

T.C.  
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI

*Malabaila dasyantha* (C. Koch) Grossh (Kelemen Keçir)  
BİTKİSİNDEN ELDE EDİLEN METANOLİK EKSTRAKTLARIN  
ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN TAYİNİ

Rukiye YILDIRIM TEKE  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN  
Doç.Dr. Fikret AKDENİZ

HAZİRAN-2014  
KARS

## ONAY SAYFASI

T.C. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Rukiye YILDIRIM TEKE'nin Doç. Dr. Fikret AKDENİZ'in danışmanlığında yüksek lisans tezi olarak hazırladığı "*Malabaila dasyantha* (C.Koch) Grossh (Kelemen-Keçir) Bitkisinden Elde Edilen Metanolik Ekstraktların Antioksidan Aktivitelerinin Tayini" adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy **BİRLİĞİ** ile kabul edilmiştir.

10 / 06 / 2014

### Adı ve Soyadı

**Başkan :** Doç. Dr. Fikret AKDENİZ  
**Üye :** Yrd. Doç. Dr. Ahmet Turan TEKEŞ  
**Üye :** Yrd. Doç. Dr. Sevilay İNCE DEMİRCİ

İmza

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun ....../....../2014 gün ve ..../  
.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

## ÖNSÖZ

“*Malabaila dasyantha* (C. Koch) Grossh” (Kelemen Keçir) bitkisinden elde edilen metanolik ekstraktların toplam fenolik madde ve antioksidan aktivitelerinin tayini çalışması Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Çalışmalarım süresince hoşgörü, ilgi, anlayış ve tecrübelerini esirgemeyen Sayın Hocam Doç.Dr. Fikret AKDENİZ’e çok teşekkür ediyorum. Ultrasonik Banyo sistemini bizden esirgemeyen Prof.Dr. İsmail ÇAKMAK’a, bitkilerin teşhisinde önemli katkıları olan Biyoloji bölümünden Araş.Gör. Gül Esmâ AKDOĞAN’a teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarında emeği geçen arkadaşlarım doktora öğrencisi Nazlı VURAL ve İnan DURSUN’a, Yüksek Kimyager Kadir TEPEBAŞ’a ve Metin BİÇİL’e teşekkür ediyorum.

Manevi desteğiyle hep yanımda olan eşim Emre TEKE’ye ve çok sevdiğim aileme; babam Recep YILDIRIM annem Nazife YILDIRIM ve kardeşlerim Hilal YILDIRIM, Büşra YILDIRIM’a teşekkür ederim.

<b>İÇİNDEKİLER</b>	
ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	vii
GRAFİKLER DİZİNİ.....	viii
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
RESİMLER DİZİNİ.....	xii
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Serbest Radikaller ve Oksidatif Sters.....	2
2.2. Oksijen ve Özellikleri.....	2
2.3. Reaktif Oksijen Türleri.....	3
2.3.1. Hidrojen Peroksit.....	4
2.3.2. Hidroksil Radikali.....	5
2.3.3. Süperoksit Radikali.....	5
2.4. Antioksidanlar.....	6
2.5. Antioksidanların Sınıflandırılması.....	6
2.5.1. Doğal Antioksidanlar.....	6
2.5.1.1. C Vitamini.....	7
2.5.1.2. E Vitamini.....	8
2.5.2. Sentetik Antioksidanlar.....	8
2.5.2.1. Propil Gallat (PG).....	9
2.5.2.2. Tersiyer Butil Hidrokinon (TBHQ).....	9
2.5.2.3. Butillenmiş Hidroksi Toluen (BHT).....	10
2.5.2.4. Butillenmiş Hidroksi Anisol (BHA).....	11
2.5.2.5. p-ters-Butil Fenol.....	11
2.5.2.6. 6-ters-Butil-m-Krezol.....	12
2.5.2.7. Irganox.....	12
2.5.2.8. Etoksikuin.....	13

2.5.3. Sentetik Antioksidanlara Duyulan İhtiyaç.....	13
2.6. Bitkilerden Antioksidant Madde Ekstraksiyonu Tayini için Kullanılan Teknikler.....	14
2.6.1. Soxhlet Ekstraksiyon.....	14
2.6.2. Basınçlı Sıvı Ekstraksiyon.....	16
2.6.3. Ultrasonik Banyo Ekstraksiyon.....	16
2.7. Bitkilerden Elde Edilen Ekstratların Antioksidant Aktivitelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Bazı Yöntemler.....	18
2.7.1. DPPH Radikal Giderme Yöntemi (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil).....	18
2.7.2. Fe-III İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi Yöntemi (FRAP)...	19
2.7.3. Cu-II İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi Yöntemi (CUPRAC).....	20
2.7.4. Toplam Fenolik Madde Tayin Yöntemi (Folin-Ciocalteu).....	21
2.8. Çalışma Materyalleri Hakkında Bilgi.....	22
3. MATERYAL ve METOD.....	23
3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar.....	23
3.1.1. Deney Çalışmalarında Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	23
3.1.2. Deney Çalışmalarında Kullanılan Kimyasal Cihazlar.....	23
3.2. Numune Hazırlama.....	23
3.3. Ekstraksiyon Deneyleri.....	24
3.3.1. Soxhlet Ekstraksiyonu.....	24
3.3.2. Ultrasonik Banyo Ekstraksiyon.....	24
3.4. Antioksidan Aktivite Tayini Metodu Seçimi ve Antioksidan Aktivite Tayini Deneyleri.....	25
3.4.1. Folin-Ciocalteu Yöntemiyle Toplam Fenolik Madde Tayini.....	26
3.4.2. DPPH Radikal Giderme Yöntemiyle (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Antioksidan Aktivite Tayini.....	26
3.4.3. Cu-II İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi Yöntemiyle (CUPRAC) Antioksidan Aktivite Tayini.....	27
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	29
4.1. Yapılan Ekstraksiyonların Verim Yüzdeleri.....	29
4.2. Toplam Fenolik Madde Tayini Deneylerinden Elde Edilen Bulgular.....	30

4.3. DPPH Radikal Giderme Yöntemiyle (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)	
Antioksidan Aktivite Tayini Deneylelerinden Elde Edilen Bulgular.....	33
4.4. Cu-II İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi Yöntemiyle (CUPRAC)	
Antioksidan Aktivite Tayini Deneylelerinden Elde Edilen Bulgular.....	35
5. SONUÇ.....	38
6. KAYNAKLAR.....	41
7. ÖZGEÇMİŞ.....	49

## ÖZET

Bu çalışmada *Malabaila dasyantha* (C.Koch) Grossh bitkisinin kurutulmuş ve öğütülmüş yapraklarından geleneksel Soxhlet ve yeni kullanılmaya başlanan bir teknik olan ultrasonik banyo ekstraksiyon yöntemleri kullanılmak suretiyle elde edilen metanolik ve etanolik ekstraktların, toplam fenolik madde içerikleri ve antioksidan aktiviteleri (kapasiteleri) belirlenmiştir.

Ekstraksiyon verimleri incelendiğinde, Soxhlet ekstrakt verimlerinin ultrasonik banyo ekstrakt verimlerinden anlamlı derecede daha yüksek olduğu bulundu. Ayrıca metanol de ekstrakt verimlerini etanole göre anlamlı derecede yükseltmiştir ( $p<0,05$ ).

Toplam fenolik madde tayini testlerinde de Soxhlet ekstraktları ultrasonik banyo ekstraktlarından, metanolik ekstraktlar da etanolik ekstraktlarından daha yüksek değerler ortaya koydular ( $p<0,05$ ).

Antioksidan aktivite (veya kapasite) tayini testlerinde, çözücünün aynı olduğu durumda ekstraksiyon teknikleri arasında anlamlı bir fark bulunmazken ( $p>0,05$ ), metanolik ekstraktlar her iki ekstraksiyon tekniğinde de etanolik ekstraktlardan daha yüksek antioksidan aktivite değerleri sergilediler ( $p<0,05$ ).

Metanolik Soxhlet ekstraktlarının toplam fenolik madde içeriklerinin metanolik ultrasonik banyo ekstraktlarından yaklaşık iki kat daha yüksek olmasına rağmen, her iki ekstrakt grubunun neredeyse aynı antioksidan aktivite değerleri sergilemesi dikkat çekici bir sonuç olarak elde edildi ( $p>0,05$ ). Bu durum Folin-Ciocalteu reaktifinin fenolik maddeler ile diğer oksitlenebilen maddeler arasındaki seçiciliğinin zayıf olmasına bağlandı. Bu nedenle de ekstraktların toplam fenolik madde içerikleri ile antioksidan aktivite değerleri arasında doğrusal bir ilişki olmadığı veya zayıf bir doğrusallık olduğu ortaya kondu.

Ultrasonik banyo ekstraksiyon tekniği, çözücü olarak metanol ve 50 dk'lık ekstraksiyon süresi, *Malabaila dasyantha* yapraklarından antioksidan etkili ekstrakt elde etmek için uygun ekstraksiyon koşulları olarak değerlendirildi.

**Anahtar kelimeler:** *Malabaila dasyantha*, Kelemen Keçir, Soxhlet ekstraksiyonu, Ultrasonik banyo ekstraksiyonu, DPPH, CUPRAC, Toplam Fenolik madde, Antioksidan aktivite tayini.

## ABSTRACT

In this study, methanolic and ethanolic extracts from dried and grounded leaves of *Malabaila dasyantha* (C.Koch) Grossh using conventional Soxhlet extraction and ultrasound assisted extraction which is a newly emerging technique were subjected to analysis in terms of their antioxidant activities and total phenolic matter contents.

It was found out that, Soxhlet extraction technique showed better extraction yield values for both extraction solvent. Methanol was also found to be more effective solvent in comparison with ethanol ( $p < 0,05$ ).

In total phenolic content assay experiments, Soxhlet technique exhibited higher values than ultrasound assisted extraction while methanol affected the results positively unlike ethanol ( $p < 0,05$ ).

With regard to the results of antioxidant activity (or capacity) assays, in the case of same solvent, there was no significant difference between the extraction techniques ( $p > 0,05$ ). But methanolic extracts exhibited higher antioxidant activity values in both assays used than those of ethanolic extracts ( $p < 0,05$ ).

It was found to be a remarkable result that, although total phenolic matter content of methanolic Soxhlet extracts were about two fold higher than those of ethanolic extracts, both exhibited almost the same antioxidant activity values ( $p > 0,05$ ). This situation attributed to the poor selectivity of Folin-Ciocalteu's reagent between phenolic substances and other oxidizable ones. Thus, no or poor linear relationship was found between total phenolic contents and antioxidant activity values of the extracts.

It was concluded that ultrasound assisted extraction, methanol as extraction solvent, and 50 dk extraction time interval were suitable extraction conditions for obtaining extracts with higher antioxidant activity from *Malabaila dasyantha* leaf.

**Key Words:** *Malabaila dasyantha*, Kelemen Keçir, Soxhlet extraction, Ultrasound assisted extraction, DPPH, CUPRAC, Total phenolic matter, Antioxidant activity



## **GRAFİKLER DİZİNİ**

Grafik 4.1. Toplam fenolik madde tayini için kullanılan kalibrasyon grafiği.....	31
Grafik 4.2. CUPRAC deneylerinde kullanılan ve Troloks standardı ile elde edilen kalibrasyon grafiği.....	35
Grafik 5.1. Ekstraktların toplam fenolik madde içeriklerine karşı IC <sub>50</sub> değerleri .....	40
Grafik 5.2. Ekstraktların toplam fenolik madde içeriklerine karşı CUPRAC değerleri grafiği .....	40

## SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BHT	Butillenmiş hidroksi toluen
BHA	Butillenmiş hidroksi anisol
CUPRAC	Cu(II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi
Cu(II)-Nc	Cu(II) neocuproin reaktifi
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
ET	Elektron Transferi
FRAP	Fe-III İndirgeme Antioksidan Gücü Yöntemi
FCR	Toplam Fenolik Madde Tayini
GAE	Gallik asit eşdeğeri
HAT	Hidrojen Atomu Transferi
IC <sub>50</sub>	Başlangıçtaki DPPH konsantrasyonunu yarıya düşürmek için gerekli olan antioksidan ekstraktı konsantrasyonu (genellikle µg/ml)
ORAC	Oksijen radikal absorban kapasitesi
S-M	Soxhlet -metanol
S-E	Soxhlet -etanol
U-M	Ultrasonik banyo – metanol
U-E	Ultrasonik banyo - etanol
TBHQ	Tersiyer butil hidrokinon
UV	Ultraviyole
TEAC	Trolox Eşiti Antioksidan Kapasitesi
TRAP	Toplam Radikal Yakalayıcı Antioksidan Parametre
Trolox	6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametil-kroman-2-karboksilik asit

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Moleküler oksijenin yapısı.....	3
Şekil 2.2. C Vitamininin kimyasal yapısı.....	8
Şekil 2.3. E Vitamininin kimyasal yapısı.....	8
Şekil 2.4. Propil Gallat'ın kimyasal yapısı.....	9
Şekil 2.5. TBHQ'nun kimyasal yapısı.....	10
Şekil 2.6. BHT'nin kimyasal yapısı.....	10
Şekil 2.7. BHA'nın kimyasal yapısı.....	11
Şekil 2.8. p-ters Butil Fenol'ün kimyasal yapısı.....	12
Şekil 2.9. 6-ters Butil m-Krezol'ün kimyasal yapısı.....	12
Şekil 2.10. Irganox'un kimyasal yapısı.....	13
Şekil 2.11. Etoksikuin'in kimyasal yapısı.....	13
Şekil 2.12. DPPH Radikalini kimyasal yapısı.....	18
Şekil 2.13. Antioksidan-DPPH Radikali tepkime mekanizması.....	19
Şekil 2.14. FRAP Reaktifi ile antioksidan bileşik arasındaki etkileşim	20
Şekil 2.15. Cu(II)'nin Antioksidan madde ile Cu(I)'e indirgenmesi...	21
Şekil 4.1. Ekstraksiyonlardan elde edilen verim yüzdeleri.....	30
Şekil 4.2. Toplam fenolik madde tayininde çözücü metanol kullanıldığında elde edilen sonuçlar.....	32
Şekil 4.3. Toplam fenolik madde tayinininde çözücü etanol kullanıldığında elde edilen sonuçlar.....	32
Şekil 4.4. Ekstraktların ve karşılaştırma maddelerinin IC <sub>50</sub> değerleri..	34
Şekil 4.5. Bakır-II İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi (CUPRAC) Deneylerinde Metanolik Ekstraktlar için elde edilen sonuçlar .....	36
Şekil 4.6. Bakır-II İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi (CUPRAC) Deneylerinde Metanolik Ekstraktlar için elde edilen sonuçlar .....	36

## **RESİMLER DİZİNİ**

Resim 2.1. Deneysel çalışmada kullanılan soxhlet ekstraksiyonu Sistemi.....	15
Resim 2.2. Deneysel çalışmada kullanılan ultrasonik banyo ekstraksiyonu sistemi.....	17
Resim 2.3. Malabaila Dasyantha (Kelemen Keçir) Bitkisi.....	22
Resim 2.4. Malabaila Dasyantha (Kelemen Keçir) Bitkisi (I).....	22

## **TABLolar DİZİNİ**

Tablo 4.1. Ekstraksiyonlardan elde edilen verim yüzdeleri.....	29
Tablo 4.2. Ekstraktların toplam fenolik madde içerikleri.....	31
Tablo 4.3. Ekstraktların ve karşılaştırma maddelerinin IC <sub>50</sub> değerleri.	33
Tablo 4.4. Bakır-II iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi (CUPRAC) deneylerinden elde edilen sonuçlar.....	35

## 1.GİRİŞ

İnsanlar, çok eski zamanlardan günümüze kadar çevresindeki bitkilerden; gıda, yakacak, ilaç, silah yapımı vb gibi değişik şekillerde faydalanmışlardır.

Milattan önce 3000’li yıllarda kullanılmaya başlanılan şifalı bitkiler 1900’lü yıllarda modern tıbbın da gelişmesiyle birlikte popülaritesini kaybetmeye başlamıştır. Yerini kimyasal ilaçlara bırakmış ve alternatif bir tıp dalı olarak kalmıştır. Zaman ilerledikçe kimyasal ilaçların önemli yan etkilerinin ortaya çıkması ve modern tıp ilaçlarının rahatsızlıkların birçoğunda tam bir başarı sağlayamaması, doğal bitkisel ilaçlara olan ilgiyi tekrar canlandırmıştır. Bu amaçla, doğal materyallerden sağlık üzerine olumlu etkileri olan ekstraktların veya drog’ların elde edilmesi, optimizasyonları ve ticari kullanım durumlarının araştırılması, son birkaç on yılın en popüler araştırma konularından biri haline gelmiştir.

