

KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

***Lathyrus Rotundifolius* WILD. (Hatun Parmağı) BİTKİSİNDEN FARKLI
TEKNİKLERLE ELDE EDİLEN EKSTRAKTLARIN ANTİOKSİDAN
AKTİVİTELERİNİN KARŞILAŞTIRMALI TAYİNLERİ**

Kadir TEPEBAŞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Fikret AKDENİZ

EYLÜL-2012

KARS

**Bu çalışma, Kafkas Üniversitesi Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından
2012-FEF-37 proje no ile desteklenmiştir.**

T.C.

**KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI**

***Lathyrus Rotundifolius* WILD. (Hatun Parmağı) BİTKİSİNDEN FARKLI
TEKNİKLERLE ELDE EDİLEN EKSTRAKTLARIN ANTİOKSİDAN
AKTİVİTELERİNİN KARŞILAŞTIRMALI TAYİNLERİ**

**Kadir TEPEBAŞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Fikret AKDENİZ**

**EYLÜL-2012
KARS**

T.C. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Kadir TEPEBAŞ'ın, Doç. Dr.Fikret AKDENİZ'in danışmanlığında yüksek lisans tezi olarak hazırladığı "***Lathyrus rotundifolius* Willd. (Hatun Parmağı) Bitkisinden Farklı Tekniklerle Elde Edilen Ekstraktların Antioksidan Aktivitelerinin Karşılaştırmalı Tayinleri**" adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy... *Birliği* ile kabul edilmiştir.

17 /09 /2012

Adı ve Soyadı
Başkan : Prof. Dr. İsmail ÇAKMAK
Üye : ..Doç. Dr. Süleyman GÜL
Üye : ..Doç. Dr. Fikret AKDENİZ

H. H. H.

imza

[Handwritten signature]

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun / / 200. gün ve /
..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

.....

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu çalışma Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Çalışmada Kars bölgesinde yetişen bir kara bitkisi olan *Lathyrus rotundifolius* Wild.'in farklı çözücü ortamında geleneksel Soxhlet ekstraksiyon tekniği ve ultrasonik dalga destekli ekstraksiyon tekniği kullanılarak ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu ekstraktların toplam fenolik madde içerikleri ile antioksidan aktivite tayinleri yapılmış ve bu değerler istatistiksel olarak birbirleriyle karşılaştırılmıştır.

Bu tez çalışmasına katkıda bulunan başta danışman hocam Doç.Dr.Fikret AKDENİZ'e teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca ultrasonik dalga destekli ekstraktların elde edilmesinde gerek teknik ve gerekse de bilimsel yardımlarını bizden esirgemeyen Prof.Dr.İsmail ÇAKMAK'a, ultraviyole spektrofotometre ölçümlerinin alınmasında Biyoloji bölümünden Yrd. Doç.Dr. İlhami GÖK'e ve bitkilerin teşhisinde önemli katkıları olan yine Biyoloji bölümü öğretim üyelerinden Yrd. Doç.Dr Fatma GÜNEŞ'e teşekkürlerimi bir borç bilirim. Ayrıca CUPRAC yöntemini uygulamam ve yorumlamamda yardımcı olan İstanbul Üniversitesi Kimya Bölümünden Doç. Dr. Mehmet ALTUN'a, Arş. Gör. Mustafa BENER'e ve Arş. Gör. Esin KONDAKCI'ya ve bitkileri toplamamda yardımcı olan Serkan TEPEBAŞ'a, UV-spektrofotometre ölçümlerinin alınmasında yapmış olduğu katkılardan dolayı çok değerli arkadaşım İnan DURSUN'a, çalışma süresince her türlü desteği esirgemeyen Arş.Gör. Onur AKYILDIRIM'a ve yüksek lisans öğrencileri, Levent KEKEÇ, Nazlı VURAL, Metin BİÇİL'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bu çalışmada benim için maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve zaman ayıran değerli aileme, öncelikle annem Döne TEPEBAŞ, kardeşlerim Özge ve Didem Naz TEPEBAŞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Yine bu çalışmaya verdikleri destekten dolayı Kafkas Üniversitesi Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne teşekkür ederim.

Bu çalışma, kısa bir zaman önce aramızdan ayrılan kadar her türlü desteğini üzerimden eksik etmeyen sevgili babam Hulusi TEPEBAŞ'a ithaf olunmuştur.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİL DİZİNİ	x
RESİM DİZİNİ	xiii
1 GİRİŞ	1
2 GENEL BİLGİLER	2
2.1 Serbest Radikaller	2
2.2 Antioksidanlar	3
2.2.1 Metabolizmadaki Antioksidan Savunma Mekanizmaları	4
2.2.2 Sentetik Antioksidanlar	5
2.2.3 Doğal Antioksidanlar	6
2.2.4 Çalışma Materyali Hakkında Bilgi	9
2.3 Antioksidan Madde Ekstraksiyonu İçin Kullanılan Teknikler	11
2.3.1 Soxhlet Ekstraksiyonu	11
2.3.2 Ultrasonik Dalga Yardımlı Ekstraksiyon	12
2.4 Bitki Ekstraktlarının Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Bazı Yöntemler	13
2.4.1 DPPH Radikal Temizleme Yöntemi	14

2.4.2	Cu-II İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi (CUPRAC) Yöntemi	15
2.4.3	Toplam Fenolik Madde İçeriğinin Tayini	16
3.	MATERYAL VE YÖNTEM	17
3.1	Kullanılan Malzemelerin Teknik Özellikleri	17
3.2	Kullanılan Kimyasalların Teknik Özellikleri	17
3.3	Numune Hazırlama	17
3.4	Ekstraksiyon İşlemleri	18
3.4.1	Soxhlet Ekstraksiyonu	18
3.4.2	Ultrasonik Dalga Yardımlı Ekstraksiyon	18
3.5	Ekstraktların Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi	19
3.5.1	DPPH Radikal Temizleme Yöntemi	19
3.5.2	Cu-II İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi (CUPRAC) Yöntemi	20
3.5.3	Toplam Fenolik Madde İçeriğinin Tayini	21
3.6	Deney Sonuçlarının İstatistiksel Analizi	21
4	BULGULAR VE TARTIŞMA	22
4.1	Ekstraksiyon İşlemlerinden Elde Edilen Bulgular	22
4.1.1	Ana Çalışma Kısmı Verim Yüzdeleri	22
4.1.2	Parametre Çalışması Kısmı Verim Yüzdeleri	25
4.1.2.1	Çözücünün Verime Etkisi	26
4.1.2.2	Parçacık Büyüklüğünün Verime Etkisi	27
4.1.2.3	Ekstraksiyon süresinin Verime Etkisi	28

4.2	Toplam Fenolik Madde Tayini Deneylelerinden Elde Edilen Bulgular	29
4.2.1.	Ana Çalışma Kısmı Toplam Fenolik Madde Tayini Deneylelerinden Elde Edilen Bulgular	29
4.2.2	Parametre Çalışma Kısmı Toplam Fenolik Madde Tayini Deneylelerinden Elde Edilen Sonuçlar	32
4.2.2.1	Çözücünün Toplam Fenolik Madde İçeriği Üzerine Etkisi	33
4.2.2.2	Parça Büyüklüğünün Toplam Fenolik Madde İçeriği Üzerine Etkisi	34
4.2.2.3	Ekstraksiyon Süresinin Toplam Fenolik Madde İçeriği Üzerine Etkisi	35
4.3	Antioksidan Aktivite Değerlerinin Tayini Deneylelerinden Elde Edilen Bulgular	36
4.3.1	DPPH Radikal Süpürme Deneylelerinden Elde Edilen Bulgular	36
4.3.1.1	Ana Çalışma Kısmında Elde Edilen Bulgular	36
4.3.1.2	Parametre Çalışma Kısmından Elde Edilen Bulgular	40
4.3.2	Cu-II İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi (CUPRAC) Deneylelerinden Elde Edilen Bulgular	47
4.3.2.1	Ana Çalışma Kısmından Elde Edilen Bulgular	47
4.3.2.2	Parametre Çalışma Kısmından Elde Edilen Bulgular	50
5	SONUÇLAR	55
6	KAYNAKLAR	60
7	EK ŞEKİLLER	65
8	ÖZ GEÇMİŞ	66

ÖZET

Bu çalışmada, *Lathyrus rotundifolius* Willd. (Hatun parmağı) bitkisinden farklı ekstraksiyon teknikleri ile elde edilen ekstraktların, ekstraksiyon verimleri, toplam fenolik madde miktarları ve antioksidan aktivite değerleri tayin edildi ve karşılaştırıldı.

Çalışma iki kısımda gerçekleştirildi. İlk kısımda, *L. rotundifolius* bitkisinden Soxhlet ve ultrasonik dalga destekli ekstraksiyon teknikleri kullanılarak ekstraktlar elde edildi. Metanol, % 50 metanol-saf su ve saf su olarak üç farklı ekstraksiyon çözücüsü kullanıldı. Elde edilen ekstraktların verim değerleri, toplam fenolik madde içerikleri ve antioksidan aktivite değerleri hesaplanarak, kullanılan iki teknik açısından karşılaştırıldı. Çalışmanın ikinci kısmında, çözücünün, parçacık büyüklüğünün ve ekstraksiyon süresinin ekstrakt verimi, toplam fenolik madde içeriği ve antioksidan aktivite değerleri üzerine etkisinin incelendiği ve karşılaştırıldığı deneyler gerçekleştirildi. Tüm deneyler üç paralel ile gerçekleştirildi ve sonuçlar ‘ortalama değer \pm standart sapma’ olarak verildi. İstatistiksel inceleme kısmında, iki ortalamanın karşılaştırılması için “t istatistiği” (Student’s t Test), ikiden fazla ortalamanın karşılaştırılması için “Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA)” kullanıldı. p değerinin 0,05’ten küçük olması durumunda karşılaştırılan ortalamaların birbirinden farklı olduğu kabul edildi. p > 0,05 durumunda ise karşılaştırılan ortalamalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı kabul edildi.

Sonuç olarak *L. rotundifolius* bitkisinden antioksidan aktivitesi yüksek ekstraktlar elde etmek için gerekli optimum şartlar, parçacık boyutu: < 125 μ m, çözücü: saf su, ekstraksiyon süresi: 70 dk ve ekstraksiyon tekniği: ultrasonik dalga destekli ekstraksiyon olarak belirlendi.

Çalışmada elde edilen toplam fenolik madde miktarları ile antioksidan aktiviteler arasında doğrusal bir ilişki olup olmadığı da incelendi. Buna göre, uygulanan her iki antioksidan aktivite tayin uygulaması açısından, bu iki değer arasında ya böyle bir ilişkinin olmadığı ya da oldukça zayıf olduğu ortaya konuldu.

