

KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

Anemone Albana STEV. Subsp. *Armena* (Sinüzit Otu)
BİTKİSİNDEN ELDE EDİLEN EKSTRAKTLARIN
ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN TAYİNİ VE FENOLİK
ASİT PROFİLİNİN HPLC-UV İLE BELİRLENMESİ

Nazlı VURAL
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç.Dr.Fikret AKDENİZ

ARALIK-2013

KARS

T.C. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Nazlı VURAL'ın Doç. Dr.Fikret AKDENİZ'in danışmanlığında yüksek lisans tezi olarak hazırladığı "**Anemone albana STEV. Subsp armena (Sinüzit Otu) Bitkisinden Elde Edilen Ekstraktların Antioksidan Aktivitelerinin Tayini ve Fenolik Asit Profilinin HPLC-UV ile Belirlenmesi**" adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

02 / 01 /2014

Adı ve Soyadı

Baskan : Prof.Dr.İsmail ÇAKMAK

Üye : Doç.Dr.Fikret AKDENİZ

Üye : Yrd.Doç.Dr.Vedat ADIGÜZEL

İmza



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

.....

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“*Anemone Albana STEV. Subsp. Armena* (Sinüzit Otu) bitkisinden elde edilen ekstraktların antioksidan aktivitelerinin tayini ve fenolik asit profilinin HPLC-UV ile belirlenmesi” adlı bu çalışma Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Çalışmalarım süresince büyük ilgi, anlayış ve tecrübelerini esirgemeyen Sayın Hocam Doç.Dr.Fikret AKDENİZ’e çok teşekkür ediyorum.

Ayrıca çalışmalarım esnasında Ultrasonik Banyo sistemini bizden esirgemeyen Prof.Dr.İsmail ÇAKMAK’a, ultraviyole spektrofotometre ölçümlerinin alınmasında Biyoloji bölümünden Doç.Dr.Süleyman GÜL’e ve bitkilerin teşhisinde önemli katkıları olan yine Biyoloji bölümünden Doç.Dr.Fatma GÜNEŞ’e, HPLC-UV ölçümlerinin alınmasında ve yorumlanmasında yardımlarını esirgemeyen Prof.Dr.Murat KÜÇÜK ve doktora öğrencisi Ozan Emre EYÜPOĞLU’na en içten teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuar çalışmalarında emeği geçen arkadaşlarım doktora öğrencisi İnan DURSUN’a, Yüksek Kimyager Kadir TEPEBAŞ’a, yüksek lisans öğrencisi Metin BİÇİL’e ve yüksek lisans öğrencisi Rukiye YILDIRIM TEKE’ye teşekkür ediyorum.

Ayrıca maddi manevi destekleri ile hep yanımda olan sevgili babam Zeki VURAL’a, annem Altun VURAL’a, Kardeşlerim Naim VURAL ve Ünal VURAL’a, manevi destekleriyle hep yanımda olan Sevgi ÖZÇEKEN, İsa ÖZÇEKEN ve arkadaşlarım Mehmet ASLAN, Hicran ÖNEM ve Sibel KAYA’ya teşekkürlerimi sunarım.

KARS-2013

Nazlı VURAL

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÖZET	vi
SUMMARY	vii
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER	x
RESİMLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Serbest Radikaller, Oksidatif Stres ve Reaktif Oksijen Türleri	2
2.1.1. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres	2
2.1.2. Reaktif Oksijen Türleri	3
2.2. Antioksidanlar	7
2.2.1. Antioksidan Tanımı ve Özellikleri	7
2.2.2. Metabolizmadaki Antioksidan Savunma Sistemleri	11
2.3. Bitkilerden Antioksidan Etkili Bileşik Ekstraksiyonu İçin Kullanılan Teknikler	13
2.3.1. Sokslet Ekstraksiyonu	13
2.3.2. Ultrasonik Dalga Destekli Ekstraksiyon	14
2.3.3. Basınçlı Çözücü Ekstraksiyonu	15
2.3.4. Mikrodalga Ekstraksiyonu	16
2.3.5. Süperkritik Sıvı Ekstraksiyon	16
2.4. Antioksidan Aktivite Tayin Metodları	18
2.4.1. DPPH Radikal Süpürme Etkisi	18
2.4.2. CUPRAC Bakır-II İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasite Yöntemi	19
2.4.3. FRAP Fe-III İyonu İndirgeme Antioksidan Gücü Yöntemi	20
2.4.4. Folin-Ciocalteu Toplam Fenolik Madde Tayin Yöntemi	21
2.5. Hidroliz Reaksiyonları	21
2.5.1. Yüksek Basınçlı Su Ortamında Hidroliz Reaksiyonları	22
2.5.2. Lignoselülozik Materyallerde Hidroliz Reaksiyonları	23
2.6. Fenolik Asit Profilinin Belirlenmesinde Kullanılan HPLC-UV Metodu	26

2.7. Çalışma Materyali Hakkında Bilgi	29
3. MATERYAL VE METOD	31
3.1. Bitki Numunelerinin Eldeleri	31
3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar	31
3.2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler	31
3.2.2. Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar	32
3.3. Kullanılan Ekstraksiyon Teknikleri	33
3.3.1. Soxhlet Ekstraksiyonu	33
3.3.2. Ultrasonik Dalga Yardımlı Ekstraksiyon	34
3.3.3. Hidrolizat Ekstraktlarının Eldesi	34
3.4. Toplam Fenolik Madde Tayini	35
3.5. Antioksidan Aktivite Tayini Metodu Seçimi	36
3.5.1. DPPH Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini	36
3.5.2. CUPRAC Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini	37
3.5.3. FRAP Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini	38
3.6. Fenolik Asit Profilini Belirlemede Yöntem Seçimi	39
3.7.1. Yöntem Geliştirme	39
3.7.1.1. HPLC-UV Koşulları	40
3.7.1.2. Standart ve Kalibrasyon	41
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	46
4.1. Ekstraksiyonlardan Elde Edilen Verim Yüzdeleri	46
4.2. Toplam Fenolik Madde Tayini Deneylerinden Elde Edilen Bulgular	48
4.3. DPPH Radikal Giderme Antioksidan Aktivite Tayini Deneylerinden Elde Edilen Bulgular	50
4.4. Bakır(II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi (CUPRAC) Deneylerinden Elde Edilen Bulgular	52
4.4. Bakır(II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi (CUPRAC) Deneylerinden Elde Edilen Bulgular	54
4.6. HPLC-UV-DAD Analizlerinden Elde Edilen Bulgular	56
4.6.1. HPLC-DAD Tekniğiyle Ekstraktlarda Fenolik Standart Tayini	56
4.6.2. HPLC-DAD (280 nm) için Tespit Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı	60

(LOQ) Değerleri	
4.6.3. Ekstraktlara Ait HPLC-UV Analizleri	61
4.6.4. Yaprak Kısımından Elde Edilen Ekstraktların HPLC-DAD Kromatogram ve Spektrumlarının Yorumlanması	63
4.6.4.1. Soxhlet Ekstraktlarına Ait HPLC-DAD Kromatogramları ve Spektrumlarının Yorumlanması	63
4.6.4.2. Ultrasonik Banyo Ekstraktlarına Ait HPLC-DAD Kromatogramları ve Spektrumlarının Yorumlanması	67
4.6.5. <i>A. Albana</i> Bitkisinin Gövde Kısımından Hidroliz İşlemiyle Elde Edilen Ekstraktların HPLC-DAD Kromatogramları ve Spektrumlarının Yorumlanması	71
4.6.6. Üç Farklı Ekstraksiyon Tekniği ile Elde Edilen Kromatogramların Karşılařtırılmalđ İncelemesi,	75
5. SONUÇ	77
6. KAYNAKLAR	83
ÖZGEÇMİŞ	92

ÖZET

Anemone albana Stev. Subs *armena* bitkisinin havada kurutulmuş yaprak ve gövde kısmından Soxhlet, ultrasonik banyo ve hidroliz işlemleriyle elde edilmiş olan ekstraktların toplam fenolik madde içerikleri, antioksidan aktiviteleri ve ekstraktlardaki fenolik asit içeriği araştırıldı.

Çözücü olarak metanol kullanılarak yapılan ekstraksiyonlarda en yüksek ekstraksiyon verimi Soxhlet ekstraksiyonundan elde edilirken (%24,95±1,30), bunu ultrasonik banyo ekstraksiyonu (%21,00±1,34) ve hidroliz işlemiyle yapılan ekstraksiyon (%1,60±0,07) takip etti. Soxhlet verimi diğer verimlerden anlamlı derecede daha yüksek çıktı ($p<0.05$).

Toplam fenolik madde içerikleri açısından Soxhlet tekniği yine en yüksek değeri (2,79±0,20 mg GAE/100 g kuru numune) ortaya koydu. Fakat ultrasonik banyo tekniği ile elde edilen değerden (2,21±0,20 mg GAE/100 g kuru numune) anlamlı derecede farklı olmadığı bulundu ($p>0,05$). En düşük değeri (0,07±0,02 mg GAE/100 g k. num.) hidroliz ekstraktları sergiledi.

DPPH radikal süpürme antioksidan aktivite tayini deneylerinde en yüksek IC₅₀ değerini (µg/mL) hidroliz ekstraktı sergiledi (35,33±1,24). Bunu sırasıyla ultrasonik banyo (57,43±1,08) ve Soxhlet (59,37±1,85) takip etti. Burada da Soxhlet ve ultrasonik banyo ekstraktları arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$). Cu-II iyonu indirgeme gücü antioksidan kapasitesi (CUPRAC) deneylerinde en yüksek değeri (mmol TEAC/Kg numune olarak) ultrasonik banyo ekstraktları sergilerken, bunu Soxhlet ve hidroliz ekstraktları takip etti (sırasıyla 357,22±10,73 - 322,78±27,99 ve 47,39±2,55). Fe-II iyonu indirgeme gücü antioksidan kapasitesi (FRAP) deneylerinde en yüksek değeri (µM olarak) Soxhlet ekstraktları ortaya koyarken (67,38±7,64), ultrasonik banyo ekstraktları (58,81±0,42) ve hidroliz ekstraktları (30,95±1,48) bu değeri takip ettiler. Hem CUPRAC hem de FRAP deneylerinde Soxhlet ve ultrasonik banyo ekstraktlarına ait değerler arasındaki fark anlamlı bulunmadı ($p>0,05$).

Ekstraktların fenolik asit profilini belirlemek üzere yapılan RP-HPLC-UV-DAD analizi, tüm ekstraktlarda benzoik asit bulunduğunu (µM Protokatekualdehit Eşdeğeri olarak: Soxhlet ekstraktları için 110, ultrasonik banyo ekstraktları için 73 ve hidroliz ekstraktları için 77), ilave olarak hidroliz ekstraktında protokatekualdehit (34 µM PE) bulunduğunu ortaya koydu.

Toplam fenolik madde ile antioksidan aktivite arasındaki ilişki FRAP ve CUPRAC testleri için pozitif, DPPH testleri için negatif bulundu.

Anahtar Kelimeler: *Anemone albana* Stev. Subs *armena*, Sinüzit otu, Ekstraksiyon verimi, Toplam fenolik madde, Antioksidan aktivite, DPPH, CUPRAC, FRAP, Fenolik asit, HPLC-UV-DAD analizi

ABSTRACT

The methanolic extracts obtained from different parts (leaves and stems) of *Anemone albana* Stev. Subs. *armena* (Sinüzit otu) plant by using Soxhlet, ultrasound assisted and acidic hydrolysis techniques were investigated in terms of total phenolic contents, antioxidant activities (capacity), and phenolic acid profiles.

The highest extraction yield was obtained from Soxhlet extraction with the value of $24,95 \pm 1,30$. This value was followed by ultrasound assisted and hydrolysis extracts ($21,00 \pm 1,34$ and $1,60 \pm 0,07$ respectively). The difference between Soxhlet and ultrasound assisted extract yields was found to be significant ($p < 0,05$).

Soxhlet extracts showed the best total phenolic matter content with the value of $2,79 \pm 0,20$ mg GAE/100 g air dried sample. These values were $2,21 \pm 0,20$ for ultrasound assisted extracts and $0,07 \pm 0,02$ for hydrolysis extracts. The difference between total phenolic content values of Soxhlet and ultrasound assisted extracts was not significant ($p > 0,05$).

In DPPH assay tests, the best IC_{50} value (as $\mu\text{g/mL}$) was exhibited, surprisingly, by hydrolysis extracts with the value of $35,33 \pm 1,24$. The difference between the IC_{50} values of ultrasound assisted ($57,43 \pm 1,08$) and Soxhlet ($59,37 \pm 1,85$) extracts was not significant ($p > 0,05$). In CUPRAC assay tests, in contrast to the DPPH assay, while the best value was exhibited by ultrasound assisted extracts, hydrolysis extract are the worst ($357,22 \pm 10,73$ and $47,39 \pm 2,55$ mmole TEAC/Kg sample). This value was obtained as $322,78 \pm 27,99$ for Soxhlet extracts. In FRAP assay tests, Soxhlet extracts showed the best FRAP values with the mean value of $67,38 \pm 7,64$ μM . Ultrasound assisted extracts and hydrolysis extracts followed this value ($58,81 \pm 0,42$ and $30,95 \pm 1,48$ μM , respectively). Both in CUPRAC tests and in FRAP tests, the difference between Soxhlet and ultrasound assisted extracts were not found to be significant ($p > 0,05$).

In order to determine phenolic acid profile of the extracts, RP-HPLC-UV-DAD analysis was applied. The analysis showed that among 15 phenolic acid standard investigated, while all extracts contained benzoic acid, hydrolysis extracts also contained protocatechualdehyde, additionally. Protocatechualdehyde equivalent concentrations of these phenolic acids were calculated (for benzoic acid: 110 μM PE in Soxhlet, 73 μM PE in ultrasound assisted, and 77 μM PE in hydrolysis extracts; for protocatechualdehyde: 34 μM PE in hydrolysis extracts).

Total phenolic content-antioxidant activity relationship was found to be positive for CUPRAC and FRAP assays, while it was negative for DPPH assay.

Key Words: *Anemone albana* Stev. Subs *armena*, Sinüzit otu, Extraction Yield, Total phenolic content, Antioxidant activity, DPPH, CUPRAC, FRAP, Phenolic acid, HPLC-UV-DAD analysis.

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABTS/TEAK	Troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi
A-H	Antioksidan-Hidrojen
BSE	Basınçlı çözücü ekstraksiyonu
BHT	Butillenmiş hidroksi toluen
BHA	Butillenmiş hidroksi anisol
CAT	Katalaz
CUPRAC	Cu(II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi
Cu(II)-Nc	Cu(II) neocuproin reaktifi
DAD	Diyot serili dedektör
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EC ₅₀ (IC ₅₀)	Başlangıçtaki DPPH konsantrasyonunu yarıya düşürmek için gerekli olan antioksidan ekstraktı konsantrasyonu (genellikle µg/ml)
FRAP	Fe-III İndirgeme Antioksidan Gücü Yöntemi
(Fe ⁺³ -TPTZ)	Demir (III) Tripridiltriazin
(Fe ⁺² -TPTZ)	Demir (II) tripridiltriazin
FC	Folin-Ciocalteu yöntemi
FT-IR	Fourier transform kızılötesi spektroskopisi
GC-MC	Gaz kromaografisi-kütle spektrometresi
GSH	Glutasyon
GSH-P _x	Glutasyon peroksidaz
GP _x	Glutasyon peroksidaz
GAE	Gallik asit eşdeğeri
HPLC-DAD	Diyot serili yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HPLC-UV	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile birleştirilmiş Ultra Viole spektrofotometresi
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
LC-MC	Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi
LOD	Limit of detection (tespit sınırı)
LOQ	Limit of quantification (tayin sınırı)
MLT	Melatonin
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfatı

ORAC	Oksijen radikal absorbans kapasitesi
PE	Protokatekualdehit Eşdeğeri
P _c	Kritik basınç
RP-HPLC	Ters faz sıvı kromatografisi
RT	Retention time (alıkonma zamanı)
ROT	Reaktif oksijen türleri
SA	Süperkritik akışkan
Sit	Sitokrom
SOD	Süperoksit Dismutaz
TBHQ	Tersiyer butil hidrokinon
T _c	Kritik sıcaklık
TFA	Trifloroasetik asit
TLC	İnce tabaka kromatografisi
Trolox	6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametil-kroman-2-karboksilik asit
TPTZ	2,4,6-tri[2-ridil]-s-triazin
UV	Ultraviyole
UV-DAD	Diyot serili ultraviyole dedektör
SOXKAR	Soxhlet ekstraktlarından elde edilen üç numunenin karışımı
ULTKAR	Ultrasonik banyo ekstraktlarından elde edilen üç numunenin karışımı
HİDKAR	Hidroliz işlemi ekstraktlarından elde edilen üç numunenin karışımı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Moleküler oksijenin yapısı	2
Şekil 2.2.	Delta ve sigma oksijenin moleküler elektron yapısı	7
Şekil 2.3.	Butillenmiş hidroksianisol (BHA)'ün kimyasal yapısı	8
Şekil 2.4.	2,6-di-ter-bütül-p-hidroksitoluen (BHT)'nin kimyasal yapısı	8
Şekil 2.5.	Tert-bütül hidroksi kinon (TBHQ)'nın kimyasal yapısı	8
Şekil 2.6.	Benzoik asit türevli fenolik asitler	9
Şekil 2.7.	Sinamik asit türevli fenolik asitler	10
Şekil 2.8.	Askorbik asidin yapısı (Vitamin C)	12
Şekil 2.9.	Saf bir madde için sıcaklık-basınç faz diyagramı	17
Şekil 2.10.	DPPH (2,2,- difenil-1-pikrilhidrazil) radikalın yapısı ve A-H ile reaksiyonu	18
Şekil 2.11.	CUPRAC yönteminde Cu (II)'nin antioksidan madde ile Cu (I)'e indirilmesi	19
Şekil 2.12.	FRAP reaktif ile antioksidan bileşik arasındaki etkileşim	20
Şekil 4.1.	Ekstraksiyonlardan elde edilen verim Yüzdeleri	46
Şekil 4.2.	Toplam fenolik madde tayini için kullanılan kalibrasyon grafiği	48
Şekil 4.3.	Ekstraktların karşılaştırmalı toplam fenolik madde içerikleri	49
Şekil 4.4.	Ekstraktların ve karşılaştırma maddelerinin, DPPH radikali konsantrasyonunu % 50 oranında azalttıkları konsantrasyon değerleri.	51
Şekil 4.5.	CUPRAC deneylerinde kullanılan ve Troloks standardı ile elde edilen kalibrasyon grafiği.	53
Şekil 4.6.	<i>A.Albana</i> bitkisine ait ekstraktların CUPRAC değerlerinin karşılaştırılması (mg TEAK/100 g kuru numune)	53
Şekil 4.7.	Troloks ile hazırlanan çalışma konsantrasyon grafiği	54
Şekil 4.8.	<i>A.Albana</i> bitkisine ait ekstraktların FRAP değerlerinin karşılaştırılması	55

Şekil 4.9.	Geliştirilen metotla HPLC' de yürütülen fenolik standartların 25 µM'lik karışımının 280 nm'deki kromatogramı [(1) Gallik asit, (2) protokatekuik asit, (3) protokatekualdehit, (4) klorojenik asit, (5) gentisik asit, (6) p-OH benzoic asit, (7) vanillik asit, (8) kafeik asit, (9) siringik asit, (10) vanillin, (11) siringaldehit, (12) p-kumarik asit, (13) Ferulik asit, (14) sinapik asit, (15) benzok asit, (16) rozmarinik asit.	56
Şekil 4.10.	HPLC analizinde kullanılan 16 fenolik asit standardının DAD ile elde edilmiş spektrumları (200-400 nm).	58
Şekil 4.11.	Dış Standart Protokatekualdehit'in 5 farklı konsantrasyonunun kromatogram karşılaştırması.	61
Şekil 4.12.	Protokatekualdehit kalibrasyon grafiği	61
Şekil 4.13.	Soxhlet, Ultrasonik Banyo ve Hidroliz işlemindeki toplam kromatografik alan grafiği	62
Şekil 4.14.	<i>A.Albana</i> bitkisinin yaprak kısmının soxhlet işlemi ile elde edilen ekstraktının 280 nm'deki kromatogramı.	63
Şekil 4.15.	<i>A.Albana</i> bitkisinde yaprak kısmında soxhlet işlemi ile elde edilen ekstraktta tespit edilen 1-17 nolu piklere ait DAD ile elde edilmiş spektrumlar (200-400 nm).	65
Şekil 4.16.	<i>A.albana</i> bitkisinin yaprak kısmından ultrasonik banyo işlemi ile elde edilen ekstraktının 280 nm'deki kromatogramı.	67
Şekil 4.17.	<i>A.Albana</i> bitkisinin yaprak kısmında ultrasonik banyo işlemi ile elde edilen ekstraktta tespit edilen 1-16 nolu piklere ait DAD ile elde edilmiş spektrumlar (200-400 nm).	69
Şekil 4.18.	<i>A.Albana</i> bitkisinin gövde kısmından hidroliz işlemi ile elde edilen ekstraktın 280 nm'deki kromatogramı.	71
Şekil 4.19.	<i>A.Albana</i> bitkisinin gövde kısmından hidroliz işlemi ile elde edilen ekstraktta tespit edilen 1-16 nolu piklere ait DAD ile elde edilmiş spektrumlar (200-400 nm).	73
Şekil 4.20.	<i>A.Albana</i> bitkisinin ultrasonik banyo, soxhlet ve hidroliz işlemleri ile elde edilen ekstraktlarının kromatogramlarının karşılaştırılması	75

Şekil 5.1.	DPPH test sonuçlarına göre elde edilen toplam fenolik madde- antioksidan aktivite ilişkisi	80
Şekil 5.2.	CUPRAC test sonuçlarına göre elde edilen toplam fenolik madde-antioksidan aktivite ilişkisi	80
Şekil 5.3.	FRAP test sonuçlarına göre elde edilen toplam fenolik madde- antioksidan aktivite ilişkisi	81

RESİMLER DİZİNİ

Resim 2.1.	Deneyisel çalışmada kullanılan soxhlet ekstraksiyonu sistemi	14
Resim 2.2.	A.Albana (Sinüzit otu) bitkisi	30

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1.	Bazı lignoselülozik maddelerden elde edilen bileşik grupları	25
Tablo 3.1.	Deneylerde kullanılan cihazlar ve markaları	31
Tablo 3.2.	Kimyasallar ve satın alındıkları firmalar	32
Tablo 3.3.	Numune yürütmesinde kullanılan gradient programı	41
Tablo 3.4.	HPLC analizlerinde kullanılan standartlar	42
Tablo 4.1.	Ekstraksiyonlardan elde edilen verim yüzdeleri	46
Tablo 4.2.	Ekstraktların toplam fenolik madde içerikleri (mg GAE/100 g kuru numune)	48
Tablo 4.3.	Ekstraktların ve karşılaştırma maddelerinin IC ₅₀ değerleri	50
Tablo 4.4.	Bakır-II iyonu indirgeme iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi (CUPRAC) deneylerinden elde edilen sonuçlar	52
Tablo 4.5.	Ekstraktların FRAP değerleri (µM)	54
Tablo 4.6.	HPLC’de yürütülen 16 fenolik standartla ilgili kromatografik parametreler	57
Tablo 4.7.	Kullanılan HPLC yönteminde bazı fenolik standartların 280 nm’de belirlenen LOD ve LOQ değerleri	60
Tablo 4.8.	<i>A.Albana</i> bitkisinin yaprak kısmında soxhlet işlemi ile elde edilen ekstraktta tespit edilen bileşenlerin alıkonma zamanı (RT), pik alanı, protokatekulaldehit eşdeğeri (PE) ve pik yüksekliği değerleri	64
Tablo 4.9.	<i>A.Albana</i> bitkisinin yaprak kısmından ultrasonik banyo işlemi ile elde edilen ekstraktta tespit edilen bileşenlerin alıkonma zamanı (RT), pik alanı, protokatekulaldehit eşdeğeri (PE) ve pik yüksekliği değerleri	68

1. GİRİŞ

Yeryüzünde oksijen kadar, hayatın başlaması ve yayılıp gelişmesi için doğrudan katkı yapmış element sayısı çok azdır. Oksijenli solunum yapan pek çok canlı türü için oksijen olmazsa olmaz bir kaynaktır. Sadece insan değil, bitkiler ve hayvanlar da metabolizmalarını sağlıklı bir biçimde sürdürebilmek için oksijen ve türevlerine ihtiyaç duyarlar. Özellikle hayvansal metabolizmada oksijenin temel görevi, vücudun enerjisini sağlayan biyokimyasal işlemlerde yer almaktır. Bununla birlikte, oksijenin vücut savunmasında rol oynamak gibi başka önemli görevleri de vardır. Oksijen, oluşturduğu “reaktif oksijen türleri” (ROT) adı verilen radikalik kimyasal türler vasıtasıyla bu görevini yerine getirir. Yani alınan oksijenin bir kısmı, vücut savunmasında yer alacak olan bu radikalik türlerin sentezlenmesinde kullanılır. ROT’lar da “bağışıklık sistemi” tarafından gerektiğinde vücuda giren çeşitli hastalıkların ajanlarını etkisiz hale getirmek için kullanılır.

Ancak, ne yazık ki, yaşam açısından bu kadar önemli olan oksijen, aynı zamanda yaşamın sona ermesinde de rol sahibidir. Bu, her canlı türü için geçerli olmak üzere, yaşam başladığı andan itibaren başlayan bir etkileşimin sonucudur. Canlılar yaşam süreleri içinde az veya çok oksijenle temas halindedirler. Her canlı, oksijenle en az temas etmiş bir halde, bir diğer ifadeyle “en indirgenmiş” biçimde yaşamına başlar. Fakat zaman geçtikçe gerek oksijenle doğrudan temas, gerekse de metabolizma faaliyetleri sonucu oluşan ROT’ların etkisiyle bu “indirgenmişlik” durumu ortadan kalkmaya başlar. Ve halk dilinde “yaşlanma” adı verilen bir “yükseltgenme” süreci işlemeye başlar.

Özellikle de ROT’lar, vücutta fazlalık hale geldiğinde, eğer bir şekilde yok edilemezlerse vücutta da zarar vermeye başlarlar. Dolayısıyla vücut bu ROT’ları dengelemek için, onların etkilerini gideren ve adını da buradan alan “antioksidan” etkili moleküller kullanır. Antioksidanların bir kısmı vücutta üretilmekle beraber, bunların yetersiz kaldığı durumlarda, önemli bir kısmı da besin maddeleri vasıtasıyla dışarıdan alınmaktadır. Dışarıdan alınan antioksidanların bir kısmı genellikle sentetik olarak üretilirler ve besin maddelerine raf ömürlerini uzatmak için katılırlar. Ancak bu sentetik antioksidanların uzun dönemde kullanıcılar açısından bazı sakıncalar oluşturduğu yönünde ortaya çıkan şüpheler, araştırmacıları son yıllarda doğal “antioksidan” kaynakları bulmaya ve bunları en uygun şekilde değerlendirmek için yöntemler ve teknolojiler geliştirmeye sevk etmiştir.

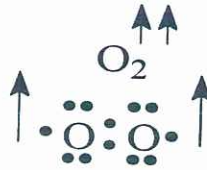
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Serbest Radikaller, Oksidatif Stres ve Reaktif Oksijen Türleri

2.1.1. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Kuantum kimyasına göre bir bağın yapısına iki elektron katılabilir ve bu iki elektronun da ters dönüş doğrultusunda olması gerekir. Bağların kopması sırasında bu iki elektron ya birlikte kalır (ikisi de bir atoma bağlanır) ya da ayrılır (biri bir atoma diğeri diğeri atoma). Elektronların birlikte kalması durumunda oluşan atom bir iyon olur, ayrılmaları durumunda ise serbest radikaller oluşur. Serbest radikal, son enerji kabuğunda eşleşmemiş bir elektron içeren ve yüksek reaktiviteye sahip olan, bir atom ya da molekül karakterindeki kimyasal bir ürün olarak tanımlanır. Serbest radikaller elektron transferi, enerji üretimi ve yaşam için gerekli olan birçok metabolik işlevin temelini oluşturur. Fakat vücutta fazla miktarda meydana gelmeleri zararlı sonuçlara sebep olabilir. Böylece serbest radikaller yaşlanma ve dejeneratif hastalıklara yol açar [1].

Serbest radikaller gibi ortaklanmamış elektronlara sahip oldukları halde serbest radikal olarak kabul edilmeyen Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Mo^{5+} gibi geçiş metalleri de serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar. Organizmadaki geçiş metallerinin içerdiği tek elektronların moleküler oksijene transferi ile oksidasyon molekülleri meydana gelir. Serbest radikal tanımında biradikal (diradikal) olarak kabul edilen moleküler oksijen, radikal olmayan maddelerle yavaş reaksiyona girdiği halde diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girebilmektedir [2].



Şekil 2.1. Moleküler oksijenin yapısı

2.1.2. Reaktif Oksijen Türleri (ROT)

Oksijen insan yaşamı için hayati olmasına rağmen, moleküler oksijen biradikal doğasının bir sonucu olarak yüksek derecede reaktif oksijen türleri (ROT) oluşturma eğilimindedir. Yüksek derecedeki ROT'lar normalde araşidonik asit metabolizması, mitokondrial solunum zinciri, fagositoz yumurtlama ve üreme gibi faaliyetlerle oluşmasına rağmen üretimleri patolojik durumlarda birkaç kat artmaktadır [3]. Reaktif oksijen türleri normal vücut metabolizması sırasında sınırlı miktarda oluşan süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^{\cdot})'dir [2]. Nispeten radikalik bir tür olmasına rağmen moleküler oksijenin (O_2) ardışık bir şekilde indirgenmesiyle reaktif oksijen türleri oluşmaktadır. Bir elektron kazanarak süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) radikaline, iki elektron alarak hidrojen peroksite (H_2O_2), üç elektron alarak hidroksil (OH^{\cdot}) radikaline dönüşür [4].

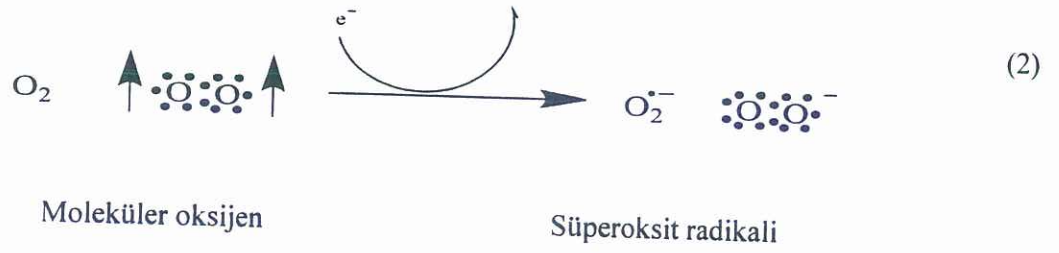


Oluşan bu reaktif oksijen türleri, buldukları ortamdaki dengelerin değişmesine neden olmaktadır. Moleküler oksijenin ardışık bir şekilde indirgenmesiyle normal metabolizma sırasında üretilen ROT'lar hücre ve dokulardaki proteinler, lipidler, enzimler, karbonhidratlar ve DNA ile reaksiyona girerek bu moleküllerin oksidasyonuna yol açarlar [5].

ROT'lar çeşitli serbest radikallerin oluşturduğu serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilirler ve hücrelerde var olan karbon merkezli organik radikaller (R^{\cdot}), tiyil radikalleri (RS^{\cdot}), sülfenil radikalleri (RSO^{\cdot}), peroksit radikalleri (ROO^{\cdot}), alkoksi radikalleri (RO^{\cdot}) gibi değişik serbest radikallerin oluşmasına neden olmaktadır [6,7].