Artan nüfusun sağlık gereksinimlerini karşılamak, başlarda, ilaçların sentetik olarak üretilmesini gündeme getirmiş ve bu nedenle büyük bir sanayi kolu ortaya çıkmıştır. Ancak bazı doğal ilaçların laboratuardaki sentezi pahalı ve karmaşık bir işlem olduğu için bu bileşiklerin, bitkilerden elde edilen bir ilaç ham maddesi olan “drog”lardan elde edilmesi önemini kaybetmemiştir. Ayrıca, sentetik ilaçlarda hedeflenen tek bir etkiye karşılık, bitkisel droglarda birkaç olumlu etki birden elde edilebilmekte ve bu durum da tedaviye katkı sağlayabilmektedir. Bu nedenle yeni doğal ilaç ham maddeleri bulmak için bitkiler üzerinde yapılan araştırmalar gün geçtikçe daha da artmaktadır .

Türkiye, üç büyük fitocoğrafik (bitki coğrafyası) kesişim yerinde bulunduğundan floristik (çiçek) açıdan oldukça zengindir. İklim, yer şekilleri ve toprak özellikleri bakımından birçok bitkinin ana vatanıdır. Türkiye’de 10 000 kadar bitki türü yetişmekte olup, bunların 1/3’ü aromatik bitkilerden oluşmakta ve 650 kadarı da halk hekimliğinde tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Serbest radikaller, dış orbitallerinde bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektronu bulunan, stabil (kararlı) olmayan ve oldukça reaktif atom veya moleküllerdir [1]. Stabil olmayan atom veya moleküllerin neden olduğu enerjik organik veya inorganik kimyasallar, birçok biyolojik materyallerdeki (DNA, nükleotidler, lipid, protein,...) moleküllerle reaksiyona girerek serbestleşirler. Serbest radikaller, dış yörüngelerindeki elektron açığını reaksiyona girdikleri komşu moleküllerden alarak giderirler. Bu moleküller elektronunu kaybettiği için kararsız bir hale geçer ve böylece yeni serbest radikaller oluşur. Etkileşim böyle devam ederek sürekli serbest radikale dönüşüme neden olan reaksiyon başlar. Bu reaksiyona “otokatalitik reaksiyon” denir[2, 3].

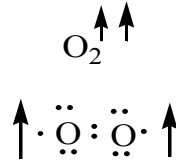
Eşleşmemiş elektron çiftleri, serbest radikallere büyük bir reaktivite kazandırarak biyolojik materyallerin birçoğuna zarar vermektedir. Diabet, kalp hastalıkları ve kanser gibi birçok hastalığın patogenezinde (organizmadaki değişiklikler) rol oynamaktadır [4, 5]. Özellikle son yıllarda kanser gibi bir çok ciddi hastalığın erken teşhisindeki araştırmalarda serbest radikaller ve oksidatif stresin üzerine yoğunlaşmıştır[6, 7].

### 2.2. Oksijen ve Özellikleri

Oksidasyon canlı organizmalar için çok önemli bir süreçtir. Oksijen ise hem yaşamın devamlılığını sağlayan hem de yaşamı sonlandıran molekül olarak bilinmektedir. Oksijen anaerobik (oksijensiz solunum yapan canlılar) canlılar için öldürücü ya da gelişimlerini durdurucu etkiye sahiptir. Örneğin; *Bacteroides fragilis* gibi bazı anaerobik canlılar düşük konsantrasyona sahip oksijenli ortamlarda yaşayabilirken, *Clostridia* gibi türler ancak oksijenin hiç olmadığı ortamlarda yaşayabilirler. Oksijenin anaerobikler üzerine zararlı etkisi, anaerobiklerin önemli hücre bileşenlerinin oksijen ile oksidasyonundan kaynaklanmaktadır[8].

Radikaller eşleşmemiş elektronları eşleştirmek istedikleri için kararsız yapıdadırlar ve bu kararsızlıkları onların kimyasal olarak aktif olmalarını sağlar. O<sub>2</sub> molekülü radikal

oluşturmasından dolayı biyolojik sistemler için tehlike oluşturmaktadır. Ancak  $O_2$ 'nin radikal yapısında olmasına rağmen, beklenildiği gibi reaktif olmadığı görülmüştür. Çünkü  $O_2$ 'nin  $\pi_{2p}^*$  orbitalindeki aynı spin kuantum sayısına sahip elektronlarını eş zamanlı olarak eşleştirebilmesi zordur. Bunun için oksijenin karşısındaki elektron verici alıcı da aynı spin kuantum sayısına sahip iki eşleşmemiş elektron içermelidir. Fakat atom ya da moleküllerin birçoğundaki elektron çiftleri bu şarta uymamaktadır. Çünkü Pauli Prensipleri'ne göre "bir elektron çifti bir orbitale zıt spinli olarak yerleşebilir". Yani oksijen atom veya moleküllerden her defasında sadece bir elektron alabilir. İki elektronunu birden eşleştiremez. Bu duruma "spin sınırlama" denir. Spin sınırlaması, oksijenle reaksiyona girebilecek birçok biyomolekülün reaksiyon hızında azalmaya sebep olur. Bu sebepten dolayı spin sınırlaması, hayatın devamlılığı açısından kritik bir öneme sahiptir[9]. Eğer oksijen molekülüne enerji ya da elektron verilirse bu spin sınırlaması ortadan kalkar ve reaktif türler oluşur. Örneğin; spin sınırlamasının temel haldeki oksijene göre yüksek enerjiye sahip olan singlet oksijende olmaması onun niçin daha reaktif olduğunu açıklamaktadır[10].



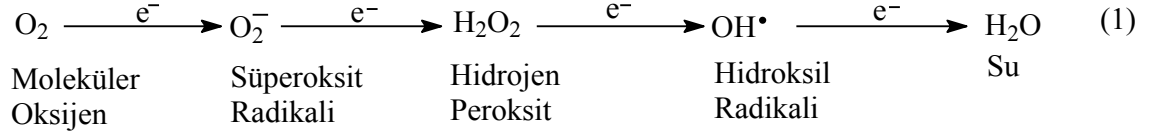
**Şekil 2.1.** Moleküler oksijenin elektron yapısı

### 2.3. Reaktif Oksijen Türleri

Elektronlar atomlardaki orbital adı verilen uzaysal alanda çiftler halinde bulunurlar. Atomlar arasındaki etkileşimlerden bağlar meydana gelmektedir. Bu etkileşim sonucunda da moleküler yapı oluşmaktadır. Serbest radikal, moleküler veya atomik yapılarda çiftleşmemiş tek elektronu olan türlere verilen isimdir. Moleküller ile kolayca elektron alışverişine giren bu moleküllere 'oksidan moleküller' veya 'reaktif oksijen molekülleri' denilmektedir[11].

Reaktif oksijen molekülleri, süperoksit radikali ( $O_2^-$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve hidroksil radikali ( $OH^\cdot$ ) dir (Denklem 1).

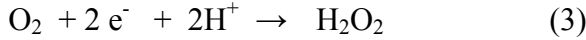
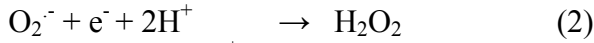




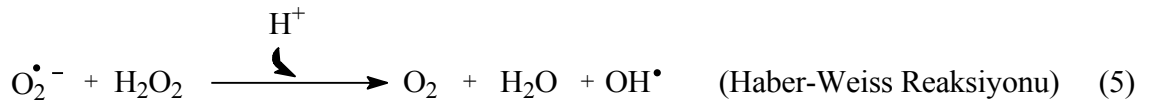
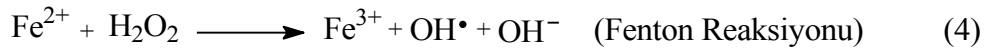
Reaktif oksijen molekülleri, çeşitli serbest radikallerin meydana geldiği serbest radikaller zincir reaksiyonlarını başlatabilirler ve hücrede organik radikaller (R<sup>•</sup>), peroksit radikalleri (ROO<sup>•</sup>), alkoksi radikalleri (RO<sup>•</sup>), kükürtlü radikaller (RS<sup>•</sup>), sülfonil radikalleri (RSO<sup>•</sup>) gibi çeşitli radikaller oluşturmaya neden olurlar[12, 13].

### 2.3.1. Hidrojen Peroksit

Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), süperoksit molekülünün etrafındaki moleküllerden bir elektron alması veya molekül halindeki oksijenin etrafındaki moleküllerden iki elektron alması sonucunda oluşan peroksitin iki protonla (H<sup>+</sup>) birleşmesi ile oluşmaktadır (Denklem 2, 3).

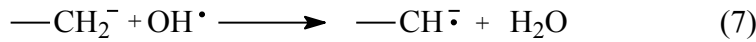


Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), çiftleşmemiş elektrona sahip olmadığı için serbest radikal değildir. Bu yüzden de reaktif oksijen türleri grubuna girmektedir. Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Fe<sup>2+</sup> gibi geçiş metallerin varlığında Fenton reaksiyonu ve süperoksitin (O<sub>2</sub><sup>-•</sup>) varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucunda, zarar verici ve en reaktif serbest oksijen radikali olan hidroksil (OH<sup>•</sup>) radikalini oluşturur (Denklem 4, 5) [14].



### 2.3.2. Hidroksil Radikal

Hidroksil radikali (OH<sup>•</sup>), Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucunda hidrojen peroksitten veya suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucu oluşmaktadır. Hidroksil radikali (OH<sup>•</sup>) yüksek reaktiviteye sahip bir oksidan radikaldir. Yarılanma ömrü çok kısadır (Denklem 6,7) [12, 13].

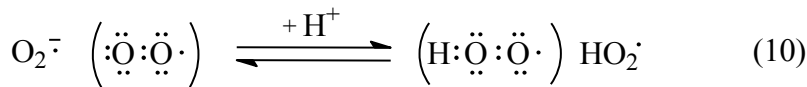


### 2.3.3. Süperoksit Radikali

Oksijen molekülü, orbitalinde çiftlenmemiş elektron taşıyorsa süperoksit radikali olarak adlandırılır. Süperoksit radikali (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşmaktadır (Denklem 8,9) [15].



Süperoksit radikali (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) anyonunun asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metallerinin indirgeyicisi olmasıdır. Süperoksit radikali (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) düşük pH da daha çok reaktiftir (Denklem 10) [16].



## 2.4. Antioksidanlar

### *Antioksidanların Tanımı ve Kısa Tarihi*

Bir antioksidan, diğerk moleküllerin oksidasyonunu inhibe eden (engelleyen) bir moleküldür. Oksidasyon; bir madde, bir oksitleme maddesi veya hidrojen-elektron transfer eden bir kimyasal reaksiyondur. Oksidasyon reaksiyonları serbest radikaller tarafından üretilir. Bu yüzden serbest radikaller, zincir reaksiyonları oluşturarak, hücrenin hasarına hatta ölümüne neden olmaktadır. Bu durumda antioksidanlar devreye girerek, serbest radikalleri ortadan kaldırarak zincir reaksiyonlarını sonlandırır. Antioksidanlar bunu yapmak için kendilerini okside ederler ve bunu indirgeyici ajanlar olan; tiyoller, askorbik asit ya da polifenoller gibi moleküllerle yaparlar[17].

Karasal bitkiler, deniz ortamına uyum sağlamak için C vitamini, polifenoller ve tokofenoller gibi denizde olmayan antioksidanları üretirler. 50 ile 200 milyon yıl arasında özellikle Jura döneminde angiosperm bitkilerinin gelişmesini sağlayan, fotosentezin yan ürünü olan reaktif oksijen türlerine karşı kimyasal bir savunma olarak birçok antioksidan pigmentleri geliştirmiştir. Başlangıçta “antioksidan” terimi özellikle oksijen tüketimini engelleyen bir kimyasal olarak anlaşılmıştır. 19'uncu ve 20'nci yüzyıllarda, metallerin korozyonunda, kauçuk vulkanizasyonunun önlenmesi gibi endüstriyel proseslerde ve içten yanmalı motorların kirlenmesinde yakıtların polimerizasyonunun önlenmesi gibi çalışmalarda antioksidan kullanılmıştır[18]. Erken ekşimeye neden olan doymamış yağların oksidasyonunun önlenmesindeki araştırmalarda biyolojik antioksidanların önemi üzerinde durulmuştur[19].

## 2.5. Antioksidanların Sınıflandırılması

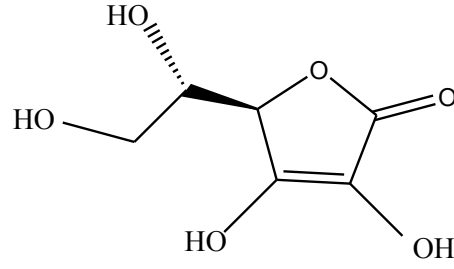
### 2.5.1. Doğal Antioksidanlar

Doğal antioksidanlar bitkilerin bütün kısımlarında, doğal olarak meydana gelmektedir. Bunlar; vitaminler, fenoller, glutatyonlar, flavonoidler, karotenoidlerdir. Bu antioksidanlar bitkisel kaynaklıdır ve serbest radikal gidericisi, peroksit parçalayıcısı,

enzim inhibitörleri ve singlet ve triplet oksijen gidericisi olarak görev yapmaktadır[20]. Doğal antioksidan bileşikleri; sebzelerde, tohumlarda, yapraklarda, çiçeklerde, köklerde, kabuklu ve kabuksuz meyvelerde bolca bulunmaktadır. Bu yüzden sebze ve meyve tüketiminin bol miktarda olması, hastalıklara yakalanma riskini azaltmaktadır[21]. Askorbik asit (C vitamini), karotenoidler, tokoferoller ve skualen en önemli doğal antioksidanlardandır. Askorbik asit kofaktör (bazı enzimlerin aktif olabilmeleri için gerekli olan enzime gevşek ya da sıkıca bağlı olan metal iyon grupları) olarak görev yapmaktadır ve bitkilerle bazı memelilerin karaciğerinde glikozdan sentezlenmektedir[22]. Domates, ıspanak, brokoli, turunçgillerde, patates gibi meyve ve sebzelerde bulunmaktadır. Askorbik asit çok çabuk okside olduğundan meyve ve sebzeleri pişirirken ve hazırlarken işe yaramaz hale gelmektedir. Bu nedenden dolayı C vitamini içeren meyve ve sebzelerin; hafif pişirilmesi, gerekebiliyorsa çiğ yenmesi ve kesildikten sonra hemen tüketilmesi önerilmektedir[23]. Doğal antioksidan olan  $\alpha$ -tokoferol ve askorbik asit; BHT, TBHQ, BHA ve PG gibi sentetik antioksidanlardan daha düşük aktiviteye sahip olduklarından dolayı besinlerin üretimlerinde ve depolanmasında kullanılmaktadır[24, 25].

#### **2.5.1.1. C Vitamini**

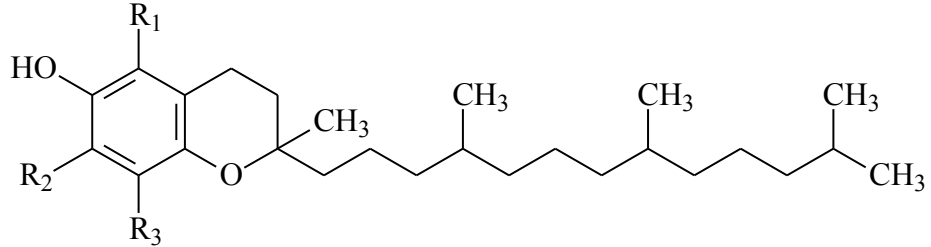
C vitamini askorbik asit olarak da bilinir. Suda çözünebilen bir vitamindir. Askorbik asit peroksil radikallerle tepkime vermektedir. Aktif bir radikal olan triklorometil peroksil ile 100 kat daha hızlı tepkime verir. Askorbik asit bir monosakkarit olan glikoz türevidir ve 6 karbonlu monosakkaritlere benzemektedir. Renksiz, beyaz, dikdörtgen şekilde kristallerden oluşur. Çok hafif kokusu vardır. Tadı ekşidir ve reaksiyonu asidiktir. Optikçe aktiftir ve polarize ışığı sağa çevirir. Asetonda çok az çözünür; eter, petrol eteri, benzen, kloroform ve yağlarda çözünmemektedir. Ticaretteki vitamin C ise askorbik asidin kalsiyum veya sodyum tuzlarından oluşmaktadır. Askorbik asit bütün canlı dokularda vardır. Bitkilerden doğal olarak elde edilebileceği gibi kimyasal olarak da üretilebilmektedir[26].