Anahtar Kelimeler: *Lathyrus rotundifolius* Willd., Hatun Parmağı, Soxhlet Ekstraksiyonu, Ultrasonik Dalga Destekli Ekstraksiyon, Toplam Fenolik Madde, Folin-Ciocalteu, Antioksidan Aktivite, DPPH, CUPRAC, Parçacık Büyüklüğü, Çözücü, Ekstraksiyon Süresi.

ABSTRACT

In this study, extraction yields, total phenolic contents and antioxidant activity values of the extracts via different extraction techniques from *Lathyrus rotundifolius* Willd. (Hatun Parmağı) were determined and compared.

The study was performed in two parts. In the first section, the extracts were obtained from grounded and sieved *L. rotundifolius* plant materials by using conventional Soxhlet extraction and ultrasound assisted extraction procedures. Methanol, % 50 methanol-distilled water mixture and distilled water were used as the extraction solvents. Extraction yields, total phenolic contents and antioxidant activity values of the extracts were calculated and compared from the point of view of extraction techniques used in the study. In the second part of the study, the effects of extraction solvents, particle dimensions and extraction time intervals upon the extraction yields, total phenolic contents and antioxidant activities were investigated and compared. All tests were performed in three parallels, and results expressed as mean value \pm standard deviation. In the statistical treatment section, 'Student's t Test' was used to compare the two calculated mean values, and "One-Tailed Analysis of Variance (ANOVA)" to compare more than two calculated mean values. When $p < 0.05$, a difference between two means assumed statistically significant.

As a result, optimum experimental conditions for obtaining extracts with higher antioxidant activity from *L. rotundifolius* plant materials were determined as: particle dimension: $< 125 \mu\text{m}$, Solvent: Methanol, Extraction Time Interval: 70 min. and Extraction Technique: Ultrasound Assisted Extraction.

In the study, it was also investigated that whether linear relationship was established between total phenolic contents and the antioxidant activities of the extracts. According to linear regression calculations, it was found out that no or weak linear relationship was exist between the two values.

Key Words: *Lathyrus rotundifolius* Willd., Hatun Parmağı, Soxhlet Extraction, Ultrasound Assisted Extraction, Total Phenolic Content, Folin-Ciocalteu, Antioxidant Activity, DPPH, CUPRAC, Particle Dimension, Solvent, Extraction Time Interval.

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ROT	Reaktif Oksijen Türleri
SOD	Süperoksit Dismutaz
ROO.	Peroksil Radikali
RO.	Alkoksi Radikali
RAT	Rekatif Azot Türleri
CAT	Katalaz
BHT	Butillenmiş Hidroksitolien
BHA	Butillenmiş Hidrokianisol
SOX	Geleneksel Soxhlet Ekstraksiyonu
ULT	Ultrasonik Dalga Destekli Ekstraksiyon
DPPH	2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil
ORAC	Oksijen Radikali Absorbans Kapasite Yöntemi
ABTS/TEAK	Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi
FRAP	Demir (III) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi
CUPRAC	Bakır (II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi
EC ₅₀	Radikal Konsantrasyonunu Yarıya Düşüren Değer
IC ₅₀	Radikal Konsantrasyonunu Yarıya Düşüren Değer
Cu(II)-Nc	Bakır (II) Neokuprin
TEAC	Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi
FC	Folin-Ciocalteu
%I	Radikal Giderme
NH ₄ Ac	Amonyun Asetat
Nc	Neokuproin
GAE	Gallik Asit Eşdeğeri
MET	Metanol
ANOVA	Tek-Yönlü Varyans Analizi
SD	Standart Sapma

ŞEKİL DİZİNİ

	Sayfa no	
Şekil 2 1	BHA'nın kimyasal yapısı	5
Şekil 2 2	BHT'nın kimyasal yapısı	6
Şekil 2 3	C vitaminin kimyasal yapısı	6
Şekil 2 4	E vitaminin kimyasal yapısı	7
Şekil 2 5	Hidroksibenzoik asit ve hidroksisinnamik asit türevi bazı fenolik asitler	7
Şekil 2 6	DPPH Radikali	14
Şekil 2 7	DPPH –Antioksidan reaksiyon mekanizması	15
Şekil 2 8	CUPRAC reaktifi ile antioksidan molekülü arasındaki reaksiyon	16
Şekil 4.1	Çözücü olarak metanol kullanılarak Soxhlet ve Ultrasonik Dalga Destekli ekstraksiyonlardan elde edilen verim yüzdeleri	22
Şekil 4.2	Çözücü olarak saf su kullanılarak Soxhlet ve Ultrasonik Dalga Destekli ekstraksiyonlardan elde edilen verim yüzdeleri	23
Şekil 4.3	Çözücü olarak %50 metanol-saf kullanılarak Soxhlet ve Ultrasonik Dalga Destekli ekstraksiyonlardan elde edilen verim yüzdeleri	23
Şekil 4.4	Parametre çalışması kısmı için yapılan ekstraksiyonlardan elde edilen verim Yüzdeleri	25
Şekil 4.5	Elde edilen verim yüzdelerine çözücünün etkisi	26
Şekil 4.6	Elde edilen verim yüzdelerine parçacık büyüklüğünün etkisi	27
Şekil 4.7	Elde edilen verim yüzdelerine ekstraksiyon süresinin etkisi	28
Şekil 4.8	Çözücü olarak metanol kullanılarak elde edilen toplam fenolik madde miktarları	29
Şekil 4.9	Çözücü olarak saf su kullanılarak elde edilen toplam fenolik	30

	madde miktarları	
Şekil 4.10	Çözücü olarak %50 metanol-saf su kullanılarak elde edilen toplam fenolik madde miktarları	30
Şekil 4.11	Parametre çalışmaları kısmından elde edilen toplam fenolik madde miktarları	32
Şekil 4.12	Toplam fenolik madde içeriği üzerine çözücünün etkisi	33
Şekil 4.13	Toplam fenolik madde içeriği üzerine parça büyüklüğünün etkisi	34
Şekil 4.14	Toplam fenolik madde içeriği üzerine ekstraksiyon süresinin etkisi	35
Şekil 4.15	Metanol çözücüsü kullanılarak elde edilen IC ₅₀ değerleri	36
Şekil 4.16	Saf su çözücüsü kullanılarak elde edilen IC ₅₀ değerleri	37
Şekil 4.17	%50 Metanol-saf su çözücüsü kullanılarak elde edilen IC ₅₀ değerleri	37
Şekil 4.18	Metanol çözücüsü kullanılarak elde edilen % inhibisyon eğrileri	38
Şekil 4.19	Saf su çözücüsü kullanılarak elde edilen % inhibisyon eğrileri	38
Şekil 4 20	%50 metanol-saf su çözücüsü kullanılarak elde edilen % inhibisyon eğrileri	39
Şekil 4 21	Parametre çalışması kısmından elde edilen IC ₅₀ değerleri	40
Şekil 4 22	Parametre çalışması kısmından elde edilen % inhibisyon değerleri	41
Şekil 4 23	DPPH radikal süpürme antioksidan aktivite değerleri üzerine çözücünün etkisi	42
Şekil 4 24	DPPH % inhibisyon antioksidan aktivite değerleri üzerine çözücünün etkisi	42

Şekil 4 25	DPPH radikal süpürme antioksidan aktivite değerleri üzerine parça büyüklüğü etkisi	44
Şekil 4 26	DPPH % inhibisyon antioksidan aktivite değerleri üzerine parçacık büyüklüğünün etkisi	44
Şekil 4 27	DPPH radikal süpürme antioksidan aktivite değerleri üzerine ekstraksiyon süresinin etkisi	46
Şekil 4 28	DPPH % inhibisyon antioksidan aktivite değerleri üzerine Ekstraksiyon süresine etkisi	46
Şekil 4 29	Metanol çözücüsü kullanılarak elde edilen CUPRAC değerleri	48
Şekil 4 30	Saf su çözücüsü kullanılarak elde edilen CUPRAC değerleri	48
Şekil 4 31	%50 metanol-saf su çözücü karışımı kullanılarak elde edilen CUPRAC değerleri	49
Şekil 4 32	Ekstraksiyonlardan elde edilen CUPRAC değerleri	50
Şekil 4 33	CUPRAC değerlerine çözücünün etkisi	51
Şekil 4 34	Parçacık büyüklüğünün CUPRAC değerlerine etkisi	52
Şekil 4.35	Ekstraksiyon süresinin CUPRAC değerlerine etkisi	54
Şekil 5.1	Toplam fenolik madde ile antioksidan aktivite arasındaki ilişki (DPPH)	58
Şekil 5.2	Toplam fenolik madde ile antioksidan aktivite arasındaki ilişki (CUPRAC)	59
Ek Şekil 1	Toplam fenolik madde tayini için kullanılan kalibrasyon grafiği	65
Ek Şekil 2	Cu-II İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi (CUPRAC) için kullanılan kalibrasyon grafiği	65

RESİM DİZİNİ

	Sayfa no
Resim 2.1 <i>Lathyrus rotundifolius</i> Willd. bitkisi	10
Resim 2.2 Deneysel çalışmada kullanılan Soxhlet ekstraksiyonu sistemi	12

1. GİRİŞ

Endüstri devriminin yaşandığı 19. yüzyıl ortalarına kadar bitkiler ve bunlardan elde edilen ekstraktlar (özütler) çeşitli sağlık sorunlarının giderilmesinde sıklıkla kullanılmış ve modern ilaç sanayii'nin temellerinin atılmasına önemli katkıları olmuştur. Endüstri devrimi ile birlikte yaşanan hızlı kentleşme sürecinde, artan nüfusa yetecek kaynakların üretilmesi ve korunması başlıca araştırma konularından biri haline gelmiştir. Özellikle hayati öneme sahip olduğundan gıdaların raf ömürlerinin uzatılması, bozulmalarının geciktirilmesi konusu oldukça ilgi görmüş, buna paralel olarak da literatüre sayısız çalışma kazandırılmıştır.

20. yüzyıldaki genel eğilim, ilaç etken maddeleri veya gıda katkı maddelerinin doğal ortamlardaki derişimlerinin oldukça düşük olması ve mevcut teknolojilerle yeterli derişimde elde edilebilmelerinin getirdiği yüksek maliyetler neticesinde, bu bileşikler sentetik olarak elde etmek ve kullanmak yönündeydi. Başlangıçta büyük bir başarı yakalayan bu bakış açısı, yüz yılın sonlarına doğru, gerçekleştirilen uzun dönemli araştırmaların ortaya koyduğu veriler ışığında sorgulanmaya başlanmış, sentetik kimyasal maddelerin insan ve çevre sağlığı üzerine olan olumsuz etkileri ortaya çıktıkça da, bunların doğal kaynaklardan “yeterli” miktarlarda elde edilebilmeleri konusu gittikçe önem kazanmıştır.

Bu türden kimyasalların doğal ortamlarından “yeterli” miktarlarda elde edilebilmeleri için kaynak çeşitliliği sağlamaya yönelik çalışmaların yanı sıra, kullanılan yöntemlerin çeşit ve etkinliklerinin artırılmasına yönelik optimizasyon çalışmaları da son zamanlarda oldukça ilgi çekmektedir.

