulan ışın miktarı da o kadar yüksektir. Spektrofotometre hem UV hem de Görünür Bölgede çalıştığından iki farklı ışık kaynağını kullanılır. Öncelikle bu ışın demetleri bir prizmadan geçirilerek içerdiği dalga boylarına ayrılır [42-43]. Her bir dalga boyu ışın bir ayna ile eşit iki parçaya ayrılır. Bu demetlerden biri sadece çözücü içeren UV geçirgen bir küvetten geçirilir. Diğeri ise eşdeğer küvette, aynı çözücüde örnek madde ile oluşturulmuş çözeltiden geçirilir [44].

Çözelti içerisindeki bütün maddeler, ışının bir dalga boyunu tutarken diğerlerini yansıtır veya geçirir. Maddenin belli bir dalga boyundaki bir ışını tutması, onun diğer fiziksel ve kimyasal özellikleri (yoğunluk, erime, kaynama noktası, donma noktası) gibi sabit bir özelliğidir. Burada amaç küvet ve çözücüden gelen etkileşmeleri fark alarak ortadan kaldırmaktır. Bu sayede sadece ve sadece numunenin etkileşimleri ortaya çıkacaktır [45]. Bu ana bileşenlere ek olarak spektrometrelerde ışığı toplamak, odaklamak, yansıtma, iki demete bölmek ve örneğin üzerine belli bir şiddetle göndermek amacıyla mercekler, aynalar, ışık bölücülerini ve giriş çıkış aralıkları vardır. Örnek ise kullanılan dalga boyu bölgesinde ışını geçiren maddeden yapılmış örnek kaplarına konularak ışın yoluna yerleştirilir [46].

Absorbansı Etkileyen Faktörler:

- Çözücü türü
- pH
- Sıcaklık
- Elektrolit derişim [47].

1.4.2. Dalga Boyu Seçimi

Örneğin yapısına, hazırlanış yöntemine, çalışma ortamı şartlarına bağlı olarak bu büyüklük değişir. Seçilen dalga boyu hızlı değişim aralığında olmamalı, çok ince bir pik üzerinde olmamalı, tekrarlanır okumaların yapılabileceği oldukça düz ve yüksek soğurum bölgelerinde, yaygan pikler üzerinde olmalıdır. Tercihen, kimyasal türler ve çözünenin soğurum yapmadığı ya da az yaptığı bir dalga boyu olmalıdır [48].

Işıma Kaynağı Özellikleri:

- Enerjisi büyük olmalıdır
- Sürekli bir spektrum vermelidir
- Enerjisi sabit olmalıdır [49].

1.4.3. Ultraviyole Alanda Absorpsiyon Ölçme Cihazlarının Başlıca Kısımları

Çözelti içindeki madde miktarını çözülden geçen veya çözeltinin tuttuğu ışık miktarından faydalanarak ölçme işlemine fotometri, bu tip ölçümde kullanılan cihazlara da fotometre denir. Fotometrik ölçümde, renksiz çözeltilerin konsantrasyonu da ölçülebilir. Analiz edilen örnek üzerine ışık demetinin bir kısmını filtreler kullanarak ayıran ve gönderen aletler kolorimetre veya fotometre olarak adlandırılırken yarıklar ya da prizmalar aracılığı ile bu seçiciliği yapan aletler spektrofotometre olarak adlandırılır. Maddenin ışığı absorplamasını incelemek için kullanılan düzeneğe absorpsiyon spektrometresi veya absorpsiyon spektrofotometresi adı verilir [50].

Işın Kaynağı: UV-Görünür bölgede D₂, H₂, civa buhar lambası gibi sürekli ışık kaynakları kullanılır. Görünür alanda yapılacak çalışmalar için genellikle 320-2500 nm arasındaki tüm ışınları veren Wolfram lambası kullanılır. Tungsten flaman lambası, görünür ve yakın IR bölgede (320-3000 nm) ışık yayar. Tungsten lambasının içinde bir miktar iyot veya brom buharı bulunursa lambanın ömrü artar ve bu lamba tungsten-halojen lambası olarak adlandırılır. Xe ark lambası, UV-görünür bölgenin tümünde (150-700 nm)

kullanılabilecek şiddetli ve sürekli ışık kaynağıdır. Civa buhar lambası, her iki bölgede ışımaya yapabilen bir ışık kaynağıdır; sürekli spektruma ek olarak kesikli hatlar da içerir [51]. Ultraviyole bölgede en çok kullanılan lambalar, hidrojen ve döteryum elektriksel boşalım lambalarıdır. Bu lambalar 180-380 nm arasında ışık yayar. Daha pahalı ve daha uzun ömürlü olan D₂ lambasının yaydığı ışığın şiddeti H₂ lambasına göre çok daha fazladır. Cam UV ışığını absorbladığı için hidrojen lambaları kvartzdan yapılıdır [52].

Filtreler: Filtreler ile monokromatik ışın demeti elde edilemez. Ancak belirli aralıklardaki demetler elde edilir. Bu demetlerin içinde de çok sayıda dalga boyları vardır. Filtreler, sürekli ışın veren bir kaynağın yaydığı ışıklardan belli bir ışımaya bandındaki diğer dalga boylarını absorplayarak çalışır.

Absorpsiyon filtrelerinde etkin bant genişliği 30-250 nm aralığındadır. Absorpsiyona duyarlı çalışan filtreler görünür bölgede kullanılır. Girişim filtreleri ile çok dar ışın bandı elde etmek için optik girişimden yararlanır. Filtreler basit sağlam ve ucuzdur [53].

Monokromatörler: Çeşitli dalga boylarından (polikromatik) oluşan bir ışın demetini tek dalga boylu (monokromatik) demetler haline dönüştürmek için kullanılan düzeneklere monokromatör denir. Monokromatör olarak prizmalar veya optik ağ denilen parçalar kullanılır [54].

Prizma: Prizmalarda dalga boyu seçilmesi, farklı dalga boylarındaki ışığın prizmaya girişte ve çıkışta farklı miktarlarda kırılması ilkesine dayanır. Prizma ışık kaynağına göre döndürülerek çeşitli dalga boylarına sahip ışığın bir aralıktan geçerek madde ile etkileşmesi sağlanır. Işık prizmaları, cam veya kuartz olabilir. Özellikle düşük UV ışınları iyi geçirmediğinden cam prizma görünür bölge için uygundur. Kuartz prizmalar ise hem UV ışınlarını iyi geçirir, hem de görünür ışık ve IR'e yakın bölgelerde çalışmaya elverişlidir. Kuartz prizmalar pahalı spektrofotometrelerde bulunur [55].

Optik ağ: Üzerinde birbirinden eşit uzaklıklarla ayrılmış ince aralıklar veya çıkıntılar bulunan bir yüzeyle etkileşen polikromatik ışık, bu yüzeyden geçtikten veya bu yüzeyden yansdıktan sonra da kırınımına uğrar. Bu tür parçalar geçirgen optik ağ veya yansıtan optik ağ

adını alır. Optik ağırlara gelen ışığın geliş açısı değiştirilerek her bir geliş açısında başka bir dalga boyu veya bunun katlarının kırınımına uğraması sağlanır. Böylece optik ağırla döndürülmesi ile farklı dalga boyundaki ışığın seçimi mümkün olur [56].

Numune Kapları: Spektrofotometrelerde kullanılan numune kaplarına bir örnek Emisyon spektroskopisi hariç bütün spektroskopik yöntemlerde numune kaplarına ihtiyaç duyulur. Numune kapları hücre veya küvet olarak adlandırılır [57]. Çalışılan dalga boyu aralığı için geçirgen olmalıdır. Mesela cam küvetler 350 nm altındaki ışığı absorplayacağı için UV bölgedeki çalışmalarda kuvars veya erimiş silis küvet kullanılır. Sodyum klorür kristalleri IR bölgede uygun hücre penceresi olarak kullanılır [58]. Küvetler, tüp veya dört köşe olabilir.

Daha çok dört köşe küvetler tercih edilir. Küvetlerin ışık geçiren kısmı cilalı diğer yerleri ise buzludur. Küvetler soft veya borosilikat cam, kuvars veya plastikten yapılır. Çalışılan dalga boyu aralığı için geçirgen olmalıdır. Cam küvetler görünür bölgedeki ölçümler için kullanılır [59].

Asidik solusyonlarda soft camlar, bazik solusyonlarda ise borosilikat camlar uygundur. Cam küvetler 350 nm altındaki ışığı absorplayacağı için UV bölgedeki çalışmalarda kuvars veya erimiş silis küvet kullanılır [60].

Kuvars küvetler ise hem UV hem de görünür bölge için kullanışlıdır. Sodyum klorür kristalleri ise IR bölgede uygun hücre penceresi olarak kullanılır. Özel üretilmiş kaliteli plastik küvetler ise 200-700 nm arasında rahatlıkla kullanılabilir. Plastik küvetler ucuz olmalarına karşılık kullanım sırasında kolayca çizilebilmeleri sebebiyle uzun ömürlü değildir. Kuvars küvetler ideal olmakla birlikte çok pahalıdır. Cam küvetler ise ucuz ve dayanıklı oldukları için en çok kullanılan küvetlerdir [61].

UV-VIS Spektrofotometrede Doğru Bir Ölçüm Yapmak İçin

- Dalga boyuna uygun, birbiriyle uyumlu ve iyi kalite küvetler kullanılmalıdır
- Küvetlerin temiz ve çizilmemiş olmasına dikkat edilmelidir

- Aşınma ve eskimeden gelebilecek farklılıkları belirlemek için küvetler düzenli olarak birbirlerine karşı kalibre edilmelidir
- Küvetler cihaza yerleştirilirken ışık giriş ve çıkış yönlerine küvetlerin cilalı kısımlar gelmelidir
- Kullanım esnasında cilalı olan kısımlardan tutulmamalıdır
- Küvetler kurutma veya başka amaçlarla ısıtılmamalıdır [62].

1.4.4. Spektrofotometrik Ölçümün Yapılışı

Spektrofotometrede ölçüm yapılırken numuneye belirli bir dalga boyundaki ışın gönderilerek numunenin absorbe ettiği ışın miktarı ölçülür. Yapılan analize göre ölçümde hangi dalga boyundaki ışının kullanılacağı analiz metodunda belirtilmektedir. Kullanılacak ışın dalga boyu bilinmiyorsa miktarı tespit edilecek maddenin 1 molar çözeltisi hazırlanıp çeşitli dalga boylarındaki absorbans değerleri ölçülür. En yüksek değer ölçüldüğü dalga boyu belirlenerek kullanılır. Spektrofotometre bu dalga boyuna ayarlanarak çözeltilerin ölçümüne geçilir. Spektrofotometrik ölçüm için üç tip çözelti hazırlanır. Bunlar: Kör, numune ve standart çözeltileridir [63].

Kör (tanık, şahit) Çözelti: Spektrofotometrede okuma yapmadan önce absorbansı sıfıra ayarlamak için kullanılan çözeltidir. Bu amaçla yapılan işleme “kör ayarı” veya 0 ayarı denir [64].

Numune Körü: Renkli veya bulanık numunelerin kullanıldığı ölçümlerde numunenin renginden gelebilecek absorbansı tespit etmek için kullanılan, içinde sadece numunenin

bulunduğu kör çözeltilerdir. Spektrofotometre optik köre karşı sıfıra ayarlanmışsa reaktif körünün absorbans değeri, numune ve standartların absorbansından çıkarılır. Numune körünün absorbansı ise sadece numunenin absorbansından çıkarılarak hesaplama yapılır [65].

Standart Çözelti: Miktarı bulunmak istenen maddenin bilinen konsantrasyonlardaki çözeltilisidir. Bir veya birden fazla olabilir. Birden fazla olduğunda grafik çizilir.

Numune Çözeltisi: İçindeki madde miktarını tespit etmek istediğimiz çözeltilerdir. Spektrofotometrik ölçümler; end-point okuma ve kinetik okuma şeklinde yapılır. End-point okuma; spektrofotometrik okumanın reaksiyon tamamlandıktan sonra tek seferde yapıldığı okumalardır. Çoğunlukla end-point okuma yapılmaktadır. Kinetik okuma ise birim zamandaki absorbans değişiminin ölçüldüğü okumalardır. Genellikle enzim analizlerinde kinetik okuma kullanılır [66].

1.5. Yüzey Yanıt Metodolojisi

İki veya daha fazla değişken yardımıyla tanımlanan yüzeylerin matematiksel ve istatistiksel tekniklerin yardımı ile modellenmesidir. Optimizasyon, prosesin belirlenen hedefler (yanıtlar) doğrultusunda, bağımsız değişkenlerin birbirleriyle olan etkileşimleri ve bu bağımsız değişkenlerin hedefe olan etkileri de göz önünde bulundurularak bir araya getirilip uygulanması işlemidir [67]. 23 Matematiksel modellemenin bir uygulama alanı olan yüzey yanıt yönteminde, deneysel tasarım ile birkaç bağımsız değişkenin (girdilerin) etkilediği cevabın (çıkıtların) optimize edilmesi amaçlanmaktadır. Yüzey Yanıt yöntemi, proses değişkenlerinin deneysel uzayını araştırmak için deneysel stratejileri, sistemin yanıtı ve üzerinde etkili olan bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi belirlemek için kullanılan empirik modelleme tekniklerini ve proses değişkenlerinin sistemin yanıtında arzu edilen etkiyi gösterdiği seviyelerinin bulunması için kullanılan optimizasyon tekniklerini içermektedir [68].

Yüzey yanıt yönteminin çeşitli dizaynları mevcuttur. En çok kullanılan iki dizaynı ise “Central Composite” ve “Box-Behnken” dizaynlarıdır. Central Composite dizaynı, her bir faktörün beş seviyesini kullanırken, Box-Behnken dizaynı her bir faktörün üç seviyesini kullanmaktadır. Box-Behnken tasarımları, tamamlanmamış bir blok tasarımının (incomplete

block design) uygun bir şekilde iki düzeyli çok etkenli bir tasarımla birleştirilmesi sonucunda ortaya çıkarlar [69]. Tasarımda tüm etkenler için alt ve üst sınırlar aynı anda hiçbir zaman kapsamadığı için, uç değerlerin yaratacağı tatmin edici olmayan sonuçlar da engellenmiş olur. Yüzey yanıt yönteminde, prosese etki edecek faktörlerin (bağımsız değişkenler) ve deneme aralığının belirlenmesinden ve deney tasarımı yapıp, analizlerin gerçekleştirilmesinden sonra regresyon analizi yöntemi ile yanıt ile bağımsız değişkenler arasındaki ilişki incelenir [70].

Regresyon modeli tahminlendikten sonra bu denklemin ilişkiyi ne derece açıkladığının ve bu denklemi kullanarak yapılacak tahminlerin ne derece hassas olacağını araştırılması gerekmektedir. Yapılan varsayımlardan biri olan, seçilen modelin matematiksel formunun uygun olduğu, dolayısıyla gerçek ortalama yanıtı temsil edebildiği de test edilmelidir. Bu amaçla varyans analizi gerçekleştirilir (ANOVA) ve model, model uygunsuzluğu testi yapılır. Uygun bir dizayndan sonra bu model uygun noktanın araştırılmasında kullanılır [71].

Kalitenin iyileştirilmesi, değişkenliğin azaltılarak ürün performansının ve sürecin iyileştirilmesi çoğunlukla doğrudan RSM kullanılarak başılır. Yöntem ilk kez G.E.P Box ve K. B. Wilson tarafından 1951'de ortaya atılmıştır. Yüzey Yanıt metodu, süreç açısından en iyi yanıtın bulunması için faktörlerin belirlenmesini, süreçte etkin olan faktör seviyelerinin bulunmasını, mevcut koşullarda elde edilen bir kalite düzeyinin üzerinde bir ürün kalitesi sağlanabilmesi için yeni üretim koşullarını belirlemeyi, yanıt ve nicel faktörler arasındaki ilişkiyi bir modelle tanımlamayı sağlar [72]. Yüzey yanıt metodolojisi sistem optimizasyonunda kullanılan bir grup istatistiksel ve matematiksel teknikten meydana gelmektedir. Bu teknik sayesinde bağımsız değişkenlerin tek veya interaksiyon halinde, proses üzerindeki etkilerini açıklayabilmek mümkündür. Yüzey Yanıt Metodolojisinin temeli, herhangi bir fiziksel sisteme ait k sayıdaki bağımsız değişkene (x) bağlı olarak meydana gelen tepki ölçümüne dayanır.

İşlem basamakları şunlardır:

-Bağımsız değişkenlerin seçimi

- Deneme desenini çıkarılması
- Kullanılacak değişkenlerin formunun oluşturulması(kodlu-kodsuz)
- Model denkleminini çıkarılması
- Denemenin grafiksel gösterimi [73].

1.6.Antibakteriyel Aktivite

Bakterisidal etkilerini enerji üreten enzimlerin inaktivasyonu, protein denatürasyonu ve hücre membranının yıkımı ile gösterirler. Bakterilerde sitoplazmik membran, mayalarda plazma membranı hedefidir [75]. Mikroorganizmaya adsorbe ve penetre olan katyonik deterjanlar, yüzeyde aktif olmaları nedeniyle stoplazmik membran permeabilitesini artırarak, lipid veya proteinlerini etkileyerek membranı disorganize ederler [76]. Bunu takiben hücre içi enzimlerin, koenzimlerin, iyon ve metabolitlerin hücre dışına sızması ile bakteri hücresinin işlevsel dengesini bozarlar. Katyonik solventler konsantrasyon artışına bağlı olarak bakteri hücrelerinde glukoz ve laktoz metabolizmasının inhibisyonu, yapısal proteinlerin denatürasyonu ile inaktivasyon, metabolik bozukluklara sebebiyet verirler [77]. Protein ve nükleik asitlerin degradasyonu sonucunda otolitik enzimler tarafından hücre lizis (hücre zarının yıkımı) olur [78]. Gram-pozitif bakteriler üzerindeki etkileri, gram-negatif bakterilere olan etkilerine göre daha güçlüdür. *Pseudomonas*, *Serratia* türleri ve *E.coli* gibi bazı gram-negatif bakterilere zayıf etki gösterirler. *Candida*'ya karşı olan dışında Fungistatik etkinlikleri azdır. Zarflı virüsler inaktive etmelerine rağmen, zarfsız virüslere etkisizdirler [79].

1.7.Kaynak Özetleri

Amerikada Boston kanser araştırma merkezinde *Ginkgo biloba*'nın yumurtalık kanser hücreleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Doğru doz ve yöntem ile uygulandığında *Ginkgo biloba*'daki etkin maddelerinin yumurtalık kanser hücreleri üzerinde tedavi edici etkileri olduğu belirtilmiştir. *Ginkgo biloba* bileşenleri olan quercetin ve ginkgolide yumurtalık kanser hücrelerinin çoğalmasını engellemektedir [80]. Bunlara istinaden yapılan birçok araştırma *Ginkgo biloba*'nın kanser hücrelerinin apoptosis yoluyla parçalanmasında etkili olduğu ve kanserleşmeyi önlediği bilinmektedir [81].