**Şekil 2.2.** C Vitamini (Askorbik asit)'in yapısı.

### 2.5.1.2. E Vitamini

E vitamini; yağda çözünen vitaminler arasındadır. Hücre zarında bolca bulunur. E vitamini aktivitesi gösteren 8 bileşik vardır. Bunlardan 4'ü tokoferol, 4'ü tokotrienoldür. Klinik ve biyokimyasal olarak sağlıklı bir fertte genellikle E vitamini eksikliği görülmemektedir. Eksikliği genellikle yağ absorblama problemi olan uzun süreli rahatsızlıklarda ortaya çıkmaktadır[27].



$R_1=R_2=R_3=Metil$ ,  $\alpha$ -Tokoferol [2,5,7,8-tetrametil-2-(4,8,12-trimetiltridesil)kroman-6-ol]

$R_1=R_3=Metil$ ,  $R_2=H$ ,  $\beta$ -Tokoferol [2,5,8-trimetil-2-(4,8,12-trimetiltridesil)kroman-6-ol]

$R_1=H$ ,  $R_2=R_3=Metil$ ,  $\gamma$ -Tokoferol [2,7,8-trimetil-2-(4,8,12-trimetiltridesil)kroman-6-ol]

$R_1=R_2=H$ ,  $R_3=Metil$ ,  $\delta$ -Tokoferol [2,8-dimetil-2-(4,8,12-trimetiltridesil)kroman-6-ol]

**Şekil 2.3.** E Vitamininin Kimyasal Yapısı

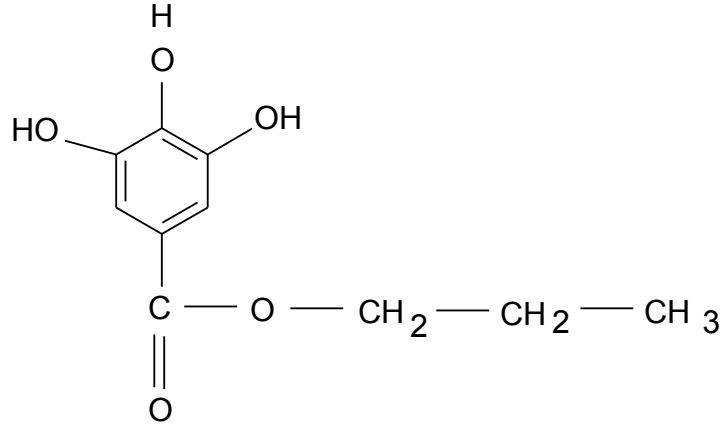
### 2.5.2. Sentetik Antioksidanlar

Sentetik olarak kullanılan antioksidanlar BHT, BHA, TBHQ, PG ve Troloks ile diğer sentetiklerdir[28]. Bu sentetik antioksidanlar yaygın olarak kullanılmaktadır ve bazı yan etkileri olduğu bilinmektedir[29, 30]. Ayrıca diğer bazı çalışmalarda da bu sentetik

antioksidanların sağlık açısından tehlikeli oldukları bildirilmiştir[29, 31, 32]. Örneğin BHT'nin karaciğerde sitokrom P-450 sistemine hasar verdiği çalışmalarla ispatlanmıştır. Farelere yüksek dozda BHT verildiğinde de karaciğerlerinde hasar görölmüştür. Ayrıca BHT gibi sentetik antioksidanların fazla alındığında vücuttan atılamadığı için adipoz dokuda (yağ dokusu) depolanmakta olduğu bilinmektedir[33].

#### 2.5.2.1. Propil Gallat (PG)

Propil esteri yada galik asit ve propanol arasında oluşan 3,4,5-trihidroksi benzoattır. 1948 yılından beri, propil gallat antioksidanı oksidasyonu önlemek için sıvı ve katı yağlar içeren gıdalara ilave edilmiştir. Gıdalardaki gösterimi E310'dur. Propil gallat; hidrojen peroksit ve serbest oksijen radikallerini oksidasyona karşı korur. Propil gallat; kozmetik, sa ürünleri, yapıştırıcılar ve yağlarda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Bazı alışmalarda Propil Gallat'ın östrojen antagonisti hastalığına neden olduğu belirtilmiştir [34-36].

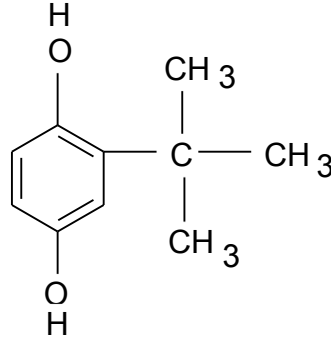


şekil 2.4. Propil Gallat'ın Kimyasal Yapısı

#### 2.5.2.2. Tersiyer Butil Hidrokinon (TBHQ)

TBHQ etkili bir antioksidandır. TBHQ gıdalarda koruyucu madde olarak doymamış bitkisel yağlarda ve yenilebilir hayvansal yağlarda kullanılır. Gıdalarda demir varken renk bozulmasını önlemek, lezzetin değişmemesi için veya malzemelerin kokmaması için gıdalara TBHQ ilave edilmektedir. TBHQ'nun gıda katkı madde numarası E319'dur. Dondurulmuş balık ve balık ürünlerinde en fazla 1g/kg'a kadar TBHQ

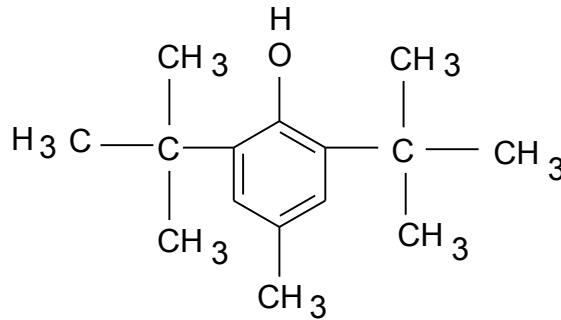
kullanılmasına izin verilmektedir. En önemli avantajı depolama ömrünü uzatmasıdır. Ayrıca korozyon önleyici olarak biyodizel ünitelerinde kullanılmaktadır. Parfümlerde buharlaşma oranını düşürmek ve kararlılığını arttırmak için sabitleyici olarak da kullanılmaktadır[37]. TBHQ'nun yüksek dozdaki kullanımlarında (1 ile 4 gr.) bulantı, kulak çınlaması, DNA hasarı, mide tümörlerinde kanserojeniteye neden olabilmektedir[38].



Şekil 2.5. TBHQ'nun Kimyasal Yapısı

### 2.5.2.3. Butillenmiş Hidroksi Toluen (BHT)

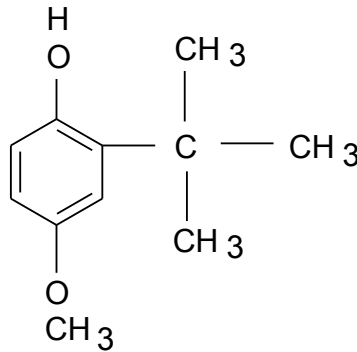
BHT lipofilik (yağda çözünen), antioksidan özellik içeren fenol türevli bir organik bileşiktir. Avrupa ve ABD'de kullanım yüzdesi oldukça düşük olmak şartıyla gıdalarda kullanımına izin verilmiştir. İnsanların diyetlerindeki sıvı yağların kullanımında ve endüstriyel kimyada serbest radikallerin kontrol altına alınmasında yaygın olarak kullanılır. BHT; kauçuk, ilaç, kozmetik, elektrik trafo yağı, petrol sektöründe, yakıtlara katkı maddesi olarak, jet yakıtlarında peroksit oluşumunu önlemek için kullanılır[39].



Şekil 2.6. BHT'nin Kimyasal Yapısı

#### 2.5.2.4. Butillenmiş Hidroksi Anisol (BHA)

BHA 2-terts-butil-4-hidroksianisol ve 3-tert-bütül-4-hidroksianisol organik bileşiklerinden oluşan izomerik bir antioksidandır. Gıda katkı maddesi olarak E320 olarak bilinir. BHA gıda koruyucu, gıda paketlenme, hayvan yemi, kauçuk, kozmetik ve petrol ürünleri gibi alanlarda kullanılmıştır. BHA 1947 yılından itibaren kokmuş olan veya koku gelişiminin engellenmesi için yenilebilir yağlar ve yağ içeren gıdalara antioksidan özellik olarak eklenmiştir. Serbest radikal olarak hareket ederek, serbest radikal reaksiyonlarını engeller[40].

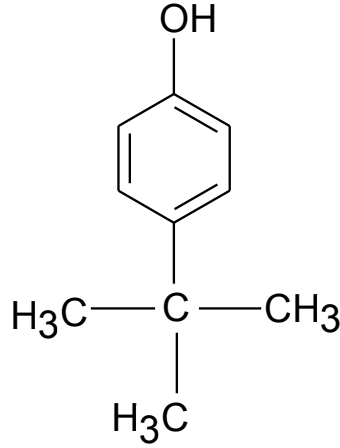


Şekil 2.7. BHA'nin Kimyasal Yapısı

#### 2.5.2.5. p-terts-Butil Fenol

Kimya endüstrisinde bu madde bir ara ürün olarak elde edilmekte, antioksidan, kozmetik, gıda katkılarının sentezinde; yapıştırıcı, çeşitli polimerler ve kauçuk üretiminde kullanılmaktadır. Bazı kimyasal özellikleri: erime noktası 100°C, kaynama noktası 237,5°C, pKa= 10,16 şeklindedir[41].





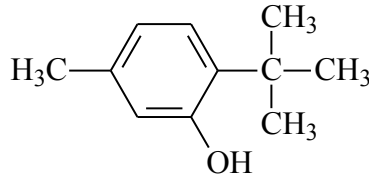
**Şekil 2.8.** p-tert-Butil Fenol'ün Kimyasal Yapısı

#### 2.5.2.6. 6-tert-Butil-m-Krezol

Lastik, lateks ve yapıştırıcılarda kullanılan diğer bazı antioksidanların eldesinde ve gıda maddelerinde tat verici olarak Avrupa Birliğinde kullanılmaktadır[42].

6-tert-Butil-m-Krezol'ün bazı kimyasal özellikleri;

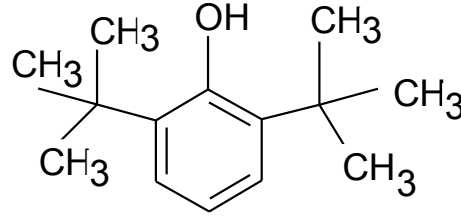
- Erime noktası 21,3 °C
- Kaynama noktası 244°C
- pKa= 11,21



**Şekil 2.9.** 6-tert-Butil-m-Krezol'ün Kimyasal Yapısı

#### 2.5.2.7. 2,6-di-tert-Butilfenol (Irganox)

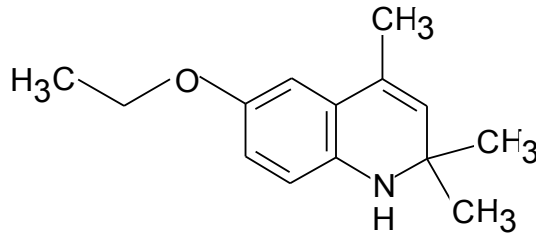
Ticari ismi Irganox L140 olan organik bir bileşiktir. Renksiz, alkillenmiş fenol ve türevleri olan bir katıdır. Endüstriyel alanda UV stabilizatörü olarak kullanılır. Petrokimyasal ürünlere ve plastiklere de katılan bir antioksidandır. Havacılık yakıtlarında kullanılır[43].



**Şekil 2.10.** Irganox L140'ın kimyasal yapısı

### 2.5.2.8. Etoksikuin

Gıda koruyucu numarası E324 olarak bilinen antioksidandır. Genellikle evcil hayvan gıdalarında yağların acılaşmasını önlemek için kullanılan koruyucu maddedir. Ayrıca armut gibi bazı meyvelerin kararmasını önlemede ve kırmızı biber gibi bazı baharatların renginin korunmasında da kullanılır[44].



**Şekil 2.11.** Etoksikuin'in Kimyasal Yapısı

### 2.5.3. Sentetik Antioksidanlara Duyulan İhtiyaç

Dondurulmuş gıdaların doğal rengini ve kokusunu kaybetmemesi, çeşitli gıda maddelerinin acılaşması ve ekşimesinin önlenmesi, meyvelerde renk değişiminin yavaşlatılması ve beyaz renkli gıdaların kararmaması için C vitamini kullanılmaktadır. Gıdalarda renk bozulmasını önlemek, lezzetin değişmemesi için veya malzemelerin kokmaması için gıdalara TBHQ ilave edilmektedir. Ayrıca korozyon önleyici, biyodizel katkısı olarak da kullanılmaktadır. Parfümlerde buharlaşma oranını düşürmek ve kararlılığını arttırmak için sabitleyici olarak da kullanılmaktadır[37]. BHT; kauçuk, ilaç,

kozmetik, elektrik trafo yağı, petrol sektöründe, yakıtlara katkı maddesi olarak, jet yakıtlarında peroksit oluşumunu önlemek için kullanılır[39, 43]. BHA gıda koruyucu, gıda paketlenme, hayvan yemi, kauçuk, kozmetik ve petrol ürünleri gibi alanlarda kullanılmaktadır[40].

## **2.6. Bitkilerden Antioksidan Madde Ekstraksiyonu İçin Kullanılan Teknikler**

Nitel ve nicel kimyasal analizler için örnek hazırlama işlemine ihtiyaç vardır. Ekstraksiyon işlemlerinin otomasyona uygun olması, organik solvent tüketimini azaltması, ekstraksiyon zamanının kısaltılması, örnek hazırlama maliyetini azaltması kritik öneme sahiptir. Bundan dolayı yeni ekstraksiyon tekniklerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalara artan bir talep olmuştur[45, 46]. Teknolojinin de gelişimine paralel olarak, ekstraksiyon prensiplerindeki ilerleyiş örnek hazırlamada yeni yöntemlere yol açmıştır. Bu yüzden de örnek hazırlarken, klasik ekstraksiyon teknikleri yerini, mikrodalga destekli ekstraksiyon, basınçlı sıvı ekstraksiyonu, süperkritik sıvı ekstraksiyonu gibi tekniklere bırakmaya başlamıştır[47].

### **2.6.1. Soxhlet Ekstraksiyonu**

Soxhlet ekstraksiyon tekniği, 1879 yılında Franz von Soxhlet tarafından geliştirilmiştir. En eski ekstraksiyon tekniklerinden biri olan Soxhlet ekstraksiyonu katı veya katı-sıvı numuneler için kullanılmaktadır. Soxhlet ekstraktörü; bir çözücü şişesi, orta çemberde bir sıvı akış borusu (sifon), soğutulmuş bir kondansör (yoğunlaştırıcı) ve ısıtma sisteminden oluşmaktadır. Örnek numune, orta çemberdeki ekstraksiyon bölmesinin içine yerleştirilir. Çözücü ise, orta çemberin altındaki çözücü şişesine konulur. Çözücü kaynama noktasının üzerinde ısıtılır ve kaynamadan gelen buharlar yoğunlaşarak numuneye doğru damlar. Çözücü numuneyi ıslatır ve çözücü seviyesi sifonun tepesine ulaştığı an, çözücü tüm numune bölmesini boşaltarak, alt kısımdaki çözücü şişesine geri damlar. Bu olay birçok kere tekrar eder. Ekstrakte olan analitler (analizi yapılacak olan madde), çözücü şişesi içerisinde kalır. Her dolaşımında taze çözücü kullanılır. Ekstraksiyon süresi ise, 6-24 saat arasında değişmektedir ve 100-500 mL hacimli

çözücüler gereklidir. Ekstraksiyon çözücüsü olarak genellikle saf organik sıvılar kullanılır[48].

Çözücü ekstraksiyonu bazı avantajlara sahiptir. Örnek taze çözücü ile temas halindedir. Sistemin sıcaklığı, distilasyon balonuna uygulanan ısının etkisiyle oda sıcaklığından daha yüksektir ve bu sıcaklık değişmeden kalır. Soxhlet ekstraksiyonu az uğraş gerektiren çok basit bir tekniktir. Kullanılan diğer alternatiflerin çoğundan daha fazla miktarda örnek kütlesi ekstrakte edilebilir[49, 50].