Bu çalışmada, muhtemel bir antioksidan etken madde kaynağı olarak düşünülen *L. rotundifolius* bitkisinden elde edilen ekstraktların, toplam fenolik madde içeriklerinin ve antioksidan aktivite değerlerinin, kullanılan parçacık boyutu, çözücü bileşimi ve ekstraksiyon tekniği ile ne şekilde değiştiği araştırılmış ve elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır.

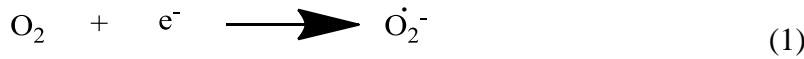
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Serbest Radikaller

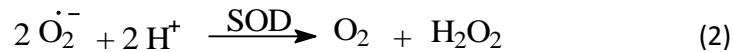
Serbest radikal, yapılarında eşleşmemiş en az bir elektron bulunduran atom, molekül veya iyonlara verilen genel isimdir. Serbest radikaller hücrelerde normal metabolizma faaliyetleri esnasında biokimyasal reaksiyonlar sonucu meydana gelmektedirler [1]. Hücrelerdeki oksidatif değişime yol açan serbest radikaller, reaktif oksijen türleri (ROT) olarak adlandırılırlar. Metabolizmadaki önemli fizyolojik fonksiyonların sonucu oluşan reaktif oksijen türleri lipitler, proteinler ve nükleik asitlere zarar vermektedir. Fakat hücrelerin karmaşık savunma mekanizmaları, reaktif oksijen türlerinin fazla birikmesine karşı koyabilecek, “antioksidan” adı verilen ve aslında kendileri de birer radikal olan bileşenleri içerirler [2].

Metabolizmada canlılığı devam ettirebilmek için oksijene ihtiyaç vardır. Bunun sonucunda metabolizmada oluşan oksijen türevli radikallere karşılık, hücre içinde bir çok enzimatik reaksiyon gerçekleşmektedir. Oksijen türevli bu radikallerden bazıları şu şekilde sıralanabilir [3]: süperoksit anyon radikali, hidroksil radikali, hidrojen peroksit, singlet oksijen ve nitrik oksit (NO).

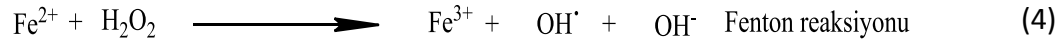
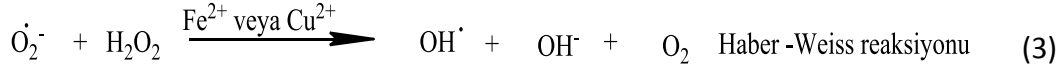
Süperoksit Anyon Radikali: Oksijen’in bir elektron almasıyla oluşmaktadır (1 no’lu reaksiyon) ve bu formu oksidatif hasara yol açmaktadır [4]. Bu reaktif türler doğrudan hücredeki lipit ve protein yapılarına saldırılmaktadır.



Hidrojen Peroksit: İki süperoksit anyon radikalının hücre içinde süperoksit dismutaz (SOD) enziminin katalizörlüğünde verdikleri reaksiyon sonucu oluşur (2 no’lu reaksiyon) [5].



Hidroksil Radikali (OH[•]): H₂O₂ molekülünün Demir (II) veya Bakır (II) iyonu ile katalizlenmesi sonucunda oldukça aktif OH[•] radikali oluşmaktadır. Bu reaksiyonlar aşağıdaki gibidir [6, 7].



Singlet oksijen (¹O₂): Ortaklaşmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Oksijendeki π_x^{*} veya π_y^{*} karşı bağ elektronlarından birinin enerji kazanarak ters spinde diğer orbitale ya da kendi orbitaline yerleşmesi sonucunda oluşmaktadır [8].

Serbest oksijen radikallerinin etkisi sonucu (R.) peroksil radikali, (ROO.), alkoksi radikali (RO.) gibi karbon merkezli radikaller de meydana gelmektedir.

2.2. Antioksidanlar

Yapılan çeşitli çalışmalar sonrasında, oksidatif stres ile mücadelede, diyabet, kronik iltihabi rahatsızlıklar, nörodejeneratif bozukluklar ve bazı kanser tipleri gibi çeşitli insan hastalıklarının oluşumunda, vücuda alınan antioksidan miktarının önemli olduğu gözlenmiştir [9]. Gıda biliminde antioksidanlar, vücut savunmasından sorumlu maddeler olarak bilinmektedir. Gıda yoluyla dışarıdan vücuda alınan ve düşük konsantrasyonlarda olan bu antioksidan etkili bileşikler, reaktif oksijen ve azot türlerinin (ROT ve RAT) olumsuz etkilerini azaltmada etkin bir rol oynarlar. Antioksidanların radikallerle tepkimeleri üç basamakta incelenebilir. Bu basamaklar;

- Radikallerin oluşması
- Radikallerin yayılması
- Radikallerin sonlanması şeklindedir.

Antioksidanlar kimyasal yapıları ve fonksiyonlarına göre sınıflandırılabilirler. Bunlardan bazıları hücre içerisinde meydana gelen metabolik reaksiyonlarda hasar gören molekülleri uzaklaştırmaya veya o moleküllerin onarılmasına yardımcı olurlar [10].

2.2.1. Metabolizmadaki Antioksidan Savunma Mekanizmaları

İnsan hücreleri, O₂-CO₂ taşınması esnasında reaktif oksijen türlerine, yani oksidatif strese maruz kalmaktadırlar. Bazı durumlarda ROT'ların konsantrasyonları hücrelerde antioksidan madde konsantrasyonunu geçmektedir [5]. Bu durumda vücutta yer alan enzimatik antioksidan savunma mekanizmaları devreye girmektedir. Bunların yetersiz kaldığı durumlarda ise dışarıdan alınan yapay veya doğal antioksidanlar ile vücut savunması güçlendirilmektedir. Bu enzimatik antioksidanlar:

Süperoksit dismutaz (SOD): Süperoksit anyon radikalini O₂ ve H₂O₂ kadar indirgeyen enzimdir. SOD enziminin çeşitli metal kompleksleri bulunmaktadır [5]. Bunlar ise CuSOD, ZnSOD, MnSOD'dir [11]. Hücre içerisinde SOD'nin yokluğunda ise mitokondride yer alan Cu,Zn-SOD önemli rol oynamaktadır.

Katalaz (CAT): Vücutta tüm önemli organlarda bulunur, fakat karaciğer peroksizomlarda yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır. Katalaz hücre içerisindeki H₂O₂'i indirgeyerek O₂ ve H₂O'ya parçalamaktadır. Yapısal olarak bir hemoproteindir.

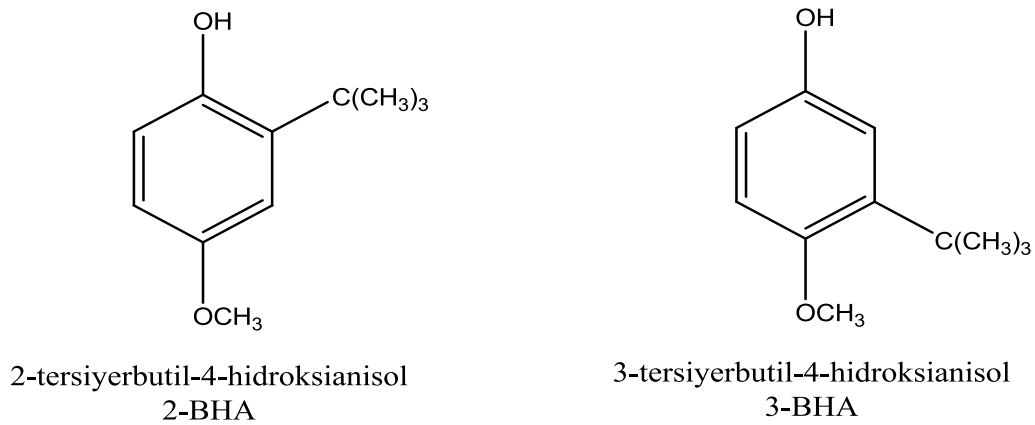
Hidrojen peroksit varlığında aktif bölgede meydana gelen oksidasyon ve reduksiyon (dismutasyon) tepkimelerini katalizlemektedir [12, 13].

Glutasyon: Glisin, glutamat ve sistein'den oluşmuş gama-glutamilsisteinilglisin adıyla bilinen bir tripeptittir [14]. de Rey-pailhaide tarafından 1890 yılında yapılan çalışmalarda RH₂ formülü ile gösterilen glutasyon, pilotion olarak da adlandırılmaktadır. Hücre içerisinde yaklaşık olarak 0,1-10 mM gibi yüksek düzeylerde bulunan glutasyon, neredeyse tüm hayvan hücrelerinde bulunmaktadır [15]. Hücrede sitozolde iki basamakta glutasyon sentezlenmektedir. Birinci basamak glutamatın gama karboksil grubu ile sisteinin alfa amino grubunun kondensasyonu ile oluşmaktadır. İkinci basamak ise sisteinin alfa karboksil grubu ile glisinin kondansasyonunu içermektedir ki

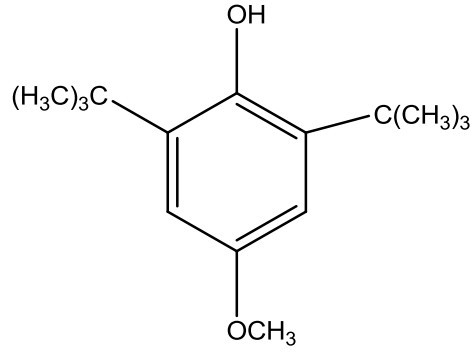
bu basamak glutasyonun hız sınırlayıcı basamağıdır [14]. Glutasyon H_2O_2 , organik peroksitler ve potansiyel olarak zehirli bazı elektrofilik ksenobiyotiklerle reaksiyona girerek organizmanın detoksifikasyon mekanizmalarında önemli bir rol oynar [15]. Mitokondrinin kullandığı oksijenin yaklaşık % 2-5 kadarı hidrojen peroksit oluşumu sağlamak üzere dönüştürülür. Mitokondride H_2O_2 'in birikimi reaktif hidroksil radikalının mitokondriyal membran ve proteinlere hasar verebilen lipid hidroperoksit oluşturmaya neden olmaktadır. Mitokondride katalaz bulunmadığından hidroperoksitlerin detoksifiye edilebilmeleri için glutasyon ve glutasyon peroksidaz'a ihtiyaç duyulmaktadır [16, 17].

2.2.2. Sentetik Antioksidanlar

Bunlara örnek olarak, yiyeceklerin bozulmasını engellemek ve zincir-kırma reaksiyonlarında lipid peroksidasyonu sonucunda DNA'da meydana gelebilecek hasarları önlemek amacıyla gıdalara katılan Butillenmiş hidroksianisol (BHA) ve butillenmiş hidroksitoluen (BHT) verilebilirler. BHA yapısal olarak iki izomere sahip karışım halinde bulunmaktadır. Bu karışımında ise 3-tertiyerbutil-4-hidroksianisol ve 2-tertiyerbutil-4-hidroksianisol bileşikleri mevcuttur.