Süperoksit Radikali

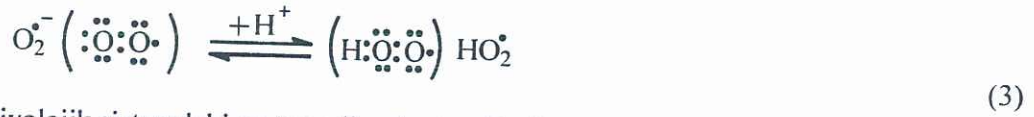
Süperoksit radikalleri hücre içerisinde O_2 'in bir elektron alarak indirgenmesi sonucu mitokondride meydana gelmektedir [8].



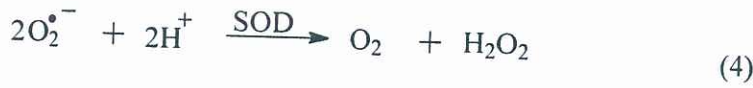
Süperoksit radikali doğrudan zarar vermez ancak, serbest radikallerin oluşumunu etkiler. Süperoksit radikali, H₂O₂ kaynağı olması ve geçiş metal iyonlarının yükseltgeyicisi olmasından dolayı önemli görülmektedir.

Süperoksit radikalinin özellikleriyle beraber bazı reaksiyonları aşağıda gösterilmiştir:

- Düşük pH değerlerinde daha reaktif olan perhidroksi radikali proton alarak oksijen perhidroksi radikalini (HO₂·) oluşturur.



- Biyolojik sistemdeki en önemli serbest radikaller oksijenden oluşan radikallerdir [9].
- Süperoksit radikali ve perhidroksi radikalinin reaksiyonu sonucu biri okside olurken diğeri indirgenir. Bu tepkime sonucunda O₂ ile H₂O₂ oluşur. Süperoksitler katalitik aktivitesi çok yüksek bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) yardımıyla H₂O₂'e çevrilir. SOD katalizörlüğündeki bu tepkimeye dismutasyon tepkimesi denmektedir [10]. Süperoksit radikali özellikle hafif asidik koşullarda SOD olmadan kendiliğinden dismutasyonla da H₂O₂'ye çevrilebilir [11].



- Hücrede üretilen süperoksit radikali hem okside edici hem de indirgeyici olarak davranabilir. Aldığı elektronu metal iyonuna, sitokrom-c'ye ya da bir radikale vererek moleküler oksijene okside olur [11].



Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

H₂O₂, oksijenin enzimatik reaksiyonlarla iki elektron alarak indirgenmesi ya da süperoksit radikallerinin enzimatik veya non-enzimatik dismutasyonu tepkimeleri sonucu oluşmaktadır. Süperoksit grubuna göre etkisinin az olduğu bilinen H₂O₂, peroksidaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz (GP_X) gibi dokularda bulunan enzimler yardımıyla su ve oksijene dönüştürülüp zararları en aza indirilir. Yapısında ortaklaşmamış elektronu bulunmamasına ve reaktif bir tür olmamasına rağmen H₂O₂'in oksitleyici özelliğe sahip bir tür olarak bilinmesinin sebebi, demir ve bakır gibi metal iyonların varlığında reaksiyon vererek son derece güçlü bir oksidan ve zarar verici olan hidroksil radikalinin oluşumunu sağlamasıdır. Bu reaksiyon Fenton Reaksiyonu olarak bilinir. H₂O₂'in süperoksit radikali ile reaksiyonu sonucunda da hidroksil radikali oluşmaktadır. Bu reaksiyon da Haber-Weiss Reaksiyonu olarak bilinmektedir [2,12].

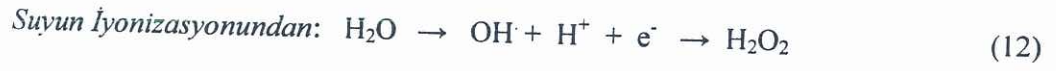
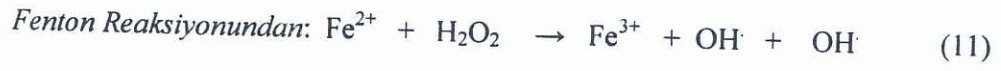
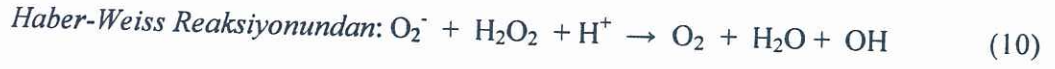


Hidroksil Radikali (OH[·])

Hidroksil iyonunun nötr şekli olan hidroksil radikali (OH[·]), hücredeki en reaktif oksidan ve en toksik radikaldir. Yarı ömrü çok kısadır ve lipitler, proteinler ve nükleik asitler dahil neredeyse bütün molekülleri okside edebilir. OH[·], ROT'nin en güçlüsüdür. OH[·], enzim sistemi bulunmadığından dolayı kolay bir şekilde bütün biyolojik sistemlerle reaksiyona girmektedir, diğer ROT'ne nazaran daha fazla zarar vermektedir. Bu nedenle vücutta H₂O₂ artışı kanser, diyabet, siroz, ateroskleroz, Alzheimer hastalığı ve yaşlanma gibi oksidatif hasar kaynaklı pek çok hastalığın oluşmasına sebep olur [13]. Oluştığı yerlerde tiyoller ve yağ asitleri gibi moleküllerden bir H atomu koparır ve karbon merkezli organik radikaller (R[·]), tiyil aradikalleri (RS[·]) ve organik peroksitler (RCOO[·]) gibi radikallerin oluşmasına ve bunun sonucunda da vücutta büyük hasarlara sebep olur [6,7].

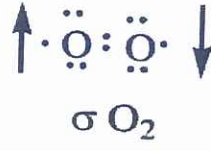


Fenton Reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonundan başka suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda da OH \cdot Oluşur. OH \cdot oluşum reaksiyonları aşağıda gösterilmiştir [14,15].

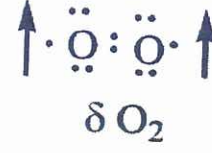


Singlet Oksijen ($^1\text{O}_2$)

Oksijenin yüksek reaktiviteye sahip bir şekli olan $^1\text{O}_2$, eşlenmemiş elektron içermediğinden serbest radikal değildir. Fiziksel ve kimyasal metodların her ikisiyle de $^1\text{O}_2$ oluşturulabilir [16]. Çoğunlukla karbon-karbon çifte bağlarıyla reaksiyona giren $^1\text{O}_2$ karoten, klorofil ve doymamış yağ asitleri gibi birçok biyolojik molekülde mevcuttur [2,5]. $^1\text{O}_2$ çoklu-doymamış yağ asitlerinden bir hidrojen (H^+) kopararak OH \cdot kadar etkin bir şekilde lipid peroksidasyonunu başlatabilir [5]. Bundan dolayı $^1\text{O}_2$ biyolojik sistemlerdeki lipid peroksidasyonunda önemli bir role sahiptir. $^1\text{O}_2$, orbitale verilen enerji sonucu oksijendeki ortaklanmamış elektronlardan birinin, bulunduğu orbitalden farklı bir orbitale veya kendi spin yönünün tersi yönüne hareket etmesiyle oluşur. Fotokimyasal reaksiyonlar için $^1\text{O}_2$ oluşumu çok önemlidir. $^1\text{O}_2$, oksijen molekülünün nitrik oksit ile reaksiyonu ya da H_2O_2 'in hipoklorit ile reaksiyonu sonucunda da üretilebilmektedir. $^1\text{O}_2$ 'in delta ve sigma olmak üzere iki çeşidi mevcuttur [17].



SİGMA



DELTA

Şekil 2.2. Delta ve sigma oksijenin moleküler elektron yapısı

2.2. Antioksidanlar

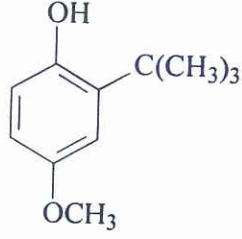
2.2.1. Antioksidan Tanımı ve Özellikleri

Serbest radikallerin canlı vücudunda meydana getirdiği oksidasyonları önlemek, serbest radikalleri yakalamak ve etkisiz hale getirmek için vücudun oluşturduğu savunma sistemine antioksidan denmektedir. Antioksidanlar 6 sınıfta değerlendirilebilir:

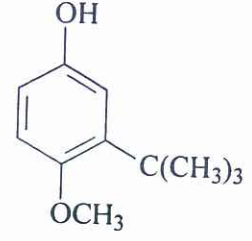
1. Serbest yağ radikallerini inaktive eden gerçek antioksidan moleküller (fenolik asit gibi),
2. Hidroperoksitlerin serbest radikallere parçalanmasını önleyen hidroperoksit kararlılığını artırıcılar (fenolik bileşikler gibi),
3. Gerçek antioksidanların aktivitesini artıran sinerjistler (sitrik asit, askorbik asit gibi),
4. Ağır metalleri bağlayarak inaktif duruma getiren metal kelat yapıcılar (fosforik asit, sitrik asit, Maillard bileşikleri),
5. Singlet oksijeni triplet oksijene dönüştüren singlet oksijen sönmüleyiciler (karotenler),
6. Radikalik olmayan bir yolla hidroperoksitleri indirgeyen hidroperoksit indirgeyici maddeler (poteinler ve aminoasitler gibi) [18]

Antioksidanlar iki tür etki ile oksidasyonları önlemektedir:

- Primer antioksidanlar; Otooksidasyon zincirlerini kırıp oksidasyonu geciktirirler. Primer antioksidanlar tokoferoller (vitamin E), butillenmiş hidroksitoluen (BHT), butillenmiş hidroksianisol (BHA), tersiyer butilhidrokinon (TBHQ) ve etoksiquin gibi doymamış yapıdaki fenolik bileşiklerdir. Bu bileşikler organizmada serbest radikalleri kabul etmiş gibi davranarak oksidasyonu ilk aşamalarından itibaren durdurmaktadır [19].

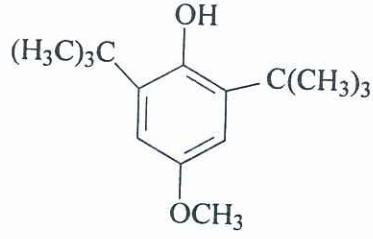


4 –metoksi-2-ter bütül fenol
(2 BHA)

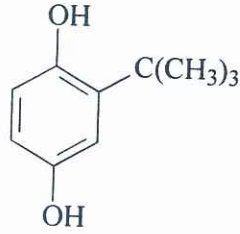


4-metoksi-3-ter bütül fenol
(3 BHA)

Şekil 2.3. Butillenmiş hidroksianisol (BHA)'ün kimyasal yapısı



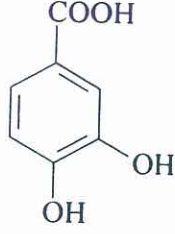
Şekil 2.4. 2,6-di-ter-bütül-p-hidroksitoluen (BHT)'nin kimyasal yapısı



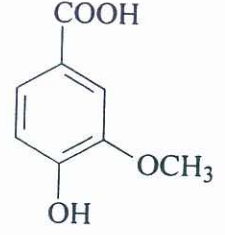
Şekil 2.5. Tert-bütül hidroksi kinon (TBHQ)'nın kimyasal yapısı

Fenolik asitler, hidroksisinnamik asit türevi olanlar ve hidroksi benzoik asit türevi olanlar olmak üzere iki grupta toplanabilirler [18]. Fenolik bileşiklerin önemli bir kısmını oluşturan hidroksisinnamik asit türevli fenolik asitlere p-hidroksibenzoik asit, p-kumarik asit, kafeik asit, 3,4-dihidroksibenzoik asit, ferulik asit, sinapik asit, vanillik asit, rosmarinik asit ve klorojenik asit gibi önemli fenolik asitler örnek verilebilir.

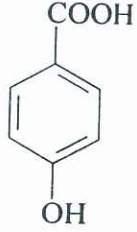
Hidroksi benzoik asitlere de gallik asit, protokatekuik asit, siringik asit, vanillik asit, resorsilik asit örnek gösterilebilir [20].



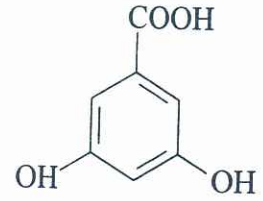
3,4-dihidroksibenzoik asit



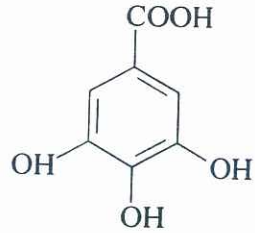
Vanillik asit



p-hidroksibenzoik asit

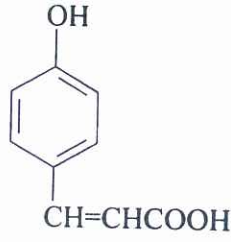


Resorsilik asit

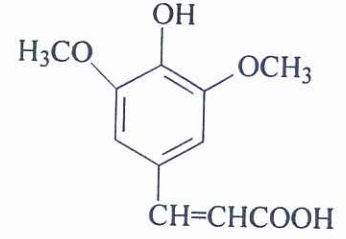


Gallik asit

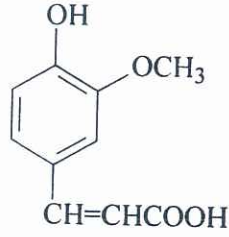
Şekil 2.6. Benzoik asit türevli fenolik asitler



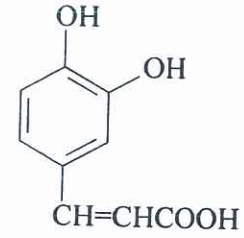
p-kumarik asit



Sinapik asit



Ferulik asit



Kafeik asit

Şekil 2.7. Sınnamik asit türevli fenolik asitler

- Sekonder antioksidanlar; Oksidasyonu geciktirerek yağların oksidasyonlarını önleyen sekonder antioksidanlar, doğrudan radikal süpürme etkisini taşımayan bir mekanizma yardımıyla ortaya çıkmaktadır. Örneğin, sitrik asit gibi bloke edici (kompleks haline getirmek suretiyle) maddeler ancak ortamda metal iyonu varsa ve askorbik asit gibi indirgeyici maddeler de ancak ortamda tokoferoller ya da diğer primer antioksidanlar varsa etkinliklerini gösterirler. Metal iyonlarının bağlanması, oksijenin süpürülmesi, hidroperoksitlerin radikal olmayan türlere dönüştürülmesi, UV ışığı absorplama veya 1O_2 'in deaktivasyonu bu mekanizmalara örnek olarak gösterilebilir [20].

2.2.2. Metabolizmadaki Antioksidan Savunma Sistemleri

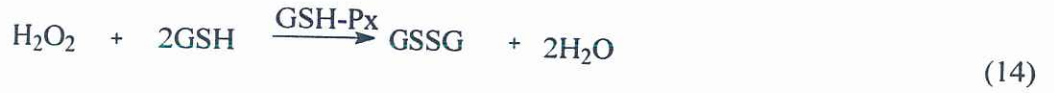
Antioksidanlar birincil ve ikincil antioksidan mekanizmalarına sahiptir. Radikal süpürücü olarak bilinen birincil antioksidanlar; süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz ve katalaz gibi enzim sistemleridir. Oksijen radikallerini yakalayan ve zincir reaksiyonlarını kıran ikincil antioksidanlar; C vitamini, E vitamini, glutatyon (GSH), bilirubin, karotenoidler ve melatonin (MLT)'dir [21-23].

Birincil Antioksidanlar;

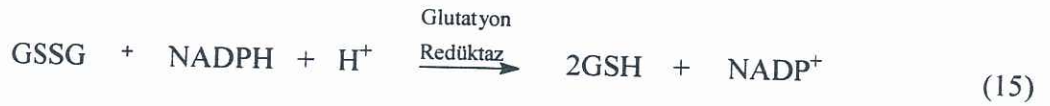
- *Süperoksit dismutaz (SOD):* Bu antioksidan madde $O_2^{\cdot-}$ 'ni H_2O_2 ve O_2 'ne parçalayıp daha zararlı formlara dönüşmesini engeller.



- *Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px):* membranlardaki en önemli antioksidanlardan biri olan E vitamini yetersizliğinde membrandaki hidroperoksitleri indirgeyerek zararlarını önler.



- *Glutatyon Redüktaz:* GSH-Px ile hidroperoksitlerin indirgenmesi sonucu oluşan Okside glutatyonu, nikotinamid adenin dinükleotit fosfatı kullanarak yeniden indirgenmiş glutatyon (GSH) dönüşümünü sağlar.

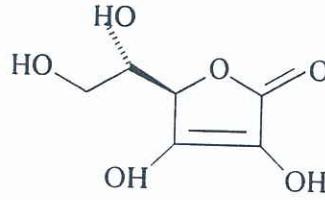


- *Katalaz (CAT):* Hücrelerde zehir etkisi yapan H_2O_2 'i su ve oksijene parçalayan enzimdir.



İkincil Antioksidanlar;

- *Vitamin C (askorbik asit)*: Endojen bir antioksidan olan askorbik asit, membran içindeki ve hücre dışındaki sıvılarda meydana gelen lipid peroksidasyonunu önlemektedir. Fazla miktar kullanımında bile toksik etki meydana getirmeyen askorbik asit, güçlü bir indirgeme aktivitesine sahiptir. Süperoksit ve OH[•] ile tepkimeye girer ve onları ortamdaki temizler.



Şekil 2.8. Askorbik asidin yapısı (Vitamin C)

- *Vitamin E (α-tokoferol)*: Güçlü bir antioksidan olan α-tokoferol, aktif radikallerle tepkimeye girerek oksidasyona karşı dayanıksız olan çoklu-doymamış yağ asitlerini koruyarak bu moleküler yapıların oksidasyona uğramasını azaltır ya da önler. Böylece oksidatif strese karşı ilk savunma mekanizmasını oluşturur. α-tokoferol vasıtasıyla Lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonu sonlandırılabilir.



- *Glutasyon (GSH)*: Antioksidan enzimlerine substrat olarak görev yapan GSH radikal kaynaklı hasarlara karşı koymaktadır. Oksidatif stres süreci içerisinde GSH düzeyi azalır ve GSSG artar. Bunun sonucunda glutasyon peroksidaz ve redüktaz etkisi ile vücutta birikmiş olan H₂O₂ ve organik hidroperoksitler ortadan kaldırılmış olur.

2.3. Bitkilerden Antioksidan Etkili Bileşik Ekstraksiyonu İçin Kullanılan Teknikler

2.3.1. Soxhlet Ekstraksiyonu

Kuru numunelerin ekstraksiyonunda kullanılan Soxhlet ekstraksiyon tekniği, 1879'da Franz von Soxhlet tarafından geliştirilmiştir. Bu teknik diğer ekstraksiyon tekniklerine bir referans olarak da kullanılmaktadır [24]. Soxhlet ekstraksiyonu yapmak için numune filtre kağıdından yapılmış bir kartuşun içine konulduktan sonra Soxhlet ekstraktörüne yerleştirilir. Kaynamanın düzenli yapılması için distilasyon balonu içerisine kaynama taşı atılır. Çözücü olarak genellikle hekzan, metanol gibi organik çözücüler kullanılır. Soxhlet kolonu üzerine soğutucu takılarak Soxhlet kolu distilasyon balonuna bağlanır. Çözücü cam balon içerisine yerleştirilip mantolu bir ısıtıcı yardımı ile ısıtılarak buharlaştırılır. Çözücü buharı geri soğutucuya geldiğinde yoğunlaşır ve filtre kağına sarılı numunenin üzerine damlalar halinde düşer. Numunenin bulunduğu ekstraksiyon tüpünün çözücü ile dolması sonucunda geri devir kolunun seviyesine ulaşır ve burada sifon oluşarak çözücü cam balon içerisine boşalmış olur. Bu işlem Soxhlet ekstraktöründeki çözücü berrak bir hal alıncaya kadar devam eder. Bu şekilde Soxhlet ekstraktörü ile yapılan ekstraksiyonun verimi daha yüksek olmaktadır [25].

Referans bir ekstraksiyon tekniği olarak kullanılan Soxhlet ekstraksiyonunun en büyük avantajı numune içerisinde hedeflenen maddenin tamamının distilasyon balonu içerisinde toplanmasıdır. Bu ekstraksiyon tekniğinde kolaylıkla buharlaşan çözücüler kullanıldığından dolayı madde ve çözücü birbirinden kolaylıkla ayrılmaktadır [26]. Uzun süreli bir ekstraksiyon olması ve fazla miktarda çözücü kullanılması da ekstraksiyon tekniğinin dezavantajlarındandır.



Resim 2.1. Deneysel çalışmada kullanılan soxhlet ekstraksiyonu sistemi

2.3.2. Ultrasonik Dalga Destekli Ekstraksiyon

Geleneksel ekstraksiyon tekniklerine alternatif olarak ekstraksiyon süresi kısa, çözücü tüketimi az olan ve çevre kirliliğini önleyen mikrodalga ekstraksiyonu, süperkritik ekstraksiyon ve ultrason destekli ekstraksiyon gibi yeni ve hızlı ekstraksiyon tekniklerine ihtiyaç duyulmuştur. Bu tekniklerde yüksek basınç ve/veya yüksek sıcaklıklarda çalışma imkanı olması ekstraksiyon süresini büyük oranda azaltmaktadır. Basınç dalgalarının elastik yapıdaki fiziksel ortamlardan yayılması sonucu ultrason etkisi oluşmaktadır [27]. Ultrasonun etkisiyle hücre duvarları hasar görür ve ekstrakte edilen maddelerin ortaya çıkması kolaylaşır. Böylece çözücü fazına daha fazla miktarda madde aktarılmış olur. Ultrasonun katı-sıvı ekstraksiyonunda kullanılmasının başlıca sebebi hızlı bir kinetik ve verim artışı sağlamasıdır. Buna ilaveten ultrasonik ekstraksiyon düşük sıcaklıklarda da kullanılabilirdiğinden dolayı sıcaklığa duyarlı maddeleri de ekstrakte edebilir. Ultrason, kullanımı daha kolay ve daha ucuz bir sistem

olması dolayısıyla daha avantajlıdır. Ultrason destekli ekstraksiyon yağ ve esansiyel yağlar, antioksidanlar gibi maddelerin ekstraksiyonunda kullanılmaktadır [28].

Mason ve arkadaşlarının bir çalışmasında, ultrasonun gıdaların işlenmesinde uygulanan ekstraksiyon, kristalizasyon, dondurma, emülsifikasyon, filtrasyon ve kurutmalarda kullanılan özellikleri ile ilgili örnekler verilmiştir [29]. Wang ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada buğday kepeğinden fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu yapılırken en uygun işlemin % 64'lük etanolla 60°C'de 25 dk süreyle uygulanan ultrasonik ekstraksiyonla elde edildiği vurgulanmıştır [30]. Wu ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda gingseng saponinlerinin ekstraksiyonu işleminin ultrason destekli sistemde geleneksel Soxhlet ekstraksiyonundan üç kat daha hızlı olduğu bulunmuştur [31].

2.3.3. Basınçlı Çözücü Ekstraksiyonu (BSE)

Basınçlı çözücü ekstraksiyonu mevcut ekstraksiyon tekniklerine bir alternatif olarak geliştirilmiştir. 1990'lı yılların başında gündeme gelen bu ekstraksiyon tekniği mevcut ekstraksiyon teknikleri ile karşılaştırıldığı zaman çözücü kullanımı, zamandan tasarruf, etkinlik ve tekrarlanabilirlik açılarından daha avantajlı olduğu kabul edilen bir katı-sıvı ekstraksiyon tekniğidir [32]. Ekstraksiyon işlemi, yüksek sıcaklık ve basınç altında çözücülerin vizkozitesini azaltarak ortamı ısıtma kapasitesini artırmakta ve böylece bileşenlerin çözünürlüğünü büyük ölçüde yükseltmektedir. Normal şartlar altında ekstraksiyonları su ile gerçekleştirilemeyen bileşikler için bu teknik kullanılarak suyun karakteri değiştirilip ekstraksiyonları mümkün hale getirilir. Su ile yapılan ekstraksiyonlar, organik çözücülere oranla toksik olmaması ve suyun çevre temizliği için uygun ve ucuz bir çözücü olması nedeniyle daha avantajlıdır [33].

2.3.4. Mikrodalga Ekstraksiyonu

1970'lerin sonlarına doğru analitik kimya laboratuvarında kullanılmaya başlanan Mikrodalga tekniği hızlı, etkin ve modern yöntemlerden biridir. Mikrodalgalar 0,3-300 GHz aralığında değişen elektromanyetik radyasyonlardır ve doğal ürünler için genel olarak 2,5-75 GHz'de ekstraksiyon işlemi uygulanmaktadır [32]. Katı tanecikler üzerinde yoğunlaşan mikrodalga yardımcı ekstraksiyon tekniği, ekstraksiyon süresini düşürmekte ve çözücü miktarını en aza indirmektedir. Bu ekstraksiyon tekniğinin etkisi büyük oranda çözücünün içeriğine, bitki materyaline ve uygulanan mikrodalganın gücüne bağlıdır. Mikrodalga ekstraksiyonuna sulardaki fenolik bileşiklerin katı faz ekstraksiyonu, besin maddeleri içerisindeki vitamin miktarının tayini, besinlerdeki flavinlerin tayini örnek verilebilir [34].

Mikrodalga ekstraksiyon tekniğinin avantajı ekstraksiyon süresinin kısa olması, kullanılan çözücü miktarının az olması ve moleküller arası zayıf hidrojen bağlarını yıkmasıdır. Mikrodalga yardımcı ekstraksiyon, sıcaklık ve basıncı kontrol edilebilen kapalı kap içerisindeki kapalı sistem ekstraksiyonu ve atmosferik basınç altında açık kap içerisinde gerçekleştirilen açık sistem ekstraksiyonu gibi iki farklı yöntem ile gerçekleştirilebilir [35].

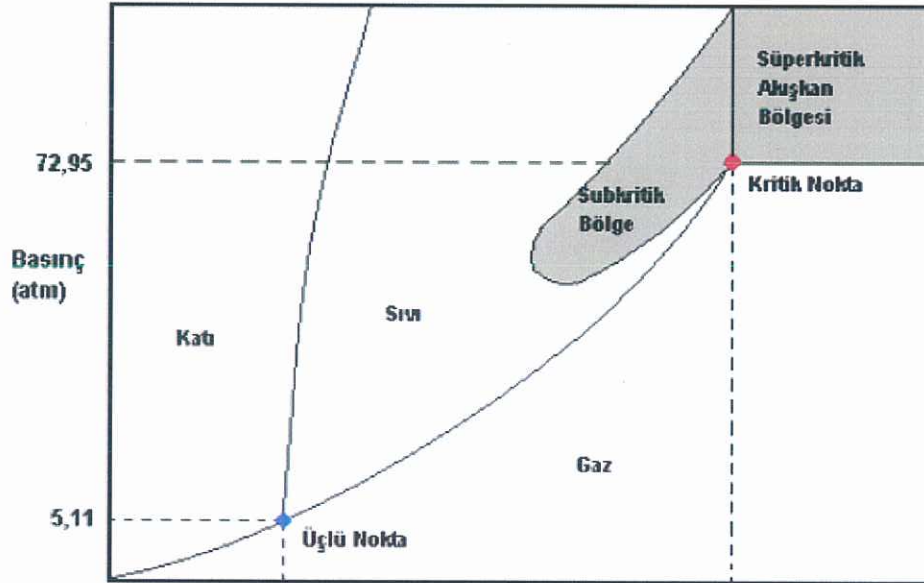
2.3.5. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyon

Süperkritik akışkan ekstraksiyonu yöntemi son yıllarda farmokoloji ve gıda endüstrisinde çokça kullanılmaktadır. Bu yöntemle daha kısa sürede, daha az çözücü harcayarak gerçekleştirilen ekstraksiyon normal koşullarda yüksek sıcaklıkta çözünen bileşikleri ayrıştırabilme özelliğinden dolayı giderek daha fazla ilgi çekmektedir [36].

Daha çok çözücü ekstraksiyonu olan süperkritik akışkan ekstraksiyonunda organik çözücüler yerine, süperkritik akışkan özelliği gösteren maddeler çözücü olarak kullanılmaktadır. Süperkritik akışkanlar bir sıvının çözme gücüne ve yoğunluğuna, ayrıca da bir gazın difüzyon kabiliyetine benzer özellikler gösterirler. Bundan dolayı bir taraftan madde çözünürken diğer taraftan da hızlı bir şekilde kütle transferi sağlanmaktadır [37]. Süperkritik bir akışkan olarak kullanılan karbondioksit (CO₂), maliyeti düşük, kolaylıkla bulunabilen, kullanımı kolay, saflık derecesi yüksek ve

çevreye zararı az olduğundan dolayı en çok tercih edilen süperkritik çözücülerdendir [38].

Bir maddenin basınç-sıcaklık faz diyagramında gaz-sıvı denge eğrisi ileriye doğru hareket ettirilecek olursa, sıcaklık ve basıncı artar. Isıl genleşmeler nedeniyle, sıvının yoğunluğu azalırken basıncın artmasından dolayı gazın yoğunluğu artmaya başlar. Giderek iki fazın yoğunlukları birbirine yaklaşır, gaz ve sıvı arasındaki farklar kaybolur ve eğri bir kritik noktaya gelir. Bu noktada madde artık “akışkan” olarak adlandırılabilir. Böylece maddenin sıcaklığı kritik sıcaklığının (T_c), basıncı ise kritik basıncının (P_c) üzerine çıkartıldığında katı, sıvı ve gaz fazlarından daha farklı, yeni bir bölge ortaya çıkar ve bu bölgede madde “süperkritik akışkan (SA)” olarak tanımlanır [39].



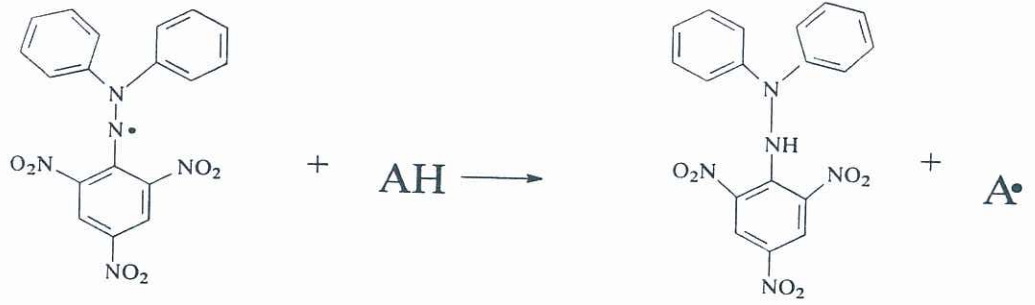
Şekil 2.9. Saf bir madde için sıcaklık-basınç faz diyagramı

Süperkritik akışkan ekstraksiyonunun avantajları yanında bu akışkanlarla ayırma işlemlerinin yüksek basınçta (örneğin 80 atm gibi) gerçekleşmesinden dolayı yüksek yatırım maliyeti ve yüksek enerji gereksinimi gibi birkaç dezavantajı da mevcuttur. Son derece önemli olmasına rağmen göz ardı edilen diğer bir dezavantajı ise, süperkritik akışkan olarak en çok kullanılan CO_2 gazı tüplerinin içeriğinde bile var olan % 1-2'lik oksijenin, antioksidanlar gibi oksijene hassas bileşikler ile tepkimeye girip az da olsa bozunmalarına neden olmasıdır [40].

2.4. Antioksidan Aktivite Tayin Metodları

2.4.1. DPPH Radikal Süpürme Etkisi

Ticari olarak elde edilebilen DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali organizmadaki diğer radikallerin aksine kararlı ve uzun ömürlü bir azot radikali. Serbest elektronlardan birinin yer değiştirmesi ile koyu menekşe rengini oluşturmaktadır [41]. Aşağıdaki şekilde DPPH'nin yapısı ve bir antioksidan molekülü (A-H) ile tepkime mekanizması birlikte verilmiştir.