Soxhlet ekstraksiyonunun dezavantajları ise, uzun zaman gerektirmesi, büyük miktarda organik çözücü kullanılmasıdır. Soxhlet ekstraksiyonu tekniği, çözücü seçiciliği ile sınırlıdır ve otomasyonu zordur[50, 51].



**Resim 2.1.** Deneysel çalışmada kullanılan Soxhlet ekstraksiyonu sistemi

### **2.6.2. Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonu**

Basınçlı sıvı ekstraksiyonu yeni bir tekniktir ve hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu veya sıcak çözücü ekstraksiyonu da denilmektedir. Bu yöntem için örnek numune, yüksek basınçlı bir ortam da tutulur. Yükseltilmiş basınç, çözücünün daha yüksek sıcaklıklarda sıvı halde bulunmasını sağlamaktadır. Yüksek sıcaklıkların kullanılması, van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağı ve dipol çekim gibi analit-örnek etkileşimlerinin bozulmasına yardımcı olarak ekstraksiyonun verimini artırır[52]. Yükseltilmiş sıcaklık çözücünün ve çözünenin yüzey gerilimini düşürür ve örneğin ıslanma derecesini artırır. Yüzey gerilimdeki azalma, analitlerin çözücüde daha hızlı çözünmesine yardımcı olur[53]. Sıcaklığın artması sıvı çözücünün viskozitesini azaltır, denge zamanının azalmasına neden olarak difüzyon hızlarını artırır ve difüzyon kontrollü örneklerde daha hızlı ekstraksiyonlara neden olur[54]. Sıcaklığın artmasıyla ekstraksiyon kinetiği de daha hızlı gerçekleşir. Genellikle ekstraksiyon, çözücünün atmosferik kaynama noktasında daha yüksek bir sıcaklıkta gerçekleştirilir. Analitlerin yayılma gücü ve çözünürlüğü sıcaklığın artmasıyla artmaktadır. Bu durum da ekstraksiyonu daha hızlı ve daha etkin yapmaktadır[52, 55].

Basınçlı sıvı ekstraksiyonunun avantajı, uygulanan basıncın sıcaklığı kaynama noktasının üzerinde bile olsa çözücü sıvı durumdadır. Bu yüzden Soxhlet ekstraksiyonundan daha hızlı bir sürede gerçekleşir[56].

### **2.6.3. Ultrasonik Banyo Ekstraksiyonu**

Bu ekstraksiyon yöntemi ses dalgaları destekli sıvı ekstraksiyonu olarak da bilinmektedir. Yöntemde örnek numuneye 20 kHz üstündeki frekanslarla titreşimler uygulanır. Bu titreşimler sıvı örneğinde kabarcıklar oluşmasına ve katıların mekanik olarak sarsılmasına neden olur. Böylece partiküllerin kopması sağlanır. Kabarcıkların sönmesi asimetrik olarak gerçekleşmektedir[57-60]. Sistemin yapısına bağlı olarak bazen kabarcıklar çökmez ve ultrasonla aynı frekansta titreşir[61]. Bu titreşim sayesinde sıvı kolay karışır ve kütle transferi kolaylaşır. Materyalde sıkışma ve genleşme olayları hızlı biçimde gerçekleşir. Katılardaki bu basınç değişimi sıkılıp bırakılan süngere

benzemektedir. Yani, katının içindeki sıvının dışarı çıkması ve dış ortamdaki sıvının katının içine girmesine neden olmaktadır[62].

Ultrasonik ekstraksiyon hem katı hem de sıvı numune hazırlamada kullanılmaktadır. Katı numunelerde; ekstraksiyon, özütleme ve bulamaç oluşumu gerçekleşir. Sıvı numunelerde ise sıvı-sıvı ekstraksiyonu, emülsiyonu veya homojenizasyonunun mümkün hale gelmesini sağlar[63].

En çok kullanılan ve en ucuz ultrasonik radyasyon kaynağı ultrasonik banyodur[64]. Ekstraksiyon verimini artıran veya etkileyen parametreler; çözücü türü, sıcaklık, örnek partikül boyutu, örnek miktarı ve kullanılan cihazdır. Bu ekstraksiyonun diğer uygulaması ise dinamik ses dalgaları destekli ekstraksiyondur[64, 65].



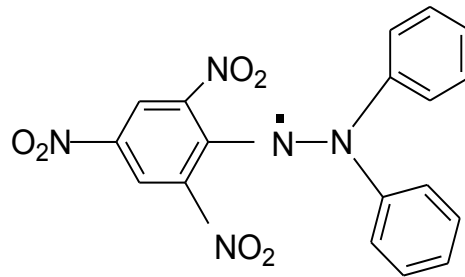
**Resim 2.2.** Deneysel çalışmada kullanılan ultrasonik banyo ekstraksiyon sistemi

## 2.7. Bitkilerden Elde Edilen Ekstratların Antioksidant Aktivitelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Bazı Yöntemler

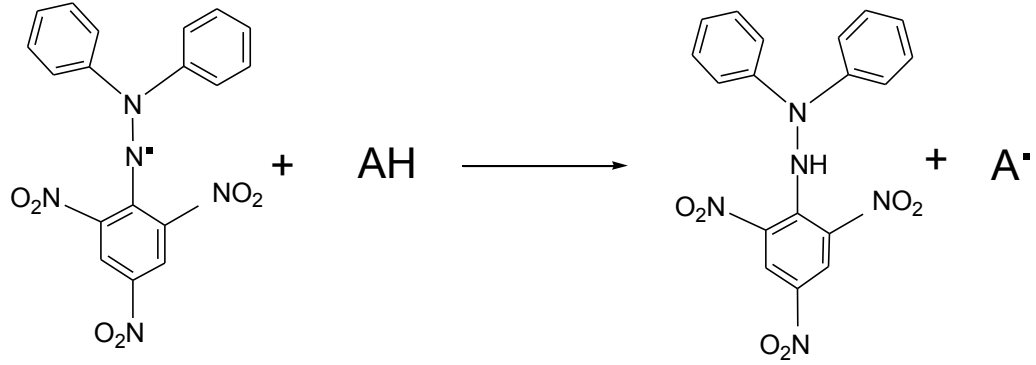
### 2.7.1. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Radikal Giderme Yöntemi

Fenolik antioksidanların aktivitelerinin tayini için kullanılan ilk sentetik oksidanlardan biridir. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikali ticari olarak elde edilebilen stabil bir radikaldir. DPPH radikali organik nitrojen radikaldir[66]. Etanoldeki çözeltisi mor renklidir. Maksimum absorbandsıda 515 nm’de verir. DPPH radikali indirgenince rengi solduğundan dolayı reaksiyonun ilerleyişi spektrofotometre ile izlenebilmektedir. DPPH’in renginin solması antioksidan konsantrasyonu ile orantılıdır. DPPH’in konsantrasyonunu % 50 oranında azaltmak için gereken antioksidan miktarına “anti-radikal etkinlik” denilmekte ve IC<sub>50</sub> (mg/mL) ile gösterilmektedir[67].

Molekülde serbest bir elektronun yer değiştirmesiyle mor-menekşe rengi oluşmaktadır. DPPH’in indirgenmiş formu şöyle oluşur: Hidrojen atomu verebilen antioksidan ile DPPH’in karıştırılması sonucu koyu menekşe renk kaybolur. Proton transferi 517 nm’deki absorbandsın azalmasına neden olur. Spektrofotometre ile absorbands sabitlenene kadar bu olay takip edilir[68, 69]. Protonu alan DPPH-H indirgenmiş haldedir. A<sup>•</sup> ise oluşturulan ilk serbest radikaldir. DPPH radikal temizleme yöntemi basit ve hızlı bir yöntemdir. Antioksidanlar bazen peroksil radikalleri ile hızlı reaksiyona girerken DPPH ile yavaş reaksiyona girebilir, hatta hiç reaksiyon vermeyebilir[70, 71, 66].



Şekil 2. 12. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikalinin kimyasal yapısı.

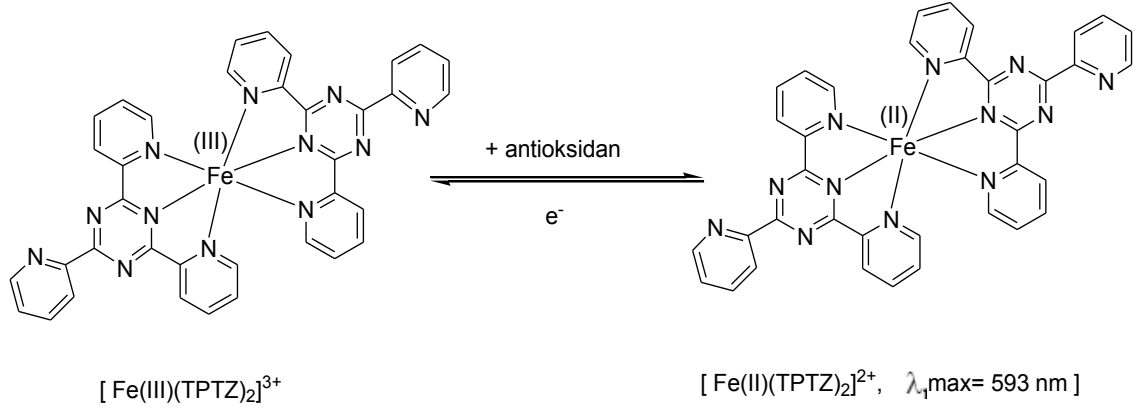


**Şekil 2. 13.** Antioksidan-DPPH radikali tepkime mekanizması

### 2.7.2. Fe-III İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi Yöntemi (FRAP)

Düşük pH'da  $Fe^{3+}$ 'ün  $Fe^{2+}$ 'ye indirgenmesi sonucu renkli ferröz-tripiridiltriiazin kompleksi oluşur. Oluşan demir tuzu oksidan olarak kullanılmaktadır[72].  $Fe^{3+}$ 'ün redoks potansiyeli yaklaşık 0,70 V'dir ve asidik ortamda gerçekleştirilir[68, 66]. Asidik ortamdaki antioksidanlar ferrik- tripiridiltriiazin kompleksini  $Fe^{2+}$ 'ye indirger ve renkli bir çözelti oluşturur. Oluşan bu çözelti de 595 nm'de okunan absorbandsa artış oluşturur. Elde edilen sonuçlar Troloks eşiti olarak da ifade edilir[73]. FRAP yöntemi sadece demir iyonunu temel aldığından, mekanik ve fizyolojik antioksidan aktivitesi için uygun görülmemiştir. FRAP yönteminin avantajları basit, hızlı ve ucuz olması, özel aletler gerektirmemesidir[70, 71]. Dezavantajı ise okside olabilen substrat içermediği için antioksidanların koruyucu özellikleriyle ilgili bilgi içermemesidir[72, 66].

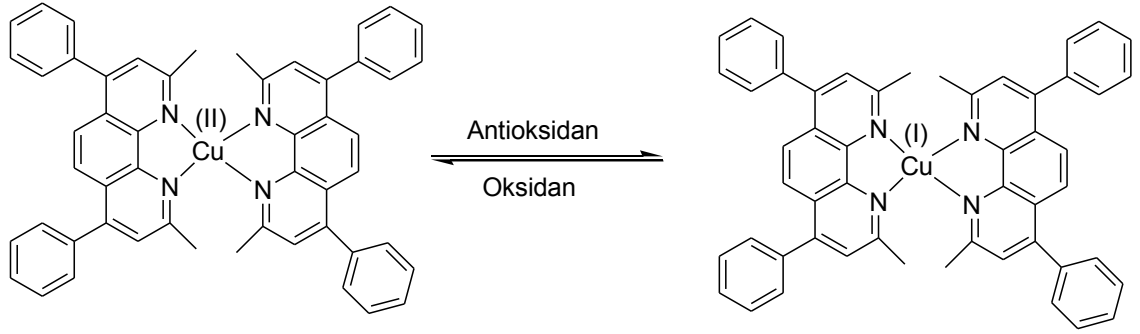




**Şekil 2. 14.** FRAP reaktifi ile antioksidan bileşik arasındaki etkileşimin gösterimi.

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

CUPRAC yönteminin temelinde Cu(II)'nin numunedeki antioksidanlar tarafından Cu(I)' e indirgenmesi yatmaktadır. Kromojenik ayıraç olarak bathocuproin diğer ismi 2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantolin kullanılmaktadır. Bu ayıraç Cu(I) ile 2:1 oranında kompleks oluşturmaktadır ve 490 nm de maksimum absorbansa sahiptir[66, 68]. CUPRAC yönteminde de Troloks ya da Troloks' a benzer madde ile karşılaştırma yapılmaktadır. Bu yöntemde Cu-II çözeltisi, kromojenik ayıraçın alkoldeki çözeltisi ve pH=7'de amonyum asetatın tampon çözeltisinin sulu hali ile karıştırılmaktadır[74]. CUPRAC yönteminin avantajı, 10 dk'lık bir süre gerektiren çok hızlı bir yöntem olmasıdır. Ürik asit, askorbik asit, gallik asit ve kuersetin gibi moleküller için CUPRAC yöntemi birkaç dakikada sonuçlanırken, daha kompleks moleküller için 30-60 dk gerekmektedir[70]. Bu yöntem için kullanılan ayıraçlar ucuzdur ve yöntemin uygulanması için uzmanlık gerekmemektedir. Bakır reaksiyonunun kinetikleri demirden daha hızlıdır.



**Şekil 2. 15.** Cu(II)' nin antioksidan madde ile Cu(I)' e indirilmesi

#### 2.7.4. Toplam Fenolik Madde Tayin Yöntemi (Folin-Ciocalteu)

Folin-Ciocalteu yöntemi fenolik bileşikler ve indirgeyici bileşiklerden molibden'e elektron transferine dayanan bir yöntemdir. Mavi renkli kompleks oluşmaktadır. 750-765 nm'de absorban ölçümü yapılır. Bu yöntemde genellikle gallik asit (mg/mL veya µg/mL) standart bileşik olarak kullanılır. Folin-Ciocalteu yöntemi fenolik olmayan birçok bileşik tarafından da indirgenemediği için fenolik bileşikler için spesifik değildir. Bu nedenle "toplam fenolik madde" belirlenmesi için çok da uygun değildir [71]. Aslında bu yöntem protein analizi için tasarlanmıştır. Daha sonra Singleton ve arkadaşları şaraptaki toplam fenollerini ölçmek için geliştirmişlerdir[68]. Gıdaların antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde Folin-Ciocalteu yöntemi basit, tekrarlanabilir ve güvenilir bir yöntemdir. Folin-Ciocalteu ayracı ticari olarak satılmaktadır. Bu yöntemin uygulanması uzun zaman gerektirdiğinden analizler için uygulanmasını zorlaştırmaktadır. Sulu fazda gerçekleştirildiğinden dolayı lipofilik bileşikler için uygulanmamaktadır[66, 68, 71].

## 2.8. Çalışma Materyali Hakkında Bilgi

Kelemen Keçir bitkisi; Tüylü uzun ömürlü bitki; kök 30-60 cm, özellikle temeline doğru çok çukurlu (girintili). Temel yaprakları tüy yapraklı, ana hatları boyu eninden uzun; esas boyutları 6-10x3cm, Çiçekleri sarı; stili yaprak dökendir.



**Resim 2.3.** *Malabaila dasyantha* (Kelemen Keçir) Bitkisi (Yrd.Doç.Dr. Doğan İlhan arşivi).



**Resim 2.4.** *Malabaila dasyantha* (Kelemen Keçir) Bitkisi (Yrd.Doç.Dr. Doğan İlhan arşivi)

### **3.MATERYAL ve METOD**

#### **3.1.Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar**

##### **3.1.1.Deney Çalışmalarında Kullanılan Kimyasal Maddeler**

Sigma-Aldrich; BHT, DPPH, Troloks, metanol, etanol (% 99,8 saflıkta).

Fluka; Folin-Ciocalteu reaktifi (2N), Neocuproine, Bakır(II) klorür dihidrat, DPPH

Merck; HCl, etanol (% 99,8 saflıkta).

##### **3.1.2. Deney Çalışmalarında Kullanılan Kimyasal Cihazlar**

RETSCH AS 200 model Elek, IKA A11 BASIC model Değirmen, SARTORIUS CP 224s Analitik Terazı, HEIDOLPH LABORAT 4000 Evaporatör, BANDELIN SONOREX model 50/60 Hz 180/640 watt (Germany) Ultrasonik Banyo, BINDER ED 53 Etüv, THERMOSPECTRONIC HELIOS  $\alpha$  UV/VIS Spektrofotometre, HANNA Ph 206 pH metre, YELLOW LINE model vorteks cihazı, BIOHIT PROLINE; GILSON; GENEX BETA; otomatik mikro pipetler (20-200  $\mu$ L ve 10-100- 1000  $\mu$ L), Azot gazı ve tüpü, +4 °C BOSCH buzdolabı, 1cm'lik 1,5 ml'lik kuvars küvetler kullanıldı.