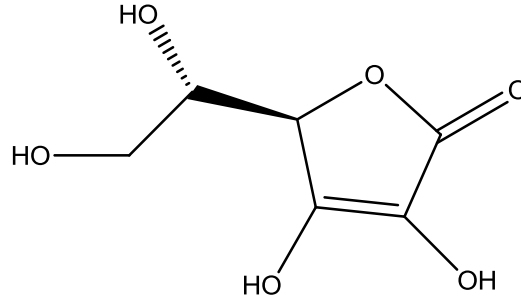
Şekil 2.1. BHA'nın kimyasal yapısı



Şekil 2.2. BHT'nin kimyasal yapısı

2.2.3. Doğal Antioksidanlar

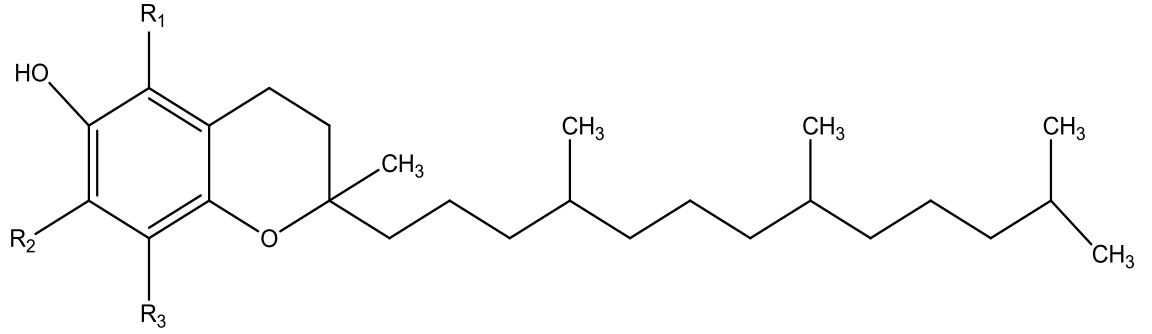
Vitaminler: Antioksidan olarak bilinen vitaminler; vitamin C (Askorbik asit) ve vitamin E (Tokoferoller)'dir. Vitamin C suda çok iyi çözünebilen ve çok güçlü bir indirgeyici olan askorbik asit semidehidroaskorbat radikal ara ürünü üzerinden kolaylıkla dehidroaskorbik aside okside olmaktadır. Askorbik asit karşılaştığı süperoksit ve hidroksil radikalleri ile kolaylıkla reaksiyona girerek ortamda bulunan radikalleri temizler [18-20].



Vitamin C (askorbik asit)

Şekil 2.3. C vitamininin kimyasal yapısı

E vitamini tokoferol yapıdadır ve doğal olarak altı çeşit türevidir. Bunlar ise; alfa beta gama, delta, eta ve zeta'dır. Bunlar içerisinde α -tokoferol, antioksidan aktivitesi en yüksek olan tokoferol türevidir. Alfa-tokoferol'ün antioksidan özelliği ise, yapısında bulundurduğu hidroksil gurubuna sahip aromatik halkanın kimyasal olarak aktif özelliğinden kaynaklanmaktadır.



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

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

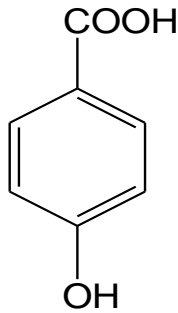
$R_1=H$, $R_2=R_3=$ metil, γ -Tokoferol [2,7,8-trimetil-2-(4,8,12-trimetiltridesil)kroman-6-ol]

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

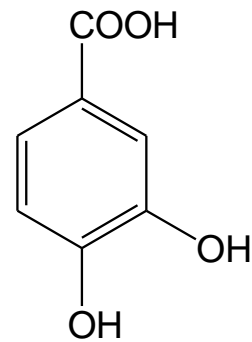
Şekil 2.4. E vitamininin kimyasal yapısı

Hücre membran fosfolipitlerinde bulunan poliansatüre yağ asitlerini serbest radikallerin etkisinden koruyan savunma hattı olarak düşünülür [8].

Fenolik asitler: Bitkilerde çok miktarda bulunmaktadır. Fenolik asitler Hidroksisinnamik asit ve hidroksibenzoik asit içeren iki ana gruba ayrılmaktadır. Ama geneline hidroksisinnamik asitler oluşturmaktadır [21]. Önemli fenolik asitler p-hidroksibenzoik asit, 3,4-dihidroksibenzoik asit, vanillik asit, siringik asit, p-kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit, sinapik asit, klorojenik asit ve rosmarinik asit'tir



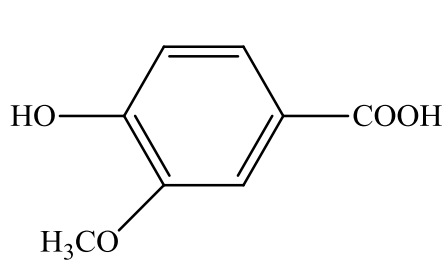
p-Hidroksibenzoik asit



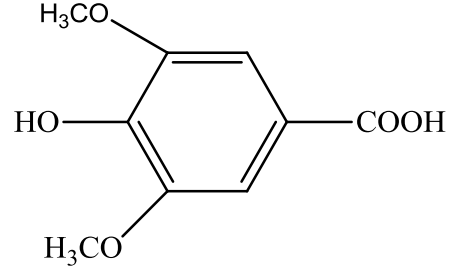
Protokateşuik asit (3,4-dihidroksi benzoik asit)

Şekil 2.5. Hidroksibenzoik asit ve hidroksisinnamik asit türevi bazı fenolik asitler

Şekil 2.5. Devam.

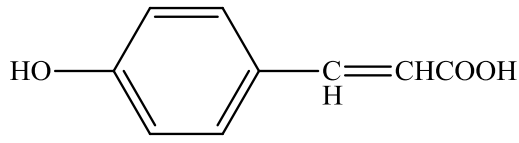


vanillik asit

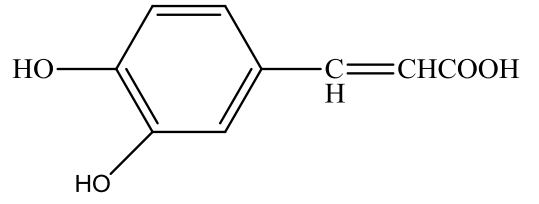


siringik asit

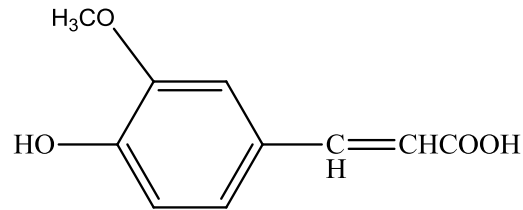
Benzoik asit türevli fenolik asitler



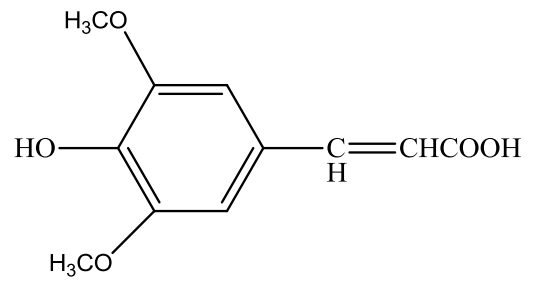
p-kumarik asit



kafeik asit



ferulik asit



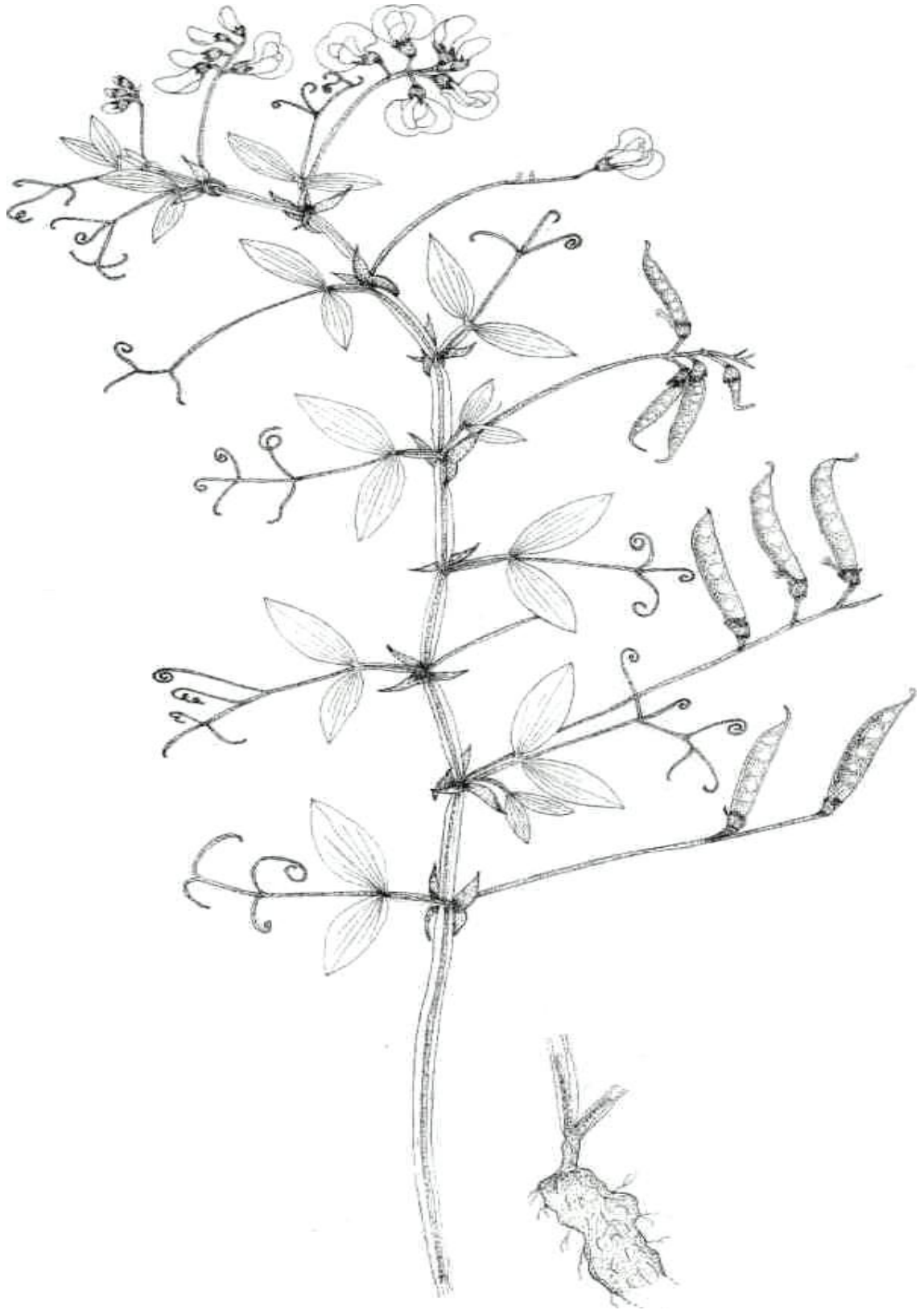
sinapik asit

Sinamik asit türevi bazı fenolik asitler

Şekil 2.5. Hidroksibenzoik asit ve hidroksisinnamik asit türevi bazı fenolik asitler