Japonya'da Sojo Üniversitesinde *Ginkgo biloba* ekstraktının tümör hücrelerinin büyümesi üzerindeki durdurucu etkileri incelenmiş. *Ginkgo biloba* ekstraktının farelerdeki melanoma, insan akciğer hücrelerindeki adenocarcinoma hücreleri üzerindeki tümör hücrelerinin büyümesini engellendiği kaydedilmiştir. *Ginkgo biloba* ekstraktının anti-tümör ajanı olarak hastalarda kullanılabileceği düşünülmektedir [82].

Amerikada Massachusetts Üniversitesinde *Ginkgo biloba* ekstraktının in-vitro koşullarda hiperglisemi ve hiper tansiyon üzerindeki etkileri incelenmiş. Fenolik içeriğinden kaynaklı olarak antioksidan etki gösterdiği, α -Amilaz, α -Glukosidaz ve Angiotensin I- Converting enzimler üzerinde inhibe edici(durdurucu) etkilerinden dolayıda diyabet ve hipertansiyon düzenleyici olduğu belirtilmektedir. Şeker hastaları ve yüksek tansiyon hastalarının kullanması tavsiye edilmektedir [83].

Japonya'da yapılan çalışmalar *Ginkgo biloba* ekstraktının, hipo glisemi(kan şekerinin düşmesi) durumunda cytochrome p-450 mekanizması yardımıyla kana daha fazla insülin bırakılmasını sağlayarak, kan şekerini düzenlediğini desteklemektedir [84].

Kore'de Seoul Üniversitesi hastanesinde yapılan bir çalışmada Koreli gönüllü kişiler üzerinde akışkan *Ginkgo biloba* ekstraktının farmakodinamik ve farmakokinetik etkileri incelenmiştir. Bitkisel tedavilerde *Ginkgo biloba* ekstraktı damar hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Farmakodinamik ve farmakokinetik oluşumlar arasında ölçülen değerler kullanılan ilaçlarla birlikte tedaviye yardımcı maksatlı doz ayarlamasında da yol göstermektedirler. Buradan sonuçlar göz önünde bulundurunca *Ginkgo*

biloba ekstraktı, kullanılan diğer ilaçlar dikkate alınarak uygun doz belirlendiğinde damar hastalıklarında etkili olduğu belirtilmektedir [85].

Danimarkada *Ginkgo biloba*'nın kan basıncını dengelemesi üzerine yapılan çalışmalarda Atardamar üzerinden yapılan ölçümlerde yükselen kan basıncını düşürücü etkileri saptanmıştır [86].

Almanya'da ve Amerika'da farklı fakültelerde *Ginkgo biloba* ekstraktının öğrenme gücü ve hafıza üzerindeki etkileri denenmiştir. *Ginkgo biloba* kullanan gönüllülerde akılda tutabilme, dikkat gibi hususlarda daha yüksek performans alınabildiği psikolojik konsantrasyon gelişimi gözlemlendiği belirtilmiştir. Öğrenme kapasitesi artmış, davranışlar daha akılcı ve etkili olmaya başlamıştır. Yan etkileri incelendiğinde uygun dozda kullanıldığında herhangi bir yan etki saptanamamıştır [87].

Suudi Arabistanda King Saud üniversitesinde *Ginkgo biloba* ekstraktının albino fareler üzerinde biyokimyasal toksik maddelerin sebep olduğu hasarlar üzerindeki tamir edici etkisi incelenmiştir [88].

Almanyada Karlsruhe üniversitesinde bağışıklık sistemi üzerinde koruyucu etkileri incelenmiş *Ginkgo biloba*'nın ve Alzheimer hastalarında kullanılabildiği açıklanmıştır. Potansiyel alerji ve diğer bağışıklık sisteminin tahribatına dayalı hastalıklarda önleyici etkisi belirtilmiştir. Diz arkasındaki romatizmal ağrılara karşı da etkili olduğu görülmüştür [89].

Mısır'da Kaire doğal araştırma merkezinde *Ginkgo biloba* ekstraktının enfeksiyon giderici ve analjezik (ağrı kesici) etkileri incelenmiştir. Sinirsel bir ağrı, şiddetli hasar görmüş

mide dokusunda ve enfeksiyon ile yüklenmiş bir model üzerinde *Ginkgo biloba* ekstraktı kullanılmıştır. Sonuçta mide dokusunu koruduğu, enfeksiyonu önlediği belirtilmiştir [90].

Litvanya Kaunas üniversitesinde *Ginkgo biloba* ekstraktının mitokondriyal kalp fonksiyonları üzerindeki etkisi incelenmiş. *Ginkgo biloba* metabolik fonksiyonların düzenlenmesi için aktif olan etkin maddeler içermektedir. Bu özellikleriyle *Ginkgo biloba* ekstraktı kullanıldığında, kan dolaşımının düzenlendiği, serbest radikal hasarına karşı hücreleri koruduğu ve kalp-damar hastalıklarına önlemede yardımcı olduğu belirtilmiştir [91].

Fransa da George Town Üniversitesinde *Ginkgo biloba* ekstraktının serbest kolesterol seviyesi üzerindeki etkileri incelenmiştir. *Ginkgo biloba* ekstraktı kullanıldığında beyinin ürettiği β -Amyloid üretimini tetikleyen proteinin aktivasyonunu inhibe ettiği, serbest kolesterol seviyesini düşürdüğü açıklanmıştır [92-93].

Ginkgo biloba yaprakları izoprenoitler (steroller, terpen trilaktonlar), alifatik alkoller ve ketonlar, organik asitler, polisakkaritler, flavonol glikozitler veya fenolik trilaktonlar gibi bileşikler ihtiva etmektedir [94].

Ginkgo biloba yaprakları astım tedavisinde ve mantar hastalığında ve alkoliklerin tedavisinde yüzyıllardır Çin'de bitkisel ilaç olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda, *Ginkgo biloba* ekstraktlarının tıbbi özellikleri üzerine pek çok çalışma yapılmış ve elde edilen sonuçlar dünyanın ilgisini çok çekmiştir [95].

Ginkgo biloba 'nın bellek geliştirme amaçlı olarak yaşlı insanlar arasında yaygın olarak kullanıldığı bilinmektedir. Aynı zamanda kalp ve beyin hastalıklarının tedavisinde kullanılır [96].

2. METARYEL METOD

2.1. Kullanılan Materyaller

Eskişehir’de yerel bir aktardan satın alınan *Ginkgo biloba* yaprakları karanlık odada 15 gün süreyle oda sıcaklığında kurutuldu. Ekstraksiyondan önce 80 mesh tane boyutuna öğütüldü ve oda sıcaklığında stoklandı. Deneylerde kullanılan bütün kimyasal maddeler, analitik veya HPLC saflıktadır. Çalışmada yararlanılan kimyasal maddeler ve özellikleri Çizelge 2.1.’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

Adı	Kullanım Amacı	Marka/Safılık
Sodyum hidroksit (NaOH)	Ekstraksiyon solüsyonu	Sigma, analitik saflıkta
Sodyum karbonat (Na ₂ CO ₃)	Sodyum karbonat çözeltisi hazırlama	Merck, analitik saflıkta

Aleminum klorür (AlCl ₃)	Aleminum klorür çözeltisi hazırlama	Merck, analitik saflık
Sodyum nitrit (NaNO ₂)	Sodyum nitrit çözeltisi hazırlama	Sigma, analitik saflıkta
Quarcetin standardı	Uv analizlerinde standart olarak.	Merck, analitik saflıkta
Metanol	Ekstraksiyon solüsyonu	Merck, HPLC saflığında
Etanol	Ekstraksiyon solüsyonu	Sigma, analitik saflıkta
Gallik asit standardı	Uv Analizlerinde standart olarak	Sigma, analitik saflıkta
Folin ciocalteu	Fenolik tayini için çözelti hazırlama	Sigma, analitik saflıkta
1,1-Difenil-2-Pikril Hidrazil (DPPH)	Antioksidan tayini için	Merck, analitik saflıkta
Hekzan	Antioksidan özellik belirleme	Sigma, HPLC saflığında
Diklormetan	Antioksidan özellik belirleme	Sigma, analitik saflıkta

2.2. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan ekipmanlar: UV-1800 Shimadzu marka UV-VIS Spektrofotometre cihazı, Mettler Toledo ME203 marka hassas terazi, Wisebath marka 50 kHz frekanslı, 20.2 cm X 17.5 cm X 22.9 cm boyutunda, 900 W elektrik gücünde ultrasonik banyo cihazı, IKA A11 marka öğütücü, Binder marka etüv, Brand marka otomatik pipetler.

2.3. Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması

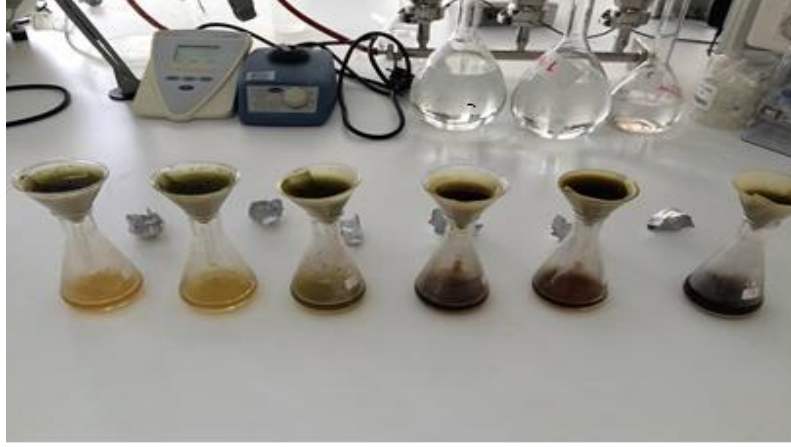
Eskişehir’de yerel bir aktardan elde edilen ve 80 mesh tane boyutuna öğütülen *Ginkgo biloba* yapraklarından 1’er g tartılarak 50 ml’lik erlenlere konuldu. Üzerlerine 30 ml etanol solventinden eklendi. Ultrasonik banyonun sıcaklığı ve süresi çalışma programına göre ayarlandı. Erlenler ultrasonik banyo içerisine yerleştirildi. Banyodaki su ile erlen içerisindeki çözelti düzeyi aynı seviyede tutuldu. Örnekler Programda belirtilen süre ve sıcaklıkta ekstrakte edilmiştir. Elde edilen ekstraktlar beyaz bant süzgeç kâğıdından süzülerek analize kadar 4 °C sıcaklıktaki buzdolabında saklandı.



Şekil 2.1. Numune ve solventin erlenlere alınması



Şekil 2.2. Ultrasonik banyo ve ekstraksiyon



Şekil 2.3. Ekstraktların süzülmesi

2.4. Toplam Fenolik Bileşik Miktarı Belirleme

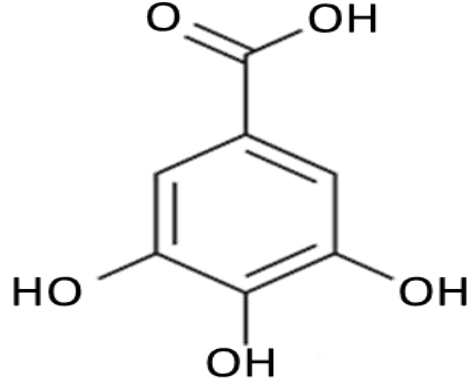
2.4.1. Çözeltilerin Hazırlanması

a. Sodyum karbonat çözeltisi hazırlama: 7,5 g Na_2CO_3 100 ml'lik balon jöjeye konuldu ve distile su ile çözülerek hacmi yine distile suyla 100 ml'ye tamamlandı.

b. Folin satın alındığı şekilde kullanıldı.

2.4.2. Deneyin Yapılışı

Toplam fenolik madde tayini için kullanılan Folin ciocalteu yöntemi, Folin ciocalteu reaktifinin (Fosfo-Molibdo-tungstat, $(\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40})-4$) ihtiva ettiği Mo^{+6} 'nın ortamda bulunan indirgeyici ajanlar tarafından Mo^{+5} 'e indirgenmesi esasına dayanmaktadır. İndirgenme reaksiyonu sonucu oluşan mavi-sarı renk 765 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmektedir [97]. Toplam fenolik madde miktarlarını belirlemek amacıyla tüm *Ginkgo biloba* ekstraktlarına Folin ciocalteu yöntemi uygulanarak her bir ekstraktta bulunan fenolik bileşikler Şekil 3.1'de yapısı verilen gallik asidin kalibrasyonundan gallik aside eşdeğer (GAE) olarak bulunmuştur.



Şekil 2.4. Gallik asitin molekül yapısı

Mo^{+6} (sarı) + e^- Mo^{+5} (mavi) Fenolik maddeler sodyum karbonat kullanılarak bazikleştirilen reaksiyon ortamında dissosiyasyon (Ayrışma) oluşur.



Çoğu antioksidan madde folin reaktifinin çalışma pH aralığında protonunu vermiş olacağından toplam antioksidan kapasitenin, fizyolojik pH'larda gerçekleşen değerinin üzerinde hesaplanma olasılığı vardır [98].

Buzdolabında saklanan numunelerden 10 ml'lik deney tüpüne 0,5 ml alındı. Üzerine 4,5 ml saf su, 4 ml sodyum karbonat ve 0,5 ml folin katılarak tüplerin ağzı kapatıldı ve 30 °C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübe edilen örneklerin UV-VIS Spektrofotometre cihazı ile 765 nm dalga boyunda absorbanları ölçüldü. Oluşturulan gallik asit konsantrasyon grafiklerinden gallik asit eşdeğeri olarak toplam fenolik madde miktarı belirlendi.

2.5. Toplam Flavonoid Bileşik Miktarı Belirleme

2.5.1. Çözeltilerin Hazırlanması

a. Sodyum nitrit çözeltisi hazırlama: 5 g NaNO_2 100 ml'lik balon jöjeye konuldu ve distile su ile çözülerek hacmi yine distile suyla 100 ml'ye tamamlandı.

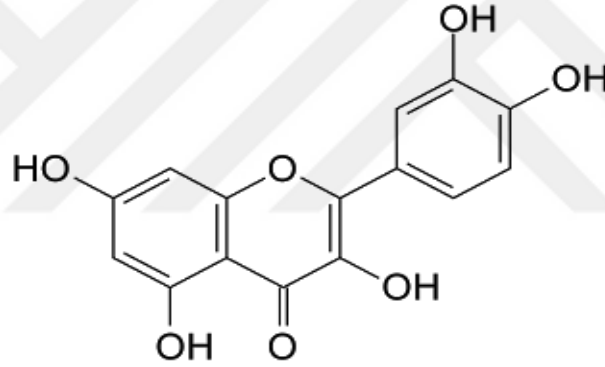
b. Sodyum hidroksit çözeltisi hazırlama: 4 g NaOH 100 ml'lik balon jöjeye konuldu ve distile su ile çözülerek, hacmi yine distile suyla 100 ml'ye tamamlandı.

c. Alevinyum klorür çözeltilisi hazırlama: 10 g $AlCl_3$ 100 ml'lik balon jöjeye konuldu ve distile su ile çözümlerek hacmi yine distile suyla 100 ml'ye tamamlandı.

2.5.2. Deneyin Yapılışı

Ginkgo biloba yapraklarından flavonoid madde ekstraksiyonu Dewanto tarafından önerilen metoda göre spektrofotometrik olarak yapılmıştır [99]. Buna göre; Buzdolabındaki numunelerden 10 ml lik deney tüpüne 1 ml alındı. Üzerine 4 ml saf su, 0,3 ml $NaNO_2$ (% 4) ekledikten sonra 6 dakika beklendi. Daha sonra üzerine 0,3 ml $AlCl_3$ (% 10), 4 ml $NaOH$ (% 5) ve 0,4 ml saf su eklenerek 10 ml tamamlandı. Tüplerin ağzı kapatılarak 15 dakika karanlık bir ortamda bekletildi.

Bekletilen örneklerin UV-VIS Spektrofotometre cihazı ile 510 nm dalga boyunda absorbasları ölçüldü. Şekil 2.5'te yapısı verilen quarcetin konsantrasyon grafiklerinden quarcetin eşdeğeri olarak toplam flavonoid madde miktarı belirlendi.



Şekil 2.5. Quarcetin'in Molekül Yapısı

2.6. Ekstraksiyon Ön Çalışmaları

2.6.1 Ekstraksiyon Verimi Üzerine Etanol Konsantrasyonunun Etkisi

Kurutulmuş ve öğütülmüş *Ginkgo biloba* yapraklarından 5 tane 100 ml'lik erlenlere 0,5'er g numune tartıldı, programda belirtilen biri saf su diğerleri farklı etanol konsantrasyonlarında (% 25,% 50,% 75,% 100) 30 ml eklendi. Ultrasonik banyoda 30 dakika

süreyle 30 °C sıcaklıkta ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi. Karışımlar beyaz bant süzgeç kâğıdından süzülerek analize kadar buzdolabında saklandı.

2.6.2. Ekstraksiyon Verimi üzerine Katı/Solvent Oranının Etkisi

Kurutulmuş ve öğütülmüş *Ginkgo biloba* yapraklarından 6 tane 100 ml lik erlene 0,5 g tartıldı. Üzerine çalışma programında belirtilen miktarlarda (20,30,40,50,60,70 ml) etanol solventinden ilave edildi.

Erlenlerin ağızları alüminyum folyo ile kapatıldı. 30 dakika süreyle ultrasonik banyoda 30 °C sıcaklıkta ekstrakte edildi. Karışım beyaz bant süzgeç kâğıdından süzülerek analize kadar buzdolabında saklandı.

2.6.3. Ekstraksiyon Verimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Kurutulmuş ve öğütülmüş *Ginkgo biloba* yapraklarından 5 tane 100 ml'lik erlene 0,5 g tartıldı ve erlenlerin ağızları alüminyum folyo ile kapatıldı. Çalışma programında belirtilen sıcaklıklarda (30,40,50,60,70°C) 30 dakika süreyle ultrasonik banyoda ekstrakte edildi. Karışımlar beyaz bant süzgeç kâğıdından süzülerek analize kadar buzdolabında saklandı.