#### **3.2. Numune Hazırlama**

*M. dasyantha*, bitkisine ait numuneler, Haziran 2013 döneminde Kars ili, Susuz ilçesinde toplandı. Güneş ışığı ve nemden korunarak karanlık bir ortama alınıp, yaprak kısımları kurutuldu. Kuruyan yaprak kısımları önce mekanik yöntemlerle yaklaşık 0,5-1 cm büyüklüğüne kadar küçültüldü. Sonra da IKA A11 basic model bir değirmende öğütüldüler. RETSCH AS 200 model bir elek kullanılarak numuneler çeşitli parçacık büyüklüklerine ayrıldılar. Numuneler koyu renkli şişelere alındı ve şişelerin boş kısımlarındaki hava azot gazı ile değiştirilerek hava almayacak şekilde kapakları kapatıldı. Numuneler daha sonra deneylerde kullanılmak üzere +4 °C de buzdolabında karanlık bir ortamda muhafaza edildi.

### **3.3.Ekstraksiyon Deneyleri**

#### **3.3.1. Soxhlet Ekstraksiyonu**

Parçacık boyutu 125 µm'den küçük numunelerden 0,1 mg hassasiyet ile tartılmış yaklaşık 5 gram alınarak ekstraksiyon çözücüsü (metanol) ile yıkanan kartuş içerisine konuldu. Kartuş 100 mL hacmindeki Soxhlet ekstraksiyon kabı içerisine yerleştirildi. Kaynama balonuna 150 mL kadar ekstraksiyon çözücüsü (metanol) konularak renkli sifon gelmeyinceye kadar yaklaşık 8 saate kadar ekstrakte edildi. Elde edilen ekstrakt, mavi band süzgeç kağıdından süzülüp, yabancı partiküller uzaklaştırıldı ve balonlardaki döner buharlaştırıcı (rotary evaporatör) ile 35-45 °C 'de çözücüleri uçuruldu. Balonlardaki kuru ekstraktlar en az 12 saat desikatörde bekletildikten sonra sabit tartıma hazırlanmış oldu ve 0,1 mg hassasiyette tartıldı. Tartılan ekstraktlar 50 mL'lik balon jöjelerde çözücüyle (metanol) çözülerek stok çözeltileri hazırlandı. Elde edilen stok çözeltilerin ışık almamaları ve azot gazından geçirilerek yabancı maddelerle reaksiyonları önlenildi. Analizlerde kullanmak için +4° C' de bir soğutucuda saklandı. Bu işlemler 3'er paralel şekilde yapıldı. Aynı işlemler diğer bir ekstaksiyon çözücüsü olan etanol için de yapıldı.

#### **3.3.2. Ultrasonik Banyo Ekstraksiyon**

Parçacık boyutu 125µm'den daha küçük numuneler kullanılarak ultrasonik banyo ekstraksiyonu uygulandı. Ultrasonik dalga ekstraksiyon işlemi için; 0,1mg hassasiyetle tartılmış 5 gram numune 250 mL'lik erlene konuldu. Üzerine 100 mL ekstraksiyon çözücüsü olan metanol eklendi. Ağız kapatılıp, 25-30°C sıcaklığa ayarlanan ultrasonik banyoda 30 dk süreyle ekstrakte edildi. Elde edilen ekstrakt süzgeç kağıdı yardımıyla süzülerek katı kısmın üzerine 100 mL daha çözücü (metanol) eklendi ve ultrasonik banyoda bu sefer 15 dk süreyle ekstrakt edildi. İşlemlerin aynısı 5 dk 'lık bir ultrasonik banyo için tekrar yapıldı. Bu işlemler sonucunda elde edilen ekstrakt süzülerek partiküller uzaklaştırıldı. Ardından döner buharlaştırıcı da çözücüleri uçuruldu. Elde edilen kuru ekstraktlar en az 12 saat desikatörde bekletildikten sonra sabit tartıma hazır duruma getirildi. Tartılan ekstarktlar 50 mL'lik balon jöjelerde çözücü ile (metanol) çözülerek stok çözeltiler hazırlandı. Stok çözeltiler azot gazından geçirilip, ışık

almayacak şekilde cam şişelerde +4°C'de muhafaza edildi. İşlemler 3 paralel şekilde yapıldı. Aynı işlemler diğer bir ekstraksiyon çözücüsü olan etanol için de yapıldı.

### **3.4. Antioksidan Aktivite Tayini Metodu Seçimi ve Antioksidan Aktivite Tayini Deneyleri**

Antioksidan aktivite tayinleri için bugüne kadar çok sayıda yöntem geliştirilmiştir[75, 76]. Bu yöntemler, hidrojen atomu transfer (HAT) reaksiyonlarına dayanan yöntemler ve elektron transferine (ET) dayanan yöntemler olmak üzere ikiye ayrılabilir. Hidrojen atomu transferi reaksiyonlarına temeline dayanan yöntemlerin birçoğu azotlu bileşiklerin bozulması sonucu oluşan peroksil radikalleri için antioksidan ve substratın rekabetine dayanan yarışmacı reaksiyonları kullanmaktadırlar. Bu yöntemler arasında şunlar sayılabilir: oksijen radikal absorban kapasitesi (ORAC), toplam radikal yakalayıcı antioksidan parametre (TRAP) ve krosin beyazlatma yöntemleri. Elektron transferi temeline dayanan yöntemler antioksidanın oksidantı indirgemesi sonucu oluşan renk değişimiyle ölçmektedir. Oluşan rengin derecesi örneklerin antioksidan konsantrasyonu ile orantılıdır. Elektron transferi temeline dayanan yöntemler arasında Folin-Ciocalteu Toplam Fenolik Madde Tayini (FCR), DPPH radikal temizleme yöntemi, Fe-III iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi yöntemi (FRAP), Cu-II İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi (CUPRAC) Yöntemi, Troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi (TEAC) yöntemi sayılabilir[77].

Biyolojik numunelerden elde edilen ekstraktların antioksidan aktivitelerinin tayininde, farklı mekanizmalar üzerinden çalışmalarından dolayı her iki reaksiyon türüne ait yöntemlerin kullanılması, iyi bir karşılaştırma yapabilmek açısından önemlidir. Ancak bu çalışmada, hem laboratuvar imkanları hem de uygulama kolaylığı açısından diğerlerine göre ön plana çıkan ET temelli yöntemler olan FCR, DPPH ve CUPRAC yöntemleri tercih edilmiştir.

### 3.4.1. Folin-Ciocalteu Yöntemiyle Toplam Fenolik Madde Tayini

Bu deneylerde standart olarak gallik asit kullanıldı. Gallik asit metanol içerisinde çözülerek 15,63; 31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000 µg/mL konsantrasyonlarında 7 ayrı standart gallik asit çözeltisi hazırlandı. 7 farklı konsantrasyondaki çözeltilerin her birinden 50 µL alınarak 2,5 mL saf su, 250 µL 1:10 oranında seyreltilmiş Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edildi ve vortekslenerek 3 dk sonra 750 µL 75 mg/mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi ilave edildi. Vorteksleme işleminden sonra 2 saat beklendi ve THERMOSPECTRONIC Helios α marka UV cihazı kullanılarak 765 nm’de absorbans değerleri okunuldu. Gallik asit standartlarının konsantrasyonları absorbans farklarına karşı grafiğe geçirilerek, kalibrasyon grafiği elde edildi. Aynı prosedür, her bir ekstraksiyon metodu için elde edilen üç paralel stok çözeltiden alınan eşit miktarların karıştırılması suretiyle oluşturulan sabit konsantrasyonlu ortak çözeltiye de uygulandı. Bu çözeltiden hazırlanan üç paralelin 765 nm’de absorbansları okundu. Kör olarak saf su kullanıldı ve kör absorbansı A1, üç paralelin absorbans ortalaması A2 olmak üzere

$$\Delta A = A2 - A1$$

eşitliği kullanılarak absorbans farkları hesaplandı. Absorbanslar gallik asit doğru denkleminde “y” bilinmeyeninin yerine yerleştirilip yapılan seyreltmeleri de dikkate almak suretiyle orijinal numunenin toplam fenolik madde içeriği mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/100 g hava kurusu numune olarak verildi.

### 3.4.2. DPPH Radikal Giderme Yöntemiyle (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)

#### Antioksidan Aktivite Tayini

Önceden hazırlanmış stok çözeltilerden seyreltme yoluyla konsantrasyonları 15,63; 31,25; 62,5; 125; 250; 500;1000 µg/mL olan çözeltiler hazırlandı. Seyreltilen numune ekstraktlarından 750 µL ve metanol çözeltisinde hazırlanmış DPPH radikalinin 1.10<sup>-4</sup> M’lık çözeltisinden de 750 µL miktarlarında alınıp karıştırılarak vortekslendi ve karanlık ortamda 50 dk inkübasyon süresi için bekletildikten sonra THERMOSPECTRONIC Helios α UV/VIS spektrofotometre cihazı ile 517 nm dalga

boyunda ölçümleri yapıldı. Her bir numunenin üç ayrı paralelinden eşit miktarlar alınıp birleştirilerek konsantrasyon ortalamaları alındı ve bu şekilde absorbansları ölçüldü. Numune körleri için 750 µL numune alınıp üzerine aynı miktarda DPPH çözeltisinin çözücüsü olan metanol ilave edildi. Kontrol çözeltisi de üç paralel olarak hazırlandı. Kontrol tüplerine 100 µM'lik DPPH çözeltisinden 750 µl ve 750 µL DPPH çözeltisinin çözücüsü olan metanol konuldu ve 50 dk sonra 517 nm'de absorbansları okundu. Karşılaştırma maddesi olarak kullanılan BHT ve Trolox için de 15,63; 31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000 µg/mL konsantrasyonlarında hazırlanan çözeltilere de aynı işlemler uygulanarak absorbansları spektrofotometrede okundu. Elde edilen absorbans değerlerinin ortalamasından körlerin ortalaması çıkartılarak standartlar ve numuneler için konsantrasyonlara karşı absorbans farkları grafiğe alındı. Bu şekilde elde edilen kalibrasyon grafiklerinden IC<sub>50</sub> (radikal konsantrasyonunu yarıya düşüren numune konsantrasyonu değerleri) hesaplandı. IC<sub>50</sub> değerleri, kontrol çözeltilerine karşılık gelen absorbansların ortalamalarının ikiye bölünmesi ile elde edilen değerlerin kalibrasyon grafiğinin doğru denkleminde “y” değeri yerine konulmasıyla karşılık gelen konsantrasyondan bulundu. % Radikal giderme oranları ise:

$$\% \text{ Radikal süpürme} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \text{ eşitliği kullanılarak hesaplandı.}$$

A<sub>0</sub>; Kontrol çözeltilerinin absorbans ortalaması

A<sub>1</sub>; Numune absorbanslarının ortalamasından kör absorbansı farkı

### **3.4.3. Cu-II İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi Yöntemiyle (CUPRAC)**

#### **Antioksidan Aktivite Tayini**

10<sup>-2</sup>M Cu (II) için, CuCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O'den 0,4262 g tartılıp su ile 250 mL'ye tamamlandı. 1 M NH<sub>4</sub>AC'dan (pH=7) 19,27 g tartılıp alındı ve su ile 250 mL'ye tamamlandı. 7,5x10<sup>-3</sup>M Neocuproin (Nc) çözeltisi için 0,0390 g'lık Neocuproin (2,9-dimethyl-1,10-fenantrolin) tartılıp % 96'lık etil alkolde çözülerek 25 mL'ye seyreltildi. Karşılaştırma maddesi olarak % 96'lık etil alkolde hazırlanmış 10<sup>-3</sup> M troloks çözeltisi kullanıldı. Cu(II) çözeltisi, Nc çözeltisi ve amonyum asetat tamponundan sırasıyla 1'er mL alınıp bir tüp içerisinde karıştırıldı. Tüpteki karışım üzerine (x) mL örnek çözeltisi (veya standart madde) ve (1,1-x) mL su ilave edilerek toplam hacim 4,1 mL'ye tamamlandı ve



vortekslendi. Tüpler kapakları iyice kapatılarak karanlık ortamda bir saat süreyle beklemeye alındı. Daha sonra 450 nm’de köre karşı absorbansları okundu.

Troloks’un metanoldeki çözeltisinden de 0,5 mL, 0,1 mL, 0,15 mL, 0,2 mL, 0,25 mL alınıp üzerlerine sırasıyla 1’er mL Cu(II), Nc, NH<sub>4</sub>Ac çözeltilerinden eklendi ve hacmin 4,1 mL’ye tamamlanması için (1,1-x) mL saf su ilavesi yapıldı. Kör için antioksidan maddeler yerine su kullanılıp 1 saat bekleme süresinden sonra 450 nm’de absorbanslar okundu. Okunan absorbans değerleri kalibrasyon doğru denkleminde yerine yazılarak  $\epsilon$  (Molar absorptivite) değeri hesaplandı. Numuneler için elde edilen fark absorbans değerleri ve troloks için elde edilen  $\epsilon$  değeri kullanılarak her bir paralel numunenin antioksidan kapasitesi değerleri mmol (veya  $\mu$ mol) TEAK/g hava kurusu numune olarak ifade edildi.

## 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 4.1. Ekstraksiyonlardan Elde Edilen Verim Yüzdeleri

*M. dasyantha* bitkisi numunelerinin çözücü olarak metanol ve etanol kullanmak suretiyle gerçekleştirilen Soxhlet ve Ultrasonik Banyo ekstraksiyonlarına ait ekstraksiyon verimi hesaplandı ve aşağıdaki Tablo 4.1.'de verildi.

Ekstraksiyon verim yüzdeleri:

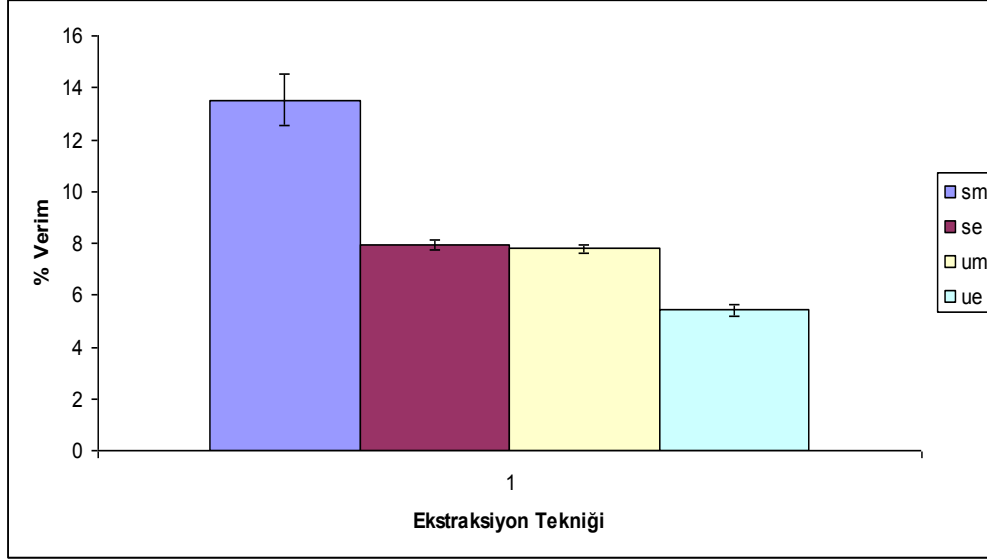
$$\% \text{ Verim} = [\text{Kuru Ekstrakt Miktarı}/\text{Havada Kuru Numune Miktarı}] \times 100$$

eşitliği kullanılarak hesaplandı

**Tablo 4.1.** Ekstraksiyonlardan elde edilen verim yüzdeleri

Ekstrakt	% Ekstraksiyon Verimi
S-M	13,53 ± 0,97
S -E	7,94 ± 0,22
U-M	7,79 ± 0,15
U-E	5,42 ± 0,24

Tablo 4.1.'de verilen verim yüzdeleri sütun grafik haline getirilerek Şekil 4.1.'de verilmiştir.