2.2.4. Çalışma Materyali Hakkında Bilgi

L. rotundifolius Fabaceae familyasındandır. Yöresel olarak hatun parmağı olarak adlandırılmakta ve çoğunlukla Doğu ve Kuzey Doğu Anadolu bölgesinde yetişmektedir. Bu bölgelerde sulu çayırlar, ekilmemiş tarlalar, orman kenarları, özellikle kuzey yamaçlarda 800-2200 m. yüksekliklerde yetişmekte ve Mayıs-Temmuz ayları arasında bitki çiçeklenmektedir. Uzun, tırmanıcı, çok yıllık, oldukça tüsüzdür. Gövde köşeli 1-2,5 mm. Yapraklar dallanmış tendirilli; yaprakçıklar bir parçalı, geniş eliptik, nadiren suborbikular, 15-75 x 5-45 mm, düz, paralel damarlı. Stipüller ovat-lanseolat yada lanseolat, yarı sagittat, 7-23 x 2-16 mm. Çiçek sapları 3-15 çiçekli, 25-65 mm. Kaliks 6-11 mm; dişler eşit değil üst diş geniş üçgenimsi, alt diş daha uzun, üçgenimsi-lanseolat, 1-3 mm. Kalik tüpü 4-11 mm. Koralla pembe-kırmızı, 10-25 mm. Meyve linear, tüsüz, üst dikiş dar kanatlı, (35-) 40-70 mm. Tohumlar 6-10, az belirgin retikulat-rugos, hilum 2-3.5 mm, tohum çevresinin 1/3 kadardır [22-24].



Resim 2.1. *Lathyrus rotundifolius* Willd. bitkisi

2.3. Antioksidan Madde Ekstraksiyonu İçin Kullanılan Teknikler

Isıl işlem uygulanarak gerçekleştirilen geleneksel Soxhlet ekstraksiyonu, bu amaçla en çok kullanılan, bazı durumlarda “referans teknik” olarak adlandırılan bir uygulamadır. Ancak yöntemin getirdiği fazla miktarda çözücü kullanılması, uzun zaman alması, çevre kirliliğine neden olması ve ısıya duyarlı bileşikler için uygun bir yöntem olmaması gibi sakıncalar nedeniyle son zamanlarda daha farklı ekstraksiyon teknikleri gittikçe yaygınlaşmakta ve literatüre bu konuda oldukça fazla sayıda çalışma kazandırılmaktadır. Bu yöntemler arasında Basınçlı Çözücü Ekstraksiyonu, Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu ve Ultrasonik Dalga Destekli Ekstraksiyon sayılabilir. Burada çalışmada kullanılması planlanan iki teknik olan Soxhlet ve Ultrasonik Dalga Destekli Ekstraksiyon teknikleri hakkında detaylı bilgi verilecektir.

2.3.1. Soxhlet Ekstraksiyonu

1879 yılında Franz von Soxhlet tarafından yeni bir ekstraksiyon tekniği geliştirildi. Günümüzde de kullanılan bu ekstraksiyon tekniği, referans ekstraksiyon tekniği olarak da kullanılmaktadır [25]. Bir Soxhlet ekstraksiyonu yapmak için önce distilasyon balonuna yeterli miktarda çözücü konulur. Düzenli kaynamasını sağlamak için distilasyon balonu içerisine birkaç tane kaynama taşı konulur. Ekstrakte edilecek numuneden bir miktar alınır ve aynı miktardaki çözücü ile yıkanmış deniz kumu ile harmanlanarak filtre içerisine konulur ve Soxhlet ekstraktörüne yerleştirilir. Soxhlet kolonu üzerine soğutucu takılarak Soxhlet kolonu distilasyon balonuna bağlanır. Distilasyon balonu ise elektrikli bir ısıtıcı vasıtasıyla ısıtılır. Buharlaşan çözücü soğutucuda yoğunlaştırılarak Soxhlet ekstraktöründeki numune üzerine dökülür ve ekstraktör haznesi dolduktan sonra distilasyon balonuna sifon yapar. Bu işlem Soxhlet ekstraktöründe toplanan çözücü berraklaşana kadar devam eder [26]. Soxhlet ekstraksiyonunun en önemli avantajları ise numune içerisindeki hedeflenen maddenin tamamını distilasyon balonuna toplamasıdır. Standart veya referans ekstraksiyon tekniği olarak adlandırılmasının sebebi budur [25, 27]. Soxhlet ekstraksiyonunun dezavantajı ise uzun süreli olması ve fazla miktarda çözücü sarfiyatının olmasıdır.



Resim 2.2. Deneysel çalışmada kullanılan Soxhlet ekstraksiyonu sistemi

2.3.2. Ultrasonik Dalga Yardımlı Ekstraksiyon

Mason ve ark. ultrasonik dalgaların gıdaların işlenmesinde uygulanan birçok işlemde, örneğin elstraksiyon, kristalizasyon kurutma ve dondurma gibi işlemlerde kullanıldığına dair örnekler vermiştir [28]. Ultrasonik dalgalar bir ortamdan geçerken kütle transferine neden olan, hem iç hem de dış dirence tesir eden bir seri etkide bulunurlar [29]. Sıvı içerisinde yüksek şiddetli ultrasonik dalgaların karıştırma ile birlikte uygulanması halinde, çözeltiye doğru olan kütle transferine karşın dış direnci düşürerek ekstrakt miktarının artması sağlanır [30]. Kullanılan dalgalar genellikle frekansları 20 kHz'den büyük olan ses dalgalarıdır. Elektromanyetik dalgalardan farkı ise ses dalgaları yayılma

esnasında genişleme ve sıkışma çevrimleri içerir. Ultrasonik destekli ekstraksiyonların iki genel tasarımı, ultrasonik banyolar veya kapalı ekstraktörler içine daldırılmış ultrasonik prob'dan ibarettirler. Ultrasonik dalganın veya ultra sesin mekanik etkisi, hücre malzemelere çözücünün fazla miktarda girmesi ve kütle transferini artırması şeklinde olur [28]. Elektron mikroskop taramaları, ultrasonik dalganın mekanik etkilerinin hücre duvarlarının yok olduğunu göstermiştir. Geleneksel ekstraksiyonlarla mukayese edildiğinde bitki özlerine daha kısa sürede ulaşılmaktadır [31]. Ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonun avantajları arasında, ultrasonik dalgaya maruz kalan bitkisel dokuların fiziksel değişime uğraması [32] ve hücre içerisindeki ekstrakte edilebilir bileşenlerin daha hızlı bir şekilde ortaya çıkması ve dolayısıyla ekstraksiyon işleminin daha kısa sürede gerçekleşmesi sayılabilir [33]. Ultrasonik dalga destekli ekstraksiyon ayrıca ucuz, basit ve geleneksel ekstraksiyon tekniklerine göre verimli bir alternatiftir [34] Bu ekstraksiyon tekniği ile ısıya duyarlı bileşenlerin ekstraksiyonunun da verimi artmaktadır [35]. Ekstraksiyon işlemi esnasında katı partiküllerin artması ultrasonik dalganın şiddetinin azalmasına, bu da ekstraksiyon işleminin uzamasına sebep olmaktadır. Ultrasonik dalganın sabit kalabilmesi için genellikle çalkalama veya karıştırma yapılması ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonun dezavantajlarından biridir [36].

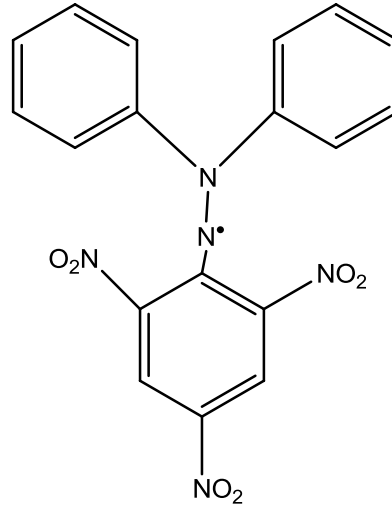
2.4. Bitki Ekstraktlarının Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesinde Kullanılan

Bazı Yöntemler

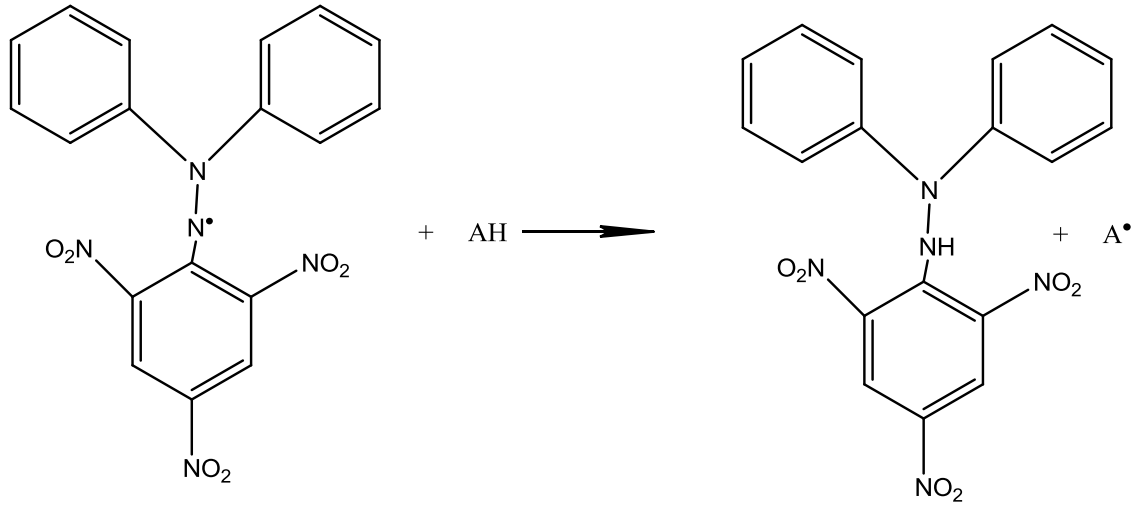
DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Radikal Süpürme Yöntemi, ORAC Oksijen Radikali Absorbans Kapasitesi Yöntemi, ABTS/TEAC (Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi) Yöntemi, β -Karoten/Linoleik Asit Model Sistemi, FRAP (Demir(III) İyonu İndirgeme Antioksidan Gücü) Metodu, Cu(II) İyonu indirgeme Antioksidan Kapasitesi (CUPRAC) Yöntemi ve toplam fenolik madde içeriğinin belirlenmesi için kullanılan Folin-Ciocalteu Yöntemi gibi yöntemler bunlardan en çok kullanılanlardan bir kaçıdır. Bu çalışmada kullanılacak olan yöntemler aşağıda detaylı olarak verilmişlerdir.