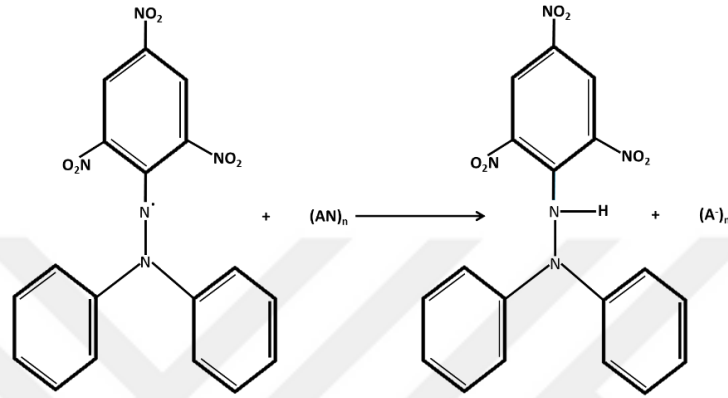
2.6.4. Ekstraksiyon Verimi Üzerine Ekstraksiyon Süresinin Etkisi

Kurutulmuş ve öğütülmüş *Ginkgo biloba* yapraklarından 4 tane 100 ml lik erlene 0,5 g tartıldı ve erlenlerin ağızları alüminyum folyo ile kapatıldı. Çalışma programında belirtilen ekstraksiyon sürelerinde(15,30,45,60 dk.) ekstrakte edilirdi. Ekstraktardaki toplam fenolik ve toplam flavonoid içeriği üzerinde farklı ekstraksiyon sürelerinin etkisi karşılaştırıldı. Diğer ekstraksiyon şartları katı/solvent oranı: 1 gram numune/30 ml, ekstraksiyon sıcaklığı: 30 °C idi, solvent olarak etanol kullanıldı. Karışım beyaz bant süzgeç kâğıdından süzülerek analize kadar buzdolabında saklandı.

2.7. 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH) Radikal Süpürme Etkisi

Bitki ekstraktlarının DPPH radikalini süpürme etkisi Sanchez-Moreno (1998) metodu esas alınarak belirlenmiştir [100]. Bir azot radikali olan DPPH'in alkol ya da sudaki

çözeltisi 517 nm’de maksimum absorbans vermektedir. Bununla birlikte H⁺ verici bir madde varlığında reaksiyon vererek protonlanmakta (indirgenmekte) ve radikal olmayan bir yapıya dönüşmektedir. Bu dönüşüm mor renkli DPPH çözeltisinin renginin açılmasıyla da gözlenmektedir. DPPH radikalinin 517 nm’de verdiği absorbans değeri ortamda bulunan H⁺ konsantrasyonuna bağlı olarak düşürmektedir. Şekil 2.6’da verilen reaksiyonda gösterildiği gibi radikal gideren antioksidan veya antiradikal türlerin varlığında DPPH radikali DPPH-H formuna dönüşmektedir.



Şekil 2.6. DPPH radikalinin DPPH-H formuna dönüşmesi

Bu amaçla daha önceden hazırlanan ve buzdolabında bekletilen örneklerden DPPH’ın kalibrasyon eğrisi için farklı konsantrasyonlarda ($6 \cdot 10^{-5}$, $5 \cdot 10^{-5}$, $4 \cdot 10^{-5}$, $3 \cdot 10^{-5}$, $2 \cdot 10^{-5}$ M) çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler kuvvetlice karıştırılıp ağzı kapatıldıktan sonra 30 dakika süre ile karanlıkta bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda her bir çözeltinin absorbansı spektrofotometrede 517 nm’de ölçülmüştür. Kalibrasyon tablosu çizilmiştir. Benzer şekilde ekstraktların 517 nm dalga boyunda absorbanları da belirlenmiştir. Her bir çözeltinin inhibisyon değerleri aşağıdaki Eş. 2.1’e göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ İnhibasyon} = 100 \times \frac{A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Numune}}}{A_{\text{Kontrol}}} \quad (2.1)$$

$A_{\text{boş}}$: Kontrolün absorbansı, A_{numune} : Ekstraktın absorbansdır.

2.8. Disk Difüzyon Testi ile Antibakteriyel Aktivitenin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan test bakterileri Nütrient Broth sıvı besiyeri ortamında 37 °C'de 24 saat inkübe edilerek aktifleştirildikten sonra 0.5 Mac Farland (108 mikroorganizma / ml) bulanıklığına göre hücre yoğunlukları ayarlandıktan sonra antibakteriyel aktiviteyi saptamak için kullanılmıştır.

Bu amaçla steril eküvyon çubukları bakteri içeren besiyerine daldırılarak Müller Hinton Agar (MHA)'lı petri kaplarına tüm yüzeyi kaplayacak şekilde ekim yapılmıştır. 0.1 gr test maddesi 1000 µl metanol içerisinde süspansiyon edildikten sonra 5 µl, 10 µl ve 20 µl olacak şekilde ayrı ayrı disklerle emdirilmiştir. Diskler petri plakları üzerine yerleştirilerek 24 saat 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda disklerin çevresinde meydana gelen inhibisyon zonları ölçülmüştür. Ayrıca negatif kontrol olarak metanol, pozitif kontrol olarak S; *Streptomisin*, DA; *Klindamisin*, VA; *Vankomisin*, P; *Penisilin*, OFX; *Ofloksasin* kullanılmıştır.

2.9. İstatistiksel Analizler

Deneylemlerin istatistiksel analizleri Instat[®] software version 3.0 ün Anova Varyans Prosedürü kullanılarak yapıldı. Anova testi, Design Expert 8.0.7.1 programı kullanarak değişkenler ve yanıt arasındaki etkileşimi tanımlamak için uygulandı. En uygun değişkenleri elde etmek için adım regresyonu kullanıldı. Parametrelerin tespiti için geri teknikler tüm değişkenleri içerir. Sonra alfa düzeylerinde uygun olmayan parametrelere sahip değişkenler denklemden atılır. Bu işlem uygun olmayan değişken kalmayınca kadar devam eder. Geri tekniklere benzer bir şekilde ileri tekniklerde verilen alfa düzeyleri içinde verilen değişkenleri değerlendirir. Geri tekniklerden farklı olarak ileri teknikler denklemden bulunmayan hiç bir değişkenle başlamaz. Denkleme ($p < 0,05$) olan değişkenler

katılır. ($p>0,05$) olan değikenler sistemden atılır. Bu proses uygun olmayan hiçbir değişken kalmayınca kadar devam eder.

Çizelge 2.2. Central compozite tasarımımda kullanılan bağımsız değişkenler, kodları ve gerçek değerleri

Bağımsız Değişkenler	Birimler	Parametrelerin Sembolleri	Kod Düzeyleri		
			-1	0	1
Ekstraksiyon Sıcaklığı	°C	(X_1)	30	45	60
Ekstraksiyon Zamanı	dk.	(X_2)	20	40	60
Etanol Konsantrasyonu	%	(X_3)	0	50	100

3. BULGULAR

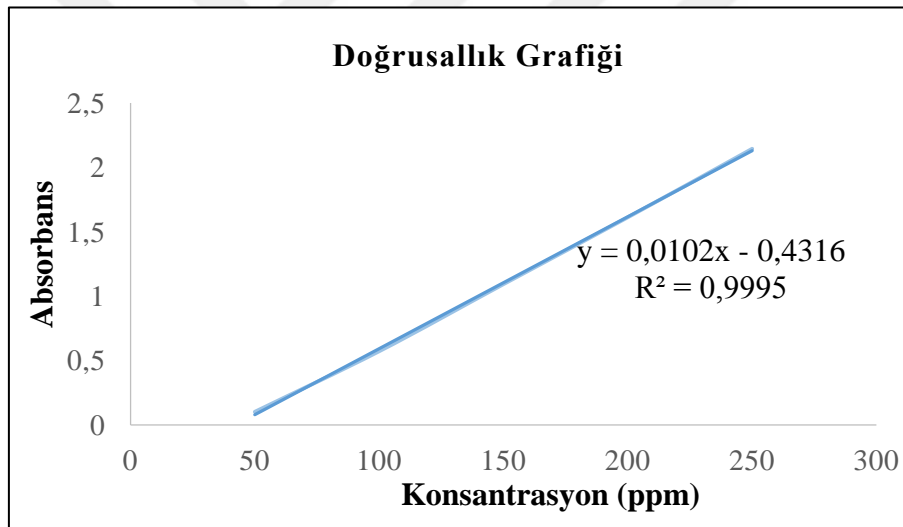
3.1. Toplam Fenolik, Flavonoid ve Antioksidan İçerikleri Belirleme Metodlarının Kalibrasyonu

3.1.1 Toplam Fenolik İçerik Belirleme Metodunun Kalibrasyon Sonuçları

Analitik metodun validasyonu için hazırlanan 50, 100, 150, 200 ve 250 ppm konsantrasyonlarında hazırlanan Gallik asit standart solüsyonlarının UV-VIS Spektrofotometrede ölçülen absorbans değerleri Çizelge 3.1’de verilmiştir. Değerlerden elde edilen doğrusallık grafiği Şekil 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Fenolik standartlarının konsantrasyonları ve absorbans sonuçları

Konsantrasyon (ppm)	50	100	150	200	250
Absorbans	0,103	0,573	1,094	1,613	2,145



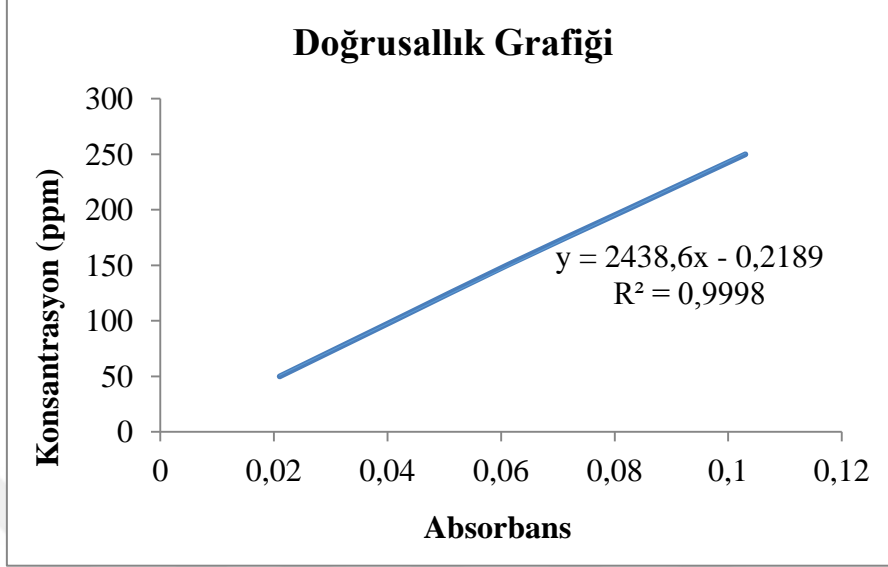
Şekil 3.1. Farklı konsantrasyonlardaki gallik asit standart solüsyonlarının doğrusallık grafiği

3.1.2. Toplam Flavonoid İçerik Belirleme Metodunun Kalibrasyon Sonuçları

Analitik metodun validasyonu için hazırlanan 50, 100, 150, 200 ve 250 ppm konsantrasyonlarında hazırlanan Quarcetin standart solüsyonlarının UV-VIS spektrofotometrede ölçülen absorbans değerleri Çizelge 3.2’de verilmiştir. Değerlerden elde edilen doğrusallık grafiği Şekil 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Flavonoid madde standartlarının konsantrasyonları ve absorbands sonuçları

Konsantrasyon (ppm)	50	100	150	200	250
Absorbans	0,020	0,039	0,059	0,087	0,105



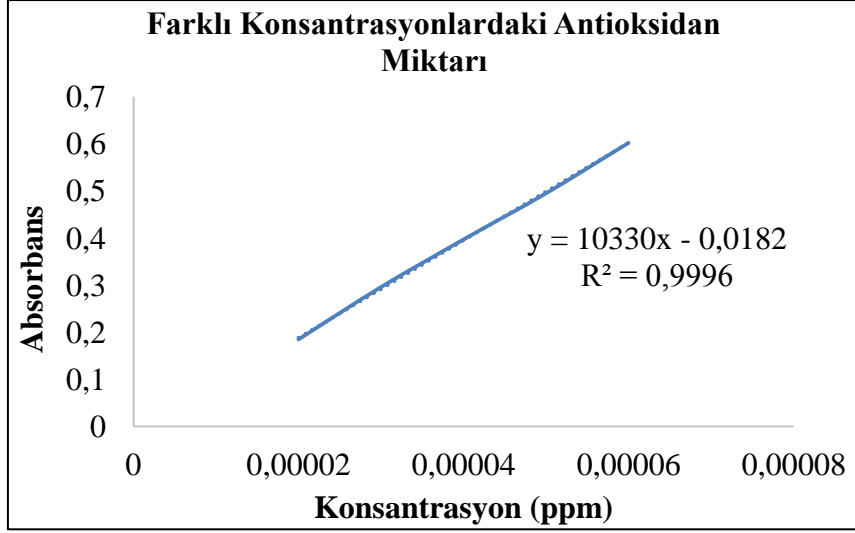
Şekil 3.2. Farklı konsantrasyonlardaki quarcetin standart solüsyonlarının doğrusallık grafiği

3.1.3. Toplam Antioksidan İçerik Belirleme Metodunun Kalibrasyon Sonuçları

Farklı DPPH konsantrasyonlarında yapılan örneklerin absorbands değerleri Çizelge 3.2’de verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde konsantrasyon miktarı arttıkça ölçülen absorbands miktarda artmaktadır.

Çizelge 3.3. Farklı DPPH konsantrasyonlarındaki absorbands değerleri

DPPH Konsantrasyonu (ppm)	Absorbans
$6 \cdot 10^{-5}$	0,602
$5 \cdot 10^{-5}$	0,495
$4 \cdot 10^{-5}$	0,397
$3 \cdot 10^{-5}$	0,296
$2 \cdot 10^{-5}$	0,185



Şekil 3.3. DPPH radikalinin 0-0,1 mg/ml konsantrasyon aralığındaki kalibrasyon eğrisi

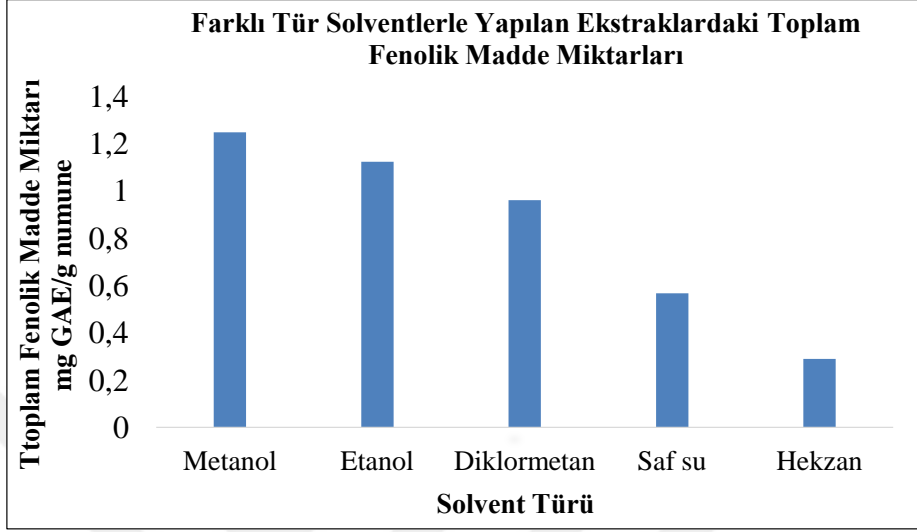
3.2. Ekstraksiyon Ön Çalışma Sonuçları

3.2.1. Uygun Solvent Belirleme Sonuçları

Kurutulmuş ve öğütülmüş *Ginkgo biloba* yaprağı örnekleri farklı solventlerle ekstrakte edildi. Ekstraktardaki toplam fenolik içerikler UV-VIS Spktrofotometre ile belirlendi. Sonuçlar Çizelge 3.4'te verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde en yüksek fenolik madde miktarının elde edildiği solvent metanol iken en düşük fenolik madde miktarının elde edildiği solvent hekzan olarak belirlenmiştir. Metanol ve etanol ile elde edilen ekstraktardaki fenolik maddde miktarları birbirine yakın olması ve metanol'ün sağlık riskleri taşımasından dolayı sonraki aşamalarda etanol ile çalışılmıştır.

Çizelge 3.4. Farklı solvent türlerinin gallik aside eşdeğerlikleri

Ekstrat	Metanol	Etanol	Diklormetan	Saf su	Hekzan
GAE(mg/1mg numune)	1,248	1,123	0,961	0,528	0,290



Şekil 3.4. Farklı tür solventlerle yapılan ekstraktardaki toplam fenolik madde miktarları

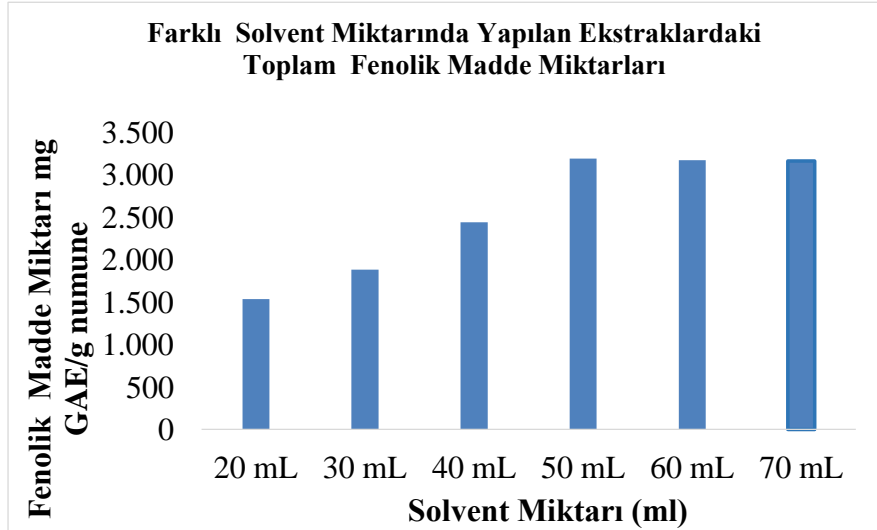
3.2.2.Eksraksiyon Verimi Üzerine Katı/Solvent Oranının Etkisi

Kurutulmuş ve öğütülmüş *Ginkgo biloba* yaprağı örnekleri farklı katı/solvent oranlarında ekstrakte edildi. Ekstraktardaki toplam fenolik ve toplam flavonoid madde miktarları UV-VIS Spektrofotometre ile belirlendi. Sonuçlar Çizelge 3.5 ve Çizelge 3.6'da verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde en yüksek fenolik madde miktarının elde edildiği katı/solvent oranı 0,5 g numune/50 ml iken en yüksek flavonoid madde miktarının elde edildiği katı/solvent oranı da 0,5 g numune/50 ml olarak belirlenmiştir. Solvent miktarı 20 ml'den 50 ml'ye kadar arttırıldığında toplam fenolik madde miktarlarında ve toplam flavonoid madde miktarlarında artış gözleniyorken, 50 ml'den sonra fenolik ve flavonoid madde miktarlarında azalma olmuştur. Şekil 3.5 ve Şekil 3.6'da da görüleceği üzere solvent miktarı arttıkça Fick Yasasına uygun olarak kütle transferi iyileştiğinden verim sürekli olarak artmış 50 ml den sonra azalmaya başlamıştır.