**Şekil 4.1.** Ekstraksiyonlardan elde edilen verim yüzdeleri

Tablo 4.1 ve Şekil 4.1’de elde edilen bulgulara bakıldığında çözücü olarak metanol kullanıldığında verimin her durumda daha yüksek olduğu, teknik olarak ise Soxhlet ekstraksiyonunun veriminin daha yüksek olduğu ilk anda göze çarpmaktadır. Soxhlet ekstraksiyonunda çözücü olarak metanol kullanıldığında verim % 13,53±0,97; çözücü olarak etanol kullanıldığında ise verim % 7,94±0,22; Ultrasonik Banyo ekstraksiyonu için çözücü olarak metanol kullanıldığında verim % 7,79±0,15; çözücü olarak etanol kullanıldığında ise verim % 5,42±0,24 olarak bulundu.

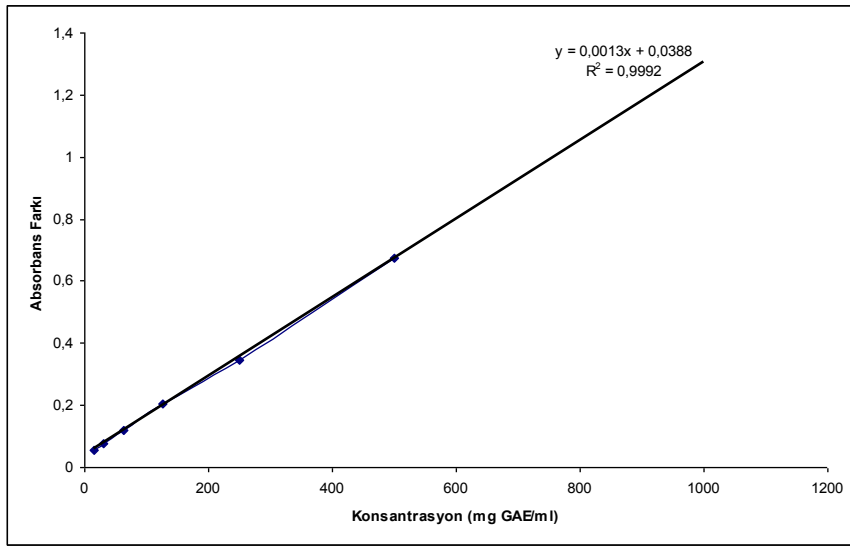
İstatistiksel çalışmalarda uygulanan Student’s t-Testi sonuçlarına göre, çözücü aynı olduğunda, Soxhlet ekstraksiyonunun verim yüzdelerinin ultrasonik banyo ekstraksiyonlarına göre anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Çözücü karşılaştırmalarında ise, teknik aynı olduğunda, çözücü olarak metanol kullanılmasının, ekstraksiyonların verim yüzdelerini anlamlı derece de artırdığı gözlenmiştir ( $p < 0,05$ ).

#### **4.2.Toplam Fenolik Madde Tayini Deneylelerinden Elde Edilen Bulgular**

Numunelerin Folin-Ciocalteu yöntemi uygulanarak elde edilen toplam fenolik madde içerikleri Tablo 4.2’de, hesaplamalar için hazırlanan kalibrasyon grafiği ise Grafik 4.1’de gösterilmiştir. Hazırlanan kalibrasyon grafiği için gallik asit kullanılmıştır.

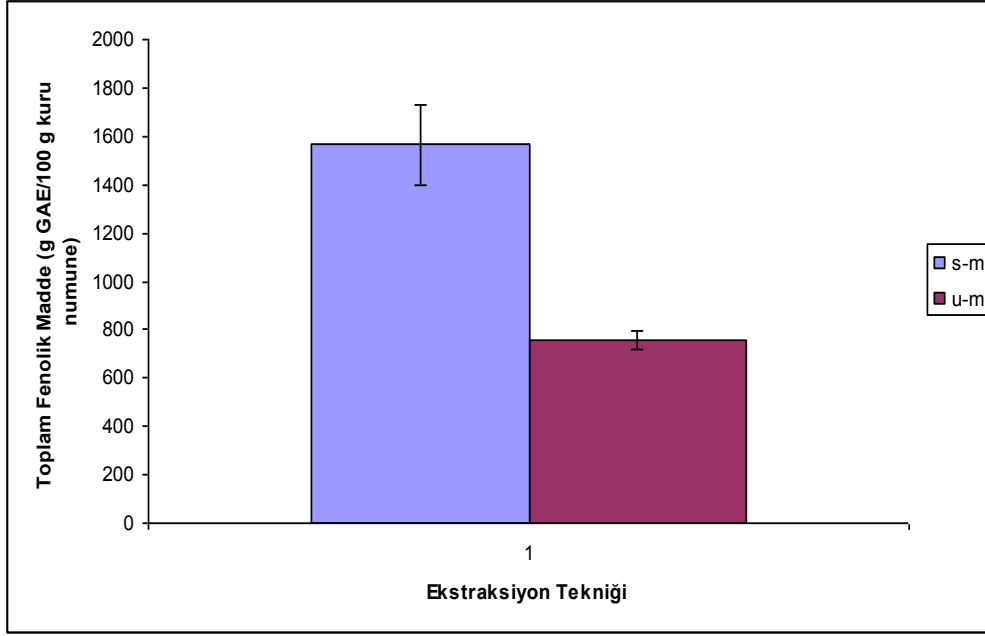
**Tablo 4.2.** Ekstraktların toplam fenolik madde içerikleri

Ekstrakt	Toplam Fenolik Madde Miktarı (mg GAE/100 g kuru numune)
S-M	1564,45±165,35
S-E	890,02±43,35
U-M	756,64±35,28
U-E	467,81±17,72

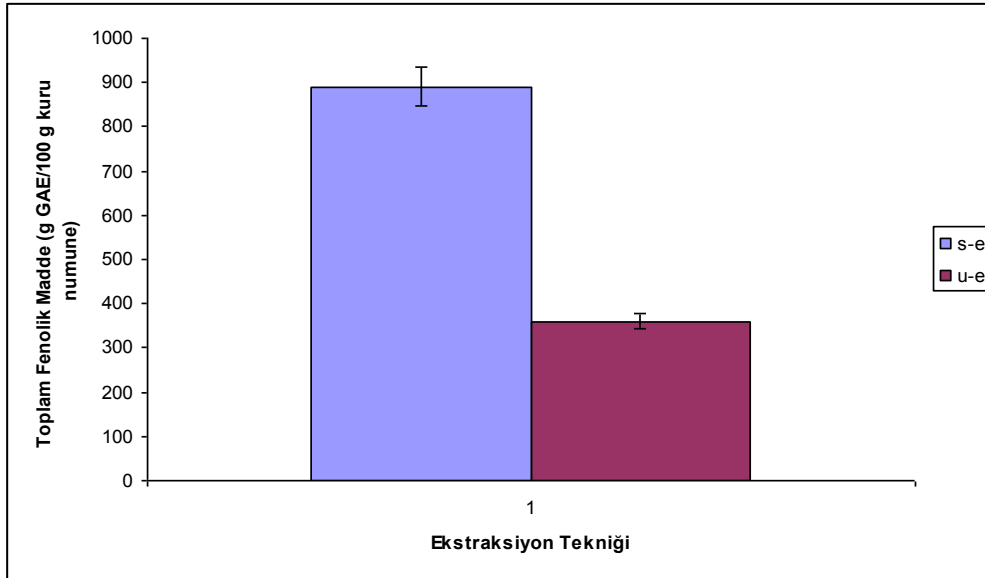


**Grafik 4.1.** Toplam fenolik madde tayini için kullanılan kalibrasyon grafiği

Karşılaştırma kolaylığı açısından, Tablo 4.2’de verilen verim yüzdeleri sütun grafik haline getirilerek Şekil 4.2 ve Şekil 4.3’te verilmiştir.



**Şekil 4.2.** Toplam fenolik madde tayininde çözücü olarak metanol kullanıldığında elde edilen sonuçlar



**Şekil 4.3.** Toplam fenolik madde tayininde çözücü olarak etanol kullanıldığında elde edilen sonuçlar

Soxhlet ekstraksiyonunda çözücü olarak metanol kullanıldığında 1564,45±165,35 mg GAE/100 g kuru numune, çözücü etanol olduğunda ise 890,02±43,35 mg GAE/100 g kuru numune toplam fenolik madde içeriğine ulaşıldı. Ultrasonik Banyo ekstraksiyonu için çözücü olarak metanol kullanıldığında 756,64±35,28 mg GAE/100 g kuru numune; çözücü olarak etanol kullanıldığında ise 467,81±17,72 mg GAE/100 g kuru numune toplam fenolik madde içeriği bulunmuştur.

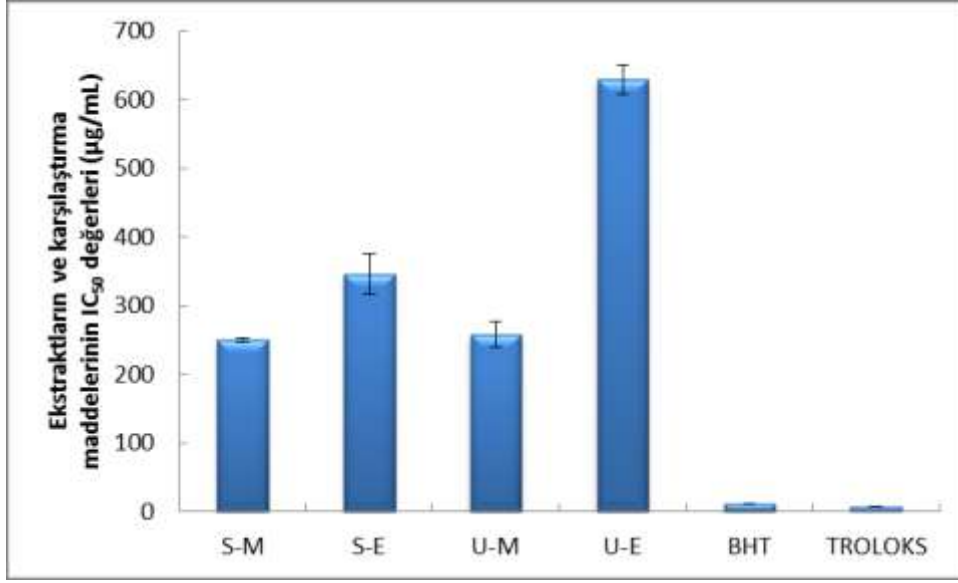
Tablo 4.2. ve Şekil 4.2.-4.3'e bakıldığında teknikler açısından Soxhlet'in, çözücüler açısından da metanol'un daha yüksek "Toplam Fenolik Madde" miktarları ortaya koyduğu görülmektedir. %95 güven seviyesinde Student's t-Test kullanılarak yapılan istatistiksel çalışma sonuçlarına göre, toplam fenolik madde içeriği açısından hem teknikler arasında, hem de çözücüler arasında anlamlı farklar bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Buna göre, çalışılan şartlar altında Soxhlet tekniği ultrasonik banyo yöntemine göre, metanol de etanol çözücüsüne göre daha yüksek toplam fenolik madde içeriği ortaya koymuştur.

#### **4.3. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Radikal Giderme Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini Deneylerinden Elde Edilen Bulgular**

*M. dasyantha* bitkisinden elde edilen her bir ekstraktın ve karşılaştırma maddeleri olan BHT ve Troloks'un, DPPH konsantrasyonunun yarısını temizlemek için gerekli olan konsantrasyonları (% 50 temizleme- $IC_{50}$  değerleri) değerleri Tablo 4.3'te verilmiştir. Tablo 4.3'teki değerlerden hazırlanan sütun grafik ise Şekil 4.4'te verilmiştir.

**Tablo 4.3.** Ekstraktların ve karşılaştırma maddelerinin  $IC_{50}$  değerleri ( $\mu\text{g/mL}$ )

<b>Ekstrakt</b>	<b><math>IC_{50}</math> Değeri (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
S-M	250,08±2,78
S-E	345,80±29,51
U-M	258,39±18,32
U-E	629,30±21,47
BHT	12,26±0,37
TROLOKS	7,53±0,10



**Şekil 4.4.** Ekstraktların ve karşılaştırma maddelerinin karşılaştırmalı IC<sub>50</sub> değerleri

Tablo 4.3 ve Şekil 4.4'ten de görüldüğü gibi, en yüksek DPPH radikali süpürme değerlerini karşılaştırma maddeleri olan BHT ve troloks sergilemişlerdir (Sırasıyla 12,26±0,37 ve 7,53±0,10 µg/mL). 250,08±2,78 µg/mL ile metanolik Soxhlet, 258,39±18,32 µg/mL ile metanolik ultrasonik Banyo, 345,80±29,51 µg/mL ile etanolik Soxhlet, 629,3±21,47 µg/mL ile etanolik ultrasonik Banyo sırasıyla bu değerleri takip ettiler. Burada daha düşük IC<sub>50</sub> değerinin daha yüksek radikal süpürme aktivitesine, dolayısıyla da daha yüksek antioksidan aktiviteye karşılık geldiği unutulmamalıdır.

% 95 güven seviyesinde ekstraktların antioksidan aktiviteleri karşılaştırma maddelerinkilerden anlamlı derecede daha düşük çıkmıştır (p<0,05). Ekstraktların kendi aralarında yapılan karşılaştırma testlerinde ise, metanolik ekstraktların etanolik ekstraktlara göre her iki teknikte de anlamlı derecede daha yüksek antioksidan aktivite sergilediği bulunmuştur (p<0,05). Çözücü metanol olduğunda teknikler arasında anlamlı bir fark gözlenmemiş (p>0,05), etanol ekstraktları ise her iki teknik açısından oldukça farklı sonuçlar ortaya koymuştur (p<0,05).

Buna göre, *M. dasyantha* bitkisinden antioksidan etkili ekstraktlar eldesinde, çözücü olarak metanol'ün, ekstraksiyon tekniği olarak da, her ikisi de aynı sonucu vermelerine rağmen, kullanım kolaylığı, zaman kazandırıcı olması, daha az çözücü kullanımı ve oda

sıcaklığında gerçekleştirilebilmesi gibi avantajları göz önünde bulundurularak ultrasonik banyo tekniğinin optimum şartları sunduğu söylenebilir.

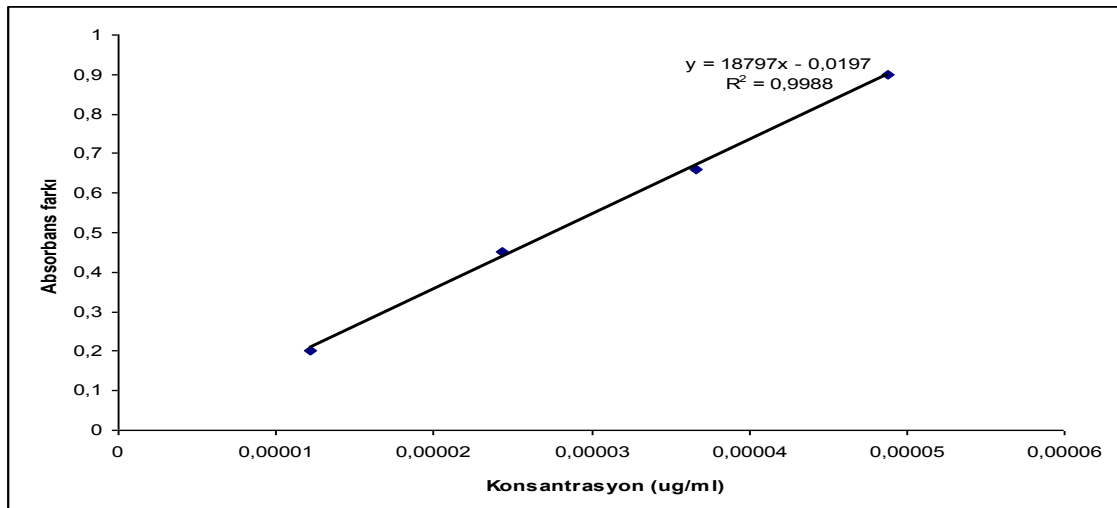
#### 4.4. Cu-II İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi Yöntemiyle (CUPRAC)

##### Antioksidan Aktivite Tayini Deneylelerinden Elde Edilen Bulgular

*M. dasyantha* bitkisine ait ekstraktların Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi (CUPRAC) tayini testlerinden elde edilen sonuçlar Tablo 4.4 ve Şekil 4.5-4.6'da verilmiştir. Kalibrasyon grafiği Troloks'un metanollü çözeltileri kullanılarak hazırlanmıştır (Grafik 4.2).