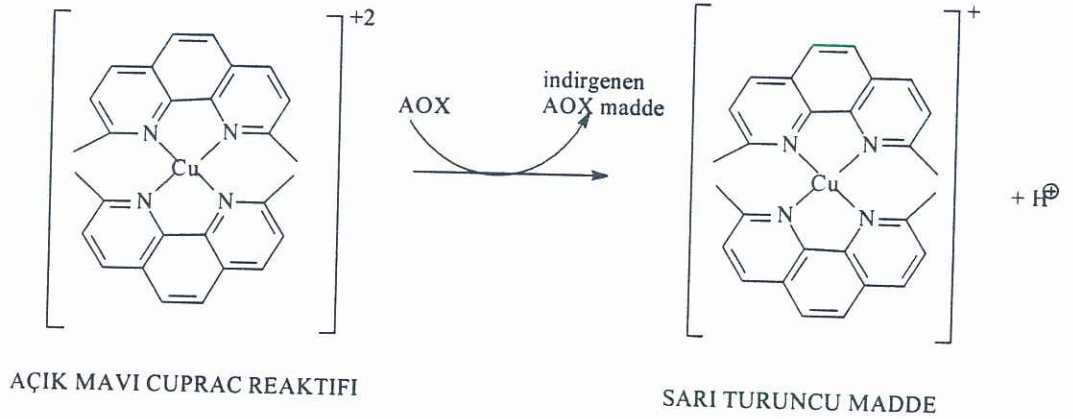
Şekil 2.10. DPPH (2,2,- difenil-1-pikrilhidrazil) radikalin yapısı ve A-H ile reaksiyonu

DPPH radikali antioksidandan bir proton kopararak α,α -difenil- β -pikrilhidrazil molekülüne indirgenmiş olur. Reaksiyon sonucu menekşe rengindeki DPPH yavaş yavaş açık sarı bir renge dönmeye başlar [42]. DPPH çözeltisinde rengin giderek açılması, reaksiyondaki karışımın absorbansının düşmesi ve dolayısıyla da yüksek radikal süpürme kapasitesi anlamına gelmektedir [43]. DPPH ile analiz yapılırken belirli miktarlarda alınan DPPH çözeltisi ve numune çözeltisi karıştırılır ve tepkime başladıktan sonra karışımın absorbansı sabit hale gelinceye kadar (yaklaşık 50 dk) beklenir. Absorbansın sabit hale geldiği DPPH radikalinin rengi açık sarıya döndüğünde anlaşılır. Daha sonra spektrofotometre ile absorbans okunur [44]. Çözelti absorbansındaki fark 515-517 nm'de (en yüksek absorbans değeri 515 nm de görülür) UV-Görünür Bölge spektrofotometresi kullanılarak ölçülür. Çözeltide kalan DPPH, antioksidan konsantrasyonu ile orantılıdır. Başlangıçtaki DPPH Konsantrasyonunu yarıya düşüren değer EC_{50} ya da IC_{50} olarak ifade edilir. Bu metot redoks tepkimeleri ile antioksidanların serbest radikalleri süpürme kabiliyetlerini değerlendirmek için kullanılan basit ve hızlı bir yöntemdir. Birçok analizi aynı anda yapmaya imkan verir.

Fakat DPPH yalnızca organik çözücülerde çözünür, suda çözünmez. Ayrıca DPPH molekülünün sterik engellemesi de büyük molekül yapısına sahip antioksidan bileşikler söz konusu olduğunda reaksiyonun yavaşlamasına hatta durmasına dahi sebep olabilmektedir [45, 46].

2.4.2. CUPRAC Bakır-II İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasite Yöntemi

Polifenolik bileşiklerin antioksidan kapasitelerini tayin etmek için Apak ve arkadaşları tarafından geliştirilen ve genel adı “Bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite tayini” olan spektrofotometrik CUPRAC yöntemi, antioksidan bileşiklerin varlığında Cu(II)-Nc (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) kompleksinin çok yoğun turuncu renkteki Cu(I)-Nc’e dönüşümünün spektrofotometrik olarak izlenmesi esasına dayanır. 450 nm’deki maksimum absorbansı ölçülmek suretiyle antioksidan kapasitesi hesaplanmaktadır [47].



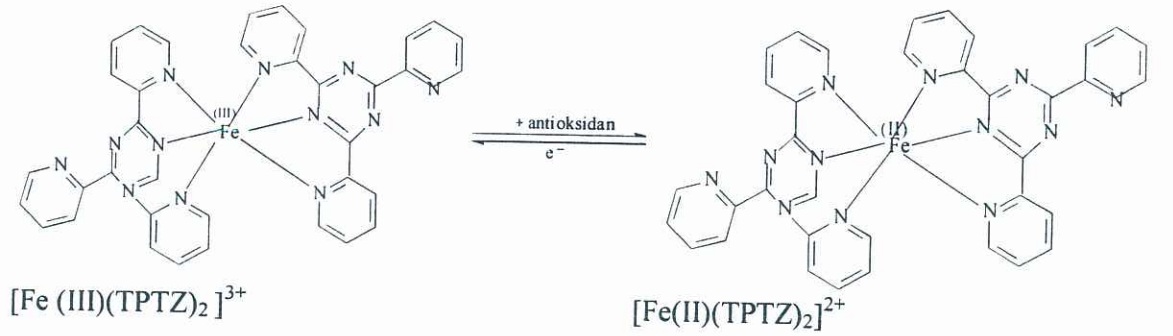
Şekil 2.11. CUPRAC yönteminde Cu (II)’nin antioksidan madde ile Cu (I)’e indirgemesi

Bu yöntem; Cu(II) klorür çözeltisi, (Nc) çözeltisi ve amonyum asetat (pH=7 tamponu) çözlülerinin karıştırılmasından sonra antioksidan ekstraktlarının eklenmesi ve 30 dk gibi bir süre beklendikten sonra spektrofotometrede 450 nm’de absorbans değerlerinin ölçülmesinden ibarettir. Yöntemin uygulanması çok fazla uzmanlık gerektirmez, kullanılan kimyasallar ucuz ve yöntem askorbik asit, ürik asit, gallik asit ve kuersetin gibi moleküller için 10 dk gibi kısa bir sürede (naringin, naringenin gibi kompleks moleküller için 30-60 dk) gerçekleştiği için avantajlıdır [48].

2.4.3. FRAP Fe-III İndirgeme Antioksidan Gücü Yöntemi

FRAP yöntemine göre düşük pH'ta Fe^{+3} 'ün Fe^{+2} 'ye indirgenmesi, renksiz demir (III) Tripridiltriazin (Fe^{+3} -TPTZ) kompleksinin antioksidanlar tarafından rengi kuvvetli mavi olan demir (II) tripridiltriazin (Fe^{+2} -TPTZ) kompleksine indirgenmesine dayanmaktadır. Bu indirgenme reaksiyonu sonuçta renkli $[Fe(III)(TPTZ)_2Cl_3]$ kompleksinin oluşumuna neden olmaktadır. Oluşan bu kompleks oksidan olarak kullanılmaktadır. FRAP reaktifi spektrofotometre ile maksimum absorbans göstermiş olduğu 595 nm'de ölçülmektedir [49, 50].

FRAP nispeten basit bir yöntem olmasına rağmen genellikle bitkilerde bulunan önemli bir antioksidan kaynağı olan glutasyon gibi antioksidanlarla çok yavaş bir tepkime göstermektedir. Ancak bitkisel kaynaklı glutasyonlar insanlar tarafından çok az absorbe edildiklerinden bu dezavantaj ortadan kalkmaktadır [51].



Şekil 2.12. FRAP reaktifi ile antioksidan bileşik arasındaki etkileşim

2.4.4. Folin-Ciocalteu Toplam Fenolik Madde Tayin Yöntemi

Foolin-Ciocalteu (FC) yöntemi, doğal numunelerin antioksidan indirgeme kapasitelerinin tayin edilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Kompleks mavi renkli bir madde olup spektrometrede 750-765 nm'de genellikle gallik asit standardı kullanılarak absorbansları okunmaktadır. Sonuçlar ise genellikle gallik asit eşdeğeri (GAE, $\mu\text{g/mL}$ veya mg/mL) olarak verilir. FC reaktifi fenolik bileşikler için kullanılmasının yanında aynı zamanda fenolik yapıda olmayan aromatik aminler, kükürt dioksit, askorbik asit, Cu(I) ve Fe(II) gibi birçok bileşiği de indirgeme özelliğine sahiptir. Bundan dolayı toplam fenolik maddenin belirlenmesinde uygun değildir [46, 52]. Fakat FC ile toplam fenol tayini güvenilir, basit ve tekrarlanabilir olduğu için tercih edilmektedir. Fenolik bileşikler FC reaktifi ile sadece bazik koşullarda reaksiyona girebilmektedir (NaCO_3 çözeltisi kullanılır ve pH 10'a ayarlanır) [42]. Aynı zamanda FC ile elektron transferi sağlayan TEAC, DPPH ve ORAC gibi metodlar arasında antioksidan kapasitelerinin ölçümü bakımından doğrusal bir korelasyon belirlenmiştir [45, 53]. Bu yöntem uzun sürede gerçekleştirildiği için rutin analizler için uygulanması zordur. Sulu fazda gerçekleştiği için lipofilik bileşiklere uygulanamamaktadır [46].

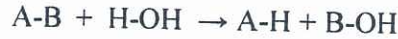
2.5. Hidroliz Reaksiyonları

Süper-ısıtılmış su (yüksek basınç altında kaynama sıcaklığının üzerine kadar ısıtılmış su) ve süperkritik suyun potansiyeli yüksektir. Normal şartlarda iyonik türler için iyi bir çözücü olan su, süperkritik şartlarda iyonik olmayan türlere de uygulanabilecek şekilde karakterini değiştirir. Bu tür ortamlarda su materyallere, normal kaynama sıcaklığından daha yüksek sıcaklıklarda uygulanabilmektedir. İyonik ve polar türler, daha düşük sıcaklıklarda ekstrakte edilebilirler. Yüksek sıcaklıklara, özellikle de kritik sıcaklıklara yaklaşıldığında polar olmayan maddeler de kolaylıkla çözünebilir ve karakterize edilebilir. Basınçlı sıcak su yüksek bir reaktivite gösterir. Asitlerle katalize edilebilen veya normalde hidrotermal dönüşümlerde kendiliğinden gerçekleşebilen bu tür reaksiyonlar çoğunlukla "hidroliz reaksiyonları" olarak adlandırılır. CO_2 de suda çözüldüğünde ortamın proton derişimini artırır ve bu durum da hidroliz reaksiyonlarını katalizler. Doğal bitkisel materyallerin hidrolizinden yakıt elde edilebildiği gibi, elde

edilen hidrolizat ürünlerinin antioksidan aktiviteleri gibi özelliklerinin araştırılması, son yıllarda giderek artan bir ilgi görmektedir [54].

2.5.1. Yüksek Basınçlı Su Ortamında Hidroliz Reaksiyonları

Basınçlı sıcak su kullanılarak, bitkisel biyokütleden şeker, nişasta, selüloz ve lignin gibi bir dizi bileşik elde edilebilmektedir. Nişasta, selüloz ve hemiselüloz, şekerin polimerleridir ve basit şekerlere dönüştürülebilirler. Nişastadan, doğrudan mikroorganizmayla ve hidrolizle basit şekerler üretilebilir ve bunlardan da son zamanlarda sanayi ölçeğinde gıda ile yarışabilecek kapasiteye ulaşan etanol (biyoetanol) elde edilebilir. Selüloz ve hemiselüloz günümüzde gıda üretiminde kullanılmayan tarımsal kaynaklardan elde edilerek basit şekerlere dönüştürülebilirler. Fakat bugüne kadar bilimsel ve teknolojik gelişmeler bu işlemi kurulu bir ticari işletmeye dönüştürmeye izin vermemiştir. Bir hidroliz reaksiyonunda bileşik su etkisiyle aşağıdaki gibi parçalanır:



Bu reaksiyon herhangi bir asit ile katalizlenir. Öyle ki bu işlem, ortamda çözünebilecek CO₂ ile dahi gerçekleştirilebilir. Sıcak su ortamında oluşan hidroliz reaksiyonlarına sıklıkla termal reaksiyonlar (Pirroliz) da eşlik eder. Sıcaklık arttıkça bu termal reaksiyonlar da daha önemli hale gelir [55].

Bitkisel materyallerden elde edilebilecek ana ürünler ile bunların hidrotermal işleme tabi tutulmalarıyla kazanılacak kimyasal bileşik grupları arasında şunlar sayılabilirler:

Nişasta: Nişastanın hidroliz yardımıyla basit şekerlere dönüşümü bilinen eski bir endüstriyel süreçtir. Hidroliz reaksiyonları mineral asitler tarafından katalizlenir, ancak bu süreç şimdilerde yerini bio-dönüşüm tekniklerine bırakmaktadır. Bu reaksiyonlarda mikroorganizmalar kullanılır, ancak proses oldukça yavaştır. Mineral asitler yerine, suda çözülmüş CO₂'in kullanıldığı bir sürecin uygunluğu üzerine çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Yapılan bir çalışmada ortama CO₂'ilave edilmesiyle glukoz veriminin % 5'ten % 60'a çıktığı belirlenmiştir [56].

Selüloz: Bitkinin ana bileşenlerinden olan selüloz, yüksek basınçlı su ile reaksiyona girip basit ve oligomer şekerlere ve çeşitli parçalanma ürünlerine (örneğin, piruvaldehid ve hidroksimetil furfural gibi) dönüşür [57]. Rapor edilen tüm çalışmalara göre hidroliz selülozu, hızlı bir şekilde glukoz olmayan sulu ürünlere, yağa, çeşitli gazlara ve kömürleşmiş atıklara parçalanabilen glukoz ve oligomerlere dönüştürmede önemli bir rol oynar.

Lignin: Bitkisel biyokütlenin önemli bir bileşenidir. Biyokütlenin sınıflandırılması çalışmalarına göre hidroliz, biyokütleyi % 70-80'lere varan oranlarda sınıflandırabilmektedir [58].

Şeker, Glikoz: Glikoz ve fruktoz'un çözücü olarak su kullanılarak süperkritik şartlarda gerçekleştirilen reaksiyonu da incelenmiştir. Yüksek sıcaklıklardaki süperkritik su içinde ve 80 MPa'a kadar olan basınçlarda D-glikozun dehidrasyon ile 5-hidroksimetil furfural, 1,2,4-benzentriol ve furfurala dönüştüğü gözlemlenmiştir. Yüksek sıcaklık ve basınç koşullarında dehidrasyon ve hidroliz gibi reaksiyonlar gerçekleşmektedir.

2.5.2. Lignoselülozik Materyallerde Hidroliz Reaksiyonları

Gıda maddelerinin oksidatif etkilerden korunması ve raf ömürlerinin artırılması için kullanılan modern sentetik antioksidanların, gerek uzun süreli kullanımlarından doğan çeşitli zararlar (örneğin karsinojenik etki gibi), gerekse de tüketicilerin doğal katkı maddelerine karşı artan ilgileri gibi sebeplerle doğal olanlarla değiştirilmesi son zamanlarda araştırma gruplarının ilgisini çekmektedir. Ancak, bu doğal antioksidan gereksiniminin, gıda olarak tüketilen bitkisel materyallerden daha çok, tarım endüstrisi ve ormancılık gibi faaliyetlerde yan ürün olarak ortaya çıkan ve adına genel olarak "lignoselülozik materyal" denilen kaynaklardan karşılanmasına yönelik çalışmalara gittikçe daha fazla ağırlık verilmektedir [59, 60]. Hidrotermal işlemler (özellikle hidroliz) esnasında, odunsu yapıdaki lignin ve lignin-hemiselüloze bağlarının kısmi depolimerizasyonu gerçekleşir. Lignin, polisakkaritlere fenolik asitlerin şeker kısmından kovalent bağlarla bağlıdır. Asidik hidroliz esnasında ligninin büyük bir kısmı çözünmese de (buna Klason lignin adı verilir), özellikle hücre duvarında hemiselülozla birlikte bulunan bir kısmı asidik ortamda çözünür (asit-çözünür lignin). Asidik

hidrolizde ele geçen bu kısım bütünüyle fenolik ya da polifenolik yapıda kabul edilir [60].

Asidik hidroliz esnasında genellikle hemiselülozlar çözünür ve şeker oligomerleri ile basit şekerleri çözelti ortamına verirler. Bunların ticari önemi vardır. Örneğin, şeker oligomerleri prebiyotik (sindirim sisteminde özellikle faydalı bakteri üremesini uyarıcı ve sindirilemeyen yiyecek bileşenleri) olarak kullanılabilirlerken, basit şekerler ise fermentasyon yoluyla etanol veya ksilitol üretiminde karbon kaynağı olarak uygulama alanı bulmuşlardır [61,62]. Hidroliz işlemi bu iki amaçla gerçekleştirilmişse, ksilooligosakkaritlerin derişimini azalttıklarından veya şekerlerin mikrobiyal mekanizmalarını inhibe ettiklerinden dolayı, şeker olmayan ürünlerin (özellikle de fenolik yapılu bileşiklerin) ortamda bulunması istenmez. Bu sorunun üstesinden gelmek için, etil asetat ekstraksiyonu yapmak suretiyle, hidrolizat ürünlerinin saflaştırılması yoluna gidilmiştir [63]. Etil asetat içinde çözünen kısım, antioksidan, antimikrobiyal ve biyolojik aktivitesi olduğu düşünülen potansiyel olarak değerli fenolik bileşikler içerir. Lignin dimer ve monomerlerinin aktif antioksidanlar olduğu rapor edilmiştir. Öyle ki, lignoselülozik materyallerden elde edilen asidik hidrolizatın etil asetat ekstraktının, sentetik antioksidanlar olan BHA ve BHT'den daha yüksek radikal süpürme kapasitesine sahip olduğu bildirilmiştir [60].

Ham ekstraktların saf bileşikler ya da saflaştırılmış fraksiyonlar yerine antioksidan olarak kullanılmasına yönelik çeşitli çalışmalar vardır [64, 65]. Bu yaklaşımın ekonomik açıdan bir avantaj taşıması bir tarafa, bazı çalışmalarda ham ekstraktların antioksidan aktivitelerinin, incelenen saf ana bileşiklerden veya bunların karışımlarından daha etkili oldukları ortaya konulmuştur [66]. Bu durumun muhtemelen, çözelti ortamında temas halinde olan birçok aktif bileşen arasındaki sinerjistik etkiden kaynaklandığı düşünülmektedir [67].

Lignoselülozik materyallerden hidrotermal işlemler sonucunda elde edilen bazı bileşik grupları aşağıdaki Tablo 1'de verilmiştir [68].

Tablo 2.1. Bazı lignoselülozik maddelerden elde edilen bileşik grupları [68].

Lignoselülozik Materyal	Elde Edilen Bileşikler
Kızıl Meşe Odunu	Siringik asit, siringaldehit, vanillik asit, vanillin [69, 70].
Zeytin Çekirdeği Kabuğu	Vanillik asit, vanillin, siringik asit, Siringaldehit, tirozol, hidroksitirozol [71].
Ladin Odunu	Vanillin, dihidrokoniferil alkol, koniferil aldehit, vanillik asit, hidrokinon, katekol, asetoguaikon, homovanillik asit, 4-hidroksibenzoik asit [72].
Şekerkamışı Posası	Benzoik asit, kafeik asit, katekol, ferulik asit, guaiakol, 4-hidroksibenzaldehit, 4-hidroksibenzoik asit, p-kumarik asit, protokatekuik asit, fenol, siringaldehit, vanillik asit, vanillin [73].

Tablo 2.1'e bakıldığında, elde edilen bileşikler içinde, antioksidan aktiviteye sahip oldukları bilinen "fenolik asitler" başta gelmektedir. Fenolik asitler, yeşil bitkilerde bulunan önemli polifenolik bileşik sınıflarından birini teşkil ederler. Ancak, bu bileşiklerin normal ekstraksiyon işlemlerinde bitkilerin sadece yeşil kısımlarından elde edilebilmeleri, yukarıda anlatılan ve bitkilerin odunsu kısımlarından da elde edilebilmelerine imkan veren hidrotermal işlemlerin önemini ortaya koymaktadır.

2.6. Fenolik Asit Profiline Belirlenmesinde Kullanılan HPLC-UV Metodu

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi birden fazla bileşen (pompa, enjektör, kolon (sabit faz) ve dedektör) içeren hareketli bir fazın (çözücü) sabit bir faz içerisinde geçirilmesi işlemidir. Hareketli fazın içindeki bileşenlerin sabit fazdaki bileşenlere duydukları ilgi süreleri farklı olduğundan sistemi farklı zamanlarda terk ederler ve ayrılan bileşenlerin bu farklı sürelerle göre verdikleri sinyaller dedektör tarafından tayin edilir. Bu da HPLC'nin ne kadar verimli olduğunu ve kısa sürede çok iyi ayrımlar yapabildiğini göstermektedir.

Kromatografik analiz süreci, hareketli fazın (çözücünün) sisteme enjeksiyonuyla başlar. Ayrılmanın gerçekleştiği kolonda hareketli fazla birlikte kolona pompalanan örnek kolon içinde bileşenlerine ayrılmaya başlar. Bileşenlerin gönderdiği sinyaller dedektör tarafından kaydedilir ve bilgisayara aktarılır. Bu sinyaller kromatogram olarak adlandırılır.

HPLC uygulamalarında hareketli faz türü ve bileşimi kromatografik performansı etkileyen faktörlerden biridir. HPLC sistemlerinde kullanılan hareketli fazlar:

- Yüksek derecede saflık
- Dedektör ile uyumluluk
- Düşük viskozite
- Örneği çözebilme
- Kimyasal açıdan inert olması
- Uygun fiyat gibi ortak özellikler taşımaktadırlar.

Sıvı fazda çözünen kimyasal maddelerin kolay ve hızlı bir şekilde bileşenlerine ayrılabilirdiği yüksek duyarlılıkta bir yöntem olan HPLC, 1970'lerden günümüze kadar laboratuvarlarda çözünemeyen organik madde karışımlarının neredeyse hepsini ayırabilmekte, saflaştırma ve analiz için yaygın olarak kullanılmaktadır.

HPLC sistemi için kritik bir öneme sahip bileşenlerden en önemlisi ayırmanın gerçekleştiği "kolon"dur. Standart bir kolon 250 mm uzunluk ve 4,6 mm iç çapındadır ve sıvı kromatografi kolonlarına 5 µm partikül büyüklüğünde dolgu maddesi doldurulmuştur. Bir pompanın kapasitesi kolon ve partikülün boyutunu belirlemektedir.

Daha uzun ve daha ince bir kolon demek daha küçük partikül boyutu demektir ve bu da iyi bir ayırım anlamına gelmektedir [74]. Kolonlarda çeşitli dolgu maddeleri kullanılmaktadır. HPLC için kullanılan 3-10 µm çapındaki birçok gözenekli mikropartikülden (alümina, sentetik reçine, polistiren-divinilbenzen veya iyon değiştirici reçineler gibi) genellikle silika olanlar yüksek kolon verimine sahip olduklarından dolayı sıvı kromatografisinde yaygın olarak kullanılmaktadır [75].

HPLC için ikinci kritik öneme sahip kısım, ayrılmanın izlendiği ve kantitatif tayini sağlayan “dedektör”dür. İdeal bir dedektör, kolondan geçen maddeyi hemen fark edebilmeli ve bunu bir elektrik sinyaline dönüştürüp farklı sapsmaları hesaplayabilmelidir. İdeal bir dedektör;

- Çıkardığı gürültü miktarı az olan ve böylece ayrılan bileşenlerin küçük miktarlarını bile tespit edebilir durumda olmalıdır.
- Sıcaklıktan ve hareketli faz kompozisyonundaki değişimlerden etkilenmemelidir.
- Kolay kullanılabilir, sağlam ve ucuz olmalıdır.
- Hücreden hızlı geçen dar pikleri bile anında hesaplayacak hıza sahip olmalıdır.
- Çok küçük miktardaki bileşenleri bile tespit edebilmelidir.

HPLC de kullanılan iki tür dedektör vardır:

Genel dedektörler: Hareketli faz ve örnek çözelti içindeki maddenin miktarlarını tayin eder. Örneğin kırılma indisini ölçen dedektörler ve kütle spektrofotometreleri.

Seçici dedektörler: Yalnızca örnek çözeltisinin özelliklerini tayin etmede kullanılmaktadır. Örneğin floresans, UV, FT-IR, elektrokimyasal, radyokimyasal dedektörler [76].

HPLC için üçüncü kritik öneme sahip kısım, çok kısa bir süre içerisinde çok sayıda örneğin analizine imkan sağlayan “enjeksiyon”dur. Örnek enjeksiyonu 1µL-500µL aralığındaki hacimlerde kullanılmaktadır. HPLC’de ise örnek hacmi 1µL kadar küçüktür. Örnek halkasına bağlı olarak altı yollu bir valftan oluşan enjeksiyon sistemi, basınç sabit tutularak yükleme pozisyonunda bir şırınga ile örnek halkanın içine enjekte edilmektedir. Valf enjektörler yüksek tekrarlanabilirlik sağlamaktadır ve geniş bir aralıktaki örnek hacimlerini yüksek basınçta çözücü akışını durdurmaksızın enjeksiyon

olanağı sağlamaktadır. Aynı zamanda kolonun tıkanmasına neden olan conta (septum) içermemektedir [74].

HPLC için dördüncü kritik öneme sahip kısım, belki de HPLC için en önemli kısım olan “pompa”dır. Bir pompa sistemi yüksek basınca dayanıklı ve sağlam bir yapıda olmalı ve akış hızı için gereken hassasiyetini sağlayabilmelidir. Bir HPLC kolonundan iyi performans elde etmek için küçük hacimde partiküller ve yüksek basınçta pompa kullanılmalıdır. HPLC’de sürgülü ve pistonlu olmak üzere iki tür pompa mevcuttur. Bir pompanın debisi 0,1 mL/dk hassasiyetle ayarlanabilmektedir. Pompa hareketli fazdan aldığı çözücüü enjeksiyona sistemine verir, çözücü enjeksiyon sisteminden geçtikten sonra HPLC ayırma birimi olan kolona gelir ve maddeler kolon içinde birbirinden ayrılır daha sonra taşıyıcı faz ile birlikte dedektöre geçerek derişimi ölçülür. En son akış hücrelerinde derişimi veya hızı değişen maddenin dedektör sinyalinde değişiklik olur ve zamanına göre gelen sinyaller kaydedicide kaydedilir [77].

2.7. Çalışma Materyali Hakkında Bilgi

Anemone albana Stev. subsp. *armena*

Familya: *Ranunculaceae*

Yaygın İsmi: *Sinüzit otu*

Çok yıllık otsu bir bitki olan *A.Albana* bitkisinin habitatu yamaç ve volkanik yamaçlardır. Minimum 2200 m ve maximum 4200 m arasındaki yükseltiye sahip yerlerde yetişen bu uzun ömürlü bitki 4,5-20 cm uzunluğunda, kök sapı dik, radikal yaprakları, gövde ve yaprak sapı beyaz bir örtüyle örtülmüştür. Taç yaprakları mor ve sarı renkte, dikdörtgen daha çok sivri ve düz görünümündedir. Yaprakların boyu erkek organlarının 2/3'nün yarısı kadardır [78].

A.Albana bitkisinin ülkemizde yayılma alanları; Amasya, Gümüşhane, Bayburt, Niğde, Kayseri, Kars, Ardahan yöreleri iken; bitki çimen ve taş aralarında yetişmektedir. Halk arasında *Sinüzit otu* olarak bilinen bitkinin yaprakları ve gövdesi baş ağrısı ve sinüzit için tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadır [79].

Kars'ın Akyaka ilçesinde yaşayan yöre insanları geleneksel olarak *A. Albana* bitkisinin taze yapraklarını ellerinde ezdikten sonra derin derin birkaç kez soluduklarını, bunun sonucunda baş ağrısı ve ateş şikayeti ile hastalanıp birkaç gün yatmak zorunda kaldıklarını, tam iyileşme sağlandıktan sonra ise sinüzit ağrılarının önemli derecede azaldığını ve sonrasında da bu rahatsızlığa daha az oranda yakalandıklarını ifade etmişlerdir. Ayrıca kurutulmuş sinüzit otunu kaynattıktan sonra, karışımın buharını soluyarak uyguladıkları kürden de olumlu sonuçlar aldıklarını eklemiştir [80].



Resim 2.2. *A. Albana* (Sinüzit otu) bitkisi (Doç. Dr. Fatma Güneş arşivi).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Bitki Numunelerinin Eldesi

Anemone albana Stev. *Subs. armena* bitkisine ait numuneler Temmuz 2011 tarihinde Kars'ın Arpaçay ve Akyaka ilçeleri sınırında bulunan Kayadöven köyü kırsalından toplandı. Bitkinin teşhisi Kafkas Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünden Doç. Dr. Fatma GÜNEŞ tarafından yapıldıktan sonra toplanan numuneler kirlere arındırılmak üzere su ile yıkanıp yaprak, gövde ve kök olmak üzere üç kısma ayrıldı. Kök kısmı atıldı ve güneşten muhafaza edilerek laboratuvar ortamında kurumaya bırakıldı. Kuruyan numuneler bıçak veya el yardımıyla ilk önce 1-2 cm oluncaya kadar küçültüldü. Daha sonra numuneler IKA A11 BASIC model bir değirmende öğütülüp küçük parçacıklar haline getirildi.

3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

3.2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler

Deneyde kullanılan kimyasallar ve satın alındıkları firmalar aşağıdaki Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Kimyasallar ve satın alındıkları firmalar

Madde Adı	Firması	Madde Adı	Firması
ABTS	Sigma-Aldrich	Kateşin	Sigma-Aldrich
Asetik Asit (HPLC derecede)	Merck ve Fluka	Metanol (HPLC saflıkta)	Sigma-Aldrich
Aseton	Merck	Klorojenik asit	Sigma-Aldrich
Asetonitril (HPLC saflıkta)	Sigma-Aldrich ve Fluka	Na ₂ CO ₃	Merck
Askorbik asit (C vitamini)	Sigma-Aldrich	NAOH	Merck
Benzoik asit	Sigma-Aldrich	p-OH benzoik asit	Sigma-Aldrich
BHT	Sigma-Aldrich	p-kumarik asit	Sigma-Aldrich
Bütanol	Sigma-Aldrich	Protokatekualdehit	Sigma-Aldrich ve Fluka
DPPH	Fluka ve Sigma-Aldrich	Protokatekuik asit	Sigma-Aldrich
Etanol	Merck	Rozmarinik asit	Sigma-Aldrich

Tablo 3.1 devam ediyor

FeCl ₃	Sigma-Aldrich	Amonyum asetat	Riadel-de haën
Ferulik asit	Sigma-Aldrich ve Fluka	Siringaldehit	Sigma-Aldrich
Folin-Ciocalteu	Fluka	Siringik asit	Sigma-Aldrich
Gallik asit	Sigma-Aldrich	TPTZ	Sigma-Aldrich
Gentisik asit	Sigma-Aldrich	Troloks	Sigma-Aldrich
HCl	Merck	Vanilik asit	Sigma-Aldrich
İzopropanol	Sigma-Aldrich	Vanilin	Sigma-Aldrich
Kaffeik asit	Sigma-Aldrich	p-vanilin	Sigma-Aldrich
sinapik asit	Sigma-Aldrich	Neokuproine	Fluka
CuCl ₂ ·2H ₂ O	Fluka	Etil asetat	Riadel-de haën

3.2.2 Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

Tablo 3.2. Deneylerde kullanılan cihazlar ve donanımlar

Cihaz Adı	Markası
HPLC (Yüksek Basıncılı/Performanslı Sıvı Kromatografisi)	Agilent 1100 Series Degasser (Gaz giderici) Agilent 1100 Series VWD (Ultraviyole Dedektör) Agilent 1200 Series DAD (Diyot Serili Dedektör)
Kolon	C18, Hichrom (250 mm x 4,6 mm i.d., 5 µm partikül)
Şırınga Pompası	Goldman syringe pump
UV-vis spektrofotometre	Ati UnicamUV2 ve Optizen pop
pH metre	Hanna Ph 211
Analitik terazi	Mettler Toledo MS204
Vorteks karıştırıcı	IKA Vortex Genius 3
Öğütücü (Blender)	Waring commercial Blender
Su banyosu	Bibby R 100B
Isıtcılı manyetik karıştırıcı	Heidolph/MR 3001 K Hei-standart
Mikropipet	Gilson (10-100 µL)/(100-1000 µL), Genex Beta (10-100 µL), Transferpette, Brand (100-1000 µL), BIOHIT PROLINE (20-200µL) ve TRANSFERPETTE (0.5- 5 ml).
Derin dondurucu (-18 °C)	VESTEL

Tablo 3.2 devam ediyor

Buzdolabı (+4 °C)	Arçelik
Etüv	Binder ve Nüve FN 120
Analitik terazi	SARTORIUS CP 224s
Vorteks karıştırıcı	YELLOW LINE model
pH metre	HANNA 206
Değirmen	IKA A11 BASIC
Elek	RETSCH AS 200 model
Döner buharlaştırıcı	HEIDOLPH LABORAT 4000
Ultrasonik banyo	BANDELIN SONOREX 50/60 Hz 180/640 watt (Germany)
Spektrofotometre	THERMOSPECTRONIC HELIOS α UV/VIS
Kuvars küvetler	1 cm' lik 1,4 mL hacimli standart küvetler

3.3. Kullanılan Ekstraksiyon Teknikleri

3.3.1. Soxhlet Ekstraksiyonu

Daha önceden öğütülmüş halde bekleyen bitki numunesi elenerek parçacık boyutu 125 µm' den küçük olan numuneler elde edildi. 0,1 mg hassasiyet ile tartılmış yaklaşık 3 gram bitki numunesi alınarak ekstraksiyon çözücüsü ile yıkanan kartuş içerisine konuldu. Kartuş 100 mL' lik Soxhlet ekstraktörü içerisine yerleştirildi. Kaynama balonuna birkaç kaynama taşı atılarak 150 mL metanol çözücüsü konuldu. Çözücü berrak bir hal alıncaya kadar ekstrakte (30-35 sifon) edildi [24, 81]. Ekstraksiyon çözücüsü olarak metanol kullanıldı. Elde edilen ekstraktlar mavi band süzgeç kağıdından süzülerek partikülleri uzaklaştırıldı ve sabit tartıma getirilmiş balonlarda rotary evaporatör ile 35-45 °C' de çözücülerini uçuruldu. Elde edilen kuru ekstraktlar en az 12 saat desikatörde bekletildikten sonra 0,1 mg hassasiyetle tartıldılar ve ayrılan ekstraksiyon çözeltisi stok çözelti haline getirilerek şişede toplandı. Stok çözelti kabının boş kısmı azot gazı ile değiştirilerek güneş ışığı almayacak şekilde +4 °C' de ileri analizler için muhafaza edildi.