Bu sonuç bitkiden fenolik ve flavonoid maddelerin maksimum olarak almak için 50 ml solvent ilavesinin uygun olacağını göstermektedir. 50 ml den sonra ilave edilecek her solvent miktarı fenolik ve flavonoid madde izolasyonunda hem zorluk yaşatacak hem de ekonomik maliyeti arttıracaktır.

Çizelge 3.5. Farklı solvent miktarlarında fenolik madde miktarları

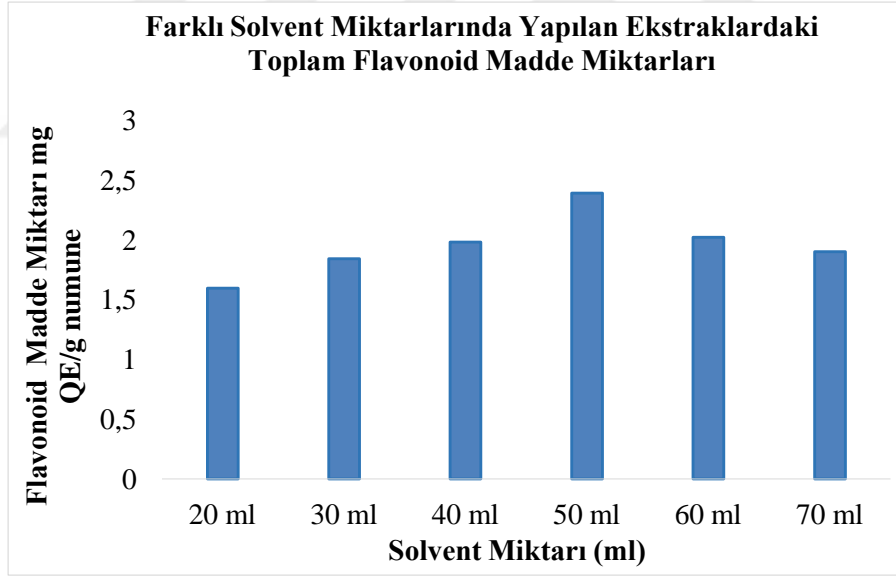
Solvent Miktarı (ml)	Fenolik Madde Miktarı (ppm)
20 ml	1,535
30 ml	1,882
40 ml	2,437
50 ml	3,188
60 ml	3,167
70 ml	3,161



Şekil 3.5. Farklı solvent miktralarında yapılan ekstraktardaki toplam fenolik madde miktarları

Çizelge 3.6. Farklı solvent miktarlarında flavonoid madde miktarları

Solvent Miktarı (ml)	Flavonoid Madde Miktarı (ppm)
20 ml	1,591
30 ml	1,843
40 ml	1,982
50 ml	2,394
60 ml	2,025
70 ml	1,901



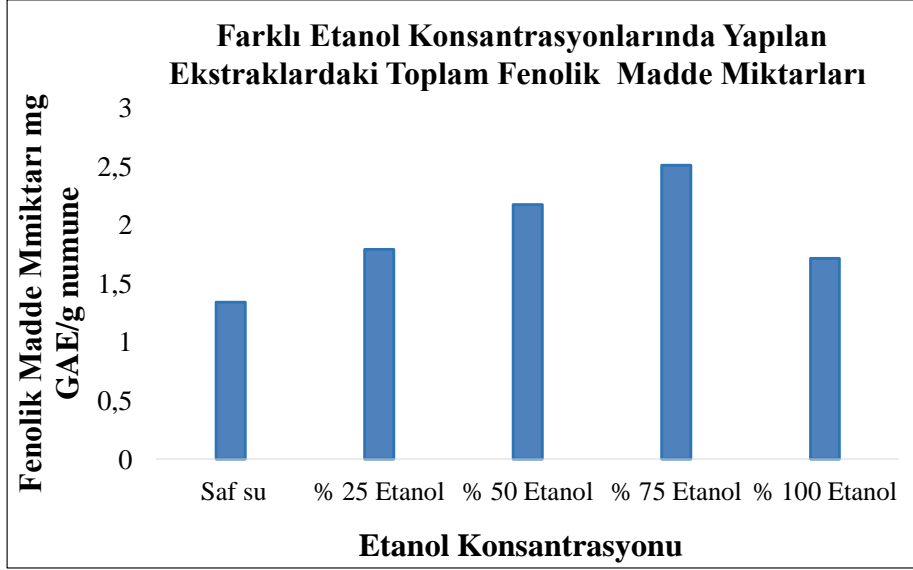
Şekil 3.6. Farklı solvent miktralarında yapılan ekstraktardaki toplam flavonoid madde miktarları

3.2.3. Ekstraksiyon Verimi Üzerine Etanol Konsantrasyonunun Etkisi

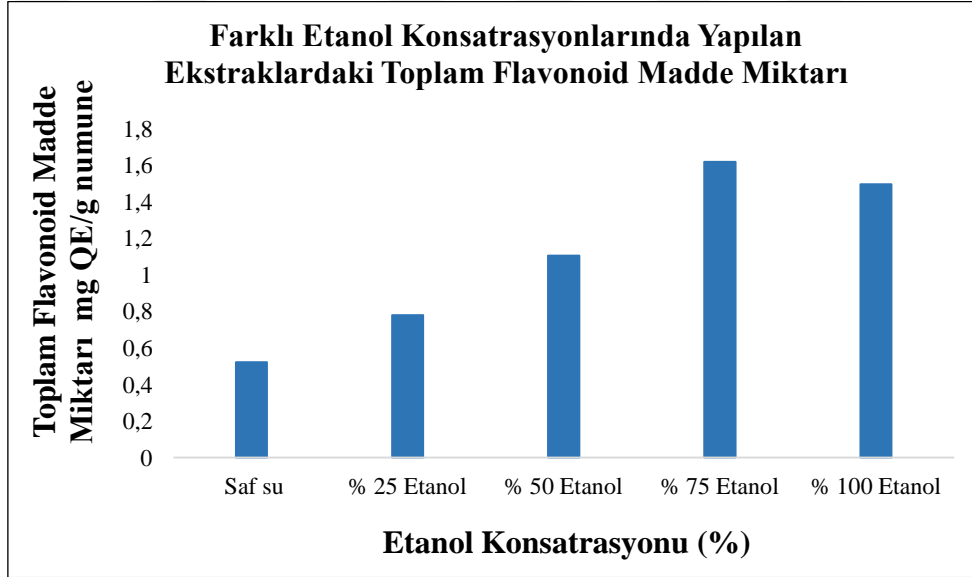
Kurutulmuş ve öğütülmüş *Ginkgo biloba* yaprağı örnekleri farklı etanol konsantrasyonlarında ekstrakte edildi. Ekstraktlardaki toplam fenolik ve flavonoid madde içerikleri UV-VIS Spektrofotometre ile belirlendi. Sonuçlar Çizelge 3.7’de verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde en yüksek fenolik ve flavonoid madde miktarı % 75 etanol konsantrasyonunda elde edilmiştir. Etanol içeriği % 75’e kadar arttıkça toplam fenolik ve flavonoid madde içeriklerinde artış gözlemlendi. Etanol konsantrasyonu bu seviyeden sonra arttıkça ekstrakte edilen fenolik ve flavonoid madde miktarlarının azaldığı görülmüştür (Şekil 3.7 ve Şekil 3.8).

Çizelge 3.7. Farklı etanol konsantrasyonlarında toplam fenolik madde ve toplam flavonoid madde miktarları

Solvent Konsantrasyonu	Toplam Fenolik Madde Miktarı mg GAE/ g numune	Toplam Flavonoid Madde Miktarı mg QE/g numune
Saf Su (% 0 Etanol)	1,341	0,522
% 25 Etanol	1,791	0,779
% 50 Etanol	2,172	1,104
% 75 Etanol	2,508	1,618
% 100 Etanol	1,713	1,495



Şekil 3.7. Farklı etanol konsantrasyonlarında yapılan ekstraktardaki toplam fenolik madde miktarları



Şekil 3.8. Farklı etanol konsantrasyonlarında yapılan ekstraktardaki toplam flavonoid madde miktarları

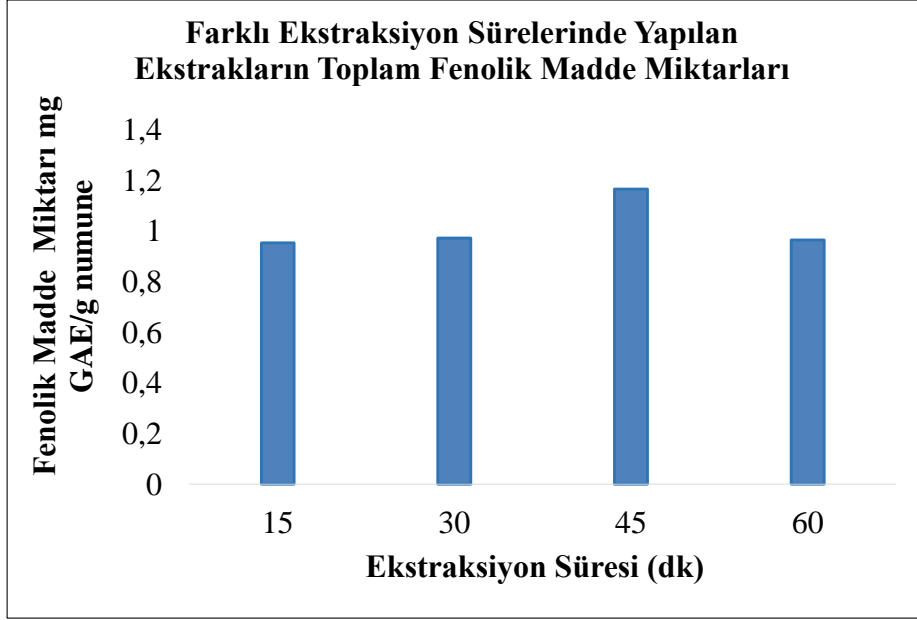
3.2.4.Eksraksiyon Verimi Üzerine Ekstraksiyon Süresinin Etkisi

Kurutulmuş ve öğütülmüş *Ginkgo biloba* yaprakları farklı ekstraksiyon sürelerinde ekstrakte edildi. Eksraklardaki toplam fenolik ve flavonoid madde içerikleri UV-VIS Spketrofotometre ile belirlendi. Sonuçlar Çizelge 3.9’da verilmiştir.

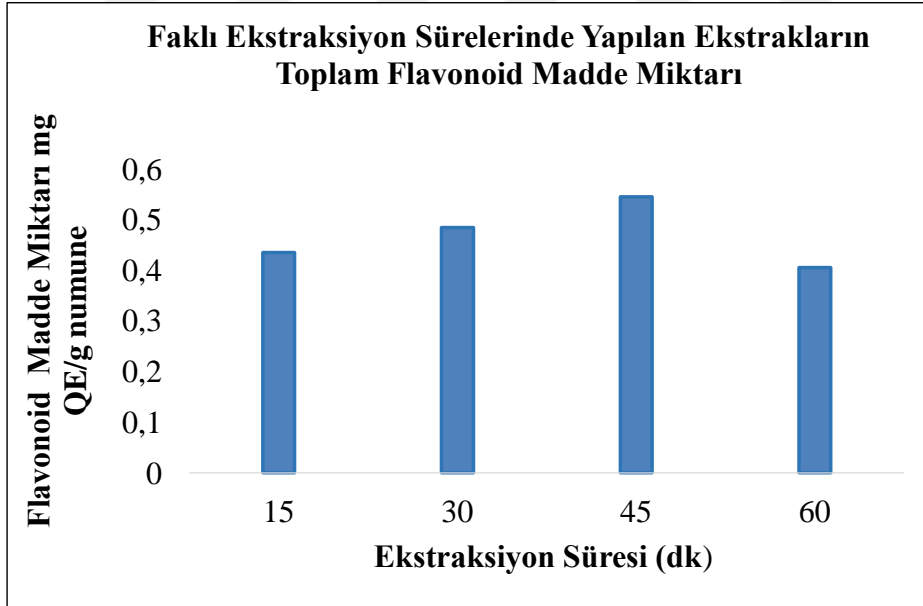
Deney sonuçları Şekil 3.9.’da ve Şekil 3.10’da verildiği gibi fenolik ve flavonoid madde miktarının en yüksek olduğu ekstraksiyon zamanının 45. dakikaya kadar sürekli arttığı, Bu süreden sonra toplam fenolik ve toplam flavonoid madde miktarında azaldığı görülmüştür. Bunun nedeni ekstraksiyon süresi artırıldığı zaman, *Ginkgo biloba* yapraklarının hücre duvarları tamamen ayrılır ve *Ginkgo biloba* yaprağı sıvı materyale geçip difüze olmaktadır. Uzun ekstraksiyon süresi boyunca *Ginkgo biloba* yapraklarının aşırı ısınması fenolik ve flavonoid moleküllerinin doymamış bağlar gibi kararsız kimyasal bağlar içermesi nedeniyle fenolik ve flavonoid madde yapısının termal bozunmasına sebep oldu ve bundan dolayı fenolik ve flavonoid madde içeriği azaldı. Sonuç olarak fenolik ve flavonoid madde ekstraksiyonu için tercih edilebilir ekstraksiyon süresi 45 dakikadır.

Çizelge 3.8. Farklı ekstraksiyon sürelerinde yapılan ekstraktların toplam fenolik ve flavonoid madde miktarları

Ekstraksiyon Süresi (dk)	Toplam Fenolik Madde Miktarı Mg GAE/g numune	Toplam Flavonoid Madde Miktarı Mg QE/g numune
15	0,953	0,435
30	0,972	0,484
45	1,165	0,545
60	0,964	0,505



Şekil 3.9. Farklı ekstraksiyon sürelerinde yapılan ekstraktların toplam fenolik madde miktarları



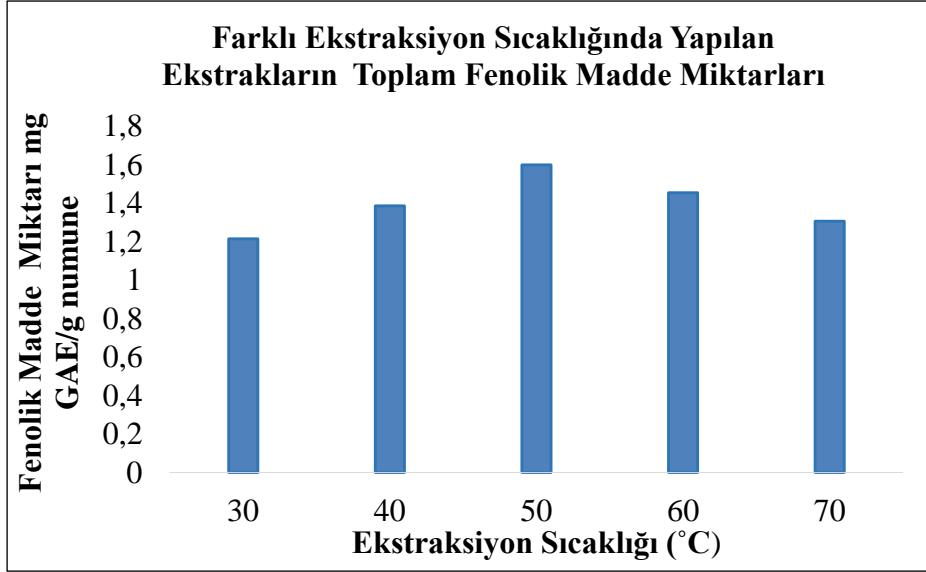
Şekil 3.10. Farklı ekstraksiyon sürelerinde yapılan ekstraktların toplam flavonoid madde miktarları

3.2.5.Ekstraksiyon Verimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

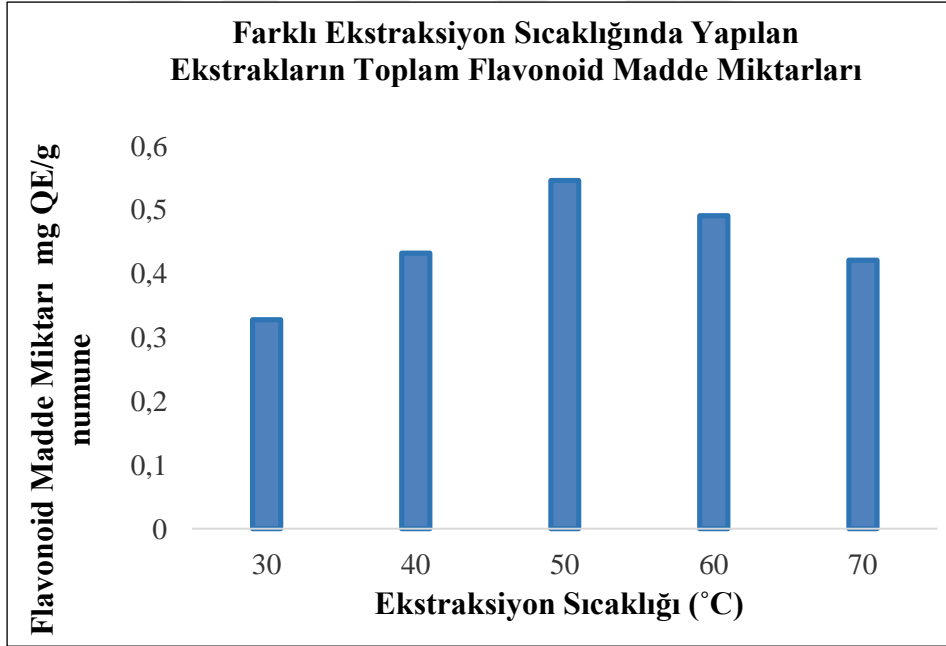
Kurutulmuş ve öğütülmüş *Ginkgo biloba* yaprakları farklı sıcaklıklarda ekstrakte edildi. Ekstraktlardaki toplam fenolik ve flavonoid madde miktarları UV-VIS Spektrofotometre ile belirlendi. Sonuçları Çizelge 3.9'da verilmiştir. Deney sonuçları Şekil 3.11 ve Şekil 3.12'de verildiği gibi fenolik ve flavonoid madde miktarı ekstraksiyon sıcaklığı 50 °C sıcaklığa kadar sürekli artış oldu ve bu noktadan sonra azalmaya başladı. Genelde yüksek sıcaklıktaki ekstraksiyonlar bitki matriksinin aktif bölgelerinden çözünen maddenin iyi desorpsiyonu nedeniyle ekstraksiyon performansı ve kütle transferini artırır. Başlangıçta sıcaklığın yükselmesiyle ekstraksiyon veriminin artması yüksek sıcaklığın fenolik ve flavonoid maddelerin bitki hücresinden kopmasından ve moleküler hareketi hızlandırmasındandır. 50 °C in üzerine çıktığı zaman ekstraksiyon verimi azalmaya başladı. 50 °C tan daha büyük sıcaklıklar, fenolik ve flavonoid maddelerin yapısının bozulmasına neden oldu. Yüksek sıcaklıklar bozunma reaksiyonunu hızlandırdı, fenolik ve flavonoid maddeler aktivitesini kaybetti ve bundan dolayı fenolik ve flavonoid madde miktarı azaldı. Sonuç olarak fenolik ve flavonoid madde ekstraksiyonu için tercih edilir sıcaklık 50 °C tır.