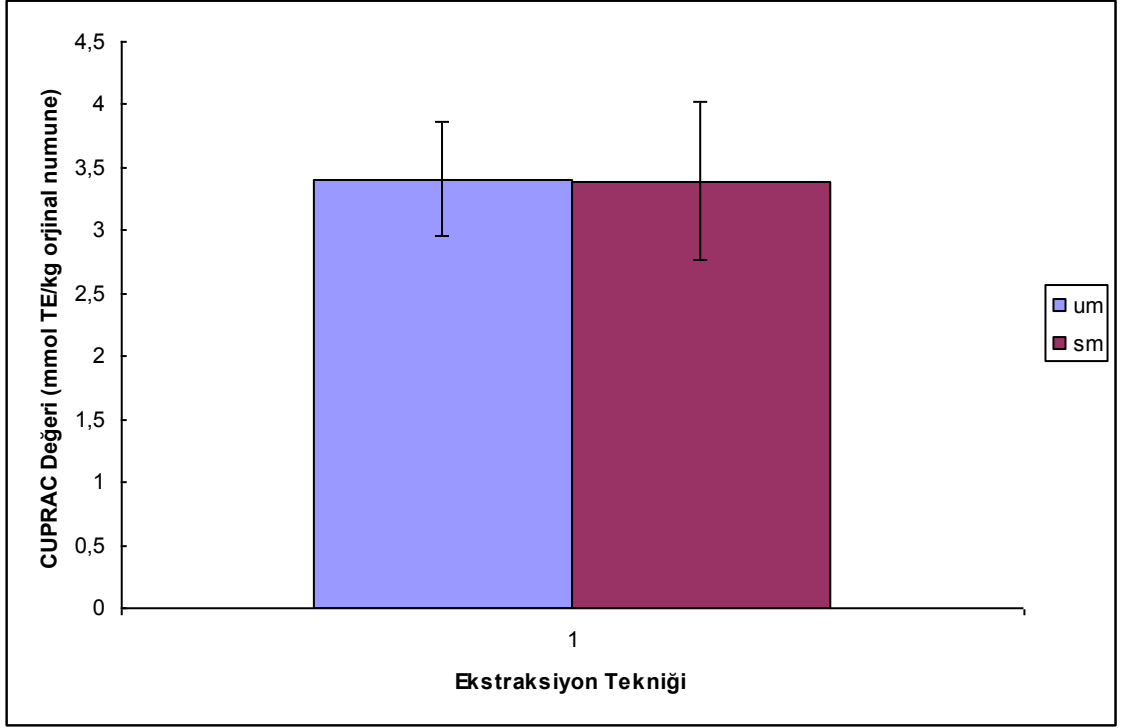
**Tablo 4.4.** Bakır-II iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi (CUPRAC) deneylerinden elde edilen sonuçlar

Ekstrakt	CUPRAC değeri (mmol TEAK/Kg kuru numune)
S-M	3,39±0,63
S-E	2,04±0,17
U-M	3,41±0,46
U-E	1,73±0,18

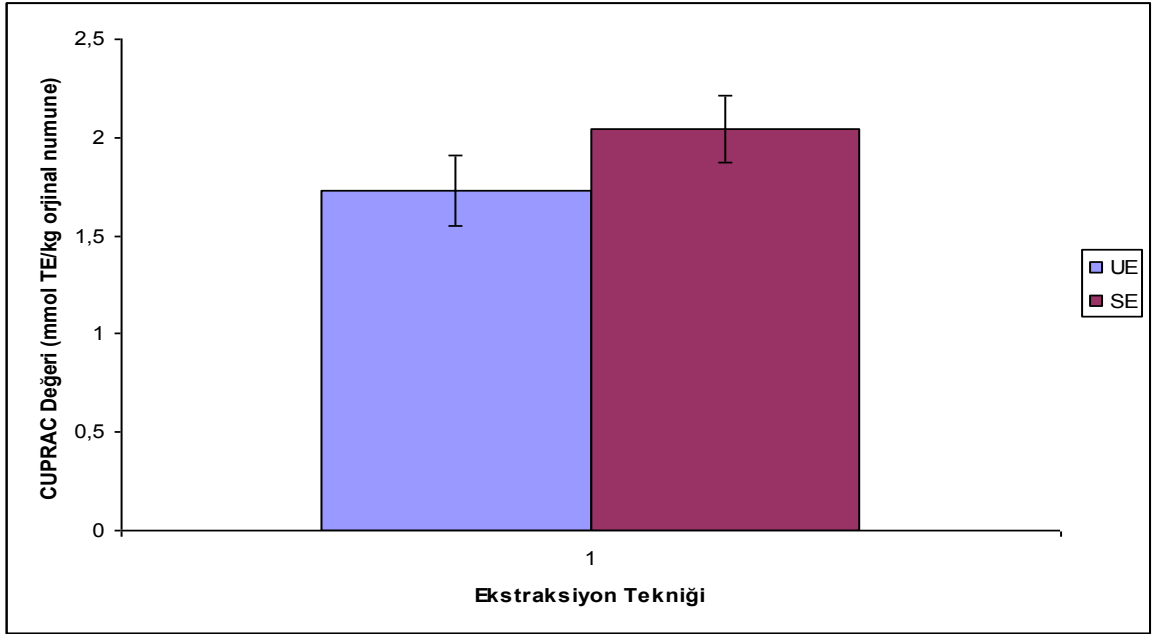


**Grafik 4.2.** CUPRAC deneylerinde kullanılan ve Troloks standardı ile elde edilen kalibrasyon grafiği





**Şekil 4.5.** Bakır-II İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi (CUPRAC) Deneylerinde Metanolik Ekstraktlar İçin Elde Edilen Sonuçlar



**Şekil 4.6.** Bakır-II İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi (CUPRAC) Deneylerinde Etanolik Ekstraktlar İçin Elde Edilen Sonuçlar

Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi (CUPRAC) testlerinde  $3,41\pm 0,46$  mmol TEAC/Kg kuru numune ile metanolik ultrasonik banyo ekstraktı en yüksek değeri sergiledi. Bunu sırasıyla  $3,39\pm 0,63$  mmol TEAC/Kg kuru numune ile metanolik Soxhlet ekstraktı,  $2,04\pm 0,17$  mmol TEAC/Kg kuru numune ile etanolik Soxhlet ekstraktı,  $1,73\pm 0,18$  mmol TEAC/Kg kuru numune ile etanolik ultrasonik banyo ekstraktı takip etmiştir.

Tablo 4.4'te ve şekil 4.5-4.6'dan da DPPH testlerinin sonuçlarını destekleyen veriler elde edilmiştir. Buna göre, her iki çözücüde de Soxhlet ve ultrasonik banyo ekstraktları arasında CUPRAC değerleri açısından anlamlı bir fark gözlenmedi ( $p>0,05$ ). Çözücüler karşılaştırıldığında ise her iki teknikle elde edilen metanolik ekstraktların CUPRAC değerlerinin etanolik ekstraktlarından anlamlı derecede daha yüksek olduğu bulundu ( $p<0,05$ ).

Bu sonuçlara göre de, *M. dasyantha* bitkisinin ekstraksiyonunda çözücü olarak metanol kullanılması, elde edilen ekstraktların antioksidan kapasitesine olumlu katkıda bulunmaktadır. Ayrıca Soxhlet yerine yukarıda avantajları sayılan ultrasonik banyo tekniğinin kullanılması da oldukça uygun bir seçenek olarak gözükmektedir.

## 5. SONUÇ

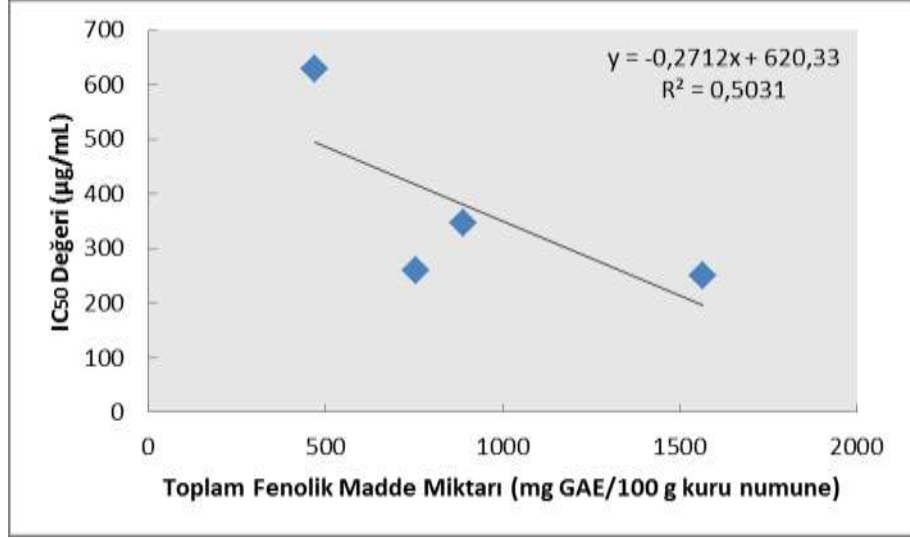
Yapılan çalışmada Doğu Anadolu Bölgesinin karakteristik bir bitki türü olan *M. dasyantha*'nın kurutulmuş ve öğütülmüş yaprak numunelerine, metanol ve etanol çözücüleri kullanılarak, Soxhlet ve ultrasonik banyo ekstraksiyon tekniklerinin uygulanmasıyla elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde içerikleri ve antioksidan aktiviteleri tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlar şu şekilde özetlenebilir:

- Ekstraksiyon verimleri incelendiğinde, Soxhlet tekniğinin her iki çözücü durumunda da ultrasonik banyo tekniğine göre daha yüksek verim yüzdeleri ortaya koyduğu belirlenmiştir ( $p < 0,05$ ). Metanol'ün de, etanole göre daha etkili bir çözücü olduğu söylenebilir.
- Elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde içerikleri, teknik ve çözücü açısından karşılaştırıldığında Soxhlet tekniği ultrasonik banyo tekniğinden, metanol de etanolden daha yüksek değerler ortaya koymuştur ( $p < 0,05$ ). Bunun Soxhlet tekniğinin daha uzun süre ile ve daha yüksek bir sıcaklıkta gerçekleştirilmesi, metanol çözücüsünün de etanol'e göre daha yüksek bir polariteye sahip olmasının bir sonucu olduğu düşünülebilir.
- DPPH radikal süpürme testi deneylerinde metanolik ekstraktlar, etanolik ekstraktlara göre anlamlı derecede daha yüksek antioksidan aktivite sergilediler ( $p < 0,05$ ). Çözücü metanol olduğunda teknikler arasında antioksidan aktiviteler açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p > 0,05$ ). Burada dikkat çekici olan husus, Soxhlet metanolik ekstrakt'ın ultrasonik banyo metanolik ekstrakttan yaklaşık iki kat daha yüksek bir toplam fenolik madde içeriğine sahip olmasına rağmen ortaya koydukları  $IC_{50}$  değerleri arasında anlamlı bir fark bulunamamış olmasıdır. Bu durum metanolik ultrasonik banyo ekstraksiyonunda elde edilen toplam fenolik madde içeriğinin, metanolik Soxhlet tekniğinde elde edilen toplam fenolik madde içeriğine göre daha yüksek oranda antioksidan aktif bileşiklerden meydana gelmiş olması ya da Soxhlet tekniğinde elde edilen ekstraktın içeriğinde bulunan ve fenolik bileşik gruplarından herhangi birine dahil olmayan, ancak Folin-Ciocalteu reaktifi ile reaksiyona girebilme yeteneğine sahip başka bileşenler bulunmasına atfedilebilir[71]. Bunun için preparatif HPLC gibi daha ileri düzey analizlere ihtiyaç duyulmaktadır.

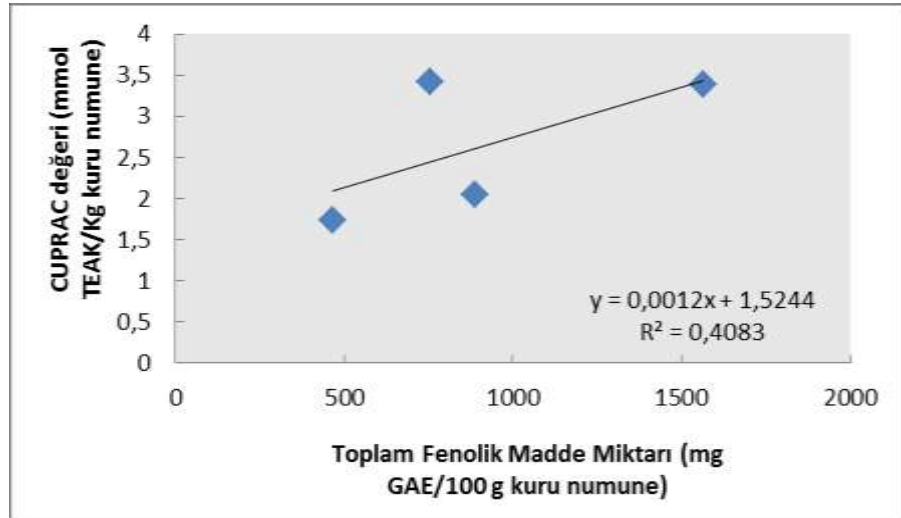
- CUPRAC testlerinde de metanolik ekstraktlar, her iki ekstraksiyon tekniği için etanolik ekstraktlara göre anlamlı derecede daha yüksek değerler ortaya koydular ( $p < 0$ ). Çözücü aynı olduğunda uygulanan teknikler arasında CUPRAC değerleri açısından anlamlı bir fark bulunamadı ( $p > 0,05$ ). Toplam fenolik madde ieriğleri ile birlikte düşünöldüğünde, DPPH testi sonuçları için yukarıda yapılan yorum burada da geçerliliğini korumaktadır.
- Ultrasonik banyo etanol ekstraktının antioksidan aktivitesinin hem DPPH hem de CUPRAC testinde en düşük antioksidan aktivite değerlerini sergilemesi ve toplam fenolik madde içeriğinin de diğer ekstraktlara göre daha düşük bulunması ayrıca incelenmesi gereken bir durumdur. Çünkü bu değer, sabit bir süre için oda sıcaklığında gerçekleştirilen ekstraksiyonlardan elde edilmiş değerdir. Farklı ekstraksiyon süreleri uygulanarak veya biraz daha yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilecek ekstraksiyonlardan, Soxhlet ekstraktlarının sergilediği değerlerine yakın değerler elde edilmesi mümkün olabilir.
- *M. dasyantha* bitkisinden antioksidan aktivite etkili ekstrakt elde etmek için 50 dk süreyle uygulanan metanolik ultrasonik banyo ekstraksiyonunun uygun ve ekonomik bir seçenek olduğu söylenebilir. Bitki ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri, karşılaştırma maddelerine kıyasla orta –düşük düzeyde bulunmuştur. Ancak bu tarz ekstraktların sadece antioksidan değer, antiviral, antibakteriyel, antispazmodik, analjezik, antienflamatuar vb gibi diğer bazı biyoaktif özellikler gösterebilecekleri dikkate alındığında, bu çalışmanın sonuçlarının, elde edilecek diğer literatür bilgisine katkı yapacağı düşünölmektedir.

Toplam fenolik madde içeriği ile antioksidan aktivite arasındaki ilişki pek çok araştırmacı tarafından incelemeye değer bulunan bir durumdur. Bir grup araştırmacı toplam fenolik madde içeriği yüksek olan ekstraktların antioksidan aktivitelerinin de yüksek olacağını öne sürmektedir[78-80]. Bir diğer grup araştırmacı ise, toplam fenolik madde ile antioksidan aktivite arasındaki ilişkinin bu şekilde doğrusallıkla açıklanamayacağını, bu durumun düşünölenenden daha karmaşık bir mekanizmaya sahip olduğunu ifade etmektedirler[81-83].

Bu ilişkinin bu çalışma kapsamında araştırılması amacıyla toplam fenolik madde içeriklerine karşı hem DPPH hem de CUPRAC testlerinde elde edilen antioksidan aktivite değerleri grafiğe geçirilmiştir (Grafik 5.1 ve 5.2).