3.3.2. Ultrasonik Dalga Yardımlı Ekstraksiyon

Daha önceden öğütülmüş hazırda bekletilen 125 µm'den küçük olan parçacık büyüklüğündeki numuneler kullanılarak yapılan ultrasonik banyo ekstraksiyonu Wang ve arkadaşlarının kullandıkları ultrasonik banyo ekstraksiyonu yönteminin küçük bir değişikliğe uğratarak uygulanmış halidir [82]. Ekstraksiyon işlem için yaklaşık 3 g kadar 0,1 mg hassasiyetle tartılmış numune 250 mL'lik bir erlene konuldu ve 100 ml ekstraksiyon çözücüsü (metanol) ilave edildi. Ağzı sıkı bir şekilde kapatılan erlen sıcaklığı 25-30 °C'ye sabitlenmiş Bandelin Sonorex (50/60 Hz, 180/640 watt Germany) model bir ultrasonik banyoda 1 saat (her 5 dk da bir karıştırılarak) süreyle ekstrakte edildi. Daha sonra ekstrakt süzülerek katı kısım üzerine 100 ml daha çözücü konuldu ve bu sefer 30 dk bekletilerek ekstrakte edildi. Aynı işlem 15 dk'lık bir süre için tekrar edildi. Elde edilen ardışık üç zamandaki çözeltiler karıştırılarak mavi bant süzgeç kağıdından süzülerek sabit tartıma getirilmiş bir balona aktarıldı ve döner buharlaştırıcıda çözücülerini uçurularak tartılmak suretiyle miktarları belirlendi. Tartılan ekstraktlar, ekstraksiyon çözücüsü (metanol) ile tekrar 50 mL'lik balon jöjelerde çözümlenerek stok çözeltileri hazırlandı. Azot atmosferinden geçirilen numuneler +4 °C'de muhafaza edildiler. Bu işlemler üç paralel olarak yapıldı.

3.3.3. Hidrolizat Ekstraktlarının Eldesi

Doğal bitkisel materyalleri elde etmede kullanılan hidroliz ekstraksiyonu, Gonzalez ve arkadaşlarının [55] kullandığı hidroliz ekstraksiyonu yöntemi hafif bir değişikliğe uğratarak uygulanmıştır. A. Albana bitkisinin gövdesine uygulanan hidroliz işleminde 1:10 oranında 8 gr'lık madde tartılarak 80 ml %3'lük H₂SO₄ çözeltisi ile karıştırılıp YELLOWLine TC3 bir ısıtıcıda üzeri cam saat ile kapatılarak çözelti ısıtmaya başlandı. Çözeltide kaynama başlayınca (82-92 °C'de) iki buçuk saat süreyle hidroliz işlemine başlandı. Hidroliz işlemi tamamlandıktan sonra mavi bant süzgeç kağıdı kullanılarak süzme işlemi yapıldıktan sonra 50 ml etil asetat eklenip iyice çalkalandıktan sonra 2 saat süre ile ayrılmaya bırakıldı. Ayrılma işlemi bittikten sonra çözünen madde etrafı alüminyum folyo ile kaplı bir cam balona alınıp geriye etil asetat içerisindeki çözünmemiş maddeye tekrar etil asetat ilave edilip ayrılmaya

bırakıldı. Bu işlem etil asetat fazı berraklaşana kadar (4 defa) tekrar edildi. Çözünmüş olarak elde edilen madde evaporatorde kurutulduktan sonra sabit tartıma getirildi ve tartılıp 50 mL metanolde stok çözeltisi elde edildi. Bu işlem üç ayrı paralel için tekrar edildi.

3.4. Toplam Fenolik Madde Tayini

Toplam fenolik madde tayini yöntemi Folin-Ciocalteu yöntemine göre yapılmıştır. Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak Slinkard ve Singleton'un metodu [84] hafif değişikliklerle uygulanmıştır. Standart olarak kullanılan gallik asit metanol içerisinde çözünerek 15,63; 31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000 µg/mL konsantrasyonlarında elde edilen 7 standart gallik asit çözeltisi kullanılarak kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Bunun için, elde edilen 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 Na₂CO₃ ilave edildi. Tekrar vorteksleme işlemi yapıldıktan 2 saat sonra Thermospectronic Helios α marka UV cihazı kullanılarak 765 nm'de absorbans değerleri okundu. 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 çözeltilerden alınan eşit miktarların karıştırılması suretiyle oluşturulan sabit konsantrasyonlu ortak çözeltiye de uygulandı. Bu çözeltilerden hazırlanan üç paralelin 765 nm'de absorbansları okundu. Kör olarak saf su kullanıldı ve kör absorbansı A1 ve üç paralelin absorbans ortalaması A2 olmak üzere

$$\Delta A = A2 - A1$$

eşitliği kullanılarak absorbans farkları hesaplandı. Elde edilen 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.

3.5. Antioksidan Aktivite Tayini Metodu Seçimi

Elektron transferine dayanan bu yöntemler, bir reaksiyon karışımı içerisinde antioksidan ve oksidan olmak üzere iki bileşen oluşturmaktadır. Oksidan olan bileşenin antioksidan olan bileşenden bir elektron alması ile metal, karbonil ve radikal içeren bileşikler indirgenmektedir. Böylece oksidan madde renk değişimine uğramaktadır. Oksidan maddesindeki rengin değişme miktarı antioksidan madde derişiminin miktarı ile orantılıdır [42]. Elektron transferine dayanan yöntemler asidik (FRAP), bazik (toplam fenolik içerik), nötr (TEAC) koşullarda, daha hızlı gerçekleştirilebilen ve yöntemin uygulanması kolay olduğundan çokça tercih edilen yöntemler grubudur. Bu yöntemler arasından DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikal süpürme yöntemi, CUPRAC Cu(II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi, FRAP Fe-III İyonu İndirgeme Antioksidan Gücü Yöntemi ve Folin-Ciocalteu Toplam Fenolik Madde Tayin Yöntemleri tercih edilmiştir. Bu yöntemler arasında genellikle lineer bir ilişki mevcuttur [41].

3.5.1. DPPH Radikal Süpürme Yöntemi

Uygulanan DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) yöntemi Cuendet ve arkadaşlarının metodunun [83] küçük bir değişiklik yapılarak kullanılmış halidir. Hazır halde bekletilen stok çözeltilerden konsantrasyonları 15,63; 31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000 µg/mL olan ekstraktlar hazırlandı. Seyreltilen numune ekstraktlarından 750 µL ve metanol çözeltisinde hazırlanmış DPPH radikalinin 1.10^{-4} M'lık çözeltisinden de 750 µL miktarlarında alınıp vortekslenildi ve karanlık ortamda 50 dk bekletildikten sonra THERMOSPECTRONIC HELIOS α UV/VIS spektrofotometre cihazı ile 517 nm (DPPH yöntemi için kullanılan maksimum dalga boyu) dalga boyunda ölçümleri yapıldı. Her bir numunenin üç ayrı paraleli birleştirilip konsantrasyon ortalamaları alındı ve bu şekilde absorbansları ölçüldü. Numune körleri için 750 µL numune alınıp üzerine etanol içerisinde hazırlanmış 100 µM'lık DPPH çözeltisinden 750 µL ilave edildi. Kontrol çözeltisi ise üç paralel olarak hazırlandı, kontrol tüplerine 100 µM'lık 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 absorbanları spektrofotometrede okunmuştur. Elde edilen absorban değerlerinin ortalamasından körlerin ortalaması çıkartılarak standartlar ve numuneler için kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Elde edilen grafikten IC₅₀ (radikal konsantrasyonunu yarıya düşüren değer) hesaplandı. IC₅₀ değerleri, kontrol çözeltilerine karşılık gelen absorbanların ortalamalarının ikiye bölünmesi ile elde edilen değerlerin kalibrasyon grafiğinin doğru denkleminde “y” değeri yerine konulmasıyla karşılık gelen konsantrasyondan bulundu. % Radikal giderme oranları ise:

$$\% \text{ Radikal süpürme} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

eşitliği kullanılarak hesaplandı.

A₀; Kontrol çözeltilerinin absorban ortalaması

A₁; Numune absorbanlarının ortalamasından kör absorbanı farkı.

3.5.2. CUPRAC (Cu (II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi) Yöntemi

Apak ve arkadaşlarının yöntemi [85] uygulanarak gerçekleştirilen bu deneyde, 10⁻² M Cu (II) için, CuCl₂.H₂O'den 0,4262 g tartılıp su ile 250 mL'ye tamamlandı. 1 M NH₄Ac'dan (pH=7) 19,27 g tartılıp alındı ve su ile 250 mL'ye tamamlandı. 7,5x10⁻³ M neokuprin (Nc) çözeltisi için 0,0390 g'lık neokuprin (2,9-dimethyl-1,10-phenantroline) tartılıp % 96'lık etil alkolde çözülerek 25 mL'ye seyreltildi. Karşılaştırma maddesi olarak %96'lık etil alkolde hazırlanmış 10⁻³ 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 vortekslendi. Tüpler kapakları iyice kapatılarak karanlık ortamda bir saat süreyle beklemeye alındı. Daha sonra 450 nm'de köre karşı absorbanları okundu.

Troloks'un metanoldeki çözeltisinden (50, 100, 150, 200, 250 µl konsantrasyonda) 0,5 mL, 0,1 mL, 0,15 mL, 0,2 mL, 0,25 mL alınıp üzerine sırasıyla 1'er mL Cu(II), Nc, NH₄Ac 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 absorpsanlar okundu. Okunan absorpsan değerleri kalibrasyon doğru denkleminde yerine yazılarak numune miktarları mol TEAK/g kuru numune olarak ifade edildi.

3.5.3. FRAP (Fe (III) İyonu İndirgeme Antioksidan Gücü) Yöntemi

Doğal ürünlerden elde edilen ekstraktlardaki antioksidan bileşenlerin serbest radikalleri indirgeme gücünü belirleme yöntemlerinin en sık kullanılanlarından biri olan FRAP testleri için Benzie ve arkadaşlarının yöntemi [86] hafif bir değişiklikle kullanılmıştır. FRAP reaktifi A, B, C çözeltilerinin ayrı ayrı hazırlanmasından sonra bu çözeltilerin belli miktar ve sıraya göre karıştırılması suretiyle hazırlanmıştır. Karşılaştırma maddesi olarak troloks kullanılmıştır.

A Çözeltisinin Hazırlanması: A çözeltisi için 2,5 mL asetik asit alınıp su ile 40 mL'ye tamamlanır. 0,5 molar NaOH ile pH 3,6'ya ayarlanarak 90 mL metanol eklenmesi ile toplam hacim 150 mL'ye tamamlanır.

B Çözeltisinin (TPTZ) Hazırlanması: B çözeltisi için 0,0486 gr TPTZ tartılıp 100 µm 6 mL HCl'de çözüldükten sonra 9 ml metanol eklenerek hacim 15 mL'ye tamamlanır.

C Çözeltisinin (FeCl₃) Hazırlanması: 0,0811 gr FeCl₃.6H₂O tartılıp 6 mL suda çözüldükten sonra 9 mL metanol eklenerek toplam hacim 15 mL'ye tamamlanır.

A, B, C çözeltileri hazırlandıktan sonra A çözeltisi üzerine 15 mL B çözeltisi ilave edilip karıştırılır ve C çözeltisinin tamamı bu karışıma ilave edilip iyice karıştırıldıktan sonra karanlık ortamda deney yapılincaya kadar muhafaza edilir. Hazırlanan FRAP reaktifinin maximum bekleme süresi 50 dk olduğundan bu süre içerisinde deneysel işlemler tamamlanmış olmalıdır. Ayrıca taze iken hemen kullanılması maximum absorpsan aralığında değerler vermesini sağlar. 10³µm

Troloks'un 600, 300, 150, 75, 37,5 µl'lik absorbanlardaki kalibrasyon grafiği kullanıldı. Beş deney tüpü alınıp üç tanesine numuneden 100'er µL ve 3 mL FRAP reaktifı, bir deney tüpüne numune körü (100 µL numune çözücüsü) ve 3 mL FRAP reaktifı, kalan bir deney tüpüne ise 100 µL numune ve 3 mL % 60'lık metanol çözeltisi ilave edildi. Bu suretle numuneler seyreltikten sonra 20 dk inkübasyon süresi dolan tüp küvete aktarıldı ve 595 nm'de UNICAM UV-100 UV/VISIBLE marka bir spektrofotometrede absorbanı okundu.

3.6. Fenolik Asit Profilini Belirlemede Yöntem Seçimi

Gıda maddelerindeki en önemli antioksidan etkili bileşik gruplarından olan fenolik asitlerin ekstraktlardaki profilini belirlemek amacıyla araştırmacılar tarafından birçok yöntem kullanılmıştır [87]. Bu yöntemlerin özelliği genellikle bazı fenolik asit gruplarına veya fenolik asitlerin belli formlarına göre ayarlanmış olmalarıdır. Fenolik asitler genel olarak su, metanol, aseton veya bunların belli oranlardaki karışımlarından elde edilen çözücülerle ekstrakte edilmektedirler. Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi (LC-MC), gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS), ince tabaka kromatografisi (TLC) ve ters faz sıvı kromatografisi (RP-HPLC) fenolik asit profillerinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmıştır [88-91]. Bu metodların her birinin analitik çalışmalarda çok kullanışlı oldukları kanıtlanmıştır. Özellikle de bu çalışmada kullanılan ters faz sıvı kromatografisi (RP-HPLC) fenolik asitlerin belirlenmesinde kullanılan en yaygın yöntemlerdendir [92].

3.6.1. Yöntem Geliştirme

Kromatografik analizler asetik asit, modifiye olmuş asetonitril (CH_3CN , ACN) ve sulu haldeki fazlara uygulanan gradient programı C18 (Agilent) kolonu ile bitki ekstraktlarının fenolik bileşimlerini ayırmak için kullanılan bir yöntemdir. Hareketli fazda fenolik asitleri protonlaştırmak için formik asit (HCOOH), asetik asit (CH_3COOH), trifloroasetik asit (TFA) ve fosforik asit (H_3PO_4) gibi asitliği modifiye ediciler kullanılarak fenolik asit piklerinin şekilleri ve çözünürlüklerinin artırılması hedeflenir [93].

3.6.2. HPLC-UV-DAD Koşulları

HPLC-UV-DAD analizleri Agilent (Almanya)'dan degazer, ultraviyole dedektör (1100 serisi) ve DAD (diyot serili dedektör 1200 serisi) donanımına sahip bir HPLC cihazında Chemstation (Agilent) programı ile kontrol edilerek yapıldı. Tüm analizlerde C18 kolon (250 mm x 4.6 mm i.d., 5 µm partikül) kullanıldı. Hareketli faz (A) metanol, (B) 50/50 (v/v) asetonitril/su içindeki % 0,5 (v/v) asetik asit çözeltisi, (C) % 2 (v/v) asetik asitin sudaki çözeltisi, (D) asetonitril çözeltilerinden oluşmaktadır. Elüsyonda takip eden gradiyent kullanıldı. Enjeksiyon hacmi 20 µl ve akış hızı 1,2 ml/dk olarak ayarlanan dedektör 280 nm dalga boyunda çalıştırıldı. Metod 45 dk da sonlanacak şekilde ayarlandı. Kolonda ayırma işlemi yapıldıktan sonra saf su ile 10 dk yıkama yapılmakta böylece kolonda kalan maddelerin uzaklaştırılması hedeflenmektedir. Bu yıkama metodu gradiyent olarak hazırlanmış ve aşağıdaki çizelgede gösterilmiştir.

Tablo 3.3. Numune yürütmesinde kullanılan gradient program

Zaman (dk)	%B çözücüsü	%C çözücüsü	%D çözücüsü	Akış hızı (mL/dk)	Maksimum Basınç (bar)
0.00	10.0	90.0	0.0	0.700	275
28.00	50.0	50.0	0.0	0.700	275
32.00	90.0	10.0	0.0	0.700	275
35.00	20.0	0.0	80.0	0.700	275
42.00	20.0	0.0	80.0	0.700	275
44.00	10.0	90.0	0.0	0.700	275
45.00	10.0	90.0	0.0	0.700	275

A çözücüsü, numuneler arası yürütmelerde uygulanan yıkama programında kullanılmıştır.

*A: metanol

B: %0,5 Asetik asit (50/50, su-asetonitril karışımında)

C: %2 Asetik asit (suda)

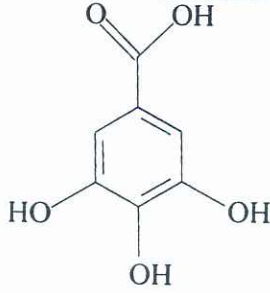
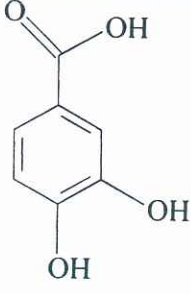
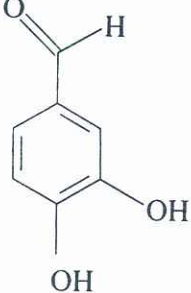
D: Asetonitril

3.6.3. Standart ve Kalibrasyon

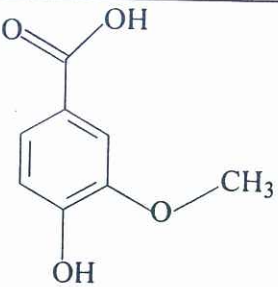
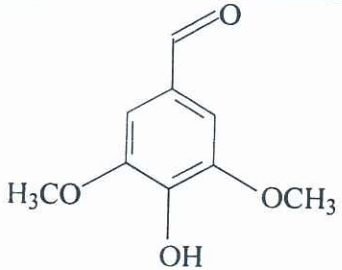
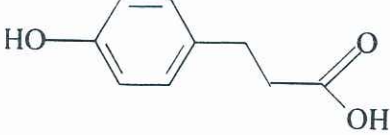
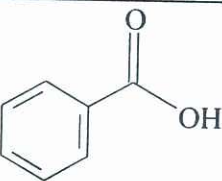
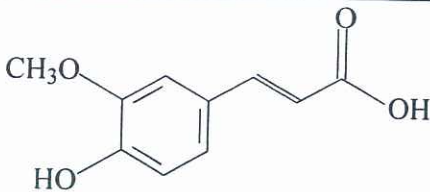
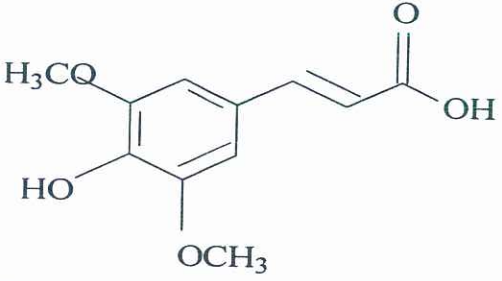
Hazırlanan tüm stok çözeltiler % 40'lık metanol çözeltisi içerisinde 50 mg/mL konsantrasyonda hazırlandı. Enjeksiyon çözeltileri, 15 standardın yukarıda anlatıldığı şekilde hazırlanan stok çözeltilerinin her birinden 25 µL alınıp 2 ml'lik ependorf kapaklı tüplerde metanol ile seyreltilmesiyle hazırlandı, analiz yapılırken 20 µL enjekte edildi. Her bir standardın konsantrasyonuna karşılık gelen maksimum konsantrasyondaki pik alanları kullanılarak kalibrasyon eğrileri elde edildi. Bütün standartların (gallik asit, protokatekuik asit, protokatekaldehit, vanilik asit, vanillin, benzoik asit, siringik asit, p-OH benzoik asit, kafeik asit, siringaldehit, p-kumarik asit, ferulik asit, sinapik asit, gentisik asit, klorogenik asit) kalibrasyonu için kullanılan dalga boyu 280 nm'dir. Ayrıca her standart için kullanılan maksimum dalga boyları şu şekildedir: protokatekuik asit, vanilik asit için 260 nm, gallik asit, siringik asit, için 274 nm, protokatekualdehit, vanilin için 280 nm, p-kumarik asit

asit, ferulik asit, sinapik asit, gentsik asit, klorogenik asit) kalibrasyonu için kullanılan dalga boyu 280 nm'dir. Ayrıca her standart için kullanılan maksimum dalga boyları şu şekildedir: protokatekuik asit, vanilik asit için 260 nm, gallik asit, siringik asit, için 274 nm, protokatekualdehit, vanilin için 280 nm, p-kumarik asit, siringaldehit için 308, klorogenik asit, kafeik asit, ferulik asit, sinapik asit, gentsik asit için 324 nm. HPLC analizlerinde kullanılan standartlar, molekül şekilleri, molekül ağırlıkları ve DAD'da gösterdikleri maksimum dalga boyları aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

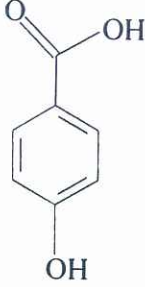
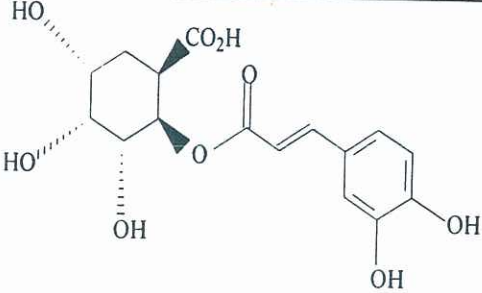
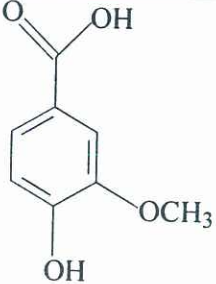
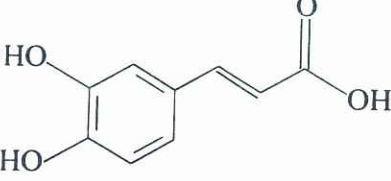
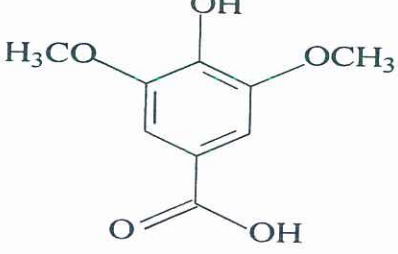
Tablo 3.4. HPLC analizlerinde kullanılan standartlar

Standartın adı	Standartın açık yapısı	Standartın Molekül ağırlığı	DAD'da maksimum dalga boyu (nm)
Gallik asit		170,12	274
Protokatekuik asit		154,12	260
Protokatekuik aldehit		138,12	280

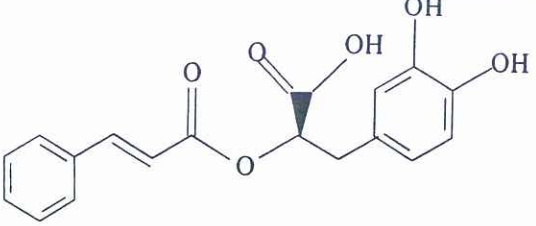
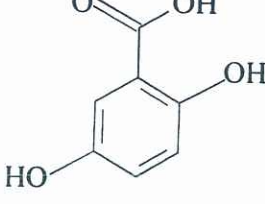
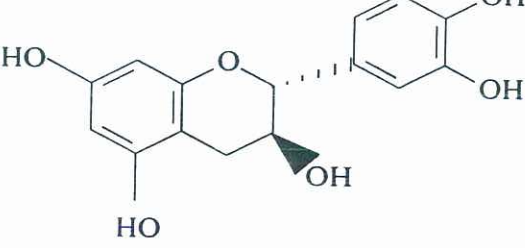
Tablo 3.4. devam ediyor

Vanilin		152,15	280
Siringaldehit		182,18	308
p-Kumarik asit		164,16	308
Benzoik asit		122,12	240
Ferulik asit		194,19	324
Sinapik asit		224,21	324

Tablo 3.4. devam ediyor

p-OH benzoik asit		138,12	260
Klorojenik asit		168,15	324
Vanillik asit		354,17	260
Kafeik asit		180,10	324
Siringik asit		198,17	274

Tablo 3.4. devam ediyor

Rozmarinik asit		360,31	324
Gentisik asit		154,12	324
Kateşin		290,27	274

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Ekstraksiyonlardan Elde Edilen Verim Yüzdeleri

Yapılan ekstraksiyon deneylerinin verimleri hesaplanarak aşağıdaki Tablo 4.1’de verilmiştir. Ekstraksiyon verim yüzdeleri:

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

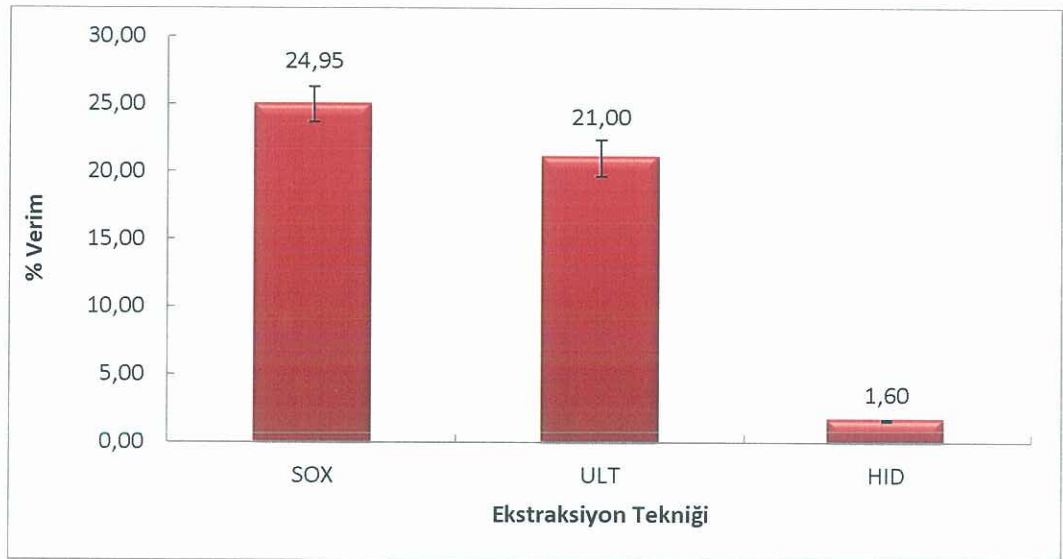
eşitliği kullanılarak hesaplandı.

Tablo 4.1. Ekstraksiyonlardan elde edilen verim yüzdeleri

Ekstrakt*	% Ekstraksiyon Verimi
SOX	24,95±1,30
ULT	21,00±1,34
HİD	1,60±0,07

* SOX: Soxhlet ekstraksiyonu (yapraklara uygulandı); ULT: Ultrasonik banyo ekstraksiyonu (yapraklara uygulandı); HİD: Hidroliz işlemi (sadece gövde kısmına uygulandı).

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



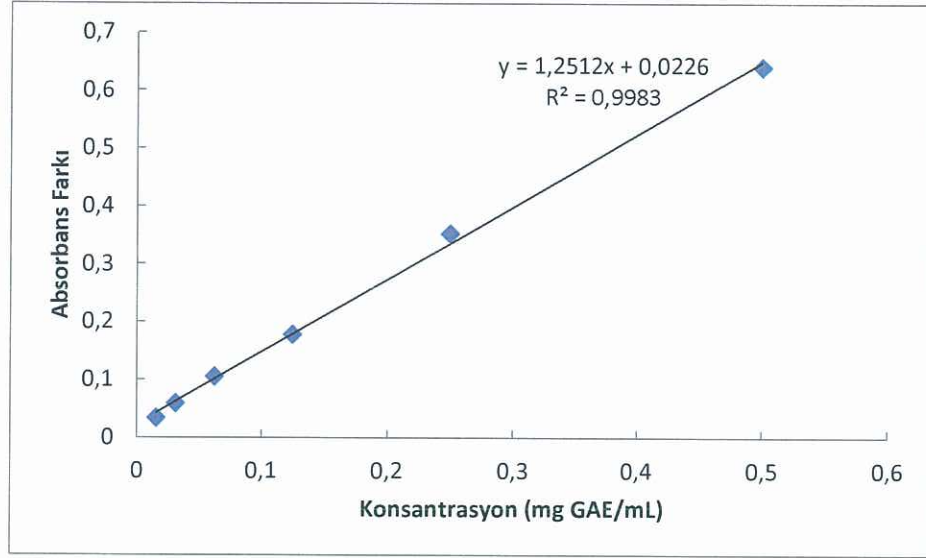
Şekil 4.1. Ekstraksiyonlardan elde edilen verim yüzdeleri

Tablo 4.1 ve Şekil 4.1’de görüldüğü gibi en yüksek ekstraksiyon verimi Soxhlet ekstraksiyonundan elde edilmiştir. Bitkinin gövdesine uygulanan hidroliz işleminde kullanılan madde miktarı (yaklaşık 8,0 g), bitkinin yaprağı ile gerçekleştirilen Soxhlet ve ultrasonik banyo ekstraksiyonlarına kullanılan miktara (yaklaşık 3,0 g) göre daha fazla olmasına rağmen verimi en düşük çıkmıştır. Ancak burada hidroliz işleminde elde edilen hidrolizatın tamamının değil, sadece bu hidrolizata uygulanan ikinci bir ekstraksiyon işlemiyle elde edilen etil asetat ekstraktlarının kullanıldığı unutulmamalıdır. Yani hidrolizatın sadece etil asetatta çözünen kısmı dikkate alınmış geri kalan kısmı atılmıştır. Ayrıca bitkinin yaprak kısmının gövde kısmından daha farklı bileşenlere sahip olabileceği düşünüldüğünde de verim yüzdeleri arasındaki mevcut fark izah edilebilir.