Çizelge 3.9. Farklı ekstraksiyon sıcaklığında yapılan ekstraktların toplam fenolik ve toplam flavonoid madde miktarları

Ekstraksiyon Sıcaklığı (°C)	Toplam Fenolik Madde Miktarları mg GAE/g numune	Toplam Flavonoid Madde Miktarları mg QE/g numune
30	1,213	0,327
40	1,384	0,431
50	1,597	0,545
60	1,452	0,490
70	1,305	0,420



Şekil 3.11. Farklı ekstraksiyon sıcaklığında yapılan ekstraktların toplam fenolik madde miktarları



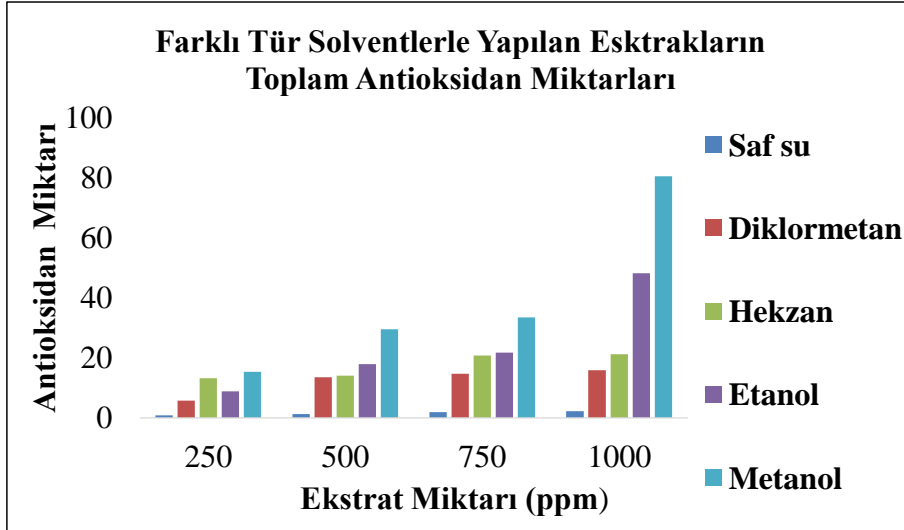
Şekil 3.12. Farklı ekstraksiyon sıcaklığında yapılan ekstraktların toplam flavonoid madde miktarları

3.3.Toplam Antioksidan Kapasite Sonuçları

Bu çalışmada *Ginkgo biloba* yaprağı ekstraktlarının radikal giderme aktiviteleri araştırıldı. Şekil 3.13’da çizilen DPPH’ın kalibrasyon eğrisinden farklı solvent içeren ekstraktların radikal giderme aktiviteleri % inhibisyon değeri olarak hesaplanmıştır. Çizelge 3.9’da verilen farklı solventlerdeki *Ginkgo biloba* ekstraktlarının DPPH degerleri 1 mg/ml konsantrasyondaki % inhibisyon değerleri karşılaştırıldığında DPPH radikali giderme aktiviteleri sırasıyla; Metanol (% 80,3) > Etanol (% 48,1) > Hekzan (% 21,2) > Diklormetan (% 15,8) > Saf su (% 2,2) hesaplanmıştır. Şekil 3.13’te *Ginkgo biloba* yapraklarının metanol solventinde yüksek antioksidan aktivite gösterdiği gözlenmiştir.

Çizelge 3.10. Farklı tür solventlerle yapılan ekstraktların toplam antioksidan miktarları

Ekstrat Miktarı (ppm)	Saf su	Diklormetan	Hekzan	Etanol	Metanol
	%				
250	0,8	5,71	13,5	8,82	25,3
500	1,3	13,5	14,3	17,9	49,5
750	1,9	14,7	20,7	21,7	63,4
1000	2,2	15,8	21,2	48,1	80,3



Şekil 3.13. Farklı tür solventlerle yapılan ekstraktların toplam antioksidan miktarları

3.4. Ultrason Destekli Ekstraksiyonda Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoid Madde Miktarlarının Yüzey Yanıt Yöntemi ile Optimizasyonu

Tek faktör yaklaşımı olarak bilinen proses değişkenlerinin bireysel etkileri önceki bölümlerde uygulandı. Bu klasik yaklaşım proses değişkenlerinin birbiri ile muhtemel etkileşimlerini ihmal eder. Yüzey Yanıt Metodolojisi (RSM) işletme parametreleri arasındaki muhtemel etkileşimleri göz önünde bulundurur. Çizelge 2.2’de minimum, orta ve maksimum noktaları içeren (etanol konsantrasyonu, zaman ve sıcaklık) üç parametreyi göstermektedir. Bulunan parametrelere göre 20 deney çalışıldı. Optimizasyon parametreleri belli aralıklarla Design-Expert software 8.0.7.1 programına kaydedildi ve yanıtlar yorumlandı.

Ultrason destekli ekstraksiyonda gerçekleştirilecek olan toplam fenolik madde ve toplam flavonoid madde yanıtlarının optimizasyonu için gerçekleştirilen çalışmada, bağımsız değişkenler daha önceki ekstraksiyon çalışmaları doğrultusunda sıcaklık (X_1) (30-70°C) ve süre (X_2) (15-60 dk.), etanol konsantrasyonu (X_3) (% 0-100) olarak belirlenmiştir. Ultrason destekli ekstraksiyon için Central Composite Design deneme planı ile elde edilen toplam fenolik madde miktarı ve toplam flavonoid madde miktarı değerler Çizelge 3.13’te verilmiştir. Design-Expert programında deneysel koşullar ve elde edilen yanıtlar girilerek optimizasyon için ikinci dereceden Quadratik bir model elde edildi.

3.4.1 Toplam Fenolik Madde Miktarı Sonuçları

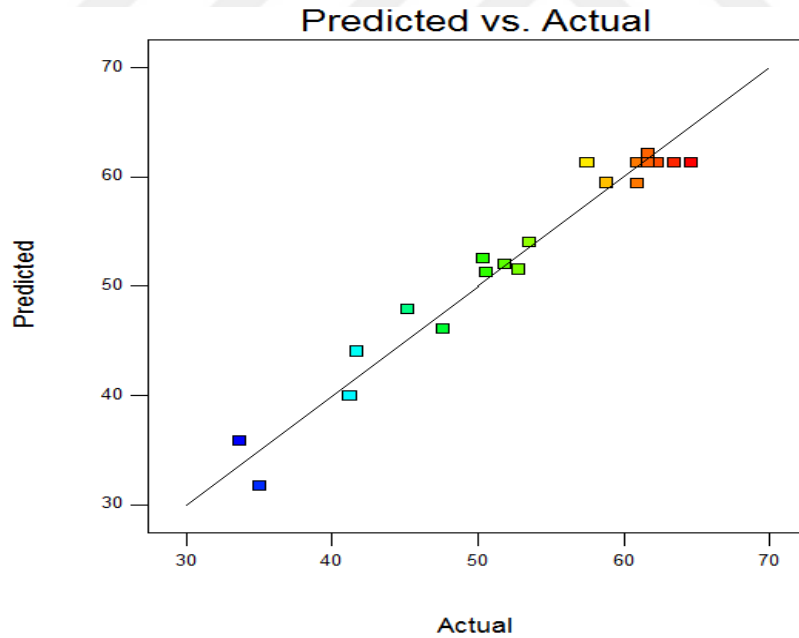
Yüzey Yanıt yöntemi uygulaması sonucunda, toplam fenolik madde ve test değişkenleri arasındaki empirik ilişkiyi ortaya koyan aşağıdaki regresyon denklemi elde edilmiştir.

$$TPC = -193,90977 + 3,18511 * X_1 + 5,79490 * X_2 + 1,74633 * X_3 - 0,018325 * X_1 * X_2 - 5,80000E - 003 * X_1 * X_2 - 1,78333E * X_2 * X_3 - 0,031185 * X_1^2 - 0,0460085 * X_2^2 - 0,012888 * X_3^2$$

Uygun olmayan model terimleri çıkartıldığında elde edilen son denklem aşağıda verilmiştir.

$$TPC = -193,90977 + 3,18511 * X_1 + 5,79490 * X_2 + 1,74633 * X_3 - 0,031185 * X_1^2 - 0,0460085 * X_2^2 - 0,012888 * X_3^2$$

Denklem analizi neticesinde R² değeri, 0,9569 olarak bulunmuştur. Tahminlenen değerler ile deneysel değerler arasındaki ilişki Şekil 3.14' te gösterilmiştir



Şekil 3.14. Ultrasonik destekli ekstraksiyonda toplam fenolik madde için deneysel ve tahmini değerlerin doğrusallık grafiği

Varyans analizi sonucu elde edilen model ve bağımsız için regresyon katsayısı, standart hata, T ve P değeri Çizelge 3.10'da verilmiştir. Çizelge incelendiğinde, UAE ile elde edilen toplam fenolik madde miktarı üzerine, etanol konsantrasyonu, zaman ve sıcaklık parametrelerinin optimum sonuçları belirlenmiştir.

Çizelge 3.11. Ultrason destekli ekstraksiyonda toplam fenolik madde miktarı sonuçlarının istatistiksel analizi

Değişkenler	Regresyon Katsayıları	Standart Hata	T Değeri	P Değeri
Konsantrasyon(X_1)	-583	0,44	-3,04	0,0025
Sıcaklık (X_2)	-617	0,68	-3,94	0,0001
Süre (X_3)	-180,7	0,65	-2,29	0,0007
$X_1.X_1$	5,44	1,28	2,66	0,0002
$X_2.X_2$	5,44	1,28	4,81	0,0001
$X_3.X_3$	2,41	0,570	3,40	0,0003
$X_1.X_2$	0,60	1,23	0,49	0,0867
$X_1.X_3$	0,977	0,822	1,19	0,3883
$X_2.X_3$	0,619	0,822	0,75	0,7872

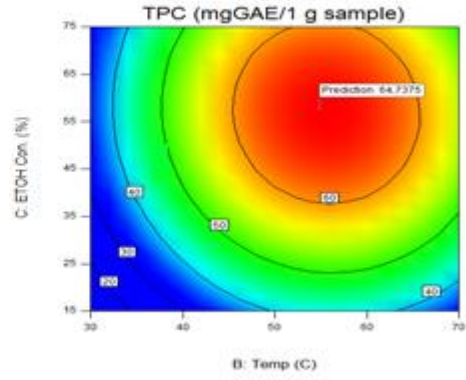
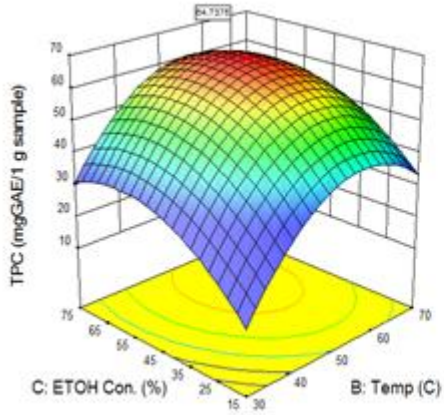
Çizelge 3.12. Ultrason destekli ekstraksiyonda toplam fenolik madde miktarı için bağımsız değişkenlerin varyans analizi

Kaynak	Serbestlik Derecesi	F Değeri	Olasılık
Model	9	24,67	0,0001
Time	1	23,73	0,0007
Temp	1	71,73	0,0001
Kalıntı Hatası	5		
Uyum Eksikliği	5	1,47	0,003
Net Hata	5		
Toplam	14		

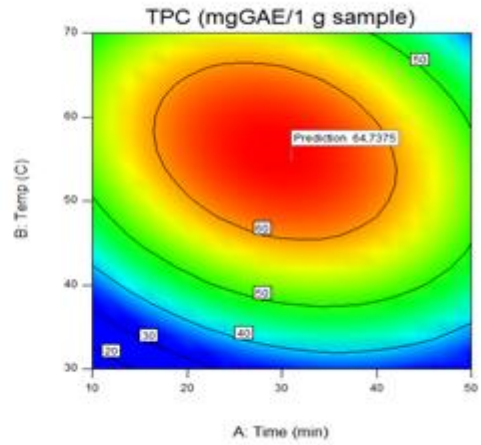
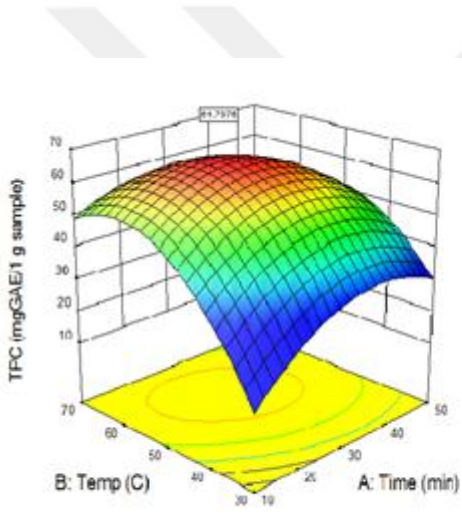
ANOVA dan elde edilen regresyon denklemi gösteriyor ki R^2 (çoklu korelasyon katsayısı) 0,9569 idi (0,75 in üzerinde bir değer modelin uygunluğunu göstermektedir). Bu modelin hesapladığı datalarda genel varyasyonun belirlenmektedir. Böylece bu model yanıtta varyasyonun %95,69'unu açıklamaya yetmektedir.

$R^2 = 0,9181$ ve Tahminlenen değer $R^2 = 0,7692$ olarak belirlenmiştir. Bu modelin iyi olduğunu gösterdi. İyi bir istatistiksel model için R^2 değeri 0–1,0 aralığında olmalıdır.

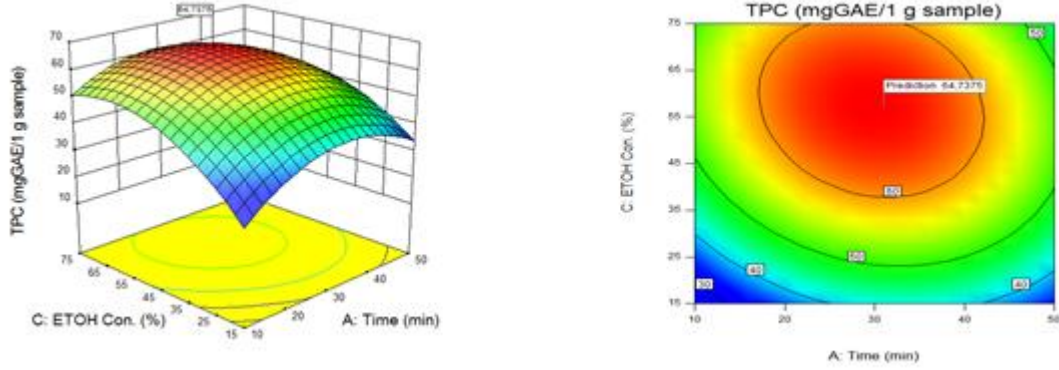
Mevcut modelin adequate precision değeri 15,766 idi ve bu ayrıca gösteriyor ki tasarım için bu model kullanılabilir. Yeterlilik değeri signal/gürültü oranının bir göstergesidir ve 4 ten büyük değerler bir modelin iyi olması için temel ön koşullardır. Aynı zamanda, varyasyon katsayısının (CV = 5,17 %) nispeten daha düşük değerleri yapılan değerlerin güvenilirliğini ve daha iyi bir kesinliğini gösterdi. Sonuç olarak, kurutulmuş *Ginkgo biloba* yaprakları ekstraksiyonundan fenolik madde miktarını tahmin etmek için yüzey yanıt metodolojisi başarılı bir şekilde uygulanabileceği söylenebilir. Varyasyon katsayısının düşük değerleri deney sonuçlarının güvenilirliğini ve kesinliğini göstermektedir. Çalışmamızda katsayı değeri (CV) 5,17 olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.15. Etanol konsantrasyonu ve ekstraksiyon sıcaklığı ile ekstraksiyon veriminin değişimi gösteren yüzey yanıt ve kontur grafikleri



Şekil 3.16. Ekstraksiyon süresi ve ekstraksiyon sıcaklığı ile ekstraksiyon veriminin değişimi gösteren yüzey yanıt ve kontur grafikleri



Şekil 3.17. Ekstraksiyon süresi ve etanol konsantrasyonu ile ekstraksiyon veriminin değişimi gösteren yüzey yanıt ve kontur grafikleri

Toplam fenolik madde miktarı için çizilen üç boyutlu yüzey yanıt grafikleri incelendiğinde, etanol konsantrasyonu arttıkça ekstrakte edilen toplam fenolik madde miktarının %75 etanol konsantrasyonuna kadar arttığı, bu noktadan sonra düşüşe geçtiği görülmektedir (Şekil 3.15 ve Şekil 3.17). Literatürde *Ginkgo biloba* yapraklarından fenolik ve flavonoid madde ekstraksiyonuna ilişkin bir optimizasyon çalışması bulunmamaktadır. Ayrıca diğer bitkisel kaynaklar kullanılarak yapılan çalışmalarda, benzer sonuçlar bildirilmiştir.

Klasik çözücü ekstraksiyonunda toplam fenolik madde miktarının etanol konsantrasyonu arttıkça önce artması, belirli bir konsantrasyon sonrası azalmasının nedeni; Çözücü konsantrasyonu, yoğunluk ve dinamik viskozite gibi fiziksel özellikler üzerine etkilidir. Bu parametreler de difüzyonu ve ekstraksiyon hızını etkilemektedir. Ayrıca, dielektrik sabiti de çözücü konsantrasyonu ile değişmektedir. Bu nedenle dielektrik sabiti düşürmek için su gibi polar bir çözücü içerisine etanol gibi polaritesi daha düşük olan bir çözücü eklenmesi ile basınç ve sıcaklık değerleri ayarlanarak antosiyanin ekstraksiyonun arttırılabileceğini raporlamışlardır. Ayrıca %60 etanol konsantrasyonunda katı soğan atıklarından orta polaritedeki fenolik maddelerin efektif bir biçimde ekstrakte edilebileceğini, daha yüksek konsantrasyonlarda ise glikozit gibi polar bileşenlerin çözünürlüğünün azalmasından dolayı iyi bir sonuç alınamayacağını bildirmişlerdir [101].