**Grafik 5.1.** Ekstraktların toplam fenolik madde içeriklerine karşı IC<sub>50</sub> değerleri grafiği



**Grafik 5.2.** Ekstraktların toplam fenolik madde içeriklerine karşı CUPRAC değerleri grafiği

Grafik 5.1 ve 5.2'ye bakıldığında toplam fenolik madde içerikleri ile antioksidan aktivite arasında zayıf bir ilişki olduğu, ya da bu ilişkinin sadece toplam fenolik madde miktarı ile açıklanamayacağı görülmektedir (tayin katsayıları sırasıyla 0,5031 ve 0,4083. Bu bulgu yukarıda bahsi geçen araştırmacılardan ikinci grubun görüşüne uygun

düşmektedir. Ayrıca, sadece moleköl yapısı belirli ve belirli pozisyonlarda hidroksil grupları içeren flavonoidlerin hidrojen atomu verdiği ve antioksidan aktivite gösterdiği de bilinmektedir[84]. Bu nedenle bu ilişkinin açık bir şekilde ortaya konması için daha ileri düzey çalışmalara gerek vardır.

## KAYNAKLAR

- [1]. Akkuş, İ., “Serbest Radikaller ve Fizyoterapik Etkileri”, Mimoza Yayınları, 1. Baskı, Konya, (1995).
- [2]. R.L. Prior,” Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables: Diet and health implications” Horticulture Science, 35, 588-592, (2000).
- [3]. D. D. Bankson et al, “Role of free radicals in cancer and Atherosclerosis” Clin Lab Med, 13(2), 462-81, (1993).
- [4]. D. Bonnefont-Rousselot et al,”Diabetes mellitus, oxidative stress and advanced glycation endproducts”, Ann Pharm Fr., 62(3), 147-57, (2004).
- [5]. G. W. Moe et al, “In vivo tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibition ameliorates cardiac mitochondrial dysfunction, oxidative stress and apoptosis in experimental heart failure” Am J Physiol Heart Circ Physiol, 17,( 2004).
- [6]. Ho C.J., Zheng S., Comhair S.A., “Differential expression of manganese superoxide dismutase and catalase in lung cancer”, Cancer Res., S.C., 61(23), 8578-85, (2001).
- [7]. Gromadzinska J, Wasowicz W, Rydzynski K, Biol Trace Elem Res.;91(3):203-15, (2003)Mar.
- [8]. Davies K.J.A. “Davies, Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems ”, International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life, vol. 50, no. 4-5, pp. 279–289, (2000).
- [9]. J.M.C. Gutteridge, “Iron and oxygen: A biologically damaging mixture”, Acta Paediatrica Scandinavica Suppl, 361, 78-85, (1989).
- [10]. Nohl, H., Gille, L., Kozlov, A., “Are mitochondria a spontaneous and permanent source of reactive oxygen species?” Redox Report, Institute for Experimental and Clinical Traumatology, (2003).
- [11]. B. Halliwell, Drug antioxidant effects. Drugs 42(4), 569-605, (1991).
- [12]. Çavdar, C., Sifil, A., Çamsan, T., “Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidan Savunma”, Türk Nef. Diyaliz Ve Transpl. Der., 3-4, 92-95, (1997).
- [13]. D. Dreher, AF. Junod, “ Role of Oxygen Free Radicals in Cancer Development”, Eur. J. Cancer, 32A, 30, (1996).
- [14]. M.K. Zainol et al, “Antioxidant Activity and Total Phenolic of Leaf, Root and Petiole of Four Accessions of Centella Asiatica (L.) Urban”, Food Chem., 81, 575-81, (2003).

- [15]. E.R. Stadtman, "Importance of Individuality in Oxidative Stress and Aging", *Free Radical Biology and Medicine*, 33(1), 37-44, (2002).
- [16]. Bektaşoğlu, B.,
- [17]. H. Sies, "Oxidative stress; oxidants and antioxidants", *Experimental Physiology* 82(2), 291-5, (1997).
- [18]. Mattil, H.A., "Antioxidants" *Annual Review of Biochemistry* 16, 77-92, (1947).
- [19]. German, J.B., "Food processing and lipid oxidation" *Advances in experimental medicine and biology* 459, 23-50, (1999).
- [20]. Lam, L.K. et al "The antioxidants of higher plants" *Phytochemistry*, 27, 969-978, (1988).
- [21]. Almes, B.M., Shigena, M.K., Hagen, T.M., "Oxidants, antioxidant and the degenerative diseases of ageing" *Proceeding of national Academy of Sciences USA*, 90, 7915-7922, (1993).
- [22]. Padayatty, J. Sebastian, Katz, Arie, Wang, Yaohui, Eck, Peter, Kwon, Oran, Lee, Je-Hyuk, Chen, Shenglin, Corpe, Christopher, "Vitamin C as an antioxidant: evaluation of the role of disease prevention." *Journal of the American College of Nutrition* 22 (1), 18-35, (2003).
- [23]. Müftüoğlu O., "Yaşasın Hayat" Doğan Kitapçılık, İstanbul (2003).
- [24]. Osawa, T., Namiki, M.A., "A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of eucalyptus leaves" *Agricultural and Biological Chemistry*, 45, 735-739, (1981).
- [25]. Nishina, A., Kubota, K., Kameoka, H., Osawa, T., "Antioxidizing component, Musizin, in *Rumex japonicus* Houtt" *Journal of the American Oil Chemists Society*, 68, 735-739, (1991).
- [26]. Hudson, B., J., "Food Antioxidants", Elsevier Science, USA. (1990).
- [27]. Fiege, H., Voges, H.W., Hamamoto, T., Umemura, S., Iwata, T., Miki, H., Fujita, Y., Buysch, H.J., Garbe, D., Paulus, W., "Fenol Türevleri" *Endüstriyel Kimya*, Wiley-VCH Ullmann Ansiklopedisi, Weinheim (2002).
- [28]. Mavi, A., "İnsan eritrosit ve lökositlerinden süperoksit dismutaz enziminin saflaştırılması ve bazı ilaçların enzim üzerine etkilerinin incelenmesi" Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, s.52-53, (2005).



- [29]. Branen, A.L., "Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene" *Journal of the American oil chemists Society*, 52, 59-63, (1975).
- [30]. Imaida, K., Fukushima, S., Shivai, T., Ohtani, M., Nakanishi, K., Ito, N., "Promoting activities of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene on 2-stage urinary bladder carcinogenesis and inhibition of  $\gamma$ -glutamyl trans peptidase-positive foci development in the liver of rats" *Carcinogenesis*, 4, 969-978, (1983).
- [31]. Ito, N., Fukushima, S., Hasegawa, A., Shibata, M., Ogiso, T., "Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats" *Journal of the National Cancer Institute* 70, 343-347, (1983).
- [32]. Gülçin, İ., "The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (*Piper nigrum*) seeds" *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 56, 491-499, (2005).
- [33]. Halliwell, B., and Gutteridge, J., "Free Radicals in Biology and Medicine (2nd ed)", pp11- 21. (1996).
- [34]. Amadasi, A., Mozzarelli, A., Meda, C., Maggi, A., Cozzini, P., "Silico ve vitro Yaklaşım Entegre tarafından Gıda Katkı içinde xenoestrogens belirlenmesi" (2009).
- [35]. "Propil Gallat en Değişik Güvenlik Değerlendirmesi Nihai Rapor " *Toksikoloji Dergisi* 26(ek3), 89-118, (2007).
- [36]. Widengren, J., Chmyrov, A., Eggeling, H., Per "Ultrasensitif Floresans Spektroskopisi içinde Photostabilities Geliştirmek için Stratejiler " *Fizikokimya A Dergisi* 111(3), 429-440, (2007).
- [37]. Almedia, ES and Fridens, "Storage stability and corrosive character of biodiesel behavior antioxidant TBHQ Fuel" 90 (11), 3480-3484, (2011).
- [38]. Gharavi N, El-Kadi A., "TBHQ yeni arık hidrokarbon reseptör ligandı sağlanır" *Ding, Metap Dispas* 33(3), 365-72, (2005).
- [39]. Di etil eter, 1ppm inhibitörü olarak BHT; susuz % 99.7 içerir. Sigma Aldrich 2012 Eylül.
- [40]. Önerilen Diyet Ödenek, Gıda ve Beslenme Kurulu, Yaşam Bilimleri Komisyonu, Onuncu Edition Alt Komitesi Ulusal Araştırma Konseyi.
- [41]. <http://echa.europa.eu/documents/10162/296c0932-cf7a-4d90-9051-ba7b224a32b3> (Erişim tarihi: 2014).

- [42]. [<http://www.chem.unep.ch/irptc/sids/OECDSEDS/TERBUTYL.pdf>] (Erişim tarihi: 2014).
- [43]. Michael Ash, Koruyucular El Kitabı, Synapse Bilgi Kaynakları ISBNB (2004).
- [44]. [<http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDS/factsheets/0003fact.pdf>] (Erişim tarihi: 2014).
- [45]. Eskilsson, C.S., Bjorklund, E., “Analytical-scale microwave-assisted extraction” *Journal of Chromatography A*, 902(1) , 227, (2000).
- [46]. Pawliszyn, J., “Sample preparation: Quo Vadis?” *Analytical Chemistry*, 75(11), 543, (2003).
- [47]. R. Kellner, M.M. M. Otto, M. Valcarcel, H.M. Widmer, “Sample Preparation, in *Analytical Chemistry*”, *Modern Approach to Analytical Science*. Wiley: Weinheim. p. 506-508, (2004).
- [48]. Luque-Garcia, J.L., de Castro, M.D.L., “Focused microwave-assisted Soxhlet extraction: devices and applications” *Talanta*, 64(3), 571, (2004).
- [49]. Castro, M.D.L., Priego-Capote, F., “Soxhlet extraction: Past and present panacea” *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2383, (2010).
- [50]. Castro, M.D.L., Garcia-Ayuso, L.E., “Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future”, *Analytica Chimica Acta*, 369(1-2), 1, (1998).
- [51]. Richter, B.E., Jones, B.A., Ezzell, J.L., Porter, N.L., Avdalovic, N., Pohl, C., “Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation”, *Analytical Chemistry*, 68(6), 1033, ), (1996).
- [52]. Mockel, H.J., Welter, G., Melzer, H., “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, (1987).
- [53]. Moreno, E., Reza, J., Trejo, A. “Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil using water under subcritical conditions”, *Polycyclic Aromatic Compounds*, 27(4), 239, (2007).
- [54]. Lundstedt, S., van Bavel, B., Haglund, P., Tysklind, M., Oberg, L., “Pressurised liquid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils”, *Journal of Chromatography A*, 883(1-2), 151, (2000).

- [55]. Rostagno, M.A., Villares, A., Guillamon, E., Garcia-Lafuente, A., Martinez, J.A., Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods. *Journal of Chromatography A*, 1216(1), 2, (2009).
- [56]. Sanchez-Brunete, C., Perez, R.A., Miguel, E., Tadeo, J.L., “Multiresidue herbicide analysis in soil samples by means of extraction in small columns and gas chromatography with nitrogen-phosphorus and mass spectrometric detection”, *Journal of Chromatography A*, 823(1-2), 17, (1998).
- [57]. Sanchez-Brunete, C., Rodriguez, A., Tadeo, J.L., “Multiresidue analysis of carbamate pesticides in soil by sonication-assisted extraction in small columns and liquid chromatography”, *Journal of Chromatography A*, 1007(1-2), 85, (2003).
- [58]. Capelo, J.L., Mota, A.M., “Ultrasonication for analytical chemistry”, *Current Analytical Chemistry*, 1(2), 193, (2005).
- [59]. Mason T.J.,” Power ultrasound in food processing. The way forward. In; *Ultrasound in Food Processing*”, MJW Povey and TJ Mason (eds), Chapman &Hall, London pp. 105-126, (1998).
- [60]. Leighton T.G., “The principles of cavitation. In; *Ultrasound in Food Processing*”, MJW Povey and TJ Mason (eds), Chapman &Hall, London pp. 151-182, (1998).
- [61]. Floros, J.D., Liang, H., “Acoustically assisted diffusion through membranes and biomaterials”, *Food Technology*, 79-84, december (1994).
- [62]. Tadeo, J.L., Sanchez-Brunete, C., Albero, B., Garcia-Valcarcel, A.I., “Application of ultrasound-assisted extraction to the determination of contaminants in food and soil samples”, *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2415, (2010).
- [63]. Huertas-Perez, J.F., Iruela, M.D., Garcia-Campana, A.M., Gonzalez-Casado, A., Sanchez-Navarro, A., “Determination of the herbicide metribuzin and its major conversion products in soil by micellar electrokinetic chromatography”, *Journal of Chromatography A*, 1102(1-2), 280, (2006).
- [64]. Domeno, C., Blasco, M., Sanchez, C., Nerin, C., “A fast extraction technique for extracting polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from lichens samples used as biomonitors of air pollution: Dynamic sonication versus other methods”, *Analytica Chimica Acta*, 569(1-2), 103, (2006).

- [65]. Hyotylainen, T., Riekkola, M.L., “Potential of effective extraction techniques and new analytical systems for profiling the marine environment”, *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 26(8), 788, (2007).
- [66]. D., Huang et al, “The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays”, *J. Agric. Food Chem.*, 53, 1841-1856, (2005).
- [67]. Frankel, EN., Meyer, AS, ., “The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants.” *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1925-1941, (2000).
- [68]. MacDonald-Wicks, L.K., Wood L.G and Garg, M.L., Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review, *J. Sci. Food Agric.*, 86, 2046–2056, (2006).
- [69]. Scalzo, R.L., “Organic acids influence on DPPH scavenging by ascorbic acid”, *Food Chem.*, 107, 40–43, (2008).
- [70]. Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K., “Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements”, *J. Agric. Food Chem.*, 53, 4290-4302, (2005).
- [71]. Magalhães, L.M., Segundo, M.A., Reis, S., Lima, J.L.F.C., “Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties”, *Anal. Chim. Acta*, 613, 1–19, (2008).
- [72]. Benzie, F.F., Strain, J.J., “The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of Antioxidant Power The FRAP Assay” , *Anal. Biochem.*, 239 (1), 70-76, (1996).
- [73]. Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., “Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays”, *Food Res. Int.*, 39, 791–800, (2006).
- [74]. R. Apak et al, “Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and A, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuprine: CUPRAC Method”, *J. Agric. Food Chem.*, 52, 7970-81, (2004).
- [75]. Prior, R.L., Cao, G., “In vivo Total Antioxidant Capacity: Comparison of Different Analytical Methods”, *Free Radical Bio. Med.*, 27, 1173–1181, (1999).
- [76]. Decker, E.A., Wagner, K., Richards, M.P., Shahidi, F., “Measuring Antioxidant Effectiveness in Food”, *J. Agric. Food Chem.*, 53, 4303-4310, (2005).

- [77]. A. Somogyi et al, “Antioxidant measurements”, *Physiol Meas.*, 28, R41–R55, (2007).
- [78]. Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N., “Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds”, *Food Chem.* 97 (4), 654–660, (2006).
- [79]. Liu, L., Sun, Y., Laura, T., Liang, X., Ye, H., Zeng, X., “Determination of polyphenolic content and antioxidant activity of kudingcha made from *Ilex kudingcha* C.J. Tseng”, *Food Chem.* , 112 (1), 35–41, (2009).
- [80]. De Oliveira, AMF, Pinheiro, LS, Pereira, CKS, Matias, WN, Gomes, RA, Chaves, OS, de Souza, MFV, de Almeida, RN, de Assis, TS, “Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Some Malvaceae Family Species”, 1, 33-43, 2012.
- [81]. Muchuweti, M., Nyamukonda, L., Chagonda, L. S., Ndhlala, A. R., Mupure, C., Benhura, M., “Total phenolic content and antioxidant activity in selected medicinal plants of Zimbabwe”, *International Journal of Food Science & Technology*, 41 (1), 33-8, (2006).
- [82]. Ghasemi, K., Ghasemi, Y., Ebrahimzadeh, MA., “Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues”, *Pak J Pharm Sci*, 22 (3), 277-81, 2009.
- [83]. Kaur, S., Mondal, P., Study of Total Phenolic and Flavonoid Content, Antioxidant Activity and Antimicrobial Properties of Medicinal Plants, *J Microbiol Exp*, 1 (1), 00005, 2014.
- [84]. Wojdyło, A., Oszmiański, J., Czemerys, R., Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs, *Food Chemistry*, 105, 940-49, 2007.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Rukiye Yıldırım Teke

Doğum Tarihi: 17/10/1988

Doğum Yeri: ANKARA

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dili: İngilizce

### Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Mimar Sinan Lisesi(2002-2006)

Lisans : Süleyman Demirel Üniversitesi(2008-2012)

Yüksek Lisans : Kafkas üniversitesi (2012-)

Çalıştığı Kurum ve Yıl:Ardahan Anadolu Lisesi (2012-I. Dönem), Ardahan Öğretmen Lisesi (2012-2013 II.Dönem), Ardahan 80.Yıl Anadolu Lisesi (2012-2013 II. Dönem)