Uygulanan istatistiksel işlemlerde Soxhlet ve ultrasonik banyo ekstraksiyonlarının ekstraksiyon verimleri karşılaştırılmış, bitkinin farklı bir kısmına uygulandığı için hidroliz ekstraktları bu karşılaştırmaya dahil edilmemiştir. % 95 güven seviyesinde uygulanan t testi (Student’s t-Test), ultrasonik banyo ekstraksiyonunun veriminin, Soxhlet ekstraksiyonunda elde edilene göre anlamlı derecede daha düşük olduğunu ortaya koymuştur ($p < 0,05$). Bu durum, Soxhlet ekstraksiyonunda uygulanan daha yüksek sıcaklık ve daha uzun ekstraksiyon süresinin birleşik etkisine bağlanmıştır.

4.2. Toplam Fenolik Madde Tayini DeneYlerinden Elde Edilen Bulgular

Numunelerin toplam toplam fenolik madde içeriğini tayin etmek için kullanılan kalibrasyon grafiği Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Grafik gallik asit kullanılarak hazırlandı.



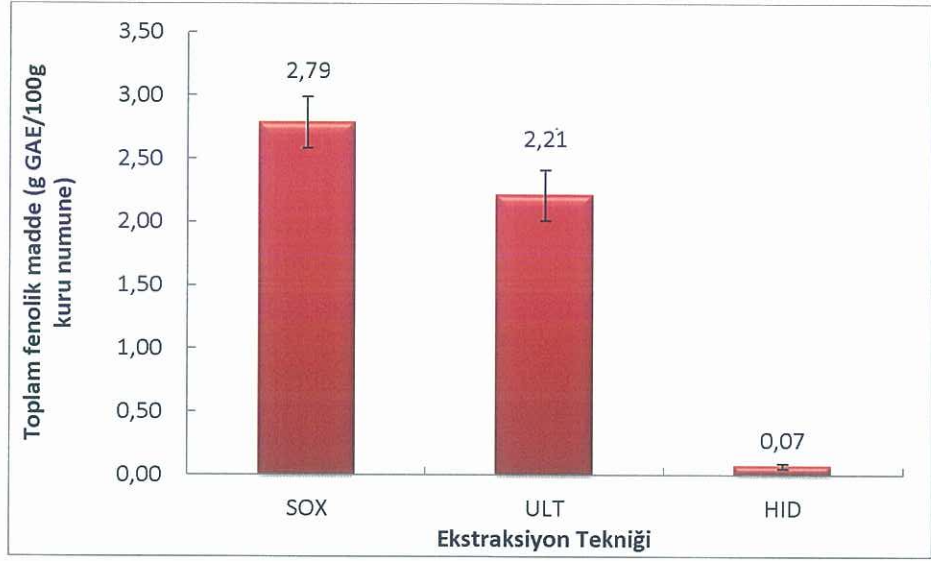
Şekil 4.2. Toplam fenolik madde tayini için kullanılan kalibrasyon grafiği

Tablo 4.2. Ekstraktların toplam fenolik madde içerikleri

Ekstrakt *	Toplam Fenolik Madde Miktarı (mg GAE/100 g kuru numune)
SOX	2,79±0,20
ULT	2,21±0,20
HİD	0,07±0,02

* SOX: Soxhlet ekstraksiyonu (yaprak); ULT: Ultrasonik banyo ekstraksiyonu (yaprak); HİD: Hidroliz işlemi (gövde).

Tablo 4.2’de hazırlanan karşılaştırmalı toplam fenolik madde içeriği grafiği Şekil 4.3’te verilmiştir.



Şekil 4.3. Ekstraktların karşılaştırmalı toplam fenolik madde içerikleri

Şekil 4.3'e bakıldığında ilk göze çarpan husus, hidroliz işleminden elde edilen ekstraktın toplam fenolik madde içeriğinin, Soxhlet ve ultrasonik banyo ekstraktlarının toplam fenolik madde içeriği değerlerinden çok daha düşük olduğudur. Soxhlet ekstraktı için elde edilen değer ultrasonik banyo ekstraktı için elde edilenden biraz daha iyi gibi gözükmektedir. Fakat istatistiksel olarak, % 95 güven seviyesinde aralarında anlamlı bir fark olmadığı ortaya konulmuştur ($p>0,05$). Ultrasonik banyo tekniğinde uygulanan daha düşük sıcaklık ve ekstraksiyon süresine rağmen, Soxhlet tekniği ile elde edilen toplam fenolik madde miktarına eşdeğer bir değer ortaya koymuş olması dikkat çekicidir. Bu durum, fenolik yapıli bileşenlerin ultrasonik dalga destekli uygulamalarda Soxhlet tekniğine göre daha kolay bir şekilde matris yapısından ayrılarak çözelti ortamına geçebildikleri hususunun yanı sıra, Folin reaktifi ile reaksiyona girebilen ve fenolik yapıli olmayan bileşen gruplarının da ultrasonik dalga destekli uygulamalarda daha fazla ekstrakte olabildiklerini akla getirmektedir. Çünkü Folin reaktifinin sadece fenolik yapıli bileşiklere karşı yükseltgeyici özelliği olmadığı, diğer indirgeyici bileşenlerle de reaksiyon verebildiği bilinmektedir [46, 52].

4.3. DPPH Radikal Giderme Antioksidan Aktivite Tayini Deneylerinden Elde Edilen Bulgular

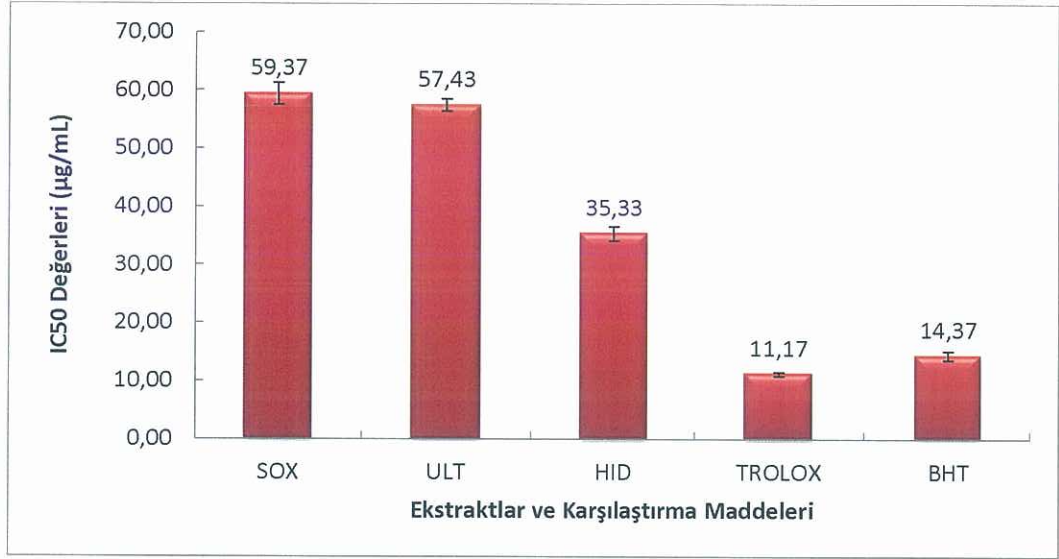
Bu yöntemde, uygulanan ekstraktın antioksidan aktivitesi ortamdaki serbest radikalleri süpürebilme kapasitesine bağlıdır. DPPH radikali, kullanılan diğer radikallere göre daha kararlı bir yapıdadır ve reaksiyon nispeten daha kısa sürede gerçekleştiği için antioksidan aktivitenin belirlenmesinde çokça kullanılmaktadır

Ekstraktların ve karşılaştırma maddeleri olarak kullanılan Trolox ve BHT'nin, DPPH radikali konsantrasyonunu % 50 oranında azalttıkları konsantrasyon değerleri, yani IC₅₀ değerleri Tablo 4.3'te, bu değerlerden hazırlanan karşılaştırma grafiği Şekil 4.4'te verilmiştir.

Tablo 4.3. Ekstraktların ve karşılaştırma maddelerinin IC₅₀ değerleri

Ekstrakt*	IC ₅₀ değeri (µg/mL)
SOX	59,37±1,85
ULT	57,43±1,08
HİD	35,33±1,24
BHT	14,37±0,79
TROLOKS	11,17±0,28

* SOX: Soxhlet ekstraksiyonu (yaprak); ULT: Ultrasonik banyo ekstraksiyonu (yaprak); HİD; Hidroliz işlemi (gövde).



Şekil 4.4. Ekstraktların ve karşılaştırma maddelerinin, DPPH radikali konsantrasyonunu % 50 oranında azalttıkları konsantrasyon değerleri.

Şekil 4.4'e bakıldığında, en iyi radikal süpürme değerlerini karşılaştırma maddeleri olan BHT ve Troloks'un sergiledikleri görülmektedir (daha düşük değer daha yüksek antioksidan aktivitesi anlamına gelmektedir). Karşılaştırma maddelerinden IC₅₀ değeri 11,17 µg/mL olan Troloks ve 14,37 µg/mL olan BHT'ye bakıldığında, Troloks'un radikal süpürücü etkisinin BHT'den daha yüksek olduğu görülmektedir. *A.Albana* bitkisine ait Soxhlet, ultrasonik banyo ve hidroliz işlemi ekstraktlarının IC₅₀ değerlerinin, karşılaştırma maddelerinin IC₅₀ değerlerinden daha yüksek çıktığı, dolayısıyla daha düşük radikal süpürücü etkiye sahip oldukları görülmüştür.

Soxhlet ve ultrasonik banyo ekstraktı arasında yapılan karşılaştırma testinde, % 95 güven seviyesinde iki değer arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0,05$). Ancak burada ilginç olan durum, % verim ve toplam fenolik madde içeriği Soxhlet ve ultrasonik banyo ekstraktlarına göre çok daha düşük olan hidroliz ekstraktının IC₅₀ değerinin, söz konusu iki ekstraktın IC₅₀ değerlerine kıyasla belirgin derecede daha düşük olmasıdır. Yani hidroliz ekstraktı, Soxhlet ve ultrasonik banyo ekstraktlarına göre daha yüksek bir DPPH radikal süpürme yeteneği, dolayısıyla daha yüksek bir antioksidan aktivite değeri ortaya koymuştur. Bu durum, bitkisel yapıda bağlı olarak bulunan ve normal ekstraksiyon şartlarında çözeltilmeye geçmeyen antioksidan aktivite değerleri yüksek bazı bileşenlerin, örneğin bağlı durumdaki fenolik asitlerin, asidik

hidroliz şartlarında ekstrakte olduğu ve çözeltiliye geçerek antioksidan aktiviteyi yükselttiği düşüncesiyle izah edilebilir [94].

4.4. Bakır(II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi (CUPRAC)

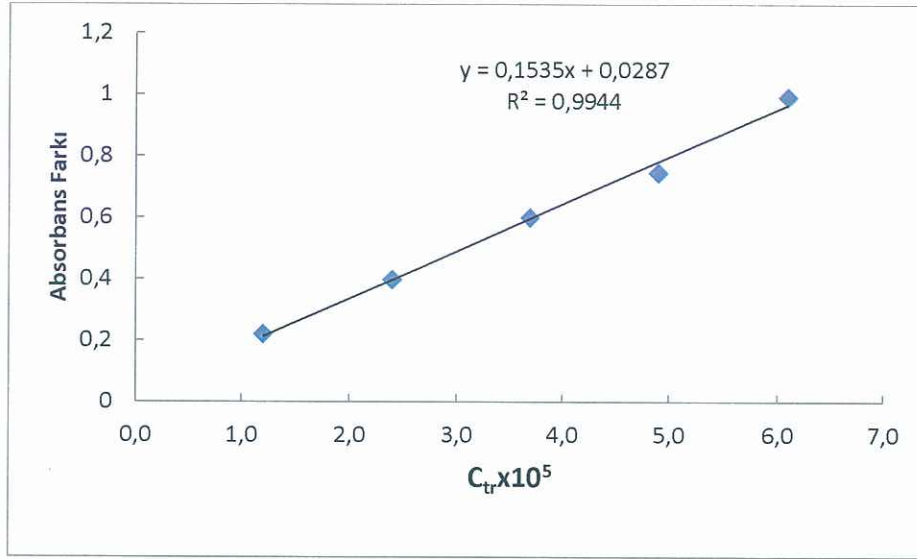
Deneylerinden Elde Edilen Bulgular

A.Albana bitkisine ait ekstraktların Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi (CUPRAC) için elde edilen sonuçlar Tablo 4.4 ve Şekil 4.6'da verilmiştir. Kalibrasyon grafiği Troloks'un metanollü çözeltileri kullanılarak hazırlanmıştır.

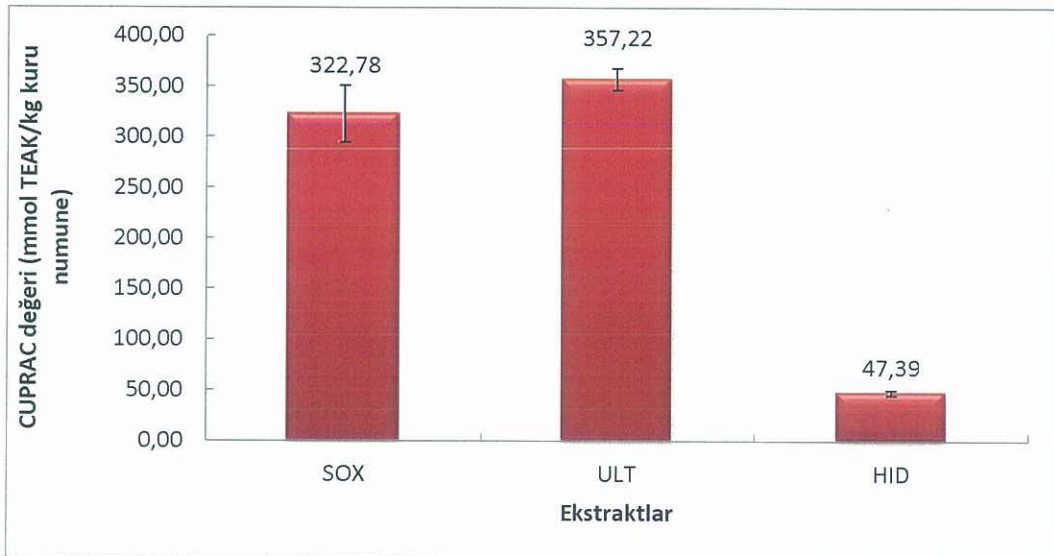
Tablo 4.4. Bakır-II iyonu indirgeme iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi (CUPRAC) deneylerinden elde edilen sonuçlar

Ekstrakt*	CUPRAC değeri (mmol TEAK/Kg kuru numune)
SOX	322,78±27,99
ULT	357,22±10,73
HİD	47,39±2,55

* SOX: Soxhlet ekstraksiyonu (yaprak); ULT: Ultrasonik banyo ekstraksiyonu (yaprak); HİD; Hidroliz işlemi (gövde).



Şekil 4.5. CUPRAC deneylerinde kullanılan ve Troloks standardı ile elde edilen kalibrasyon grafiği.



Şekil 4.6. *A.Albana* bitkisine ait ekstraktların CUPRAC değerlerinin karşılaştırılması

Şekil 4.6'ye bakıldığında *A.Albana* bitkisine ait ultrasonik banyo ekstraktlarından elde edilen CUPRAC değerinin en yüksek değer olduğu belirlenmiştir. Bu sonucu sırasıyla Soxhlet ve hidroliz ekstraktlarının CUPRAC değerleri takip etti. Yapılan istatistiksel analizlerde Soxhlet ve ultrasonik banyo ekstraktlarının CUPRAC değerleri arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0,05$). Ancak, DPPH radikal süpürme yönteminde Soxhlet ve ultrasonik banyo ekstraktına göre daha yüksek bir antioksidan aktivite değeri

sergileyen hidroliz ekstraktı, CUPRAC yönteminde daha düşük bir değer ortaya koymuştur. Bu durum, literatürde yer alan, testlerde kullanılan farklı yapıdaki serbest radikallerin, yapısal farklılıklar, pH, çözücü vs gibi eşdeğer olmayan çeşitli faktörlerin etkisiyle, aynı ekstraktlara uygulandığında farklı sonuçlar verebilecekleri bilgisiyle açıklanabilir [95].

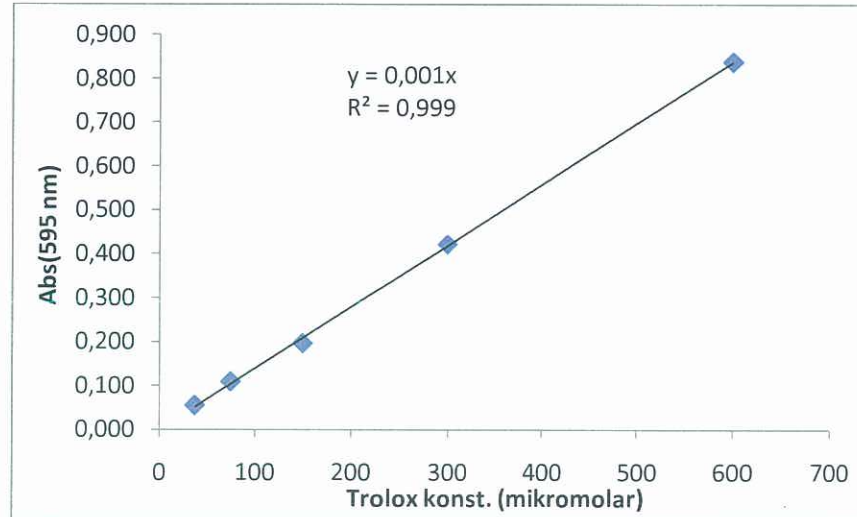
4.5. Fe (II) İyonu İndirgeme Antioksidan Gücü (FRAP) Deneylerinden Elde Edilen Bulgular

Tablo 4.5. Ekstraktların FRAP değerleri

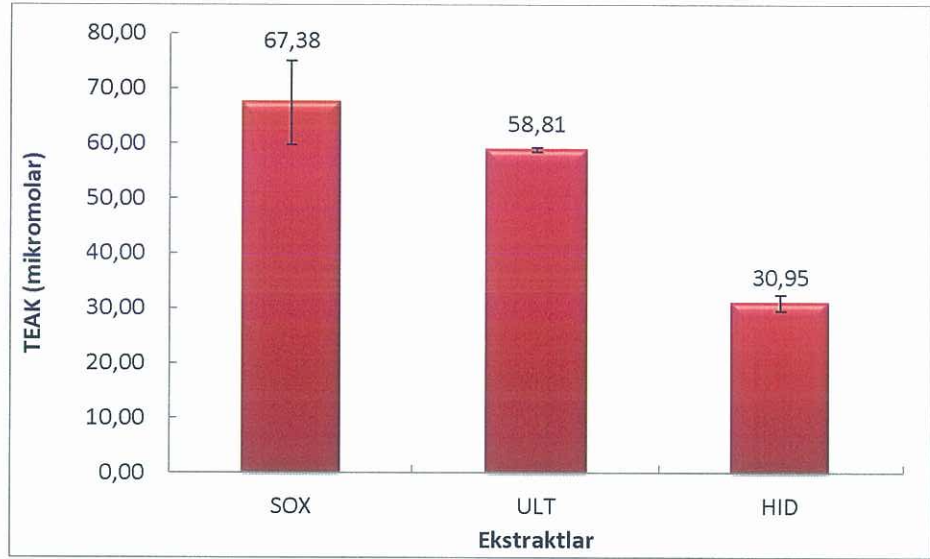
Ekstrakt*	FRAP Değeri (μM)
SOX	67,38 \pm 7,64
ULT	58,81 \pm 0,42
HİD	30,95 \pm 1,48

* SOX: Soxhlet ekstraksiyonu (yaprak); ULT: Ultrasonik banyo ekstraksiyonu (yaprak); HİD; Hidroliz işlemi (gövde).

100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyondaki üç ayrı bitki ekstraktı FRAP reaktifi ile muamele edildi. Karşılaştırma maddesi olarak troloks kullanıldı.



Şekil 4.7. Troloks ile hazırlanan çalışma konsantrasyon grafiği



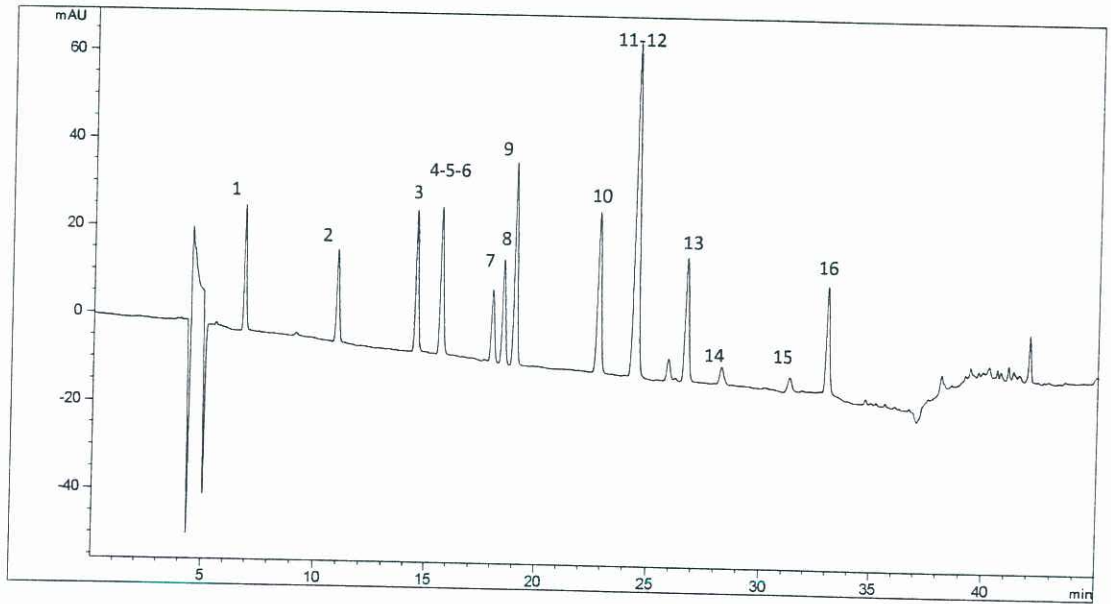
Şekil 4.8. *A. Albana* bitkisine ait ekstraktların FRAP değerlerinin karşılaştırılması

Şekil 4.8’de en yüksek antioksidan aktiviteyi bitkinin yaprak kısmına uygulanan Soxhlet ekstraktının sergilediği görülmüş, fakat istatistiksel analizler yapıldığında Soxhlet ve ultrasonik banyo ekstraktı arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$). Bu sonuçlar, CUPRAC değerleri ile paralellik göstermekle birlikte, DPPH radikal temizleme deneylerindeki sonuçlar ile karşılaştırıldığında, hidroliz ekstraktının antioksidan aktivite değerinin daha düşük olarak elde edildiği görülecektir. Bu durum, yukarıda CUPRAC test sonuçları için yapılan yoruma benzer şekilde açıklanabilir. Yani, uygulanan tüm antioksidan aktivite tayini deneylerinde kullanılan farklı yapıdaki radikallerden Neocuproin ve TPTZ her üç ekstrakt için benzer davranış gösteriyorken, DPPH ise tersi bir durum ortaya koymuştur. Bu durum radikaller ve uygulanan teknikler arasındaki farklılıklara atfedilmiştir [95].

4.6. HPLC-UV-DAD Analizlerinden Elde Edilen Bulgular

4.6.1. HPLC-DAD Tekniğiyle Ekstraktlarda Fenolik Standart Tayini

Uygun şartlara getirilen HPLC-DAD metodu ile 16 fenolik asit standardının uygun bir şekilde birbirinden ayrılması sağlanmıştır. Standartların birbirinden ayrılması işlemi 45 dk sürmüştür. Ayrılma işlemi tamamlanmış olan 16 fenolik asit standardına ait kromatogram Şekil 4.9'da gösterilmiştir. Bu metod ile alıkonma zamanları aynı olan 4 (klorojenik asit), 5 (gentisik asit), 6 (p-OH benzoik asit) ile yine alıkonma zamanları aynı olan 11 (siringaldehit), 12 (p-kumarik asit) st üste çakışmış Şekilde aynı kromatogramda görülmektedir. 4 (klorojenik asit) ve 5 (gentisik asit) ile 11 (siringaldehit) ve 12 (p-kumarik asit)'nin alıkonma zamanları ve maksimum absorbands gösterdikleri dalga boyları aynıdır.



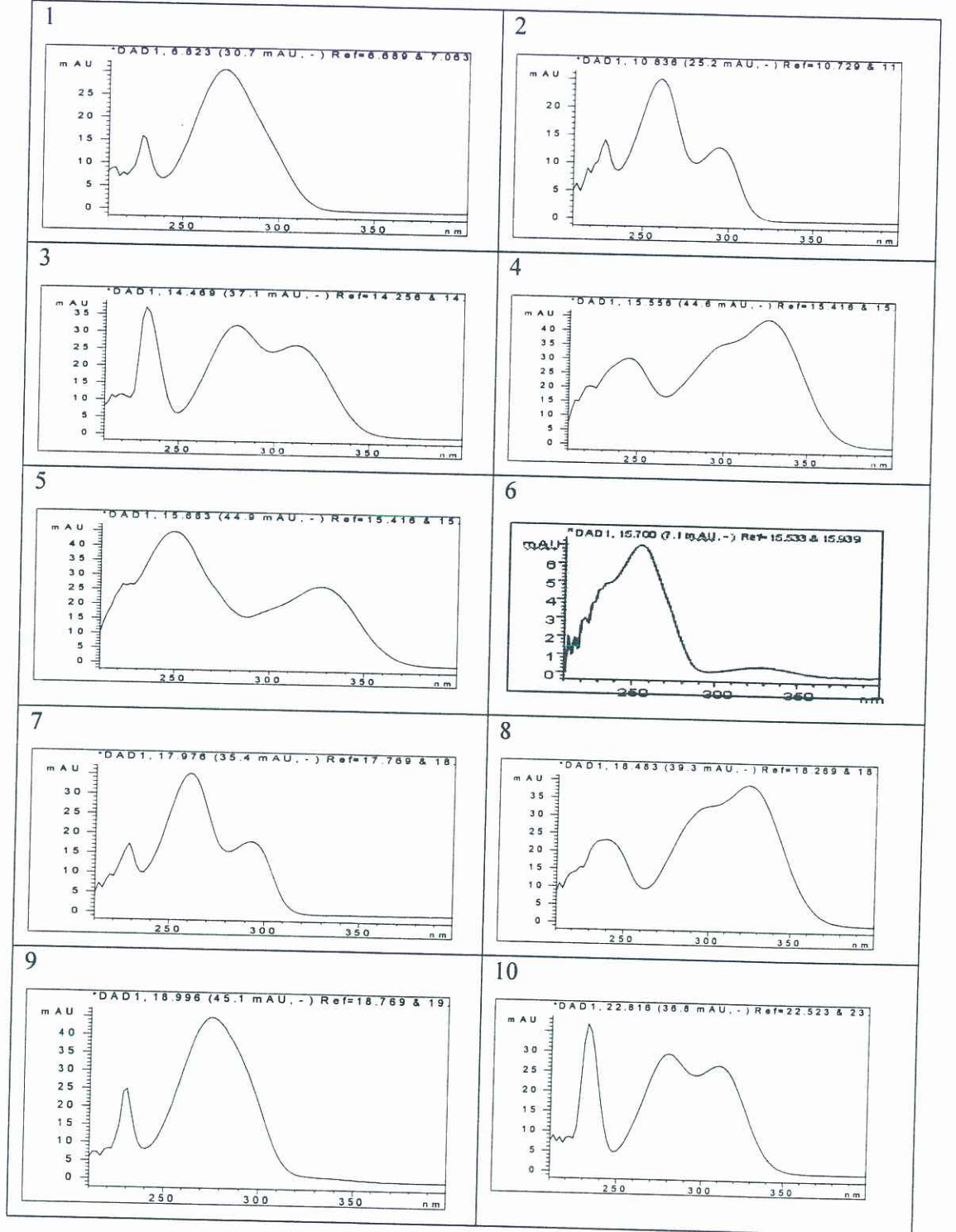
Şekil 4.9. Geliştirilen metotla HPLC' de yürütülen fenolik standartların 25 μ M'lik karışımının 280 nm'deki kromatogramı [(1) Gallik asit, (2) protokatekuik asit, (3) protokatekualdehit, (4) klorojenik asit, (5) gentisik asit, (6) p-OH benzoic asit, (7) vanillik asit, (8) kafeik asit, (9) siringik asit, (10) vanillin, (11) siringaldehit, (12) p-kumarik asit, (13) Ferulik asit, (14) sinapik asit, (15) benzoik asit, (16) rozmarinik asit.

DAD'da maksimum dalga boyları belirlenmiş olan 16 tane fenolik standardın spektrumları incelenmiş ve her bir standardın maksimum absorpsiyon sergilediği dalga boyları seçilmiştir. Kromatogramlarda tespit edilmiş olan 16 fenolik standardın alıkonma zamanları (RT: retention time) ve maksimum absorbans verdiği dalga boyları Tablo 4.6'da gösterilmiştir.

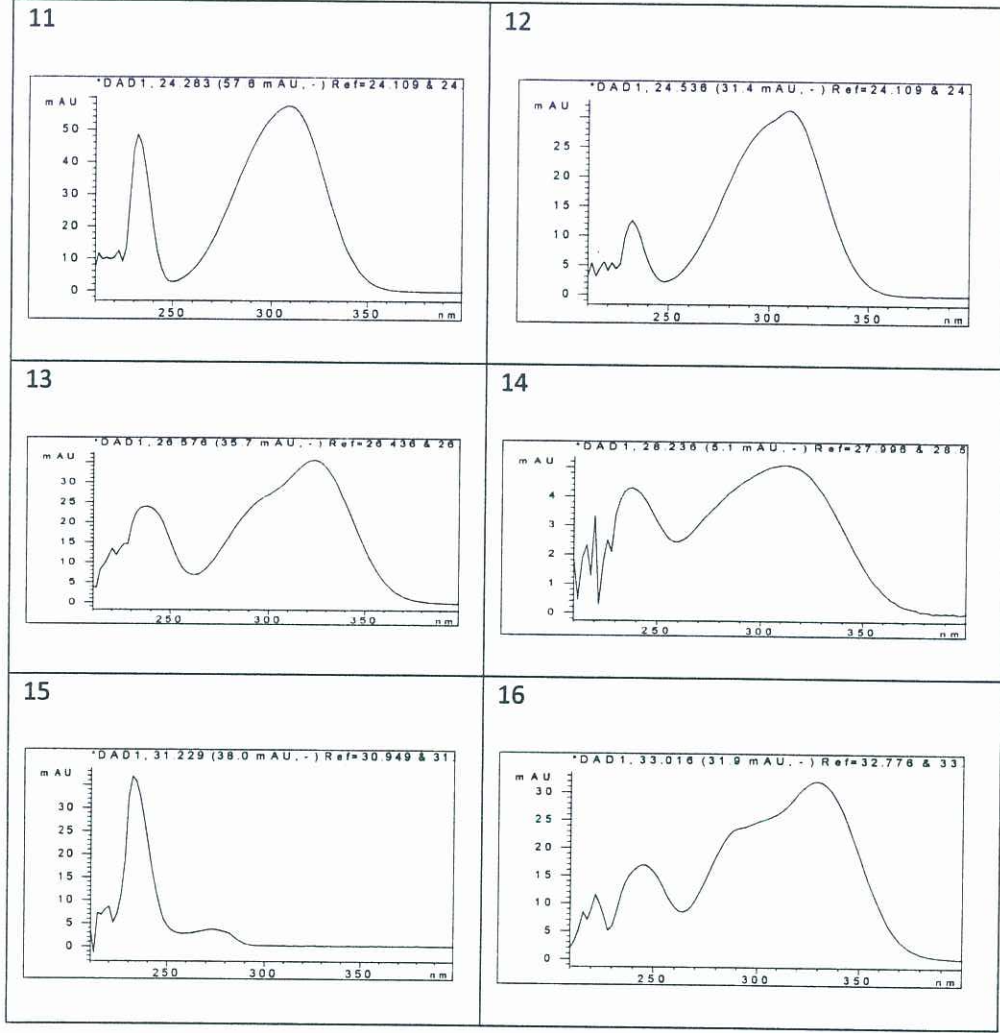
Tablo 4.6. HPLC'de yürütülen 16 fenolik standartla ilgili kromatografik parametreler

	Fenolik Standardın Adı	RT (Dakika)*	Maksimum Absorpsiyon Dalga Boyu (nm)
1	Gallik asit	6,823	274
2	Protokatekuik asit	10,836	260
3	Protokatekualdehit	14,469	280
4	Klorojenik asit	15,556	324
5	Gentisik asit	15,683	324
6	p-OH Benzoic asit	15,700	260
7	Vanilik asit	17,976	260
8	Kafeik asit	18,483	324
9	Siringik asit	18,996	274
10	Vanilin	22,816	280
11	Siringaldehit	24,283	308
12	p-kumarik asit	24,536	308
13	Ferulik asit	26,576	324
14	Sinapik asit	28,236	324
15	Benzoik asit	31,229	240
16	Rozmarinik asit	33,016	324

Kromatogramlarda numaralandırılmış olarak verilen standartların spektrumları aşağıda Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4.10 devam ediyor



Şekil 4.10. HPLC analizinde kullanılan 16 fenolik asit standardının DAD ile elde edilmiş spektrumları (200-400 nm).