Çözücü olarak su ve farklı konsantrasyonlarda etanol:su kullanılan bir çalışmada %50 etanol konsantrasyonunda en yüksek toplam fenolik madde ekstraksiyonuna ulaşmıştır. Bunun nedenini benzer şekilde etanolün kütle transferini arttırmasına ve bu doğrultuda daha fazla fenolik madde ekstrakte edilmesine bağlamışlar, çözünür fenolik ve flavonoid maddelerin genellikle hücre kofullarında bulunurken, lignin ve çözünmeyen polifenollerin hücre zarında protein ve polisakkaritlere bağlı olarak bulunması, yüksek konsantrasyonlardaki etanolün protein denatürasyonuna yol açarak fenolik ve flavonoid madde ekstraksiyonunu önlemesi olarak göstermiştir [102].

Yüzey yanıt grafikleri incelendiğinde, ekstraksiyon süresi arttıkça ekstrakte edilen toplam fenolik madde miktarının 45. dakikaya kadar hızlı bir şekilde attığı, ancak bu noktadan sonra düşüşe geçtiği görülmektedir (Şekil 3.16 ve Şekil 3.17). Daha önce yapılan çalışmalarda benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Şekil 3.15 ve Şekil 3.16 incelendiğinde, ekstraksiyon sıcaklığının toplam fenolik madde ekstraksiyonunda belirleyici bir faktör olduğu görülmektedir. *Ginkgo biloba* yaprağından ekstrakte edilen toplam fenolik madde miktarı yaklaşık 50°C'ye kadar hızlı bir artış göstermiş, bu dereceden sonra düşüş görülmüştür.

Bunun nedeni yüksek sıcaklıkta suyun dielektrik sabiti azalmakta ve çözücü özelliğinde değişiklik meydana gelmekte ve fenolik maddelerin daha iyi ekstrakte edilebilmelerini sağlamaktadır. Yüksek sıcaklık aynı zamanda fenolik maddelerin çözünlüğünü, difüzyon hızını, ekstraksiyon hızını arttırmakta, çözücü viskozitesini ve yüzey gerilimini azaltmaktadır. Ancak ekstraksiyon sıcaklığındaki fazla artış, kimyasal ve enzimatik degradasyona bağlı olarak fenolik maddelerin degradasyonu ya da diğer bileşenlerle reaksiyona girmesi sonucu bileşenlerin stabilitesinin engellenmesi nedeniyle toplam fenolik madde miktarında azalma görölmektedir [103].

Sonuç olarak toplam fenolik madde miktarı için elde edilen yüzey yanıt grafikleri incelendiğinde, *Ginkgo biloba* yapraklarından fenolik madde ekstraksiyonun optimum koşulların; Ekstraksiyon zamanı: 31,220, Ekstraksiyon sıcaklığı: 54,119, Etanol konsantrasyonu: % 57,944 olduğu belirlenmiştir.

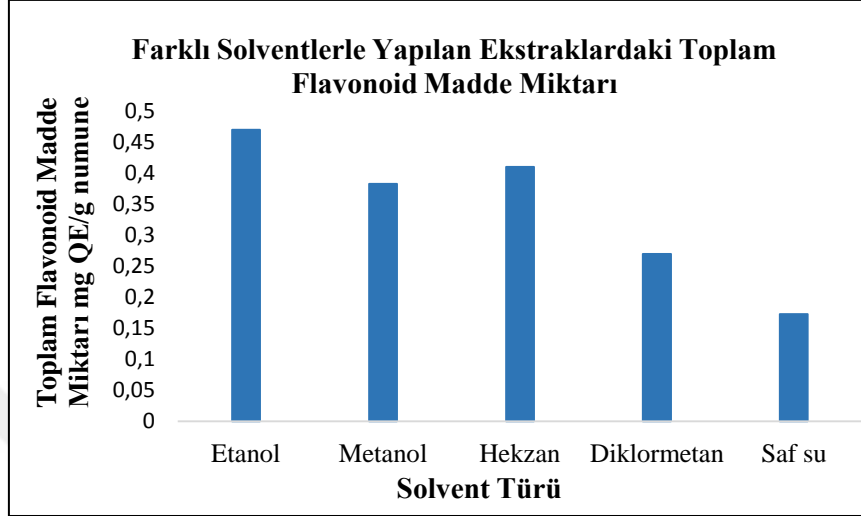
Çizelge 3.13. Toplam fenolik toplam flavonoid madde için bağımsız değişkenlerin (X_1 , X_2 , X_3) central kompozite tasarımları ve deneysel sonuçlar

Çalışma	Ekstraksiyon Sıcaklığı	Ekstraksiyon Süresi	Etanol Konsantrasyonu	Toplam Fenolik Madde Miktarı	Toplam Flavonoid Madde miktarı
	$^{\circ}\text{C}$	Dk.	%	Mg GAE/g Numune	Mg QE/g Numune
1	30	30	45	35	6,16
2	40	40	30	41,67	7,49
3	30	50	45	60,94	8,5
4	50	50	45	52,78	8,29
5	40	60	30	51,87	10,51
6	30	50	45	57,49	9,3
7	30	50	45	61,7	8,58
8	10	50	45	47,66	6,97
9	20	40	30	33,69	6,68
10	40	40	60	50,33	8,06
11	30	50	15	41,23	10,16
12	40	60	60	58,79	11,34
13	30	70	45	53,52	10,93
14	30	50	75	60,96	7,61
15	20	60	60	61,62	8,39
16	30	50	45	62,26	10,73
17	20	40	60	45,16	9,38
18	30	50	45	63,47	11,79
19	30	50	45	64,59	12,01
20	20	60	30	50,55	9,38

3.4.2. Toplam Flavonoid Madde Miktarı Sonuçları

Çizelge 3.14. Farklı solvent türleri ile yapılan ekstraktların quarcetin eşdeğerleri

Ekstrat	Metanol	Etanol	Hekzan	Diklormetan	Saf su
QE(mg/1mg numune)	0,383	0,470	0,410	0,270	0,173



Şekil 3.18.Farklı solvent türleri ile yapılan ekstraktların quarcetin eşdeğer toplam flavonoid madde miktarları

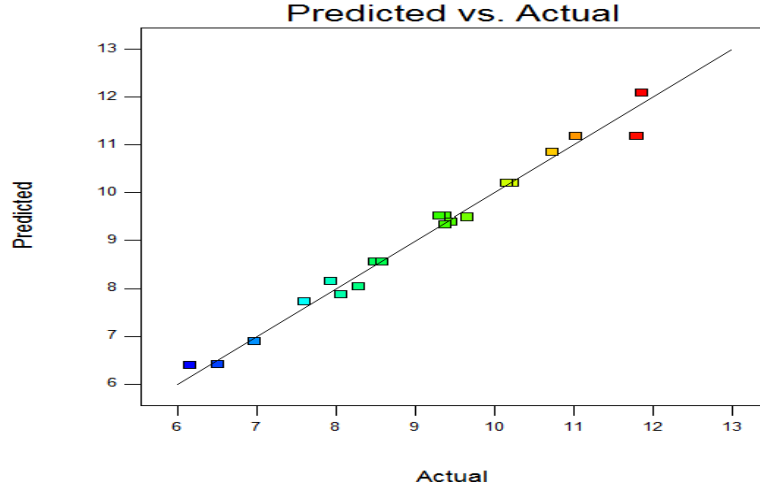
Yüzey Yanıt Yöntemi uygulaması sonucunda, toplam flavonoid madde ve test değişkenleri arasındaki empirik ilişkiyi ortaya koyan aşağıdaki regresyon denklemi elde edilmiştir.

$$TFC = -8,61167 + 0,36503 * X_1 + 0,30355 * X_2 + 0,16116 * X_3 - 5,45539E - 004 * X_1 * X_2 - 2,54968E - 004 * X_1 * X_3 - 7,57172E - 004 * X_2 * X_3 - 3,45813E - 003 * X_1^2 - 2,14682E - 003 * X_2^2 - 1,18677E - 003 * X_3^2$$

Uygun olmayan model terimleri çıkartıldığında elde edilen son denklem aşağıda verilmiştir.

$$TFC = -8,61167 + 0,36503 * X_1 + 0,16116 * X_3 - 7,57172E - 004 * X_2 * X_3 - 3,45813E - 003 * X_1^2 - 1,18677E - 003 * X_3^2$$

Regresyon analizi sonucunda, R^2 0.9839 olarak elde edilmiştir. Tahminlenen değerler ile deneysel değerler arasındaki ilişki Şekil 3.19' de gösterilmiştir



Şekil 3.19. Ultrason destekli ekstraksiyonda toplam flavonoid madde için deneysel ve tahmini değerlerin doğrusallık grafiği.

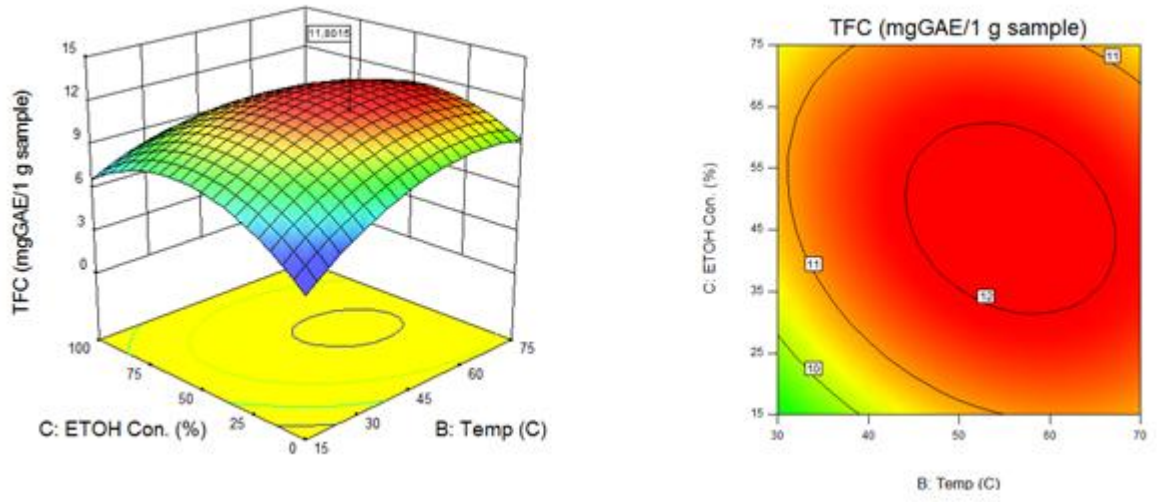
Varyans analizi sonucu elde edilen model ve bağımsız değişkenler için regresyon katsayısı, standart hata, T ve P değeri Çizelge 3.15'te verilmiştir. Çizelge incelendiğinde, UAE ile elde edilen toplam flavonoid madde miktarı üzerine, etanol konsantrasyonu, zaman ve sıcaklık parametreleri istatistiksel olarak önemli anlaşılmıştır.

Çizelge 3.15. Ultrason destekli ekstraksiyonda toplam flavonoid madde miktarı sonuçlarının istatistiksel analizi

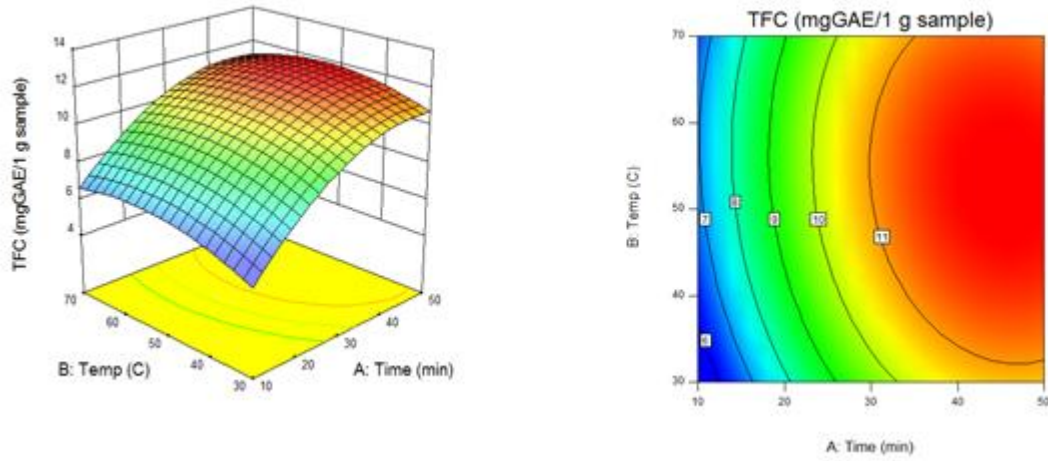
Değişkenler	Regresyon Katsayıları	Standart Hata	T Değeri	P Değeri
Etanol Konsantrasyonu (X_1)	-583	0.011	1.836	0.001
Sıcaklık (X_2)	-617	0,037	-5,09	0,0001
Süre (X_3)	-180,7	0,039	-9,51	0,0001
$X_1.X_1$	5,44	0,54	8,99	0,0001
$X_2.X_2$	5,44	0,49	3,28	0,0001
$X_3.X_3$	2,41	0,18	3,94	0,0001
$X_1.X_2$	0,60	0,45	0,23	0,1234
$X_1.X_3$	0,977	0,27	0,89	0,3183
$X_2.X_3$	0,619	0,30	2,28	0,0003

Çizelge 3.16. Ultrason destekli ekstraksiyonda toplam flavonoid madde miktarı için bağımsız değişkenlerin varyans analizi

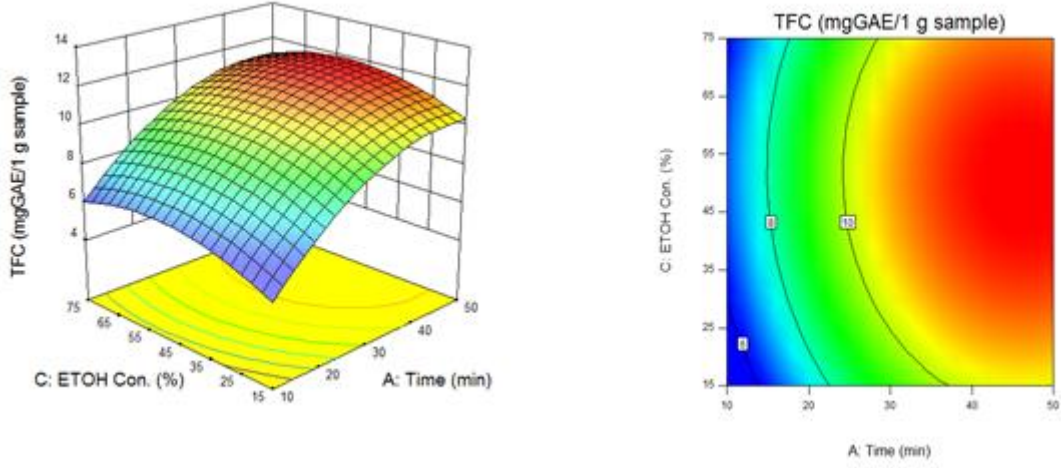
Kaynak	Serbestlik Derecesi	F Değeri	Olasılık
Model	9	67,83	<0,0001
Time	1	118,02	<0,0001
Temp	1	63,24	<0,0001
Uyum Eksikliği	10		
Kalıntı Hatası	6	1,10	0,04869
Net Hata	4		
Toplam	19		



Şekil 3.20. Etanol konsantrasyonu ve ekstraksiyon sıcaklığı ile ekstraksiyon veriminin değişimi gösteren yüzey yanıt ve kontur grafikleri



Şekil 3. 21. Ekstraksiyon süresi ve ekstraksiyon sıcaklığı ile ekstraksiyon veriminin değişimi gösteren yüzey yanıt ve kontur grafikleri



Şekil 3.22. Ekstraksiyon süresi ve etanol konsantrasyonu ile ekstraksiyon veriminin değişimi gösteren yüzey yanıt ve kontur grafikleri

Toplam flavonoid madde miktarı için yüzey yanıt grafikleri incelendiğinde, ekstrakte edilen flavonoid madde miktarı %75 etanol konsantrasyonuna kadar sürekli yükselmekte, daha sonra düşüş görülmektedir. En yüksek flavonoid madde miktarı %75 etanol konsantrasyonunda elde edilmiştir.

Ultrason destekli ekstraksiyonda toplam flavonoid madde miktarı üzerine sıcaklığın etkisi incelendiğinde (Şekil 3.20 ve Şekil 3.21), sıcaklığın flavonoid madde ekstraksiyonu üzerinde etkisi olduğu görülmektedir. Ultrason banyosunun sıcaklığı arttırıldıkça, ekstrakte edilen toplam flavonoid madde miktarı sıcaklık değeri 50 °C olana kadar sürekli artmış daha sonra azalmıştır.

Ultrason destekli ekstraksiyonda toplam flavonoid madde miktarı üzerine zamanın etkisi incelendiğinde (Şekil 3.21 ve Şekil 3.22) Toplam flavonoid madde miktarı yaklaşık 45. dakikaya kadar artış göstermiş, bu dakikadan sonra azalmaya başlamıştır.

Ultrasonik destekli ekstraksiyonda toplam fenolik ve toplam flavonoid madde miktarı üzerine yanıt yüzey yanıt grafikleri incelendiğinde değişkenlerin toplam flavonoid madde ekstraksiyon sonuçları üzerine etkisinin, toplam fenolik madde ekstraksiyon sonuçları üzerine etkisi ile benzer olduğu görülmektedir.

Design Expert 8.0.7.1 programının ikinci derece denklemleri için ANOVA testi sonuçları Çizelge 3.12’de verilmiştir. Regresyon denklemi katsayıları hesaplandı ve veriler ikinci dereceden polinom denklemine uyduruldu. ANOVA’dan elde edilen regresyon denklemi gösterdiği R^2 (çoklu korelasyon katsayısı) 0,9839 idi 0,75 in üzerinde bir değer modelin uygunluğunu göstermektedir. Regresyon analizleri % 95 güven aralığında yapıldı. Elde edilen modelin f değeri 41,46 dır ve $p < 0,0001$ olması türetilmiş modelin uygun olduğunu göstermektedir. Bu modelin hesapladığı datalarda genel varyasyonun belirlenmesiydi. Böylece bu model yanıtta varyasyonun %98,39’unu açıklamaya muktedirdi. $R^2 = 0,9584$ ve Predicted $R^2 = 0,9184$ olarak belirlendi, bu modelin iyi olduğunu gösterdi. İyi bir istatistiksel model için, R^2 değeri 0–1,0 aralığında olmalı, ve bu değer 1,0 e yakındı.