2.4.1. DPPH Radikal Temizleme Yöntemi

DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) uzun ömürlü, koyu mor renkli bir radikaldir. DPPH çözeltisi antioksidan maddeden bir tane H (hidrojen atomu) kopararak indirgenir ve ortamdaki DPPH konsantrasyonunun azalmasıyla mor renkli DPPH çözeltisinin rengi giderek açılarak açık sarı bir renk alır. İndirgenmiş DPPH radikali ise en yüksek absorbans değerini 515-528 nm’de vermektedir. Bu indirgenme işlemi yaklaşık olarak 50-60 dakikada gerçekleşmektedir [37]. Yüksek konsantrasyondaki antioksidan madde reaksiyon gereği ortamda bulunan DPPH radikallerini süpürür ve antioksidan konsantrasyonu azaldıkça ortamda bulunan indirgenmiş DPPH konsantrasyonu artar. Bu artışın sonucunda kullanılan antioksidan konsantrasyonu değeri yardımıyla radikal konsantrasyonunu yarıya düşüren değer hesaplanır. Bu değer genellikle EC_{50} veya IC_{50} şeklinde ifade edilir. DPPH yöntemi antioksidan bileşiklerinin radikal süpürme aktivitesini belirleyen kolay uygulanabilir bir yöntemdir [38].



Şekil 2.6. DPPH Radikali



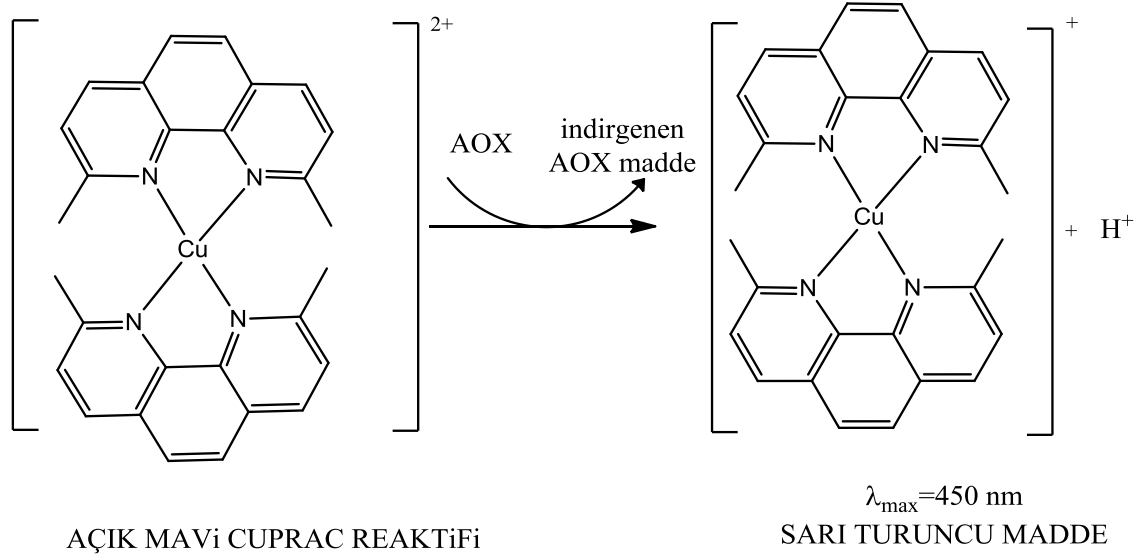
Şekil 2.7. DPPH –Antioksidan reaksiyon mekanizması

2.4.2 Cu-II İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi (CUPRAC) Yöntemi

Bu yöntem Apak ve arkadaşlarının geliştirmiş olduğu, bakır-II neokuproin'in antioksidanlar tarafından bakır I neokuproin'e indirgenmesi esasına dayanan bir antioksidan tayin metodudur. Bis(neokuproin) bakır(II) klorürün (Cu(II)-Nc), n-elektrona sahip antioksidanlarla reaksiyonu sonucu bileşik bis(neokuproin) bakır(I) klorür'e indirgenmektedir.



Bu reaksiyonda polifenolik antioksidanların Ar-OH grupları Cu(II)-Nc'i indirgeyerek 450 nm maksimum absorbanı veren çok yoğun turuncu renkte Cu(I)-Nc şelatını oluşturmaktadır. Normal CUPRAC metodunda, genellikle oksidasyon reaksiyonu 30 dakikada gerçekleşmektedir. Fakat flavonoid glikozitlerinin aglikonlarına hidrolizlenmesi sonucu oluşan yeni bileşiklerin çoğu da antioksidan güç göstermektedir [39]. Bu nedenle CUPRAC reaktifi ile yavaş reaksiyona giren antioksidanların sıcaklıkla inkubasyonu sonucunda bu süre kısalmaktadır [39, 40].



Şekil 2.8. CUPRAC reaktifi ile antioksidan molekölü arasındaki reaksiyon

2.4.3. Toplam Fenolik Madde İçeriğinin Tayini

Bitkisel canlıların büyümesinde önemli rol oynayan fenolik madde miktarlarını belirleyebilmek ve antioksidan aktiviteyi oluşturan hidroksil grupları hakkında bilgi edinebilmek için Folin-Ciocalteu (FC) yöntemi doğal maddelerin toplam fenolik madde miktarlarının ölçümü için kullanılan bir yöntemdir.

Folin-ciocalteu reaktifi ile fenolik maddeler etkileştirilerek bunların okside olması ve belirli bir süre bekletilerek tepkimenin tamamlanması sağlanır. Oluşan renkli karışımın 745-765 nm de absorbansı okunur ve hazırlanan bir kalibrasyon grafiği yardımıyla fenolik içeriğin konsantrasyonu genellikle kalibrasyon grafiğinin hazırlanmasında kullanılan standart bir fenolik bileşik cinsinden (örneğin gallik asit) ifade edilir [37, 41].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Malzemelerin Teknik Özellikleri

Çalışmada, SARTORIUS CP 224s analitik terazi, BIOHIT PROLINE(20-200µl), BRAND TRANSFERETTE (0,5- 5 ml) otomatik mikro pipetler, YELLOW LINE model vorteks, HANNA pH 206 pH metre, IKA A11 BASIC değirmen, RETSCH AS 200 model elek, HEIDOLPH LABORAT 4000 rotary evaporatör, BANDELIN SONOREX 50/60 Hz 180/640 watt ultrasonik banyo (Germany), THERMOSPECTRONIC HELIOS α UV/VIS spektrometre, 1 cm'lik 1,4 mL'lik kuvars küvetler kullanıldı.

3.2. Kullanılan Kimyasalların Teknik Özellikleri

Gallik asit, Neokuproin, BHT (butillenmiş hidroksitoluen - 2,6-di-tert-butil-4-methoksifenol-), Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit), metanol (HPLC derecede), Sigma (Almanya); Folin- Ciocalteu reaktifi (2N), DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikali, bakır (II) klorür dihidrat, Fuluka (Almanya); amonyum asetat, Riadel-de haën (Almanya); sodyum karbonat, Merck (Almanya)'dan temin edildiler.

3.3. Numune Hazırlama

L. rotundifolius bitkisi toplandıktan sonra toprak partiküllerin den arındırılmak için suyla yıkandı. Doğrudan güneş ışığı almayan ve kuru hava akımının sağlandığı bir ortamda seyrek serilerek kurutuldu. Kurutulan bitki küçük parçalara bölündükten sonra öğütücüde öğütüldü ve elenerek parçacık büyüklüğü 250-125 (+125) µm ile <125 (-125) µm olmak üzere ikiye ayrıldı. Elde edilen iki farklı parçacık büyüklüğüne sahip numuneler karanlık ortamda ekstraksiyon için muhafaza edildiler.

3.4. Ekstraksiyon İşlemleri

3.4.1. Soxhlet Ekstraksiyonu

Kurutulmuş *L. rotundifolius* bitkisinden <125 µm (ve >125µm) kısmından 0,1 mg hassasiyet ile tartılmış yaklaşık 5 gram alınarak ekstraksiyon çözücüsü ile yıkanan kartuş içerisine konuldu. Kartuş 100 mL'lik Soxhlet ekstraktörü içerisine yerleştirildi ve kaynama balonuna birkaç kaynama taşı konularak 150 mL çözücü konuldu. Çözücü berraklaşana kadar ekstrakte (40-45 sifon) edildi [25,35]. Ekstraksiyon çözücüsü olarak metanol, saf su ve % 50 (v/v) metanol-su çözeltisi kullanıldı. Elde edilen ekstraktlar mavi band süzgeç kağıdından süzülerek partikülleri uzaklaştırıldıktan sonra, sabit tartıma getirilmiş balonlarda rotary evaporatör ile 35-45 °C'de çözücüleri uçuruldu. Elde edilen kuru ekstraktlar en az 12 saat desikatörde bekletildikten sonra 0,1 mg hassasiyetle tartılarak ekstraksiyon çözücüsü kullanılarak stok çözelti haline getirildiler. Stok çözelti atmosferi azot atmosferi ile değiştirilerek güneş ışığı almayacak şekilde +4 °C'de analiz için muhafaza edildiler.

3.4.2. Ultrasonik Dalga Yardımlı Ekstraksiyon

Önceden hazırlanmış <125 µm ve 250-125 µm parçacık boyutundaki numuneden kullanılmaktadır. Ekstraksiyon Wang ve arkadaşlarının [34] bir çalışmasında kullandıkların ultrasonik banyo ekstraksiyon tekniği hafifçe modifiye edilerek gerçekleştirildi. Ekstraksiyon için yaklaşık 5 g kadar 0,1 mg hassasiyetle tartılmış numune, 250 ml'lik bir erlene konularak üzerine 100 mL ekstraksiyon çözücüsü ilave edildi ve ağzı sıkıca kapatılarak sıcaklığı 25-30 °C sabitlenmiş BANDELIN SONOREX (50/60 Hz, 180/640 watt Germany) model bir ultrasonik banyoda 20 dakika süreyle ekstrakte edildi. Elde edilen ekstrakt süzülerek üzerine 100 mL daha çözücü konuldu ve bu sefer 10 dakika süreyle ekstrakte edildi. Aynı işlemler 5 dakikalık bir süre için üçüncü defa tekrar yapıldı. Elde edilen ardışık üç farklı zamandaki ekstraktlar birleştirilerek mavi bant süzgeç kağıdından süzülerek sabit tartıma getirilmiş balona aktarıldı ve rotary evaporatörde çözücüleri uçurularak tartılmak suretiyle miktarları

belirlendi. Ekstraktlar, ekstraksiyon çözücüsü ile tekrar çözülerek 100 mL'lik balon jojelerde stok çözelti hazırlandı. Azot atmosferinde +4 °C'de muhafaza edildiler. Bu işlem her bir çözücü için üç kez yapıldı ve ekstraksiyon çözücüsü olarak metanol, saf su ve % 50 (v/v) metanol-su çözeltisi kullanıldı.