2 (protokatekuik asit) ve 7 (vanillik asit) numaralı bileşiklere ait DAD spektrumları benzerlik göstermekte ve iki bileşiğin de yaklaşık 260 nm'de maksimum absorbanza sahip olduğu görülmektedir. Literatürde bu bileşikler benzoik asit türevi olarak bilinmektedir. Aynı şekilde 4-8-16 (klorojenik asit, kafeik asit, rozmarinik asit), 3-10 (protokatekualdehit, vanillin), 11-12-13-14 (siringaldehit, p-kumarik asit, ferulik asit, sinapik asit) numaralı bileşiklere ait DAD spektrumları da benzerlik göstermekte, dolayısıyla kendi aralarında yapısal benzerlikler ve davranışlar gösterdikleri söylenebilir.

4.6.2. HPLC-DAD (280 nm) için Tespit Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)

Değerleri

Tespit sınırı (LOD, limit of detection) bileşenlerin her biri için örnekte bileşenin varlığının teyit edilebildiği, fakat metodun uygulandığı koşullarda miktarı tam olarak belirlenemeyen en düşük değerdir. Genellikle pik sinyalinin gürültüye oranının (S/N) 3 olduğu değer alınır. Tayin sınırı (LOQ, limit of quantification), örnek metod koşullarında, belirlenen miktarının ne kadar olduğunun ifade edilebildiği en düşük değerdir [96]. Genellikle pik sinyalinin gürültüye oranının (S/N) 10 olduğu değer alınır.

$$C_A = \frac{C_{A(\mu M)} \times MW_A}{1000}$$

$C_{A(ppm)}$ = çalışılan fenolik standardın ppm cinsinden konsantrasyonu

$C_{A(\mu M)}$ = Çalışılan fenolik standardın μM cinsinden konsantrasyonu

MW_A = Çalışılan fenolik standardın molekül ağırlığı

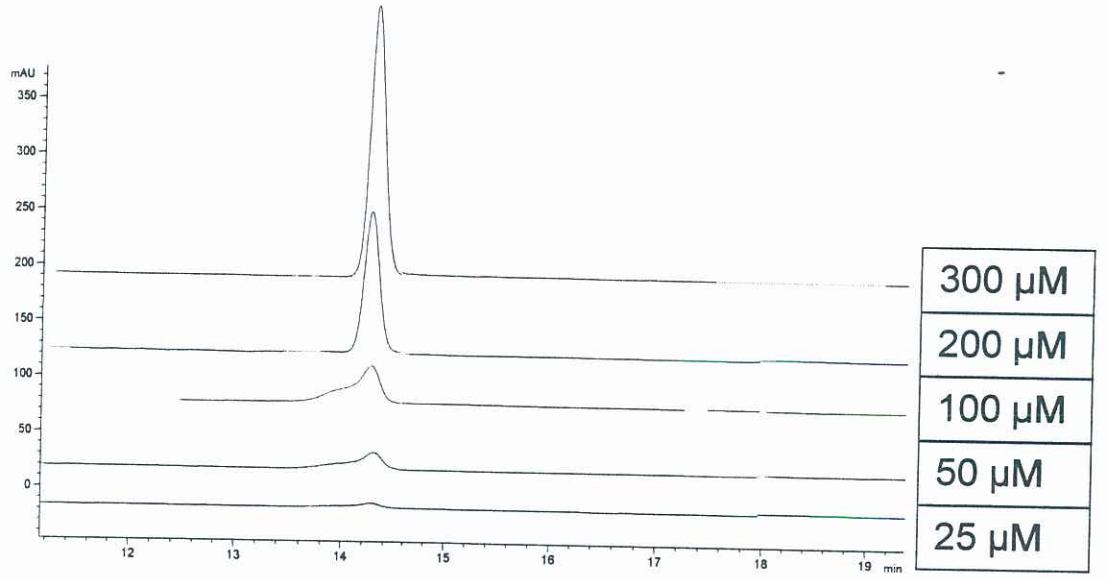
Farklı konsantrasyonlarda çalışılmış bazı standartlar için hesaplanan LOD değerleri tabloda gösterilmiştir [97].

Tablo 4.7. Kullanılan HPLC yönteminde bazı fenolik standartların 280 nm'de belirlenen LOD ve LOQ değerleri

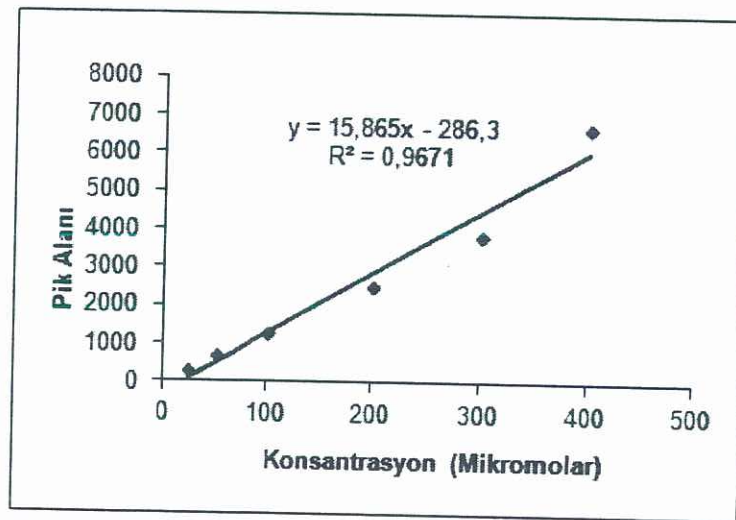
HPLC Sırası R5	Fenolik Standart	(280 nm'de) Çalışılan Konsantrasyon		LOD		LOQ	
		Ppm	μM	ppm	μM	ppm	μM
1	Gallik asit	3,4	20	0,36	2,12	1,20	7,06
2	Protokatekuik asit	3,1	20	0,40	2,63	1,35	8,76
3	Kafeik asit	3,6	20	0,47	2,64	1,58	8,80
4	Siringaldehit	3,6	20	0,59	3,22	1,95	10,72

4.6.3. Ekstraktlara Ait HPLC-UV Analizleri

Taranan standartların, protokatekualdehit eşdeğerlerinin kromatogram pik alanlarından hesaplanabilmesi için, 5 farklı konsantrasyonda hazırlanan protokatekualdehit çözeltilerinin yürütülmesinden elde edilen kromatogram pikleri Şekil 4.11'de; bu verilerden hazırlanan protokatekualdehit konsantrasyonuna karşı pik alanı kalibrasyon grafiği ise Şekil 4.12'de verilmiştir.

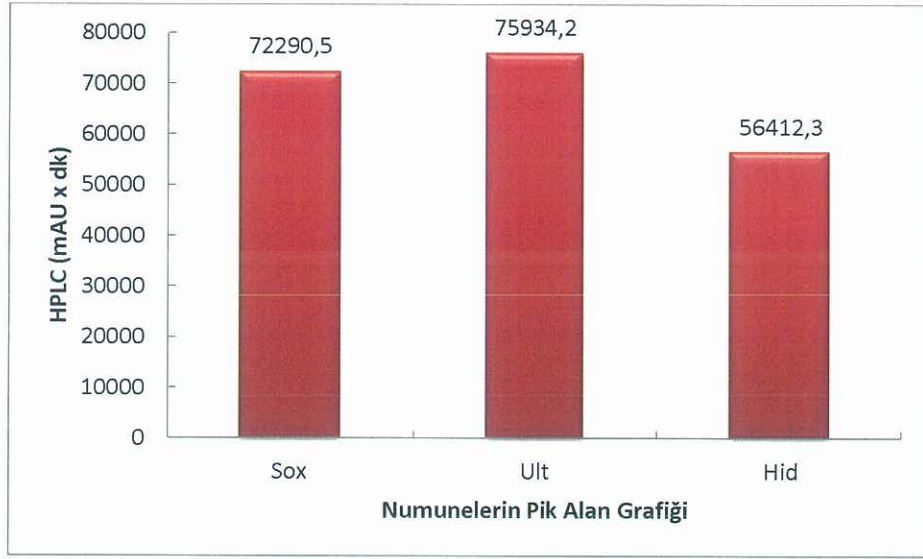


Şekil 4.11. Dış Standart Protokatekualdehit'in 5 farklı konsantrasyonunun kromatogram karşılaştırması.



Şekil 4.12. Protokatekualdehit kalibrasyon grafiği.

A.Albana bitkisinin iki farklı kısmından (yaprak, gövde) üç farklı ekstraksiyon tekniği ile hazırlanmış ekstraktlara ait HPLC-DAD yöntemiyle 280 nm'deki kromatogramlarından elde edilen pik alanı değerleri hesaplanmış, grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.13).

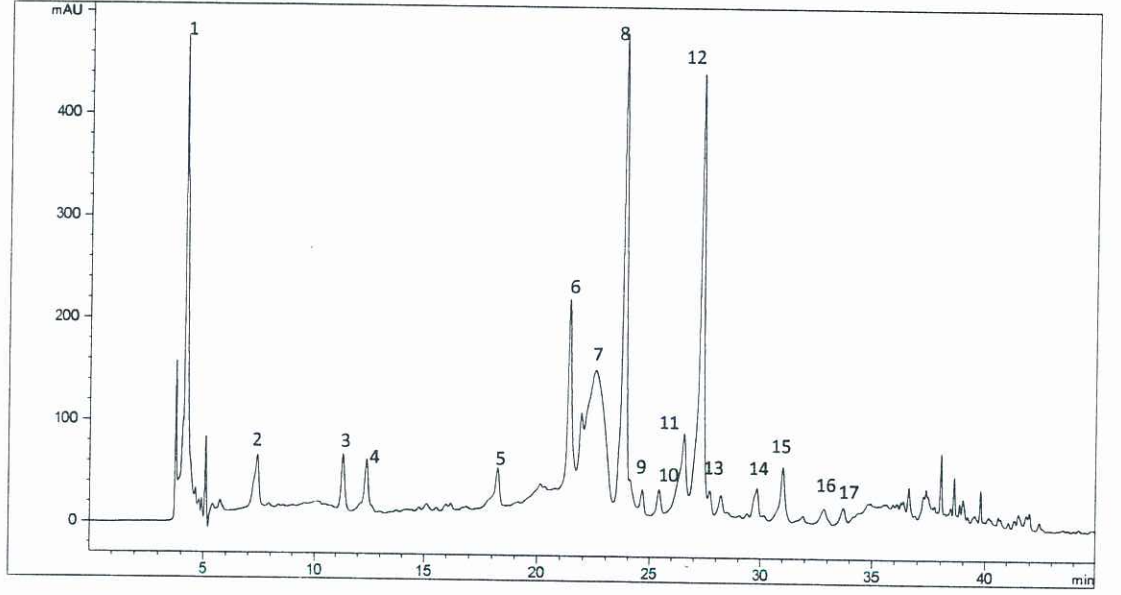


Şekil 4.13. Soxhlet, ultrasonik banyo ve hidroliz işlemindeki toplam kromatografik alan grafiği

Bitkiden üç yöntemle elde edilen ekstraktlar ve mevcut durumdaki on altı standart kullanılarak HPLC çalışması yapılmış ve elde edilen kromatogramlar incelenmiştir. Analiz sonrası, ekstraktlar içerisinde mevcut olan bazı fenolik standartlar ve mAU değeri yüksek olan fakat bilinmeyen bileşikler numaralandırılmış, 280 nm'deki alıkonma zamanı, pik alanı ve pik yüksekliği değerleri verilmiştir. Kromatogramlarda 35. dakikadan sonra gelen pikler değerlendirmeye alınmamıştır. Agilent ChemStation (Agilent 1100 series (DAD 1200)) programı ile 280 nm'de elde edilmiş olan kromatogramlar için integrasyon yapılmış, bilinmeyen ve bilinen pikler için dış standart olarak protokatekualdehitin farklı konsantrasyonlardaki pik alanı kalibrasyon grafiği kullanılarak protokatekualdehit eşdeğer konsantrasyonları hesaplanmıştır.

4.6.4. Yaprak Kısımından Elde Edilen Ekstraktların HPLC-DAD Kromatogram ve Spektrumlarının Yorumlanması

4.6.4.1. Soxhlet Ekstraktlarına Ait HPLC-DAD Kromatogramları ve Spektrumlarının Yorumlanması

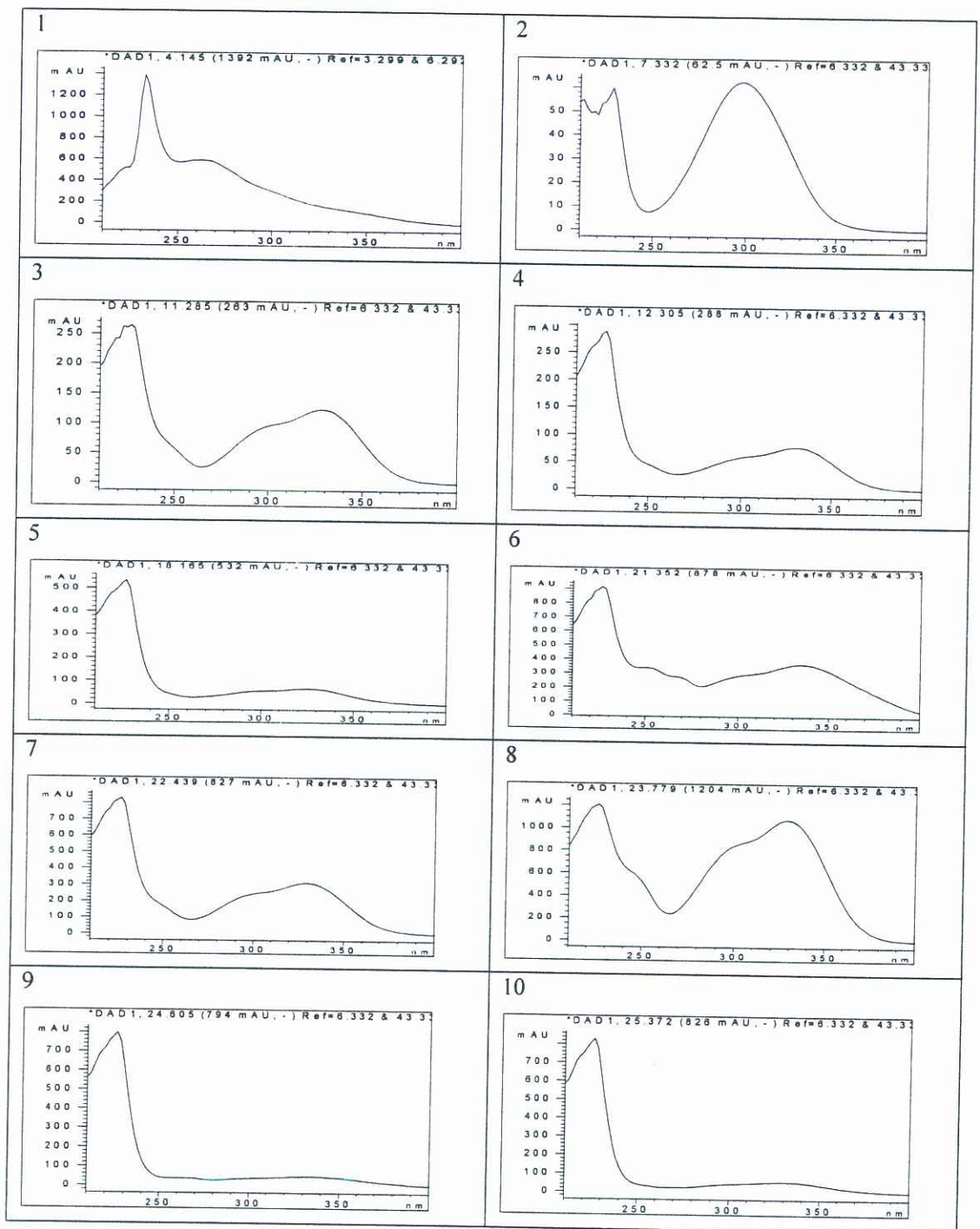


Şekil 4.14. *A. Albana* bitkisinin yaprak kısmından Soxhlet işlemi ile elde edilen ekstraktın 280 nm'deki kromatogramı.

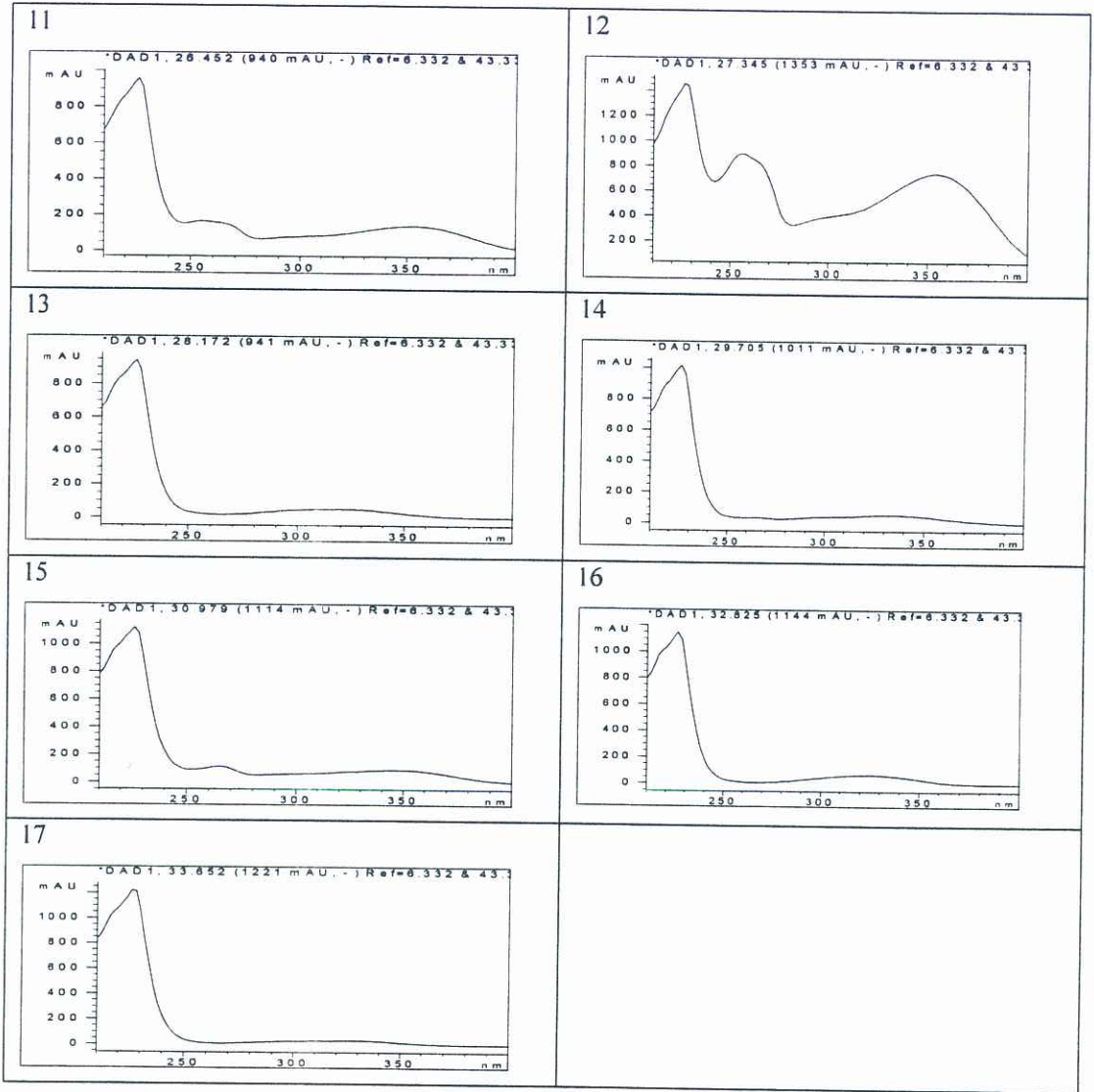
Tablo 4.8. *A.Albana* bitkisinin yaprak kısmında Soxhlet işlemi ile elde edilen ekstraktta tespit edilen bileşenlerin alıkonma zamanı (RT), pik alanı, protokatekualdehit eşdeğeri (PE) ve pik yüksekliği değerleri

Pik No	Bileşik adı	Alıkonma Zamanı (RT, dak.)	Pik Alanı (mAUxdak)	PE ^a (µM)	Pik Yüksekliği (mAU)
1	Bilinmeyen A	4,141	4779,7	319	479,5
2	Bilinmeyen B	7,395	2434,6	172	71,0
3	Bilinmeyen C	11,31	1319,3	101	72,2
4	Bilinmeyen D	12,368	1870,2	136	67,4
5	Bilinmeyen E	18,224	2513,5	177	59,8
6	Bilinmeyen F	21,365	4213,7	284	225,0
7	Bilinmeyen G	22,493	8554,5	557	156,2
8	Bilinmeyen H	23,771	6829,8	449	485,5
9	Bilinmeyen I	24,639	805,4	69	39,6
10	Bilinmeyen J	25,413	863,3	73	39,8
11	Bilinmeyen K	26,525	2856,5	198	94,6
12	Bilinmeyen L	27,292	7162	469	446,8
13	Bilinmeyen M	28,188	725	64	34,5
14	Bilinmeyen N	29,817	882,1	74	41,9
15	Benzoik asit	30,99	1458,5	110	62,5
16	Bilinmeyen O	32,837	702,2	62	22,1
17	Bilinmeyen P	33,697	524,2	51	23,3

^a PE (Protokatekualdehit Eşdeğeri, µM): Şekil 12'de farklı konsantrasyonlarda enjekte edilen protokatekualdehite karşı pik alanı kalibrasyon grafiğinden elde edilen pik alanı = (15,865 x PE konsantrasyonu) – 286,3 denklemiyle hesaplanan değerler.



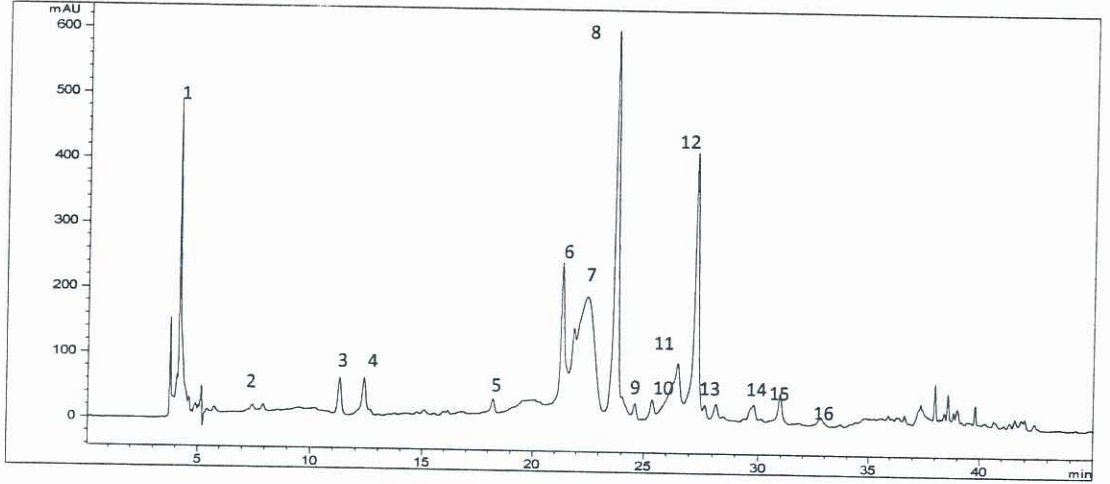
Şekil 4.15 devam ediyor.



Şekil 4.15. *A. Albana* bitkisinde yaprak kısmında Soxhlet işlemi ile elde edilen ekstraktta tespit edilen 1-17 nolu piklere ait DAD ile elde edilmiş spektrumlar (200-400 nm).

3 (Bilinmeyen C), 4 (Bilinmeyen D), 7 (Bilinmeyen G), 8 (Bilinmeyen H) numaralı bileşiklere ait spektrumlar benzerlik göstermekte, bunların yapısal benzerliklerinin olabileceği düşünülmektedir. 5 (Bilinmeyen E), 9 (Bilinmeyen I), 10 (Bilinmeyen J), 11 (Bilinmeyen K), 13 (Bilinmeyen M), 14 (Bilinmeyen N), 16 (Bilinmeyen O), 17 (Bilinmeyen P) numaralı bileşiklere ait spektrumlar incelendiğinde, benzoik asitin ve literatürdeki benzoik asit türevlerinin spektrumları ile benzerlik gösterdikleri, dolayısıyla benzoik asit türevleri olabilecekları söylenebilir.

4.6.4.2. Ultrasonik Banyo Ekstraktlarına Ait HPLC-DAD Kromatogramları ve Spektrumlarının Yorumlanması

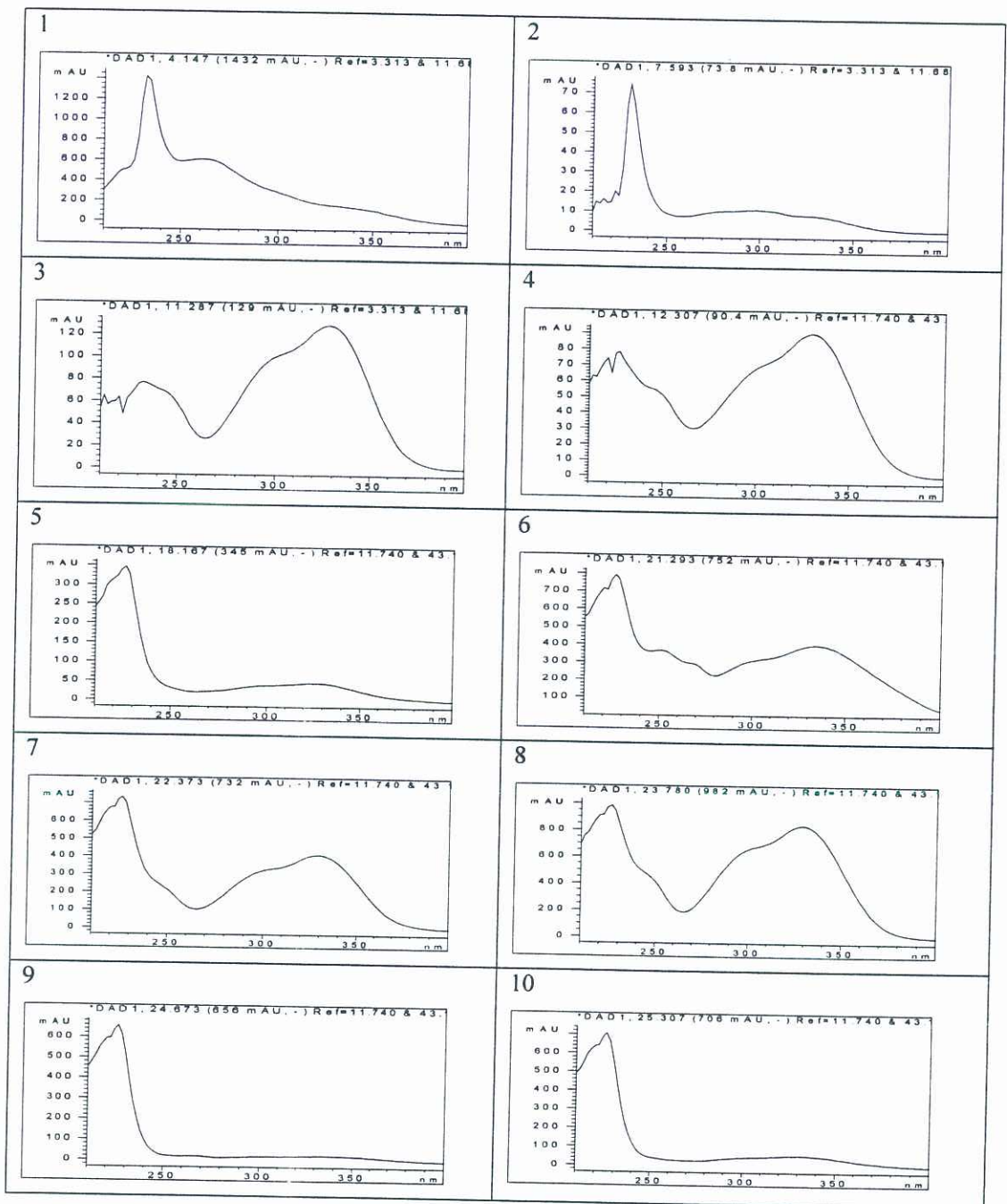


Şekil 4.16. *A. albana* bitkisinin yaprak kısmından ultrasonik banyo işlemi ile elde edilen ekstraktının 280 nm'deki kromatogramı.