Mevcut modelin adequate precision değeri 28,388 idi ve bu ayrıca gösteriyor ki tasarım için bu model kullanılabilir. Yeterlilik değeri signal/gürültü oranının bir göstergesidir ve 4 ten büyük değerler bir modelin iyi olması için temel ön koşullardır.

Aynı zamanda, varyasyon katsayısının (CV = 3,13 %) nispeten daha düşük değerleri yapılan değerlerin güvenilirliğini ve daha iyi bir kesinliğini gösterdi. Kurutulmuş *Ginkgo biloba* yaprakları ekstraksiyonundan flavonoid madde miktarını tahmin etmek için yüzey yanıt metodu başarılı bir şekilde uygulanabilir. Varyasyon katsayısının düşük değerleri deney sonuçlarının güvenilirliğini ve kesinliğini göstermektedir. Çalışmamızda katsayı değeri (CV) 3,13 idi. Varyasyon katsayısı ne kadar düşük olursa deneysel sonuçların güvenilirliği ve hassasiyeti o kadar yüksek olur.

Sonuç olarak *Ginkgo biloba* yapraklarından flavonoid madde ekstraksiyonun optimum koşulları:

Ekstraksiyon zamanı: 47,883 dk.

Ekstraksiyon sıcaklığı: 36,336 °C

Etanol konsantrasyonu : % 69,512 olduğu anlaşılmıştır.

3.5. *Ginkgo Biloba* Yapraklarının Antibakteriyel Kapasite Sonuçları

Çizelge 3.17. *Ginkgo biloba* yapraklarının antibakteriyel kapasite sonuçları

Mikroorganizma	PK					<i>Ginkgo biloba</i> (µl)			NK(µl)		
	S	DA	VA	P	OFX	5	10	20	5	10	20
<i>S.aureus</i> ATCC25923	13	30	28	45	27	-	7	11	-	-	-
<i>E.coli</i> ATCC35218	25	-	-	9	50	-	-	-	-	-	-

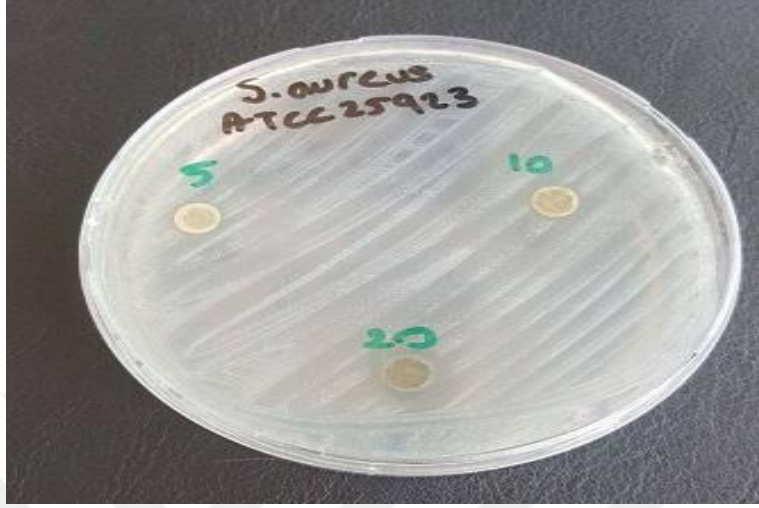
S; *Streptomisin*, DA; *Klindamisin*, VA; *Vankomisin*, P; Penisilin, OFX; *Ofloksasin*, PK; Pozitif kontrol, NK; Negatif Kontrol

Hücre duvarının yapısı; Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerde birbirinden farklıdır. Bakterilerin Gram negatif veya pozitif olarak sınıflandırılmaları hücre duvarlarındaki yapı farklılarından ötürüdür. Gram pozitiflerde protein ağırlıklı yapı olduğundan mor, Gram (-) hücre duvarı lipid ve lipopolisakkarit ağırlıklı olduğundan Gram boyama sonucunda pembe boyanırlar. Bu farklılık kullanılacak antibiyotiklerin seçiminde rol oynar

Bu çalışmada *Ginkgo biloba* metanol ekstratının Gram (-) bakterilerden *E.coli* ve Gram (+) lersen ise *S.aureus*'a karşı antibakteriyel etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Çalışma sonucunda 1 gr tartılarak 30 ml metanol'de ekstra edilerek kurutulmuş ekstratdan 0.1 gr alınarak 1000 µl metanol ekstratında tekrar çözülerek boş antibiyotik disklerine farklı miktarlarda emdirilmiştir.

Çalışma sonucunda 10 ve 20 µl yükleme yaptığımız disklerin etrafında sırasıyla *S.aureus*'da 7 ve 11 mm'lik zon oluştuğu görülmüştür (Şekil 3.18). Ekstraktın *E.coli*'ye karşı hiçbir antibakteriyel etki göstermediği belirlenmiştir.

Benzer şekilde pozitif kontrol olarak kullanılan, *Klindamisin* (DA) ve *Vankomisin* (VA) e'karşıda bu bakterinin dirençli olduğu görülmüştür. Muhtemelen bu farklılık hücre duvarı yapısından kaynaklanmaktadır.



Şekil 3.23. *S.aureus* zon bölgesi

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Ana vatanı Doğu Asya olan ginkgoifna sınıfına mensup olan *Ginkgo biloba*'nın yapraklarındaki toplam fenolik madde miktarı ve toplam flavonoid madde miktarının belirlenmesi için Yüzey Yanıt Analiz Metodu geliştirilip valide edildi. Optimizasyonda ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon zamanı ve çözücü konsantrasyonu ekstraksiyon parametresi olarak kullanıldı. Ekstraksiyon sıcaklığı, etanol konsantrasyonu ve ekstraksiyon süresinin Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon ile elde edilen ekstraksiyon sonuçları üzerinde önemli etkiye sahip en uygun şartları bulduktan sonra, *Ginkgo biloba* yapraklarından 3 farklı parametrede (ekstraksiyon zamanı, ekstraksiyon sıcaklığı ve etanol konsantrasyonu) 20 farklı ekstraksiyon yapıldı. Ekstraksiyon parametreleri Design Expert programında Centrel Compozite tasarımı kullanılarak optimize edilmiştir. Toplam fenolik madde miktarı için Ekstraksiyon süresi (31,22 dakika), ekstraksiyon sıcaklığı: 54,11°C, solvent konsantrasyonu 57,94% etanol; Toplam Flavonoid madde miktarı için ekstraksiyon süresi: 47,88 dakika ekstraksiyon sıcaklığı: 39,33°C, solvent konsantrasyonu: % 69,51 etanol bulunmuştur.

Cynara scolimus L. Atıklarından yapılan bir çalışmada ekstrakte ettikleri toplam fenolik madde miktarı, çalışılan en uzun süre olan 110,4 dakikaya kadar hızlı bir artış göstermiş daha sonra azalmıştır [104]. *Ficus carica L.* Azenjar ile yapılan bir çalışmada toplam fenolik madde ekstraksiyonu için optimum ekstraksiyon süresini 115,14 dakika olarak bulmuş, bu dakikadan sonra ekstrakte edilen toplam fenolik madde miktarında düşüş meydana geldiğini bildirmişlerdir. Toplam fenolik madde ekstraksiyonu, maksimum ekstrakt elde edilene kadar kütle transferinin artmasına bağlı olarak zamanla arttığını bildirmişlerdir [105]. Bu çalışmada ise fenolik madde miktarı için optimum ekstraksiyon süresi 31,22 dakika bulunmuştur.

Tagetes erecta L. atıkları ile yapılan bir çalışmada % 34,8 ile % 70 etanol konsantrasyonları arasında fenolik madde ekstraksiyonunun etanol konsantrasyonu ile arasında önemli pozitif doğrusal bir ilişki olduğu görülmüştür. %70 üzeri yüksek etanol konsantrasyonlarında ise toplam fenolik madde miktarında artış görülmemiştir [106]. *Ilex kudingcha* C.J. Tseng ile yapılmış kudingcha içeceği ile yapılan bir çalışmada, Toplam fenolik madde %70 etanol konsantrasyonuna kadar artış göstererek, maksimum seviyeye ulaşmış 219,28 mg klorojenik asit/g olarak tespit edilmiştir, bu değerden sonra toplam fenolik madde içeriği düşüşe geçmiştir. %50 ile %90 etanol seviyesinde tespit edilen toplam fenolik madde içeriği istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur [107]. Bizdeki çalışma sonuçlarından ise % 75 etanol konsantrasyonu içeren ekstraktlarda toplam fenolik ve toplam flavonoid madde miktarında maksimum verime ulaşılmıştır.

Limon kabukları ile yapılan çalışmada ultrason destekli ekstraksiyon ile % 30 ile 70 etanol konsantrasyonu aralığında çalışmış olup; %30 etanol konsantrasyondan ile %63,93 etanol konsantrasyonuna kadar ekstrakte edilen toplam fenolik madde miktarı artmış, optimum noktada 15,08 mg GAE/g olarak bildirilmiştir. Bu konsantrasyondan sonra ekstrakte edilen miktarda azalma görülmüştür [108]. Bu çalışmada ise, *Ginkgo biloba* bitkisinin yapraklarından en yüksek fenolik ve flavonoid madde miktarını %75'lik etanol konsantrasyonunda elde ettik.

Buğday kepeğinden ultrason destekli ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakte ettikleri fenolik maddelerin optimizasyonu çalışmasında, artan etanol konsantrasyonu ile ekstrakte edilen fenolik ve flavonoid madde miktarında yavaş bir artış olduğu rapor edilmiş, % 60 etanol konsantrasyonunda gerçekleştirilen ekstraksiyonda, optimum değer olan 2,99 mg GAE/g değerine ulaşmış, artan etanol konsantrasyonu ile ekstrakte edilen miktar azalarak % 95 etanol konsantrasyonunda en düşük seviye olan 1,48 mg GAE/g değerine düşmüştür [109]. Bu çalışmada ise, *Ginkgo biloba* bitkisinin yapraklarından % 75'lik etanol konsantrasyonunda fenolik madde miktarını 2,508, flavonoid madde miktarını ise 1,618 olarak bulduk.

İkinci derece polinom modelinin deney verilerini tarif etmek için yeterli olduğu bulunmuştur. Ayrıca *Ginkgo biloba* yapraklarının antibakteriyel etkisi Disk Difüzyon Test metodu kullanılarak araştırılmış ve *S. aureos* bakterisine karşı antibakteriyel özellik gösterdiği belirlenmiştir.

Çalışmada *Ginkgo biloba* yaprağı ekstraktlarının radikal giderme aktiviteleri de araştırıldı. Farklı tür solvent içeren ekstraktların radikal giderme aktiviteleri % inhibisyon değeri olarak hesaplanmıştır. *Ginkgo biloba* ekstraktlarının DPPH değerleri 1 mg/ml konsantrasyondaki % inhibisyon değerleri karşılaştırıldığında, DPPH radikali giderme aktiviteleri sırasıyla; Metanol (% 80,3) > Etanol (% 48,1) > Hekzan (% 21,2) > Diklormetan (% 15,8) > Saf su (% 2,2) olarak bulunmuştur. *Ginkgo biloba* yapraklarının etanol solventinde yüksek antioksidan aktivite gösterdiği gözlenmiştir. Günümüzde, yapay maddelerden kaçışın artmasının doğal fenolik maddelerin önemini daha da artıracığı açıktır.

Gıda, deri ve ilaç bilimi alanlarındaki kullanım olanakları yanında insan sağlığı üzerine de önemli etkileri bulunan fenolik ve flavonoid maddelerin etki mekanizmalarının anlaşılması ve teknolojik olarak kullanılabilme yollarının araştırılmasının önemli olduğu görülmektedir. Bu doğrultuda, fenolik ve flavonoid maddelerce zengin olan meyve ve sebze endüstrisi atıklarının da değerlendirilmesinde bu kaynakların kullanılmasını sağlayabilecek yeni tekniklerin üzerinde çalışılması ve endüstriyel kullanım olanaklarının araştırılmasının önemli olduğu söylenebilir.

Ginkgo biloba bitkisinin yapraklarından toplam fenolik ve toplam flavonoidin ekstraksiyon koşullarının belirlerken ortamın H⁺ koşullarında göz önüne alınarak farklı pH aralıklarında toplam fenolik ve toplam flavonoid madde miktarı belirlenebilir. Tıbbi açıdan çok önemli olan bu bitkiden toplam fenolik ve toplam flavonoid madde miktarı eldesi için ekstraksiyonda farklı asit türlerinin etkisinde araştırılabilir. *Ginkgo biloba* bitkisinin yaprakları tıbbi açıdan önemli olduğu için biz yapraklarını çalıştık ama araştırmalar bu bitkinin meyvesinin de antioksidan kapasiteye sahip olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

[1] Başer, H.C., 1990, ‘‘Tıbbi Bitki ve Baharatların Dünyada ve Türkiye’de ki Ticareti ve Talep Durumu’’, Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı Dergisi, 53, 18-22.

[2] Kaya, G., 2006, ‘‘Tıbbi Bitki rezervi olarak orman kaynaklarının gelecek değerinin belirlenmesinde kullanılan P&P modelinin irdelenmesi’’ ZK  Bartın Orman Fakültesi Dergisi, 8 (9):23-32.

[3] Brown DJ., 1996, Phytotherapy Herbal medicine meets clinical science. NARD Journal:41–52.

[4] Baysal A., 2009, Türkiye Beslenme ve Sağlık Araştırması; www.sagem.gov.tr/TBSA_Beslenme_Yayını.pdf. Beslenme, 13. Baskı, Hatiboğlu Yayınları

[5] Allegrucci, G., Caccone, A., Cataudella, S., Powell, J.R. and Sbordonı, V., 1995, Acclimation of the European sea bass to freshwater: monitoring genetic changes by RAPD polymerase chain reaction to detect DNA polymorphisms, Marine Biology., 121, 591-559.

[6] Anon., 1992, Herbal remedies market in USA: Growth areas. OTC Market Report Update USA, July 1992 [abstract].

[7] Martin CM., 1997, It’s only natural-Herbal remedies claim their niche. The consultant Pharmacist;12:631–636.

[8] Palo Alto, CA., 1998, Dialog, Information, Services. Piers Imports (US Ports) Database 573.

[9] Croom EM, Walker L., 1995, Botanicals in the pharmacy: New life for old remedies. Drug Topics (Nov. 6):84–93.

[10] Brown DJ., 1996, Phytotherapy Herbal medicine meets clinical science. NARD Journal:41–52.

[11] Braquet P, Hosford D., 1991, Ethnopharmacology and the development of natural PAF antagonists as therapeutic agents. J. Ethnopharmacol;32(1-3):135–139.

[12] Kleijnen J, Knipschild P., 1992, *Ginkgo biloba* . Lancet; 340(8828):1136–1139.

[13] Anon., 1992, Herbal remedies market in USA: Growth areas. OTC Market Report Update USA.

[14] Anon., 1999, Food for thought product informationsheet No. 8042. *Ginkgo biloba* & *Huperizia serrata* amino acids & Co-Q-10. <http://www.domainserver.net/lifeplus/thought.htm>.

[15] Martin CM., 1997, It's only natural-Herbal remedies claim their niche. The consultant Pharmacist;12:631–636.

[16] Biotek U., 1998, Pegasus *Ginkgo biloba* . <http://www.biotekusa.com/ginkgo.htm>.

[17] Springen K, Cowley G. Brain boosters., 1997, Sale of *Ginkgo biloba* , natural memory booster, climb to over \$100 mil Newsweek:58.

[18] Palo Alto, CA., 1998 Dialog, Information, Services. *Ginkgo biloba* in Imports (US Ports) Database File 573.

[19] Croom EM, Walker L., 1995, Botanicals in the pharmacy: New life for old remedies. Drug Topics:84–93.

[20] Kanowski S, Herrmann WM, Stephan K, Wierich W, Horr R., 1996, Proof of efficacy of the *Ginkgo biloba* special extract EGb 761 in outpatients suffering from mild to moderate primary degenerative dementia of the Alzheimer type or multi-infarct dementia. Pharmacopsychiatry 29(2):47–56.

[21] Kleijnen J, Knipschild P., 1992, *Ginkgo biloba* for cerebral insufficiency. Br. J. Clin. Pharmacol. 34(4):352–358.

[22] Winter E., 1991, Effects of an extract of *Ginkgo biloba* on learning and memory in mice. Pharmacol. Biochem. Behav. 38(1):109–114. 236.

[23] Cohen-Salmon C, Venault P, Martin B, Raffalli-Sebille MJ, Barkats M, Clostre F, Pardon MC, Christen Y, Chapouthier G., 1997, Effects of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) on learning and possible actions on aging. J. Physiol. Paris. 91(6):291– 300.

[24] Smith PF, Maclennan K, Darlington CL., 1996, The neuroprotective properties of the *Ginkgo biloba* leaf: a review of the possible relationship to platelet-activating factor (PAF). J. Ethnopharmacol. 50(3):131–139.