3.5. Ekstraktların Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi

Çalışmada elde edilen ekstraktların antioksidan aktiviteleri DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikal temizleme, bakır-II iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi (CUPRAC) yöntemlerine göre ve toplam fenolik madde içeriklerinin tayini ise Folin-Ciocalteu Yöntemine göre yapıldı.

3.5.1. DPPH Radikal Temizleme Yöntemi

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) yöntemi Cuendet ve arkadaşlarının metodunun hafif modifiye edilmesiyle yapıldı [42]. Stok çözelti konsantrasyonları 1000 µg/mL'ye seyreltildikten sonra 9 kez ½ oranında seyreltildiler (1000-1,95 µg/mL) ve seyreltilmiş çözeltilerden 750 µl alınarak üzerlerine etanolde hazırlanmış 100 µM'lık DPPH çözeltisinden 750 µL ilave edildi. Numune körleri için 750 µL numune alındı ve üzerlerine DPPH çözeltisinin çözücüsü ilave edildi. Kontrol çözeltisi için 100 µM'lık DPPH çözeltisinden 750 µL alındı ve üzerine 750 µL numune çözücüsü ilave edildi ve vortekslenerek 50 dakika sonra 517 nm absorbans okundu. Üç tane kontrol çözeltisi ve her bir konsantrasyona ait üç paralel ve bir kör olarak ölçüm yapıldı. Karşılaştırma maddesi olarak konsantrasyonları 1000 µg/mL olarak hazırlanmış BHT ve Trolox kullanılmıştır. Kontrol çözeltisinin absorbansları ortalaması ve her bir konsantrasyon için üç paralelin absorbansları ortalamasından kör absorbans farkları alınarak kalibrasyon grafiği çizildi. Elde edilen bu grafikten IC₅₀ (radikal konsantrasyonunu yarıya düşüren) değer hesaplandı. IC₅₀ değerleri, kontrol çözeltilerine karşılık gelen absorbansların ortalaması ikiye bölünmesi ile elde edilen değerlerin kalibrasyon grafiğinin doğru denkleminde "y" değeri yerine konulması ile hesaplanır. Denklem 5'e göre % radikal giderme (% I) hesaplandı.

$$\% \text{ Radikal süpürme} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad (5)$$

A_0 ; Kontrol çözeltilerinin absorbans ortalaması, A_1 ; numune absorbanslarının ortalamasından kör absorbans farkı.

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

Bu deneyler Apak ve arkadaşlarının yöntemi uygulanarak gerçekleştirildi [39]. Bunun için 10^{-2} M Cu (II) için 0,4262 g $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tartılarak bir miktar saf suda çözüldükten sonra 250 mL'ye seyreltildi. 1 M NH_4Ac (pH=7); tampon çözeltisi için 19,27 g NH_4Ac saf suda çözüldü ve 250 mL'ye seyreltildi. $7,5 \times 10^{-3}$ M Neokuproin (Nc) çözeltisi için tartılan 0,0390 g'lık neokuproin % 96'lık etil alkolde çözümlenerek 25 mL'ye seyreltildi. Karşılaştırma maddesi olarak % 96 etil alkolde hazırlanmış 10^{-3} M trolox çözeltisi kullanıldı. Ölçüm için reaktifler şu şekilde eklendi:

Bir test tüpüne sırasıyla 1'er mL Cu(II), Nc, NH_4Ac , x mL antioksidan madde ve (1,1 – x) ml saf su eklenerek toplam hacim 4,1 mL'ye tamamlandı.

Taze hazırlanmış 10^{-3} M trolox çözeltisinden 0,1 mL, 0,2 mL, 0,3 mL, 0,4 mL ve 0,5 mL hacimler alınarak daha önceden hazırlanmış sırasıyla 1'er ml Cu(II), Nc ve NH_4Ac üzerine eklendi. Hacmi 4,1 ml'ye tamamlamak için (1,1 – x) ml saf su ilave edildi. Kör olarak antioksidan madde yerine saf su konularak 1 saat inkübasyondan sonra 450 nm'de absorbans değerleri okundu. Her bir hacme ait üç paralel absorbanslarının ortalamasından kör absorbans farkı alınarak kalibrasyon grafiği çizildi ve doğru denklemi elde edildi. Stok çözeltiler ise 0,200-0,400 nm aralığında absorbans verecek şekilde seyreltilerek ölçümleri alındı. Elde edilen numune absorbansları kalibrasyon doğru denkleminde “y” bilinmeyenini yerine konularak numunedeki miktarları mol TE/g kuru numune olarak ifade edildi.

3.5.3. Toplam Fenolik Madde İçeriğinin Tayini

Toplam fenolik madde tayini Folin-Ciocalteu yöntemine göre Slinkard ve Singleton'un metodu hafif değişikliklerle uygulanarak gerçekleştirildi [41]. Standart olarak metil alkolde hazırlanmış 1 mg/mL'lik gallik asit kullanılarak kalibrasyon grafiği elde edildi. 1 mg/mL konsantrasyondaki gallik asit 1/2 oranında 10 kez seyreltildi ($1-1,95 \cdot 10^{-3}$ mg/mL). Elde edilen 10 tane farklı konsantrasyondaki çözeltilerin her birinden 50 µL alınarak üzerlerine 2,5 mL saf su, 250 µL 1:10 oranında seyreltilmiş Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edildi ve vorteksenerek 3 dk. sonra 750µL 75 mg/mL Na₂CO₃ ilave edildi. Tekrar vorteksenerek 2 saat sonra THERMOSPECTRONIC helios α marka bir UV cihazı kullanarak 765 nm'de absorbans değerleri okundu. Deneyler üç paralel olarak tekrar edildi ve kör olarak saf su kullanıldı. Kör absorbansı A1 ve üç paralelin absorbans ortalaması A2 olmak üzere:

$$\Delta A = A_2 - A_1 \quad (6)$$

eşitliğinden yararlanarak absorbans farkları hesaplandı. Her bir konsantrasyona karşılık gelen absorbanslar ile gallik asit kalibrasyon grafiği oluşturuldu. Ekstraktlardan elde edilen stok çözeltilere de gallik asit'e uygulanan işlemler aynen uygulandı ve absorbans farkları hesaplandı. Elde edilen absorbanslar gallik asit doğru denkleminde "y" bilinmeyenini yerine konularak ve yapılan seyreltmeler de dikkate alınarak orijinal numunenin toplam fenolik madde içeriği mg veya g GAE/100 g kuru numune olarak hesaplandı.

3.6. Deney Sonuçlarının İstatistiksel Analizi

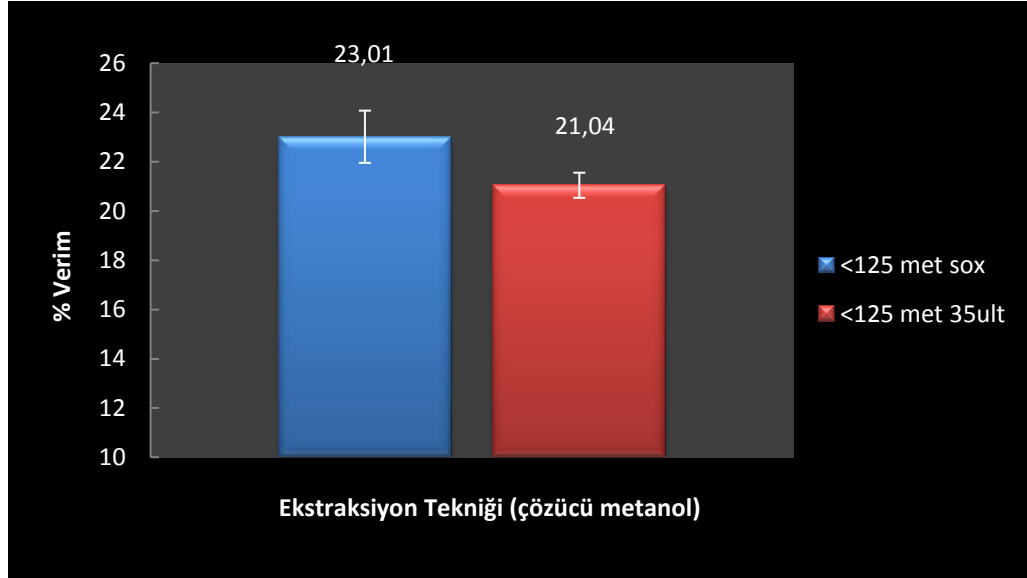
Tüm deneyler üç paralelle gerçekleştirildi ve sonuçlar 'ortalama ± standart sapma' şeklinde verildi. İki ortalamanın karşılaştırılması için 't istatistiği' (Student's t-Test), ikiden fazla ortalamanın karşılaştırılması için ise 'tek yönlü varyans analizi' (ANOVA) gerçekleştirildi. p değerlerinin 0,05'ten daha küçük olması durumunda ($p < 0,05$) karşılaştırılan ortalamalar arasındaki farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu kabul edildi. Hangi ortalamaların farklı olduğu, 'en küçük anlamlı fark' yöntemi uygulanmak suretiyle belirlendi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Ekstraksiyon İşlemlerinden Elde Edilen Bulgular

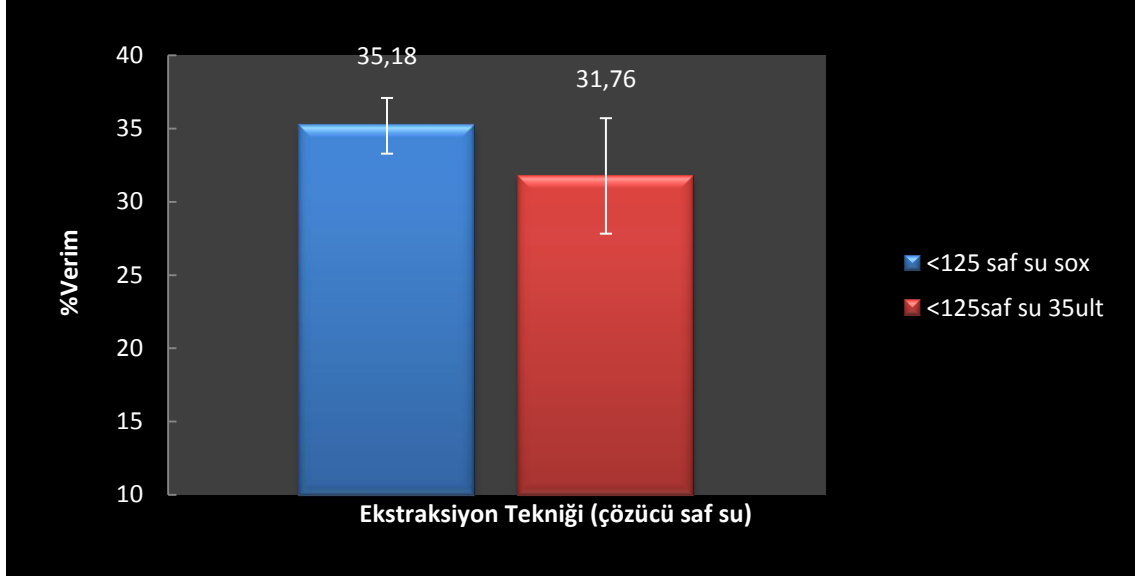
Çalışmada parçacık boyutunun 125 µm'den küçük tutulduğu, ultrasonik dalga destekli ekstraksiyon süresinin 35 dk ile sınırlandırıldığı, çözücü olarak da metanol, % 50 metanol-su (v/v) ve saf suyun kullanıldığı ekstraksiyon deneyleri ile bunlara ilişkin sonraki testler, literatürde yer alan çalışmalar da [43] dikkate alınarak “Ana Çalışma Kısmı” olarak ayrı bir başlık altında incelendi. Parçacık boyutunun değiştirildiği ve farklı ekstraksiyon sürelerinin kullanıldığı deneyler ise “Parametre Çalışması Kısmı” başlığı altında toplandı.