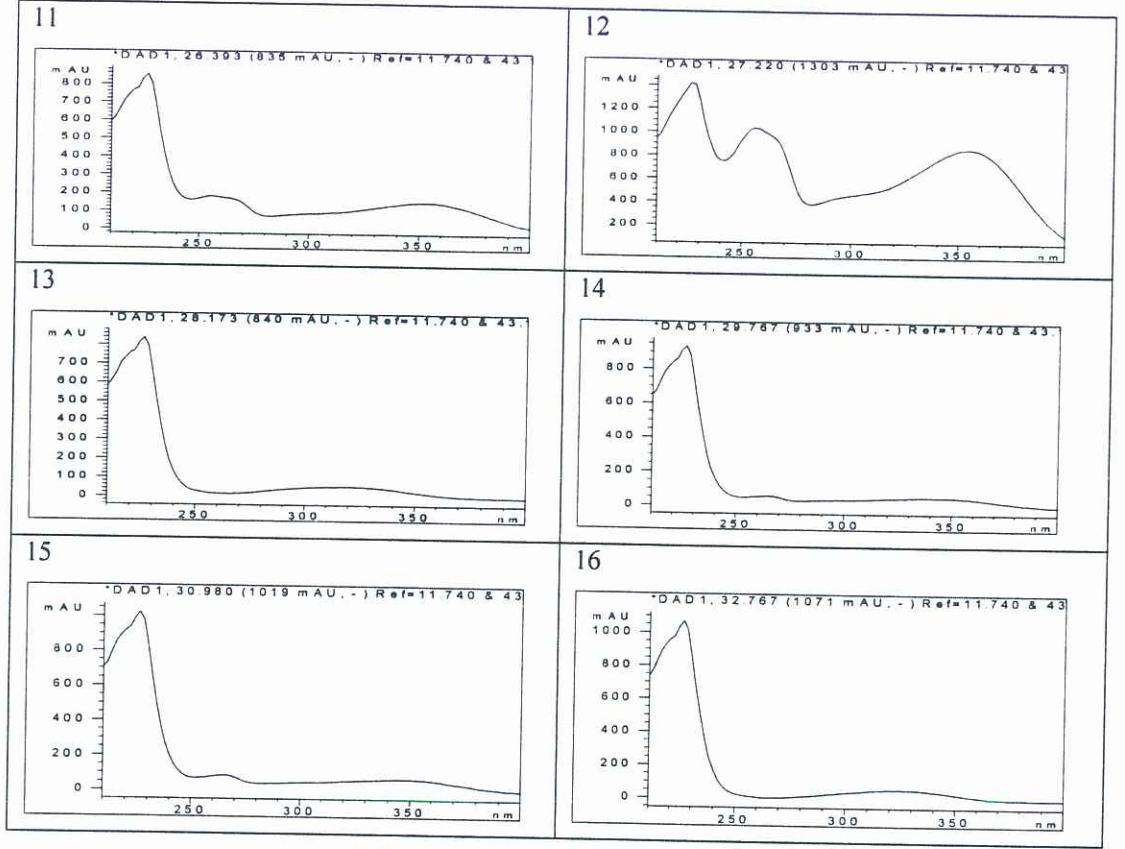
Tablo 4.9. *A.Albana* bitkisinin yaprak kısmından ultrasonik banyo işlemi ile elde edilen ekstraktta tespit edilen bileşenlerin alıkonma zamanı (RT), pik alanı, protokatekualdehit eşdeğeri (PE) ve pik yüksekliği değerleri

Pik No	Bileşik adı	Alıkonma Zamanı (RT, dak.)	Pik Alanı (mAU \times dak)	PE ^a (μ M)	Pik Yüksekliği (mAU)
1	Bilinmeyen A	4,156	3620,8	246	497,1
2	Bilinmeyen B	7,919	207	31	13,1
3	Bilinmeyen C	11,296	634,1	58	56,7
4	Bilinmeyen D	12,361	869,8	73	57,4
5	Bilinmeyen E	18,2	881,6	74	29,9
6	Bilinmeyen F	21,317	4500,5	302	241,9
7	Bilinmeyen G	22,436	9260,1	602	190,3
8	Bilinmeyen H	23,705	8401,4	548	599,2
9	Bilinmeyen I	24,586	354,7	40	28,4
10	Bilinmeyen J	25,359	603,1	56	3,6
11	Bilinmeyen K	26,473	3181,5	219	91,5
12	Bilinmeyen L	27,242	5939,3	392	415,2
13	Bilinmeyen M	28,132	514,1	51	30,5
14	Bilinmeyen N	29,774	629,5	58	30,9
15	Benzoik asit	30,939	877,6	73	48,3
16	Bilinmeyen O	32,796	295,3	37	14,2

^a PE (Protokatekualdehit Eşdeğeri, μ M): Şekil 12'de farklı konsantrasyonlarda enjekte edilen protokatekualdehite karşı pik alanı kalibrasyon grafiğinden elde edilen pik alanı = (15,865 x PE konsantrasyonu) - 286,3 denklemiyle hesaplanan değerler



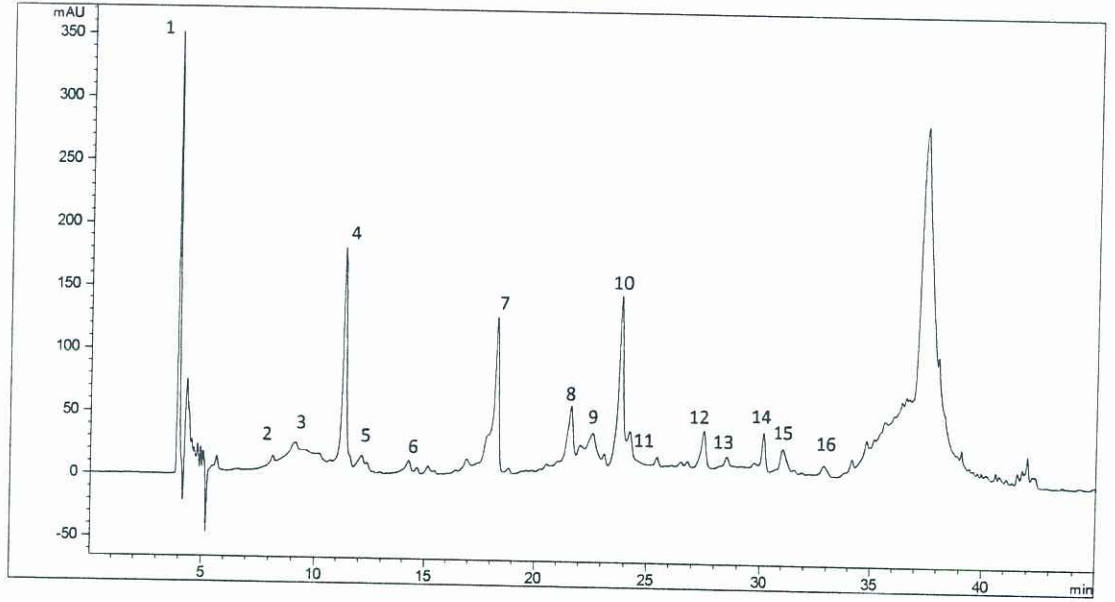
Şekil 4.17 devam ediyor



Şekil 4.17. *A.Albana* bitkisinin yaprak kısmında ultrasonik banyo işlemi ile elde edilen ekstrakta tespit edilen 1-16 nolu piklere ait DAD ile elde edilmiş spektrumlar (200-400 nm).

3 (Bilinmeyen C), 4 (Bilinmeyen D), 7 (Bilinmeyen G), 8 (Bilinmeyen H) numaralı bileşiklere ait spektrumlar benzerlik göstermekte, bunların yapısal benzerliklerinin olabileceği düşünülmektedir. 5 (Bilinmeyen E), 9 (Bilinmeyen I), 10 (Bilinmeyen J), 11 (Bilinmeyen K), 13 (Bilinmeyen M), 14 (Bilinmeyen N), 16 (Bilinmeyen O), 17 (Bilinmeyen P) numaralı bileşiklere ait spektrumlar incelendiğinde, benzoik asitin ve literatürdeki benzoik asit türevlerinin spektrumları ile benzerlik gösterdikleri, dolayısıyla benzoik asit türevleri olabilecekleri söylenebilir.

4.6.5. *A.Albana* Bitkisinin Gövde Kısımından Hidroliz İşlemiyle Elde Edilen Ekstraktların HPLC-DAD Kromatogramları ve Spektrumlarının Yorumlanması



Şekil 4.18. *A.Albana* bitkisinin gövde kısmından hidroliz işlemi ile elde edilen ekstraktın 280 nm'deki kromatogramı.

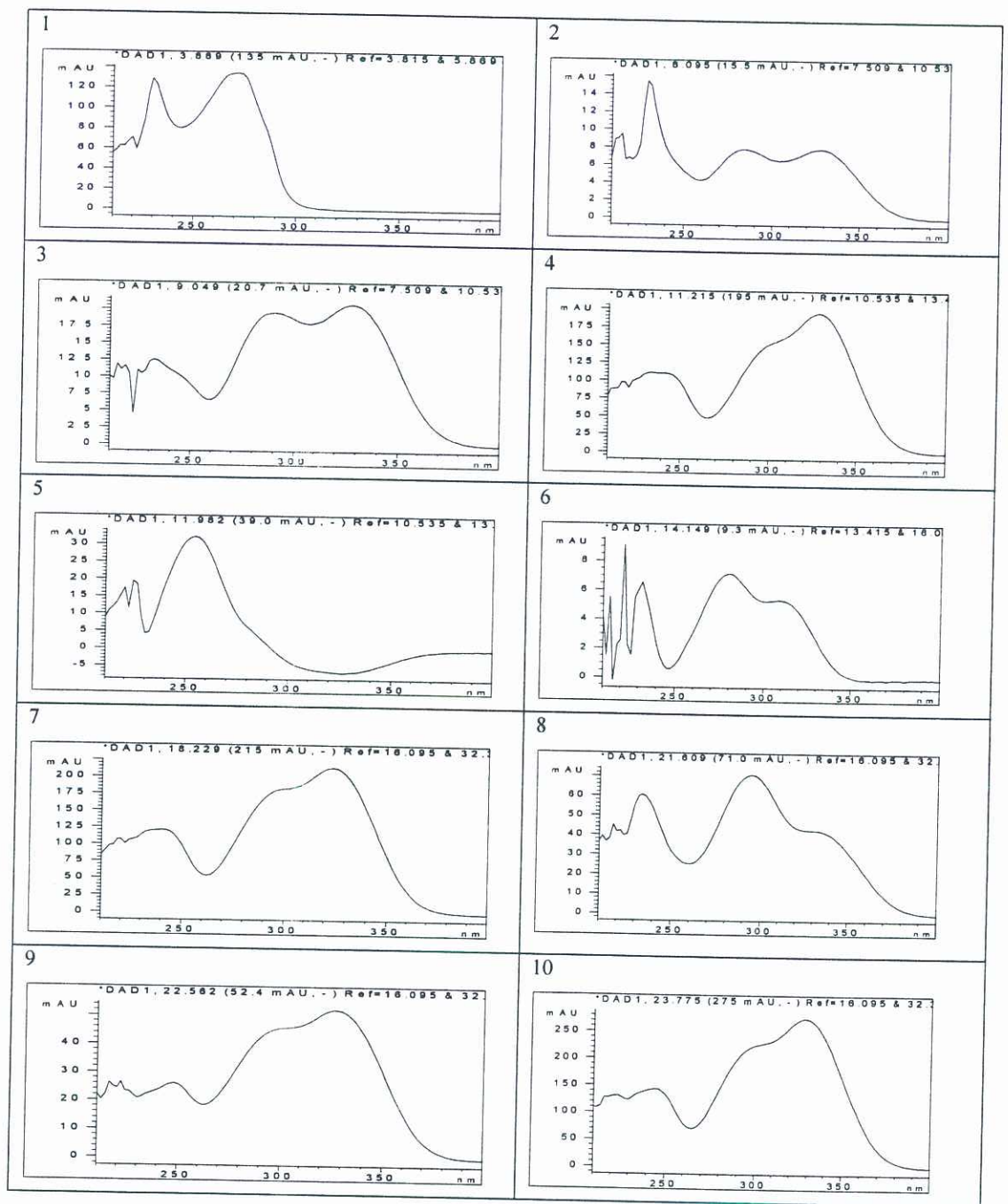
Tablo 4.10. *A.Albana* bitkisinin gövde kısmında hidroliz işlemi ile elde edilen ekstraktta tespit edilen bileşenlerin alıkonma zamanı (RT), pik alanı, protokatekualdehit eşdeğeri (PE) ve pik yüksekliği değerleri.

Pik No	Bileşik adı	Alıkonma Zamanı (RT, dak.)	Pik Alanı (mAUxdak)	PE ^a (µM)	Pik Yüksekliği (mAU)
1	Bilinmeyen A	3,938	2163,4	155	363,4
2	Bilinmeyen B	8,143	214,5	32	11,6
3	Bilinmeyen C	9,139	1597,9	119	22,6
4	Bilinmeyen D	11,301	2451,9	173	178,3
5	Bilinmeyen E	12,092	292,4	37	14,0

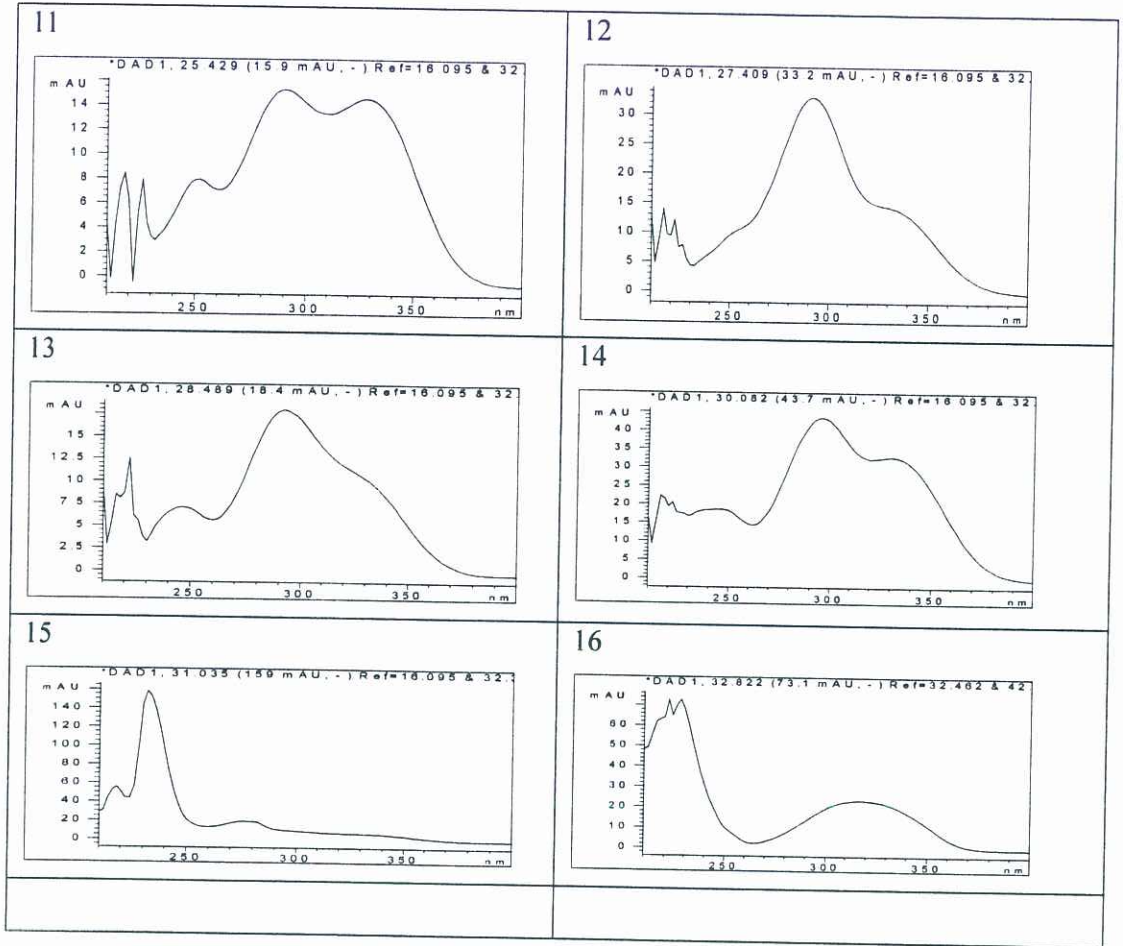
Tablo 4.10 devam ediyor.

6	Protokatekualdehit	14,241	248,3	34	11,0
7	Bilinmeyen F	18,238	2788,2	194	126,7
8	Bilinmeyen G	21,593	1633,2	121	57,7
9	Bilinmeyen H	22,566	1216,2	95	36,2
10	Bilinmeyen I	23,78	2558,3	179	146,0
11	Bilinmeyen J	25,409	537	52	18,4
12	Bilinmeyen K	27,481	1048,2	85	40,3
13	Bilinmeyen L	28,49	1249,7	97	20,0
14	Bilinmeyen M	30,114	671,6	61	39,3
15	Benzoik asit	30,996	921	77	27,1
16	Bilinmeyen N	32,832	458,8	47	14,6

^a PE (Protokatekualdehit Eşdeğeri, μM): Şekil 12'de farklı konsantrasyonlarda enjekte edilen protokatekualdehite karşı pik alanı kalibrasyon grafiğinden elde edilen pik alanı = (15,865 x PE konsantrasyonu) - 286,3 denklemiyle hesaplanan değerler



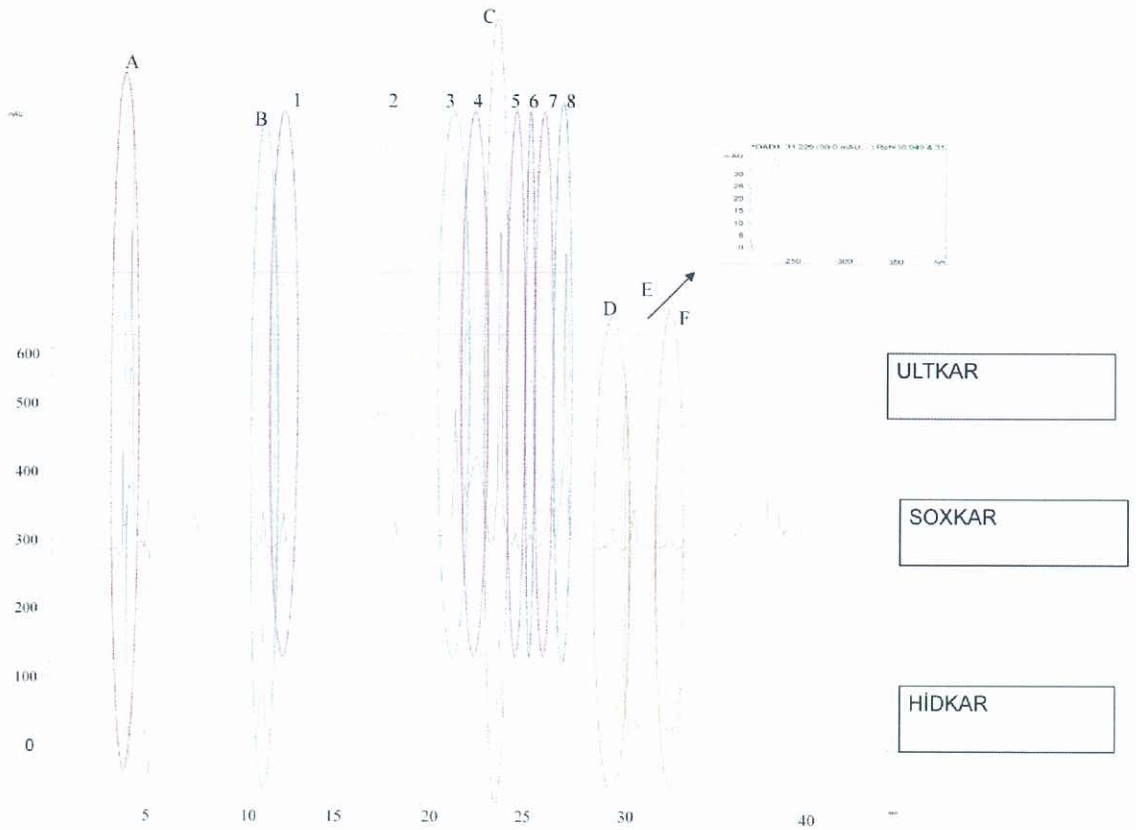
Şekil 4.19 devam ediyor



Şekil 4.19. *A.Albana* bitkisinin gövde kısmından hidroliz işlemi ile elde edilen ekstraktta tespit edilen 1-16 nolu piklere ait DAD ile elde edilmiş spektrumlar (200-400nm).

Yukarıdaki hidroliz kromatogramında görülen numaralandırılmış piklerde apolar bölgeye doğru artış görülmüştür. Piklerin apolar bölgeye doğru artmasının sebebi muhtemelen şekerli bir bileşiğin bulunması ve şekerin kopması ile glikozidik ya da dimerik yapısının bir sonucu olarak piklerin daha geç çıkmasıdır. 35. dakikadan sonra büyük bir pik görülmüştür. Bu pikin de şekerli bir bileşikten geldiği ve şekerin kopması ile apolar bölgeye kaymış olabileceği düşünülmektedir. İçeriğinde protokatekualdehit ve benzoik asit görülmüştür. 4 (Bilinmeyen D), 7 (Bilinmeyen F), 9 (Bilinmeyen H) ve 10 (Bilinmeyen K) ile numaralandırılmış piklerin spektrumlarının benzerlik gösterdiği dolayısıyla da bunların kendi aralarında yapısal benzerlik gösterebileceği düşünülmektedir.

4.6.6. Üç Farklı Ekstraksiyon Tekniği ile Elde Edilen Kromatogramların Karşılaştırmalı İncelemesi



Şekil 4.20. *A. Albana* bitkisinin ultrasonik banyo, Soxhlet ve hidroliz işlemleri ile elde edilen ekstraktların kromatogramlarının karşılaştırılması.

DAD spektrumları incelendikten ve RT'leri karşılaştırıldıktan sonra kromatogramlar üzerinde işaretleme yapılmıştır. Şekil 4.20'de karşılaştırılmış olarak gösterilen kromatogramlarda üç ekstraksiyon tekniğinde de ortak olan pikler A, B, C, D, E, F ve sadece Soxhlet ile ultrasonik banyo ekstraksiyonlarında ortak çıkan pikler 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 olarak numaralandırılmıştır. Kromatogramlarda ovaler içerisinde alınan piklerden aynı RT'ye sahip olanlar, aynı bileşiklerdir. Buna göre; RT'si yaklaşık 3,9 olan A işaretli pikler, RT'si yaklaşık 11,4 olan B işaretli pikler, RT'si yaklaşık 23,6 olan C işaretli pikler RT'si yaklaşık 29,9 olan D işaretli pikler, RT'si yaklaşık olarak 31,2 olan E (benzoik asit) işaretli pikler ve RT'si yaklaşık 33 olan F işaretli pikler aynı bileşiklere aittir. Bu bileşiklerin UV-DAD spektrumları da birbirine çok benzemektedir. Bitkinin yaprak kısımlarından elde edilen Soxhlet ve ultrasonik banyo ekstraktlarının kromatogramlarına göre, RT'si 12,5 olan 1 numaralı pikler, RT'si 13,0 olan 2 numaralı pikler, RT'si 21,1 olan 3 numaralı pikler, RT'si 22,5 olan 4 numaralı pikler, RT'si 24,5 olan 5 numaralı pikler, RT'si 25,7 olan 6 numaralı pikler, RT'si 26,3 olan 7 numaralı pikler ve RT'si 27,2 olan 8 numaralı pikler de aynı bileşiklere aittir. E işaretli bileşiğin her üç ekstraktta da bulunduğu ve benzoik asit olduğu DAD spektrumları incelenerek belirlenmiştir.

Soxhlet ekstraksiyonunda muhtemelen yöntemde uygulanan sıcaklığın daha yüksek olması nedeniyle pikler, ultrasonik banyo ekstraksiyonuna göre daha iyi çıkmıştır. Hidrolizde ise bu pikler (1,2,3,4,5,6,7,8) kaybolmuştur. Bunun sebebi muhtemelen, bu bileşiğin şekerli ya da dimerik yapıda bir bileşik olması neticesinde, hidrolizden etkilenerek yapısal bozunmaya uğraması ve başka bir türe dönüşmesidir. A numaralı ovalde görüldüğü gibi hidroliz piki daha iyi performans sergilemiştir. Bu durum, muhtemelen ilgili bileşiklerin glikozidik ya da dimerik yapıda olmaları ve hidroliz ortamındaki parçalanmalar sonucu miktarlarında artış olması ile ilgilidir. Hidroliz işlemi uygulanarak elde edilen ekstraktta diğerlerinden farklı olarak protokatekualdehit de belirlenmiş, genel olarak da hepsinde fenolik asit olarak benzoik asit bulunduğu görülmüştür.

5. SONUÇ

A.Albana bitkisinin yaprak ve gövdesinden üç farklı ekstraksiyon tekniği ile elde edilen ekstraktların ekstraksiyon verimleri hesaplanmış, toplam fenolik madde içerikleri, antioksidan aktiviteleri ve içeriğinde var olan fenolik asitlerin tespit edilmesi amacıyla HPLC-UV-DAD analizleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar şu şekilde sıralanabilir:

Bitkinin farklı kısımlarından farklı ekstraksiyon teknikleriyle elde edilen ekstrakt verimleri karşılaştırılmıştır. Bitkinin yaprak kısımlarına uygulanan Soxhlet ve ultrasonik banyo ekstrakt verimleri, bitkinin gövdesine uygulanan hidroliz işleminden elde edilen verimden daha yüksek çıkmıştır. Bu değerler Soxhlet ekstraksiyonu için ortalama % $24,95 \pm 1,30$ ve ultrasonik banyo ekstraksiyonu için % $21,00 \pm 1,34$ iken hidroliz ekstraktı için % $1,60 \pm 0,07$ düzeyindedir. Soxhlet ve ultrasonik banyo ekstraksiyon verimleri arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p < 0,05$). Hidroliz işlemi sadece gövdeye uygulandığı için bu karşılaştırmaya ve ekstraktlar üzerinde gerçekleştirilen sonraki testlerden elde edilen ortalama değer karşılaştırmalarına dahil edilmemiştir. Bu anlamlı fark, Soxhlet ekstraksiyonunun daha yüksek sıcaklıkta ve daha uzun sürelerde (8 saat-60-85 °C) uygulanması nedeniyle ki bu değerler ultrasonik banyo ekstraksiyonu için 1,45 saat ve 30-50 °C'dir, sıcaklık ve sürenin ortak etkisine bağlanmıştır.

Ekstraktların toplam fenolik madde içeriklerine bakıldığında, en iyi değeri $2,79 \pm 0,20$ mg GAE/100 g kuru numune ile yine Soxhlet ekstraktları sergilemiştir. Bu değeri $2,21 \pm 0,20$ mg GAE/100 g kuru numune ile ultrasonik banyo ve $0,07 \pm 0,02$ mg GAE/100 g kuru numune ile de hidroliz ekstraktları takip etmiştir. Ancak toplam fenolik madde içerikleri açısından Soxhlet ve ultrasonik banyo ekstraktları arasında anlamlı bir fark elde edilememiştir ($p > 0,05$). Daha düşük sıcaklık ve daha kısa ekstraksiyon süreleriyle gerçekleştirilen ultrasonik banyo ekstraksiyonlarının toplam fenolik madde içeriği açısından Soxhlet ekstraksiyonlarına eşdeğer bir performans ortaya koymuş olması dikkat çekici bulunmuştur.

DPPH radikal süpürme antioksidan aktivite değerleri (IC_{50}) açısından en iyi performansı Troloks ($11,17 \pm 0,28$ µg/mL) ve BHT ($14,37 \pm 0,79$ µg/mL)'den sonra hidroliz ekstraktları sergilediler: $35,33 \pm 1,24$ µg/mL. Bu değeri sırasıyla ultrasonik banyo ekstraktları ($57,43 \pm 1,08$ µg/mL) ve Soxhlet ekstraktları ($59,37 \pm 1,85$ µg/mL) takip ettiler (düşük değer daha yüksek antioksidan aktiviteye karşılık gelmektedir). En

düşük ekstraksiyon verimi ve toplam fenolik madde içeriği değerlerine sahip olan hidroliz ekstraktlarının daha yüksek DPPH radikal süpürme etkisi göstermeleri, matrice bağlı olan ve DPPH radikali ile reaksiyona girme yeteneği yüksek olan bazı bileşenlerin asidik hidroliz etkisiyle çözelti ortamına geçmiş olabilecekleri düşüncesini akla getirmektedir. Daha net bir şey söyleyebilmek için, bu durumun daha ileri test ve tekniklerle araştırılmasına ihtiyaç vardır. Soxhlet ve ultrasonik banyo ekstraktlarının IC₅₀ değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$).

Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi (CUPRAC) testlerinde en yüksek değeri $357,22\pm 10,73$ mmol TEAC/Kg kuru numune ile ultrasonik banyo ekstraktları ortaya koydular. Bunu sırasıyla $322,78\pm 27,99$ mmol TEAC/Kg kuru numune ile Soxhlet, $47,39\pm 2,55$ mmol TEAC/Kg kuru numune ile hidroliz ekstraktları takip etti. Yine Soxhlet ve ultrasonik banyo ekstraktları için elde edilen CUPRAC değerleri arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$).

Fe (III) iyonu indirgeme antioksidan gücü (FRAP) deneylerinde en yüksek değeri Soxhlet ekstraktları sergilediler: $67,38\pm 7,64$ μ M. Bu değeri $58,81\pm 0,42$ μ M ile ultrasonik banyo ekstraktları ve $30,95\pm 1,48$ μ M ile hidroliz ekstraktları takip etti. Soxhlet ve ultrasonik banyo ekstraktlarının FRAP değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$).

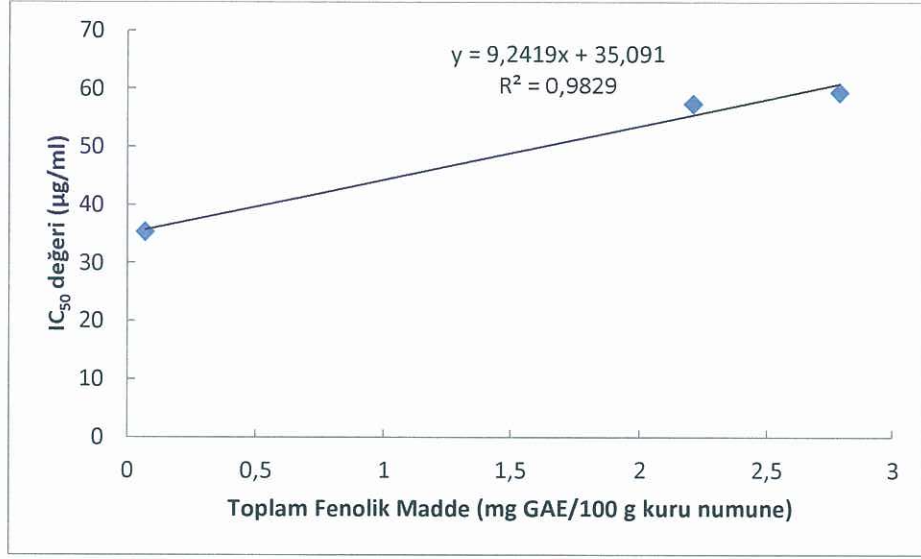
Antioksidan aktivite tayin deneylerinde dikkat çeken bir durum, uygulanan testlerde hidroliz ekstraktlarının sadece DPPH testlerinde Soxhlet ve ultrasonik banyo ekstraktlarından daha yüksek antioksidan aktivite değerleri sergilemelerine karşın, CUPRAC ve FRAP testlerinde daha düşük değerler ortaya koymuş olmasıdır. Bu durum literatürde de yer alan, testlerde kullanılan farklı yapıdaki radikallerin çeşitli değişkenlerin etkisiyle (pH, çözücü vs) aynı ekstraktlara karşı daha farklı davranabilecekleri bilgisine uygunluk göstermektedir [95].