- [25] Krieglstein J, Ausmeier F, El-Abhar H, Lippert K, Welsch M, Rupalla K, Henrich-Noack P., 1995, Neuroprotective effects of *Ginkgo biloba* constituents. *Eur. J. Pharm. Sci.*3:39–48.
- [26] White HL, Scates PW, Cooper BR., 1996, Extracts of *Ginkgo biloba* leaves inhibit monoamine oxidase. *Life Sci.* 58:1315–1321.
- [27] Chermat R, Brochet D, DeFeudis FV, Drieu K., 1997, Interactions of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761), diazepam and ethyl beta-carboline-3-carboxylate on social behavior of the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 56(2):333–339.238 P.-C. Chan *et al.*
- [28] Chandrasekaran K, Mehrabian Z, Spinnewyn B, Chinopoulos C, Drieu K, Fiskum G., 2002, Bilobalide, a component of the *Ginkgo biloba* extract (EGb 761), protects against neuronal death in global brain ischemia and in glutamate-induced excitotoxicity. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 48(6):663–669.
- [29] Chandrasekaran K, Mehrabian Z, Spinnewyn B, Chinopoulos C, Drieu K, Fiskum G. 2003, Neuroprotective effects of bilobalide, a component of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) in global brain ischemia and in excitotoxicity-induced neuronal death. *Pharmacopsychiatry*;36 Suppl 1:S89–S94.
- [30] Eskilsson, C.S., Bjorklund, E., 2000, Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 902(1), 227
- [31] Pawliszyn, J., 2003, Sample preparation: Quo Vadis? *Analytical Chemistry*, 75(11), 2543
- [32] R. Kellner, M.M. M.Otto, M.Valcarcel, H.M., 2004, Widmer, Sample Preparation, in *Analytical Chemistry: Modern Approach to Analytical Science*. Wiley: Weinheim. p. 506-508.
- [33] Luque-Garcia, J.L. de Castro, M.D. L., 2004, Focused microwave-assisted Soxhlet extraction: devices and applications. *Talanta*, 64(3), 571
- [34] de Castro, M.D. L., 2010, Priego-Capote, F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2383
- [35] de Castro, M.D. L., 1998, Garcia-Ayuso, L.E. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*, 369(1-2), 1

[36] Falandysz, J. Wyrzykowska, B. Warzocha, J. Barska, I., 2004, Garbacik-Wesolowska, A., Szefer, P.: Organochlorine pesticides and PCBs in perch *Perca fluviatilis* from the Odra/Oder river estuary, Baltic Sea. *Food Chemistry*, 87(1), 17

[37] Diagne, R.G. Foster, G.D, Khan., 2002, S.U: Comparison of Soxhlet and microwave-assisted extractions for the determination of fenitrothion residues in beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(11), 3204

[38] Richter, B.E. Jones, B.A.,1996, Ezzell, J.L., Porter, N.L., Avdalovic, N., Pohl, C.: Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation. *Analytical Chemistry*, 68(6), 1033

[39] Mockel, H.J. Welter, G., Melzer, H., 1987, Correlation between Reversed-Phase Retention and Solute Molecular-Surface Type and Area .1. Theoretical Outlines and Retention of Various Hydrocarbon Classes. *Journal of Chromatography*, 388(2), 255

[40] Moreno, E. Reza, J. Trejo, A., 2007, Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil using water under subcritical conditions. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 27(4), 239

[41] Lundstedt, S. van Bavel, B. Haglund, P. Tysklind, M. Oberg, L., 2000, Pressurised liquid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils. *Journal of Chromatography A*, 883(1-2), 151

[42] Rostagno, M.A. Villares, A. Guillamon, E. Garcia-Lafuente, A. Martinez., 2009, J.A. Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods. *Journal of Chromatography A*, 1216(1), 2

[43] R. Kellner, M.M. M.Otto, M.Valcarcel, H.M., 2004, Widmer, Sample Preparation, in *Analytical Chemistry: A Modern Approach to Analytical Science*, xyz, Editor. Wiley: Weinheim.

[44] Onur, Feyyaz; *Analitik Kimya II*, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayın No:101, s:135-149;

[45] Sasaki K, Wada K, Hatta S, Ohshika H, Haga M., 1997, Bilobalide, a constituent of *Ginkgo biloba* L. potentiates drug-metabolizing enzyme activities in mice: possible mechanism for anticonvulsant activity against 4-O-methylpyridoxine-induced convulsions. *Res. Commun Mol. Pathol. Pharmacol*;96(1):45–56.

[46] Duche JC, Barre J, Guinot P, Duchier J, Cournot A, Tillement JP., 1989, Effect of *Ginkgo biloba* extract on microsomal enzyme induction. *Int. J. Clin. Pharmacol. Res.*9(3):165–168.

[47] Bir kimyacının deney günlüğü, 2017 ‘‘UV Spektrofotometresi’’
<https://mugeyol.wordpress.com/tag/absorbansi-etkileyen-degisikler-nelerdir>.

[48] Hu Z, Yang X, Ho PC, Chan SY, Heng PW, Chan E, Duan W, Koh HL, Zhou S., 2005, Herb-drug interactions: a literature review. *Drugs*;65(9):1239–1282.

[49] Bir kimyacının deney günlüğü, 2017 ‘‘UV Spektrofotometresi’’
<https://mugeyol.wordpress.com/tag/absorbansi-etkileyen-degisikler-nelerdir>.

[50] Williamson EM., 2005, Interactions between herbal and conventional medicines. *Expert Opin Drug Saf* 4(2):355–378.

[51] Wold RS, Lopez ST, Yau CL, Butler LM, Pareo-Tubbeh SL, Waters DL, Garry PJ, Baumgartner RN., 2005, Increasing trends in elderly persons’ use of nonvitamin, nonmineral dietary supplements and concurrent use of medications. *J. Am. Diet Assoc.*105(1):54–63.

[52] Eliason BC, Kruger J, Mark D, Rasmann DN., 1997, Dietary supplement users: demographics, product use, and medical system interaction. *J. Am. Board Fam. Pract*;10(4):265–271.

[53] Miller LG., 1998, Herbal medicinals: selected clinical considerations focusing on known or potential drug-herb interactions. *Arch. Intern. Med.*;158(20):2200– 2211.

[54] Chermat R, Brochet D, DeFeudis FV, Drieu K., 1997, Interactions of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761), diazepam and ethyl beta-carboline-3-carboxylate on social behavior of the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.*56(2):333–339.238 P.-C. Chan et al.

[55] Joyeux M, Lobstein A, Anton R, Mortier F.,1995, Comparative antilipoperoxidant, antinecrotic and scavenging properties of terpenes and biflavones from Ginkgo and some flavonoids. *Planta Med.* 61(2):126–129.

[56] Packer L, Saliou C, Droy-Lefaix M-T, Christen Y., 1998, *Ginkgo biloba Extract Egb 761: Biological Actions, Antioxidant Activity, and Regulation of Nitric Oxide Synthase*. NewYork: Marcel Dekker, 303–341 p.

[57] Scholtyssek H, Damerau W, Wessel R, Schimke I., 1997, Antioxidative activity of ginkgolides against superoxide in an aprotic environment. *Chem. Biol. Interact.* 106(3):183–190.

[58] Gardes-Albert M, Abdelhafid S, Ferradini C, Droy-Lefaix M.,1990, Egb 761 scavenger effect against OH and O₂- radicals. A gamma pulse radiolysis study. *Free Radic. Biol. Med.*9 (Suppl. 1):190.

- [59] Emerit I, Oganessian N, Sarkisian T, Arutyunyan R, Pogosian A, Asrian K, Levy A, Cernjavski L., 1995, Clastogenic factors in the plasma of Chernobyl accident recovery workers: anticlastogenic effect of *Ginkgo biloba* extract. *Radiat. Res.* 144(2):198–205.
- [60] Lin SY, Chang HP., 1997, Induction of superoxide dismutase and catalase activity in different rat tissues and protection from UVB irradiation after topical application of *Ginkgo biloba* extracts. *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.* 19(6):367–371.
- [61] Droy-Lefaix MT, Cluzel J, Menerath JM, Bonhomme B, Doly M., 1995, Antioxidant effect of a *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) on the retina. *Int. J. Tissue React.* 17(3):93–100.
- [62] Lee SL, Wang WW, Lanzillo J, Gillis CN, Fanburg BL., 1998, Superoxide scavenging effect of *Ginkgo biloba* extract on serotonin-induced mitogenesis. *Biochem. Pharmacol.* 56(4):527–533.
- [63] Ellison JM, DeLuca P., 1998, Fluoxetine-induced genital anesthesia relieved by *Ginkgo biloba* extract. *J. Clin. Psychiatry*;59(4):199–200.
- [64] Winter JC., 1998, The effects of an extract of *Ginkgo biloba*, EGb761, on cognitive behavior and longevity in the rat. *Physiol. Behav.* 63(3):425–433.
- [65] Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN., 1994, Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91(23):10771–10778.
- [66] Benzi G, Moretti A., 1995, Age- and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system. *Free Radic. Biol. Med.* 19(1):77–101.
- [67] Sastre J, Millan A, Garcia de la Asuncion J, Pla R, Juan G, Pallardo, O'Connor E, Martin JA, Droy-Lefaix MT, Vina J., 1998, A *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) prevents mitochondrial aging by protecting against oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 24(2):298–304.
- [68] Ha SW, Yi CJ, Cho CK, Cho MJ, Shin KH, Park CI., 1996, Enhancement of radiation effect by *Ginkgo biloba* extract in C3H mouse fibrosarcoma. *Radiother. Oncol.* 41(2):163–167.
- [69] Itokawa H, Totsuka N, Nakahara K, Maezuru M, Takeya K, Kondo M, Inamatsu M, Morita H., 1989, A quantitative structure-activity relationship for antitumor activity of long-chain phenols from *Ginkgo biloba* L. *Chem. Pharm. Bull (Tokyo)* 37(6):1619–1621.

[70] Itokawa H, Totsuka N, Nakahara K, Takeya K, Lepoittevin JP, Asakawa Y., 1987, Antitumorprinciples from *Ginkgo biloba* L. Chem. Pharm. Bull (Tokyo)35(7):3016–3020.*Ginkgo biloba Leave Extract* 239

[71] Agha AM, El-Fattah AA, Al-Zuhair HH, Al-Rikabi AC., 2001, Chemopreventive effect of *Ginkgo biloba* extract against benzo(a)pyrene-induced forestomach carcinogenesis in mice: amelioration of doxorubicin cardiotoxicity. J. Exp. Clin. Cancer Res.20(1):39–50.

[72] Naidu MU, KumarKV, Mohan IK, Sundaram C, Singh S., 2002, Protective effect of Ginkgo biloba extract against doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice. Indian J. Exp. Biol. 40(8):894–900.

[73] Daba MH, Abdel-Aziz AA, Moustafa AM, Al-Majed AA, Al-Shabanah OA, El- Kashef HA., 2002, Effects of L-carnitine and *Ginkgo biloba* extract (EG b 761) in experimental bleomycin-induced lung fibrosis. Pharmacol. Res. 45(6):461–467.

[74] Naidu MU, Shifow AA, Kumar KV, Ratnakar KS., 2000, *Ginkgo biloba* extract ameliorates gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. Phytomedicine;7(3):191– 197.

[75] Özyurt, M. 2005. Aldehyd, peroksijen ve perasetik asit ile klor verici ajan icermeyen ve alet dezenfektanı olarak önerilen diğer dezenfektanlar, genel kullanım alanları ve antimikrobiyal etkinlikleri. 4. Ulusal sterilizasyon dezenfeksiyon kongresi, Kongre Kitabı. Editörler: Günaydın, M. Saniç, A., Gürler, B. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara. 180-199.

[76] Caillier, L.de Givenchy, E.T., Levy, R., Vandenberghe, Y., Gèribaldi, S., Guittard, F., 2009. Synthesis and Antimicrobial Properties of PolymerizableQuaternary Ammoniums. Eur. J. Med. Chem. 1, 1-8.

[77] Chambers, H.F. 2007. Miscellaneous Antimicrobial Agents; Disinfectants, Antiseptics & Sterilants. Basic & Clinical Pharmacology. Eds: Katzung, B.G(ed). Connecticut, Appleton& Lange. Tenth edn. 803-811.

[78] Gordin, F.M. Schultz, M.E., Huber, R.A., Gill, J.A., 2005. Reduction in nosocomial transmission of drug resistant bacteria after introduction of an alcohol-based handrub. Infect. Cont. Hosp. Ep. 26, 650-653.

[79] Kayaalp, O., 2009, Antiseptikler ve dezenfektanlar. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi ilaç bilimi, Ankara. 1. Cilt, 12. baskı. 307-314.

[80] Massi, L. Guittard, F., Levy, R., Gèribaldi, S., 2009, Enhanced activity of fluorinated quaternary ammonium surfactants against pseudomonas aeruginosa. Eur. J. Med. Chem. 44, 1615-1622.

[81] Abbasoğlu, U, 2009, Dezenfektanlar: Sınıflama ve amaca uygun kullanım alanları. 6. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi, Kongre Kitabı. Editörler: Perçin, D., Günaydın, M., Zenciroğlu, D., Esen, Ş, Aydın, F. *Bilimsel Tıp Yayınevi*, Ankara. 109-120.

[82] Massieu L, Moran J, Christen Y., 2004, Effect of *Ginkgo biloba* (EGb 761) on staurosporine-induced neuronal death and caspase activity in cortical cultured neurons. *Brain Res.*1002(1–2):76–85.

[83] Bastianetto S, Quirion R., 2002, Natural extracts as possible protective agents of brain aging. *Neurobiol. Aging.*23(5):891–897.

[84] Luo Y., 2006, Alzheimer's disease, the nematode *Caenorhabditis elegans*, and *Ginkgo biloba* leaf extract. *Life Sci.* 78(18):2066–2072.

[85] Atzori C, Bruno A, Chichino G, Bombardelli E, Scaglia M, Ghione M., 1993, Activity of bilobalide, a sesquiterpene from *Ginkgo biloba*, on *Pneumocystis carinii*. *Antimicrob. Agents Chemother.*37(7):1492–1496.

[86] Hilton M, Stuart E., 2004, *Ginkgo biloba* for tinnitus. *Cochrane Database Syst. Rev.*CD003852.240 P.-C. Chan et al.

[87] Ahlemeyer B, Krieglstein J., 2003, Pharmacological studies supporting the therapeutic use of *Ginkgo biloba* extract for Alzheimer's disease. *Pharmacopsychiatry* 36(Suppl1):S8–14.

[88] Dos Santos-Neto LL, de Vilhena Toledo MA, Medeiros-Souza P, de Souza GA., 2006, The use of herbal medicine in Alzheimer's disease-a systematic review. *Evid Based Complement Alternat Med.* 3(4):441–445.

[89] Fitzpatrick AL, Fried LP, Williamson J, Crowley P, Posey D, Kwong L, Bonk J, Moyer R, Chabot J, Kidoguchi L, Furberg CD, De Kosky ST., 2006, Recruitment of the elderly into a pharmacologic prevention trial: the Ginkgo Evaluation of Memory Study experience. *Contemp. Clin. Trials.*27(6):541–553.

[90] Ramassamy C., 2006, Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. *Eur. J. Pharmacol.* 545(1):51–64.

[91] Eckert A, Keil U, Kressmann S, Schindowski K, Leutner S, Leutz S, Muller WE., 2003, Effects of EGb 761 *Ginkgo biloba* extract on mitochondrial function and oxidative stress. *Pharmacopsychiatry*;36(Suppl 1):S15–S23.

[92] Kumar V., 2006, Potential medicinal plants for CNS disorders: an overview. *Phytother. Res.* 20(12):1023–1035.

[93] Dajas F, Rivera F, Blasina F, Arredondo F, Echeverry C, Lafon L, Morquio A, Heizen H., 2003, Cell culture protection and in vivo neuroprotective capacity of flavonoids. *Neurotox. Res.* 5(6):425–432.

[94] Ponto LL, Schultz SK., 2003, *Ginkgo biloba* extract: review of CNS effects. *Ann Clin. Psychiatry.* 15(2):109–119.

[95] Christen Y., 2000, Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 71(2):621S–629S.

[96] Luo Y, Smith JV, Paramasivam V, Burdick A, Curry KJ, Buford JP, Khan I, Netzer WJ, Xu H, Butko P., 2002, Inhibition of amyloid-beta aggregation and caspase-3 activation by the *Ginkgo biloba* extract EGb761. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*;99(19):12197– 12202.

[97] Özyurt, M. 2005. Aldehid, peroksijen ve perasetik asit ile klor verici ajan içermeyen ve alet dezenfektanı olarak önerilen diğer dezenfektanlar, genel kullanım alanları ve antimikrobiyal etkinlikleri. 4. Ulusal sterilizasyon dezenfeksiyon kongresi, Kongre Kitabı. Editörler: Günaydın, M. Sa

[98] Rutala, W.A. Weber D.J. 2005. Disinfection, sterilization, and control of hospital waste. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Principles and practice of infectious diseases*. Philadelphia: Elsevier. 6. baskı: 3331-3347. niç, A. Gürler, B. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara. 180-199.

[99] Dewanto, V., Wu, X., Adom, K., K., Liu, R., H., 2002. Thermal Processing Enhances The Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. *J. Agric. Food Chem.* 50: 3010-3014.1

[100] Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.-A., & Saura-Calixto, A. 1998. Procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of Science and Food Agriculture* 76, 270-276.

[101] Khiari, Z., Makris, P. D., Kefalas, P., 2009, An investigation on the recovery of antioxidant phenolics from onion solid wastes employing water/ethanol-based solvent systems. *Food and Bioprocess Technology*, 2(4): 337-343

[102] Galvan d'Alessandro, L., Kriaa, K., Nikov, I., Dimitrov, K., 2012, Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. *Separation and Purification Technology*, 93(1): 42-47.

- [103] Prasad, N. K., Hassan, F. A., Yang, B., Kong, W. K., Ramanan, N. R., Azlan, A., Ismail, A., 2011, Response surface optimisation for the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities of underutilised *Mangifera pajang* Kosterm. peels. *Food Chemistry*, 128(4), 1121-1127.
- [104] Zuorro, A., Maffei, G., Lavecchia, R., 2015, Reuse potential of artichoke (*Cynara scolimus* L.) waste for the recovery of phenolic compounds and bioenergy. *Journal of Cleaner Production*, In Press.
- [105] Bachir, M., Meziat, L., Benchikh, Y., VeLouaileche, H., 2014, Deployment of response surface methodology to optimize recovery of dark fresh fig (*Ficus carica* L., var. Azenjar) total phenolic compounds and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 162: 277-282.
- [106] Gong, L., Li, H. & Wang, D., 2012, "Health Investment, Physical Capital Accumulation, and Economic Growth", *China Economic Review*, 23, 1104-1119.
- [107] Sun, T., Zhao, W. Z., Yang, L. B. & Fan, L. H., 2011, The impact of psychological capital on job embeddedness and job performance among nurses: A structural equation approach. *Journal of Advanced Nursing*, 68, 1, 69-79.
- [108] Dahmoune, F., Boulekbache, L., Moussi, K., Aoun, O., Spigno, G., Madani, K., 2013, Valorization of Citrus limon residues for the recovery of antioxidants: Evaluation and optimization of microwave and ultrasound application to solvent extraction. *Industrial Crops and Products*, 50: 77-87.
- [109] Wang, Y., Chen, C., Wu T., Xu J., Han, X., 2008, Methyl tert-butyl ether (MTBE) induced Ca²⁺-dependent cytotoxicity in isolated rabbit tracheal epithelial cells, *Toxicology in Vitro* 22 ; 1734–1741

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı : KARAHAN, Mesut Yılmaz
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 01.07.1991, Afyonkarahisar
Medeni hali : BEKAR
Telefon : 0 (506) 057 65 03
e-mail : mesutyilmazkarahan@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	Uşak Üniversitesi/Kimya Bölümü	-
Lisans	Uşak Üniversitesi/Kimya Mühendisliği	2013
Lise	Şuhut Anadolu Lisesi	2009

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2014	Muratbey Peynirleri	Kimya Mühendisi
2015-2016	Ağaoğlu tekstil	Üretim mühendisi

Yabancı Dil

İngilizce (ÇOK İYİ)

Hobiler

Sinema, Kitap, Spor,