Ekstraktlar, içeriklerindeki fenolik asitlerin belirlenmesi amacıyla 15 standart fenolik asit karşılaştırma maddesi olarak kullanılarak HPLC-UV-DAD analizine tabi tutuldular. Bitkinin gövde ve yaprak kısımlarının ekstraktlarına uygulanan HPLC-UV-DAD analizlerinde genel olarak yaprak kısımlarında daha yüksek pikler tespit edilmiştir. Bitkinin yaprak kısmına uygulanan Soxhlet ekstraksiyonu ve ultrasonik banyo ekstraksiyon piklerinin çoğunun (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) aynı alıkonma süreleri (RT) ve UV spektrumlarına sahip olduğu görülmüştür. Fakat Soxhlet ekstraksiyonunda

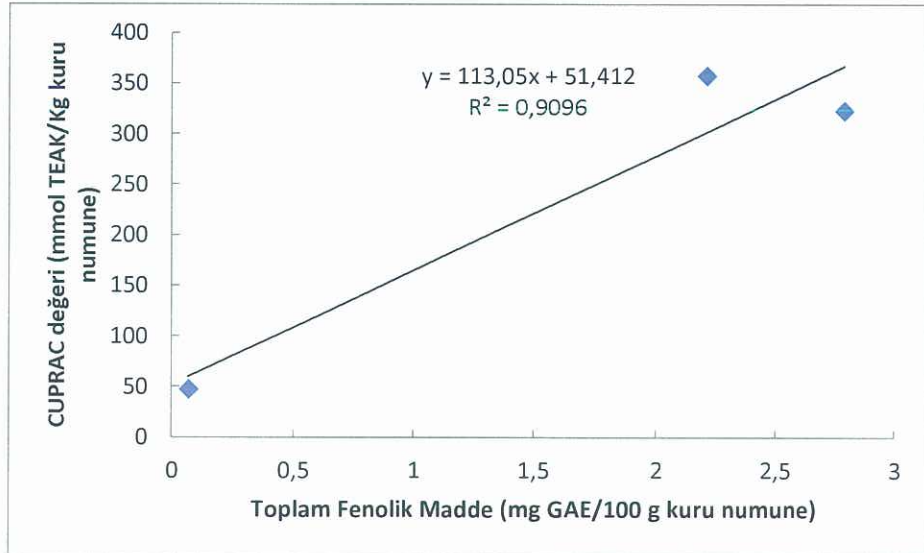
muhtemelen yöntemde uygulanan sıcaklığın daha yüksek olması nedeniyle pikler, ultrasonik banyo ekstraksiyonuna göre daha iyi çıkmıştır. HPLC tekniği bitkinin farklı kısımlarına uygulandığı için tam bir yorum yapılamazsa da Şekil 4.20’de verilen (A, B, C, D, E, F) pikleri üst üste çakışmış ve aynı UV spektrumlarını sergilemişlerdir. Soxhlet ve ultrasonik banyo ekstraksiyonlarında pik yoğunluğu genellikle iç bölgelerde toplanmışken bitkinin gövde kısmına uygulanan hidroliz işlemlerinde pik yoğunluğunun apolar bölgede (parmakizi bölgesi) toplandığı görülmüştür. Ayrıca hidrolizde 35. dakikadan sonra büyük bir pik görülmüştür. Bunların sebebinin muhtemelen bu bileşiğin şekerli ya da dimerik yapıda bir bileşik olması neticesinde, hidrolizden etkilenerek yapısal bozunmaya uğraması ve başka bir türe dönüşmesi olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak ekstraktların hepsinde benzoik asit (Soxhlet ekstraktlarında 110 μM PE, ultrasonik banyo ekstraktlarında 73 μM PE ve hidroliz ekstraktlarında 77 μM PE) görülmesine ek olarak hidroliz ekstraktlarında protokatekualdehit de (34 μM PE) tespit edilmiştir. Hidroliz işlemi, Soxhlet ve ultrasonik banyo ekstraksiyon tekniklerinin ekstrakte etmede etkisiz olduğu fenolik asit olan protokatekualdehit’i ortaya çıkarmayı başarmıştır. Kromatogramlarda hangi bileşik olduğu tespit edilemeyen ve işaretlenen yapıların aydınlatılabilmesi için LC-MS gibi daha güçlü bir teknik kullanılabilir.

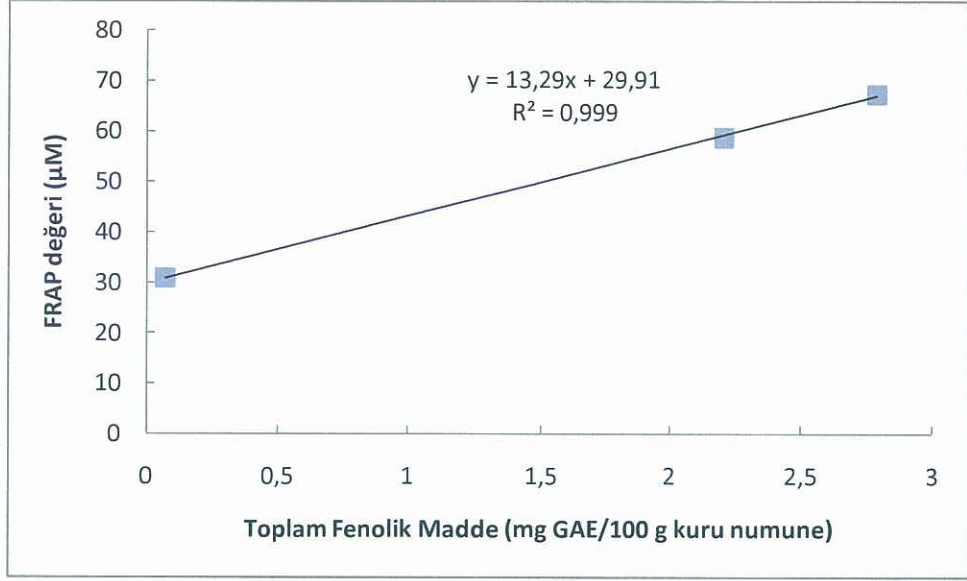
Toplam fenolik madde miktarının antioksidan aktiviteyi (kapasiteyi) nasıl etkilediği sorusu, bu konuda araştırma yapan gruplarca üzerinde durulan bir tartışma konusudur. Toplam fenolik maddenin antioksidan aktiviteyi olumlu etkilediğini, aralarındaki ilişkinin doğrusallıkla açıklanabileceğini ifade eden araştırma gruplarının [98, 99] yanı sıra, bu ikisi arasında böyle bir ilişkinin olmadığını, en azından mevcut ilişkinin biraz daha karmaşık olduğunu ifade eden araştırma grupları da vardır [100, 101]. Fakat durum ne olursa olsun, bu iki parametre arasındaki ilişkinin doğrusallığını incelemek ilgi çekici olabilir. Bu çalışmada kullanılan üç farklı antioksidan aktivite tayin metoduyla (DPPH, CUPRAC ve FRAP) elde edilen değerler ayrı ayrı, her bir ekstrakt türü için (Soxhlet, ultrasonik banyo ve hidroliz) toplam fenolik madde miktarlarına karşı grafiğe geçirilerek en küçük kareler doğrusu çizdirildi ve regresyon katsayıları hesaplandı. Grafikler Şekil 5.1-5.3’te verilmiştir.



Şekil 5.1. DPPH test sonuçlarına göre elde edilen toplam fenolik madde-antioksidan aktivite ilişkisi



Şekil 5.2. CUPRAC test sonuçlarına göre elde edilen toplam fenolik madde-antioksidan aktivite ilişkisi



Şekil 5.3. FRAP test sonuçlarına göre elde edilen toplam fenolik madde-antioksidan aktivite ilişkisi

Şekil 5.1, 5.2 ve 5.3, bu ilişkinin varlığı açısından incelendiğinde ilk göze çarpan husus, elde edilen grafiklerin doğrusallığının her üç uygulama için de oldukça yüksek değerde olmasıdır. CUPRAC ve FRAP uygulamaları için toplam fenolik madde miktarındaki artışın antioksidan aktiviteyi de artırdığını söylemek mümkün iken, DPPH testlerinde ise tersi bir durum söz konusudur. DPPH testlerinde de yüksek bir doğrusallık elde edilmiş olmakla birlikte, buradaki ilişki tersi yöndedir. Daha küçük IC_{50} değerinin daha yüksek antioksidan aktiviteye karşılık geldiği göz önüne alınırsa negatif eğimli bir grafik beklenen durum olmalı iken, bunun tersi bir grafik elde edilmiştir. Bu durum, literatürde yer alan her iki görüşü de destekler niteliktedir. Dolayısıyla, genel olarak toplam fenolik maddedeki artışın antioksidan aktiviteyi olumlu etkilediği söylenebilse de, durumun öngörülenden daha karmaşık olduğunu söyleyen araştırmacıların görüşü biraz daha ön plana çıkmaktadır.

A. albana bitkisinin yaprak ve gövdesinden Soxhlet, ultrasonik banyo ekstraksiyonu ve hidroliz işlemiyle elde edilen ekstraktların antioksidan aktivitelerinin ve ekstraktlardaki fenolik asitlerin tespiti çalışması için şunlar söylenebilir: Genel olarak en yüksek ekstraksiyon verimlerini ve toplam fenolik madde miktarını Soxhlet ekstraktları sergilemiş olsa da, bu değerlerin ultrasonik banyo ekstraktlarının ortaya koymuş olduğu antioksidan aktivite değerlerini geçmeye yetmediği ortadadır. Ultrasonik banyo ekstraksiyonu hem daha düşük sıcaklıkta hem de daha kısa sürede gerçekleştirilebilmesi

açısından belirgin bir avantaj ortaya koymuştur. Lignoselülozik materyallere uygulanabilen asidik hidroliz işleminin ise, bitkisel yapıda bağlı olarak bulunan ve diğer ekstraksiyon türleri ile ekstrakte edilebilmeleri zor olan bazı bileşik gruplarının kazanımı için uygun ve uygulaması basit bir yöntem olduğu söylenebilir.

6. KAYNAKLAR

- [1]. B. Aydemir, E. Karadağ Sarı, “Antioksidanlar ve Büyüme Faktörleri ile İlişkisi”, *Kocatepe Vet Der.*, 2 (2), (2009), 56-60.
- [2]. İ. Akkuş, “Serbest Radikaller ve Fizyoterapik Etkileri”, 1. Baskı, Mimoza Yayınları. Konya, (1995).
- [3]. R. Singh, S. Sharad, S. Kapur, “Free Radicals and Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: Relevance of Dietary Antioxidants”, *journal, Indian Academy of Clinical Medicine*, 5(3), (2004), 218-25.
- [4]. K. Apel, H. Hirt, “Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction”, *Annu. Rev. Plant Biol*, 55, (2004), 373-99.
- [5]. B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, “Free Radicals in Biology and Medicine”, Oxford University Press, New York, (1999), Pp: 55-99.
- [6]. C. Çavdar, A. Sifil, T. Çamsan, “Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidan Savunma”, *Türk Nef. Ve Transpl. Der.*, 3-4; (1997), 92-95.
- [7]. D. Dreher, A.F. Junod, “Role of Oxygen Free Radicals in Cancer Development”, *Eur. J. Cancer*, 32A:30 (1996).
- [8]. E.R. Stadtman, “Importance of Individuality in Oxidative Stress and Aging”, *Free Radical Biology and Medicine*, 33(1), (2002), 37-44.
- [9]. J.M. Mates, “Effects of Antioxidant Enzymes in the Molecular Control of Reactive Oxygen Species Toxicology”, *Toxicology*, 153: (2000), 83-104.
- [10]. B. Bektaşoğlu, “Hidroksil Radikal Süpürülmesine Dayalı Antioksidant Aktivite Ölçümünde Yeni Bir Yöntem Geliştirilmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Fen bilimleri Enstitüsü, (2007).
- [11]. J. Harbinson, C.L. Hedley, “Changes in p-700 Oxidation During the Early Stages of the Induction of Photosynthesis”, *Plant Physiol*, 103: (1993), 649-60.
- [12]. M. K. Zainol, M. K. Abd-Hamid, S.Yusof, R. Muse, “Antioxidant Activity and Total Phenolic of Leaf, Root and Petiole of Four Accessions of *Centella Asiatica* (L.) Urban”, *Food Chem.*, 81, (2003), 575-81.
- [13]. M. Özyürek, B. Bektaşoğlu, K. Güçlü, R. Apak, “Hydroxyl Radical Scavenging Assay of Phenolics and Flavonoids with a Modified Cupric Reducing Antioxidant Capacity (CUPRAC) Method Using Catalase for Hydrogen Peroxide Degradation” *anal. chimica acta.*, 616, (2008), 196-206.

- [14]. F. Haber, J. Weiss, "The Catalytic Decomposition of Hydrogen Peroxide by Ion Salts", Proc. R. Soc., 147(A): (1934), 332-51.
- [15]. H.J.H. Fenton, "Oxidation of Tartaric Acid in Presence of Iron", J. Chem. Soc. Trans., 65: (1894), 899-911.
- [16]. T. Kayış, "Diazinon' un Subletal Konsantrasyonlarının Pimpa Turionellae L.' nin Eşey Oranı ve Bazı Biyokimyasal Parametreleri Üzerine Etkileri", Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana (2010).
- [17]. İ. Büyük, S. Soydam-Aydın, S. Aras, "Molecular Responses of Plants to Stress Conditions", Türk Hij. Den. Biyoloji Derg., 69(2); (2012), 97-110.
- [18]. J. Pokorný, "Introduction, In: Antioxidants in Food: Practical Applications" (Eds: J. Pokorný, N. Yanishlieva, M. Gordon), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, (2001), p:2.
- [19]. M.E. Diken, "Bazı Şifalı Bitkilerin Antioksidan İçerikleri", Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir (2009).
- [20]. M. H. Gordon, "The Development of Oxidatif Rancidity in Foods, In: Antioxidants in Food: Practical Applications" (Eds: J. Pokorný, N. Yanishlieva, M. Gordon), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, (2001), p:17.
- [21]. K. Cui, et. al, "Role of Oxidative Stress in Neurodegeneration: Recent Developments in Assay Methods for Oxidative Stress and Nutraceuticd Antioxidants", Progress in Neuro-Psychopharmacology, Biological Pschiatry, 8, (2004), 771-799.
- [22]. L. Goth, "Simple Method for Determination of Serum Activity and Referance Range", Clin. Chem. Acta, 196; (1991), 143-152.
- [23]. C. Datta, J. Gupta, A. Sarkar, D. Sengupta, "Effect of Organophosphorus Insecticide Phosphomidon on Antioxidant Defence Components of Human Erythrocyte and Plasma, Indian J. Exp. Biol., 30(1), (1995), 65-67.
- [24]. M.D.L., De Castro, F., Priego-Capote, " Soxhlet Extraction: Past and Present Panacea", J. of Chromatography A, 1217, (2010), 2383-2389.
- [25]. E. Priego-Lopez, et. al, "Focused Microwave-Assisted Soxhlet Extraction: An Expeditive Approach for The Isolation of Lipids From Sausage products", Food Chem., 83, (2003), 144.

- [26]. F. Soxhlet, "Die Gewichtsanalytische Bestimmung Des Milchfettes", Polytechnisches J. (Dingler's), 232, (1879), 461.
- [27]. H. Liang, "Modeling of Ultrasound Assisted and Osmotically Induced Diffusion In Plant Tissue", PhD Dissertation, Purdue University, Indiana, US, (1993).
- [28]. Ş. Tavman, S. Kumcuoğlu, Z. Akkaya, "Bitkisel Ürünlerin Atıklarından Antioksidan Maddelerin Ultrason Destekli Ekstraksiyonu", Ege Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, GIDA, İzmir, 34(3), (2009), 175-182.
- [29]. T.J. Mason, L. Paniwnyk, J.P. Lorymer, "The Uses of Ultrasound in Food Technology", Ultrasonic Sonochemistry, (1996), 8:253-260.
- [30]. Y.Y. Borisov, N.M. Gynkina, L.D. Rozenberg, "Acoustic Drying. In: Physical Principles of Ultrasonic Technology", Plenum Pres., Vol.2, (1973), Pp:381-474.
- [31]. J. WU, L. Lin, F. Chau, "Ultrasound Assisted Ekstraktion of Gingseng Saponins from Gingseng Roots and Cultured Gingseng Cells", Ultrasonics Sonochemistry, (2001), 8: 347-352.
- [32]. B. Kaufmann, P. Christen, "Recent Extraction Techniques for Natural Products: Microwaveassisted Extraction and Pressurised Solvent Extraction", Phytochemical Anal., (2002), 13:105-113.
- [33]. M. Çam, Y. Hışıl, Basınçlı Solvent Ekstraksiyonu ve Uygulamaları. Ege Üniversitesi, Mühendislik Fak., Gıda Teknolojileri Elektronik Derg., (2006), (3) 79-86.
- [34]. S. Kuşlu, F. Çavuş, "Mikrodalga Enerjisinin Analitik Kimya Sahasında ve Katalizör Hazırlamada Kullanımı", Mühendislik Bilimleri Derg., 14 (3), (2008), 267-277.
- [35]. V. Beejmohun, O. Fliniaux, F. Lamblin, et. al, "Microwave-Assisted Extraction of The Main Phenolic Compounds in Flaxseed", Phtochemical Anal., 18, (2007), 275-282.
- [36]. Y. Yamani, M. Khajeh, E. Ghasemi, M. Mirza, K. Javidnia, "Comparison of Essential Oil Compositions of *Salvia Mirzayanii* Obtained by Supercritical Carbondioxide Extraction and Hydrodistillation Methods", Food Chem., 108, (2007), 341-346.

- [37]. S.B. Hawthorne, "Analytical-Scale Supercritical Fluid Extraction", *Anal. Chem.*, 62(11), (1990), 633A-42A.
- [38]. G.D. Porta, S. Porcedda, B. Marongiu, E. Reverchon, "Isolation of Eucalyptus Oil by Supercritical Fluid Extraction Flavour and Fragrance", *J.14*, (1999), 214-218.
- [39]. R.E. Majors, "Supercritical Fluid Extraction: An Introduction", *LC-GC Magazine of Separation Science*, 9 (2), (1991), 78.
- [40]. K. Yamaguchi, M. Murakami, H. Nakano, S. Konosu, et. al, "Supercritice Carbondioxide Extraction of Oils from Antarctic Krill.", *J. Agric. Food Chem.* 34: (1986), 904-907.
- [41]. S. Albayrak, O. Sağdıç, A. Aksoy, "Bitkisel Ürünlerin ve Gıdaların Antioksiidan Kapasitelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler", *Erciyes Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü Derg.*, 26 (4): (2010), 401-409.
- [42]. D. Huang, B. Ou, RL. Prior, "The Chemistry behind Antioxidan Capacity Assays", *J. Agric. Food Chem.*, 53, (2005), 1841-1856.
- [43]. A.R. Ndhala, M.Moyo, J. Van Staden, "Natural Antioxidants: Fascinating or Mythical Biomolecules Molecules", 15: (2010), 6905-30.
- [44]. M.C. Sanchez, J.A. Larrauri, C.F. Saura, "A Procedure to Measure The Antiradical Efficiency of Polyphenols", *J. Sci. Food and Agric.*, 76, (1998), 270-276.
- [45]. R.L. Prior, X. Wu, K. Schaich, "Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements" *J. Agric. Food Chem.*, 53, (2005), 4290-4302.
- [46]. L.M. Magalhaes, M.A. Segundo, S. Reis, J.L.F.C. Lima, "Methodological Aspects About in Vitro Evaluation of Antioxidant Properties", *Anal.Chem. Acta.*, 613, (2008), 1-19.
- [47]. R. Apak, K. Güçlü, M. Özyürek, S.E. Karademir, "Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and A, Using Their Cupric İon Reducing Capability in the Presence of Neocuprine: CUPRAC Method", *J. Agric. Food Chem.*, 52: (2004), 7970-81.
- [48]. M. Özyürek, K. Güçlü, R. Apak, "The Main and Modified CUPRAC Methods of Antioxidant Measurement", *Trends in Anal. Chem.*, 30(4), (2011), 652-664.

- [49]. I.F.F. Benzie, J.J. Strain, "The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of *Antioxidan Power*: The FRAP Assay", *Anal. Biochem.*, 239 (1), (1996), 70-76.
- [50]. F. Akdeniz, İ. Dursun, K. Tepebaş, D. Şuekinçi, "Determination and Comparison of Antioxidan Activities of the Extracts from Dried Fruits of *Laurocerasus Officinalis* Roem. Via Different Extraction Techniques", ISOPS10th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (Book of Abstracts), Ankara, Turkey, (2012).
- [51]. C. Guo, J. Yang, J. Wei, Y. Li, et. al, "Antioxidant Activities of Peel, Pulp and Seed Fractions of Common Fruits as Determined by FRAP Assay", *Nutrition Research*, 23, (2003), 1719-1726.
- [52]. L.K. Macdonald-Wicks, L.G. Wood, M.L. Garg, "Methodology for the Determination of Biological Antioxidant Capacity in vitro: a review", *J. Sci. Food Agric.*, 86, (2006), 2046-2056.
- [53]. S. Lussignoli, M. Fraccaroli, G. Andrioli, G. Brocco, et. al, "Microplate-based Clorometric Assay of the Total Peroxyl Radical Trapping Capability of Human Plasma", *Anal Biochem*, 269, (1999), 38-44.
- [54]. Ö. Akpınar, S.Sabancı, O. Levent, A. Sayaslan, "Evaluation of Antioxidant Activity of Dilute Acid Hydrolysate of Wheat Straw During Xylose Production", *Industrial Crops and Products*, 40, (2012), 39-44.
- [55]. J. Gonzalez, J.M. Cruz, H. Dominguez, J.C. Parajo, "Productions of Antioxidants from *Eucalyptus Globulus* Wood by Solvent Extraction of Hemicellulose Hydrolysates", *Food Chem.*, 84, (2004), 243-251.
- [56]. I.C. Roberto, S.I. Mussatto, R.C.L.B. Rodrigues, "Dilute-Acid Hydrolysis for Optimization of Xylose Recovery From Rice Straw in a Semi-Pilot Reactor", *Industrial Crop and Products*, 17, (2003), 171-176.
- [57]. M. Sasaki, Z. Fang, Y. Fukushima, T. Adschiri, "et. al", "Dissolution and Hydrolysis of Cellulose in Subcritical and Supercritical Water", *Industrial-Engineering Chemistry Research*, 39, (2000), 2883-90.
- [58]. G. Lissens, A.B. Thomsen, L. De Baere, "Thermal Wet Oxidation Improves Anaerobic Biodegradability of Raw and Digested Biowaste", *Environ Sci Technol* 38, (2004), 3418-24.

- [59]. R. Aguilar, J.A. Ramirez, G. Garrote, M. Vazquez, "Kinetic Study of Acid Hydrolysis of Sugarcane Bagasse", *J. Food Eng.* 55, (2002), 309-318.
- [60]. A. Herrera, S.J. Tellez-Luiz, J.J. Gonzalez-Gabriales, J.A. Ramirez, et. al, "Effect of Hydrochloric Acid Concentration on The Hydrolysis of Sorghum Straw and Atmospheric Pressure", *J. Food Eng.*, 63, (2004), 103-109.
- [61]. R.H. Baney, X. Cao, R.G. Jones, W. Ando, et. al, "Silsesquioxanes In Containing Polymers", Chapter 6, (2000), p 157.
- [62]. B. Rivas, J.M. Dominguez, H. Dominguez, J.C. Parajo, "Bioconversion of Posthydrolysed Autohydrolysis Liquors: An Alternative for Xylitol Production From Corn Cobs", *Enzyme and Microbial Technology*, Vol.31, (2002), 431-438.
- [63]. J.M. Cruz, J.M. Dominguez, H. Dominguez, J.C. Parajo, "Soxhlet Extraction of Hemisellulosic Wood Hydrolysates: A Procedure Useful for Obtaining both Detoxified Fermentation Media and Polyphenols With Antioxidant Activity", *Food Chem.*, 67, (1999), 147-153.
- [64]. P.J. White, Y. Xing, "Antioxidants from Cereals and Legumes. Natural Antioxidants: Chemistry Health Effect and Applications", Champaign, IL: AOCS Press, (1997), 25-63.
- [65]. P. Zandi, M.H. Gordon, "Antioxidant Activity of Extracts from Old Tea Leaves", *Food Chem.*, 64: (1999), Pp: 285-288 (4).
- [66]. R. Radi, M. Rodriguez, L. Castro, R. Telleri, "Inhibition of Mitochondrial Electron Transport by Peroxynitrite", *Arch. Biochem. Biophys*, 308, (1994), 89-95.
- [67]. M.P. Kahkonen, A.I. Hopia, H.J. Vuorela, J.P. Rauha, et. al, "Antioxidant Activity Of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds", *J. Agric. Food Chem.*, 47: (1999), 3954-62.
- [68]. A. Chong, J.A. Ramirez, G. Garrote, M. Vazquez, "Hydrolysis of Sugar Cane Bagasse Using Nitric Acid, a Kinetic Assesment", *J. Food Eng.* 61 (1): (2004), 143-152.
- [69]. A.V. Tran, R.P. Chambers, "Red Oak Wood Derived Inhibitors in The Ethanol Fermentation of Xylose by *Pichia Stipitis* CBS 5776", *Biotechnol. Lett.*, 7, (1985), 841-846.

- [70]. A.V. Tran, R.P. Chambers , “Ethanol Fermentation of Red Oak Acid Prehydrolysate by The Yeast *Pichia Stipitis* CBS 5776”, *Enzyme Microb. Technol.*, 8, (1986), 439-45.
- [71]. J. Fernandez-Bolanos, B. Felizon, M. Brenes, R. Guillen, “et. al”, “Hydroxytyrosol and Tyrosol as The Main Compounds Found in The Phenolic Fraction of Steam-Exploded Olive Stones”, *J. Am. Oil. Chem Soc*, 75: (1998), 1643-1649.
- [72]. S. Larsson, A. Reimman, N.O. Nilverbant, L.J. Lönsson, “Comparison of Different Methods for Detoxification of Lignosellülosic Hydrolyzates of Spruce”, *Appl. Biochem. Bioetchnol.*, (1999), 77-79, 91-103.
- [73]. J. Darias-Martin, B. Luis-Martin, M. Carrillo-Lopez, R.M. Lamuela-Raventos, et.al, “Effect of Cafeic Acid on The Color on Red Wine”, *J. Agric. Food*, 50: (2002), 2062-67.
- [74]. M. Mermet, and M.V. Otto, *Analytical Chemistry, A Modern Approach to Analytical Science* (2. bs.), Germany, Wiley-VCH, (2004).
- [75]. D. A. Skoog, E.J. Holler, S. R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*, (6.bs.), Thomson Brooks/Cole, Kanada, (2004).
- [76]. <http://www.kimyaevi.com> adresli internet sitesinden 19.10.2013 tarihinde saat 14.33 itibariyle yapılan taramadan elde edilen sonuçlar.
- [77]. A. Yıldız, Ö. Genç, S. Bektaş, *Enstrümental Analiz Yöntemleri*, Hacettepe Yayınları, (1997) 417-422.
- [78]. A.E. Yaprak, S.T. Körüklü, A.O. Ketenoglu, “A Synopsis of the Genus *Pulsatilla* (Ranunculaceae) in Turkey”, *Ankara University, Turk J. Bot.*, 35, (2011), 351-355.
- [79]. F. Güneş, N. Özhatay, “An Ethnobotanical Study from Kars (Eastern) Turkey”, *Biological Diversity and Conservation, Kars*, 4/1, (2011), 30-41.
- [80]. Bilgi, bitkinin bu amaçla kullanıldığı bölge olan, Kars ili Akyaka ilçesi Büyük Durduran köyünden Kadir Tepebaş ile Haziran-2011’de yapılan yüz yüze görüşmeden sağlanmıştır.
- [81]. L. Wang, L. Curtis, Weller, “Recent Advances in Extraction of Nutraceuticals from Plants”, *T. Food Sci. Y Technol.*, 17, (2006), 303.
- [82]. J. Wang, et. al, “Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Wheat Bran.”, *Food Chem.*, 106, (2008), 804-810.

- [83]. M. Cuendet, K. Hostettmann, O. Potterat, W. Dyatmiko, "Iridoid Glucosides with Free Radical Scavenging Properties from *Faragraea Blumei*", *Helvetica Chimica Acta*, 80 (4), (1997), 1144-52.
- [84]. K. Slinkard, V.L. Singleton, "Total Phenolic Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods", *A.J.E.V*, 28, (1977), 49-55.
- [85]. R. Apak, et. al, "Mechanism of Antioxidant Capacity Assays and The Cuprac (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity) Assay *Microchim Acta*", *Public Library of Sci.*, 160: (2008), 413-419.
- [86]. I.F.F. Benzie, J.J. Strain, W.Y. Chung, "Antioxidant" (reducing) Efficiency of Ascorbate in Plasma is not Affected by Concentration, *J. Nutr. Biochem.*, vol.10, 3, (1999), 146-150.
- [87]. P., Matilla, J., Kumpulainen, "Determination of Free and Total Phenolic Acids in Plant-Derived Foods by HPLC With Diode-Array Detection", *J. Agric. Food Chem.*, 50: (2002), 3660-67.
- [88]. S., Perez-Magarino, I., Revilla, M.L., Gonzalez-SanJose, S., Beltran, "Various Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry to the Analysis of Phenolic Compounds", *J. of Chromatography, A*, 847: (1999), 75-81.
- [89]. Y.C., Fiamegos, C.G., Nanos, J., Vervoort, C.D., Stalikas, "Analytical Procedure for the in-vial Derivatization-Extraction for Phenolic Acids and Flavonoids in Ethanolic and Aqueous Plant Extracts Followed by Gas Chromatography with Massselective Detection", *J. of Chromatography A*, 1041: (2004), 11-18.
- [90]. H., Schmidlein, K., Hermann, "Quantitative Analysis for Phenolic Acids by Thin Layer Chromatography", *J. of Chromatography A*, 115: (1975), 123-128.
- [91]. G., Cartoni, F., Cocciol, R., Jasionowska, "Capillary Electrophoretic Separation of Phenolic Acids", *J. of Chromatography A*, 709: (1995), 209-214.
- [92]. K. Zhang, Y. Zuo, "Naturel Phenolics Antioxidants in Human Fluids: Analytical Approaches and Antioxidant Capacity Studies", *Pak. J. Anal. Envir. Chem.*, vol. 7, no.1, (2006), 39-47.

- [93]. Q. Wu, M. Wang, J.E. Simon, "Analytical Methods to Determine Phytoestrogenic Compounds", *J. of Chromatography B*, 812, (2004), 325-55.
- [94]. I.M., Sani, S., Iqbal, K.W., Chan, M., Ismail, "Effect of Acid and Base Catalyzed Hydrolysis on the Yield of Phenolics and Antioxidant Activity of Extracts from Germinated Brown Rice (GBR)", *Molecules*, 17, (2012), 7584-94.
- [95]. R. Apak, S. Gorinstein, V. Böhm, K.M. Schaich, M. Özyürek, K. Güçlü, "Methods of Measurement and Evaluation of Natural Antioxidant Capacity/Activity (IUPAC Technical Report)", *Pure Appl. Chem.*, 85 (5), (2013), 957-98.
- [96]. H., Kafalı, "Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Kolon Sonrası Türevlendirme ile 7 Adet Sülfonamid Tespitinin Metod Validasyonu" Yüksek lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, (2008).
- [97]. N.A., Burnaz, "ON-LİNE HPLC-FRAP Antioksidan Aktivite Tayin Yönteminin Geliştirilmesi ve Bazı Doğal Ürünlere Uygulanması", Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 2013.
- [98]. C., Alaşalvar, *et al*, "Compositional Characteristics and Antioxidant Components of Cherry Laurel Varieties and Pekmez", *J. Food Sci.*, 70 (1), (2005), S47-S52.
- [99]. K., Tawaha, *et al*, "Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Selected Jordanian Plant Species", *Food Chem.*, 104, (2007), 1372-78.
- [100]. S.M., Khamsah, *et al*, "Antioxidant Activity and Phenolic Content of Orthosiphon Stamineus Benth from Different Geographical Origin", *J. Sustainability Sci. and Management*", 1 (2), (2006), 14-20.
- [101]. M., Muchuweti, *et al*, "Total phenolic content and antioxidant activity in selected medicinal plants of Zimbabwe", *International J. Food Sci. & Technology*, 41 (1), (2006), 33-38.

ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Iğdır'ın Aralık ilçesinde doğdu. 2005 yılında Iğdır Lisesi'nden mezun oldu. 2007 yılında Kafkas Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümüne girdi. 2011 yılında "Kimyager" ünvanıyla mezun oldu. 2011 yılında Kafkas Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Analitik Kimya Anabilimdalı'nda yüksek lisansa başladı ve halen yüksek lisans öğrenimine devam etmektedir.

Yayınları

1. P. Filiz, L. Çavlan, L. Arı, Ö. Samancı, K. Tepebaş, İ. Dursun, N Vural, M. Biçil, F. Akdeniz, "Tırşik Otundan (*Arum dioskoridis* Sm) Elde Edilen Ekstraktların Fenolik Madde İçeriğinin Ve Antioksidan Aktivitelerinin Tayini" XI. Analitik Kimya kongresi, Hatay, (2012)
2. N. Vural, F.Akdeniz, İ.Dursun, K.Tepebaş, "Antioxidant Activities of the Extracts from *Anemone albana* Stev by Different Extraction Techniques", 6th Black Sea Basin Conference on Analytical Chemistry, PP232, Trabzon, Turkey 10-14 September (2013).