4.1.1. Ana Çalışma Kısmı Verim Yüzdeleri



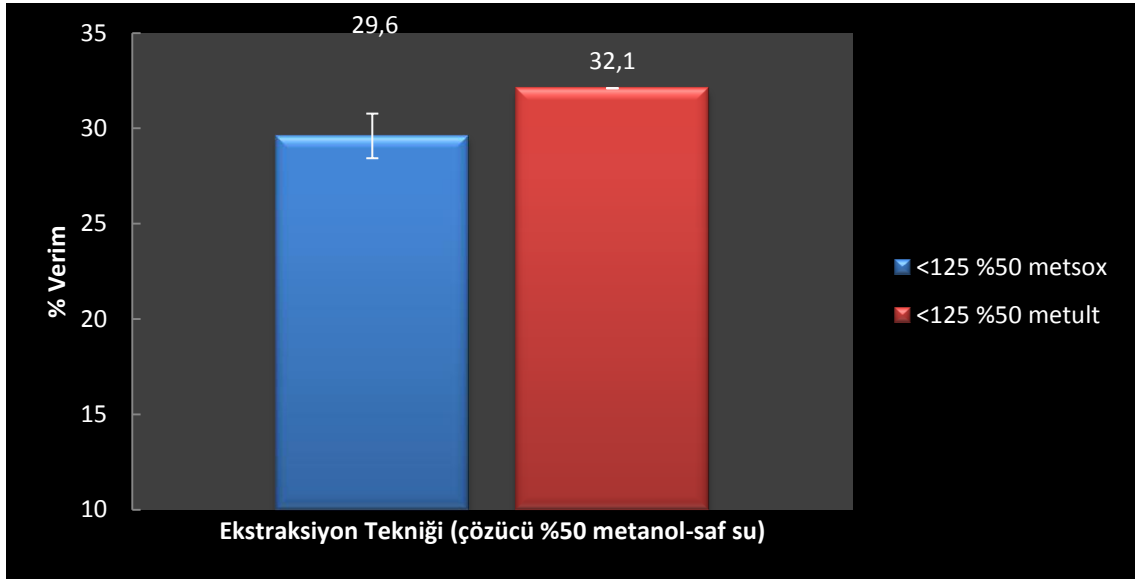
<125metsox: 125 µm'den küçük metanol Soxhlet ekstraksiyonu; <125metult: 125 µm'den küçük metanol 35 dk'lık ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu,

Şekil 4.1. Çözücü olarak metanol kullanılarak Soxhlet ve Ultrasonik Dalga Destekli ekstraksiyonlardan elde edilen verim yüzdeleri



<125safsusox:125 μm 'den küçük saf su Soxhlet ekstraksiyonu; <125safsuult: 125 μm 'den küçük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu,

Şekil 4.2. Çözücü olarak saf su kullanılarak Soxhlet ve Ultrasonik Dalga Destekli ekstraksiyonlardan elde edilen verim yüzdeleri



<125%50metsox:125 μm 'den küçük %50 metanol-saf su Soxhlet ekstraksiyonu; <125%50metult: 125 μm 'den küçük %50 metanol-saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu,

Şekil 4.3. Çözücü olarak %50 metanol-saf kullanılarak Soxhlet ve Ultrasonik Dalga Destekli ekstraksiyonlardan elde edilen verim yüzdeleri

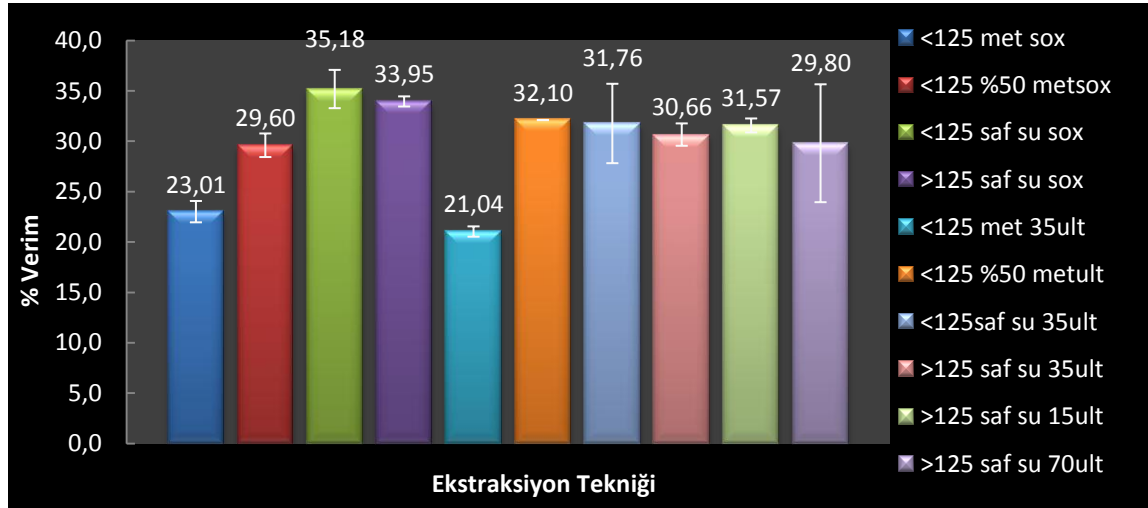
Üç ayrı çözücü ile gerçekleştirilen ekstraksiyonlardan elde edilen ortalama değerler karşılaştırıldığında (sırasıyla metanol, saf su ve % 50 metanol-saf su çözücülerine göre

Soxhlet-Ultrasonik Dalga Destekli Ekstraksiyon verimleri (%): $23,01 \pm 1,06$ - $21,04 \pm 0,51$; $35,18 \pm 1,90$ - $31,76 \pm 3,94$ ve $29,60 \pm 1,17$ - $32,10 \pm 0,91$) ilk bakışta şunlar söylenebilir: Şekil 4.1 ve 4.2'den de görüleceği gibi çözücü olarak metanol ve saf suyun kullanıldığı ekstraksiyonlarda Soxhlet ekstraksiyonu, ultrasonik dalga destekli ekstraksiyondan daha yüksek değerler ortaya koymuştur. Ancak çözücü olarak % 50 metanol-saf su'nun kullanıldığı ekstraksiyonlarda (Şekil 4.3) ultrasonik dalga destekli ekstraksiyon, Soxhlet ekstraksiyonundan daha yüksek değer sergilemiştir. Çözücü olarak saf suyun kullanıldığı ekstraksiyon deneylerinin her iki teknikte de yüksek değerler sergilediği Şekil 4.2'den görülmektedir. Çözücü olarak metanol ve saf suyun kullanıldığı deneylerde, iki farklı ekstraksiyon tekniğinin verimleri arasında oluşan farkın, her iki teknikte uygulanan birbirinden oldukça farklı ekstraksiyon süreleri (6-8 saate karşın 35 dk) ile Soxhlet ekstraksiyonunun nispeten daha yüksek bir sıcaklıkta gerçekleştirilmesinden kaynaklandığı öngörülebilir. Ancak çözücü olarak % 50 metanol-saf su kullanılan ekstraksiyon deneylerinde, ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonun Soxhlet deneylerinden daha yüksek bir verim ortaya koyması ilgi çekici olabilir. Bu durum, Şekil 4.1 ve 4.2 dikkatle incelendiğinde açıklanabilir. Çözücü olarak saf metanol ve saf su kullanıldığında verim değerleri ya en düşük değerler, ya da en yüksek değerler olarak göze çarpmaktadır. Çözücünün % 50'lik bir karışım halinde uygulanması, Soxhlet ekstraksiyonu verimini saf metanol ve saf su kullanıldığında elde edilen değerlerin arasında bir yere çekmektedir (sırasıyla % $23,01 \pm 1,06$; % $29,60 \pm 1,17$ ve % $35,18 \pm 1,90$). Yani su çözücüsüne daha az polar bir bileşen olan metanolün ilave edilmesi Soxhlet veriminde bir düşmeye yol açmakta, ancak aynı etki ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonda oluşmamaktadır. Her iki ekstraksiyon tekniğinin farklı yapıları ve uygulama şartları bu durumu ortaya çıkarabilir. Örneğin Soxhlet ekstraksiyonu buharlaşma-yoğunlaşma döngüsüne dayalı bir tekniktir. Bu nedenle buhar fazının daha uçucu bileşence daha zengin olacağı, dolayısıyla ekstraktör haznesine dolan yoğunlaşmış çözücünün % 50'den daha yüksek yüzdede metanol içereceği, diğer bir deyimle ekstraksiyon ortamındaki çözücünün polaritesinin kaynama ortamındakinden daha düşük olacağı söylenebilir. Oysa ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonda her iki çözücünün molekülleri her şartta numune ile sürekli temas halinde bulunmaktadır. Dolayısıyla su molekülleri etkinliklerini tam anlamıyla ortaya koyabilmektedirler.

Yapılan istatistiksel analizlerde, ekstraksiyon çözücüsü olarak metanol kullanıldığında elde edilen ekstraksiyon verim ortalamalarının farklı olduğu ($p < 0,05$), diğer iki ekstraksiyon çözücüsünden elde edilen ortalamaların ise teknikler arası anlamlı bir fark sergilemedikleri ($p > 0,05$) belirlenmiştir. Yani çözücü metanol olduğunda, Soxhlet ekstraksiyonu ultrasonik dalga destekli ekstraksiyondan daha iyi bir değer sergilemiş, diğer iki çözücü durumunda belirgin bir fark ortaya koymamıştır.

4.1.2. Parametre Çalışması Kısmı Verim Yüzdeleri

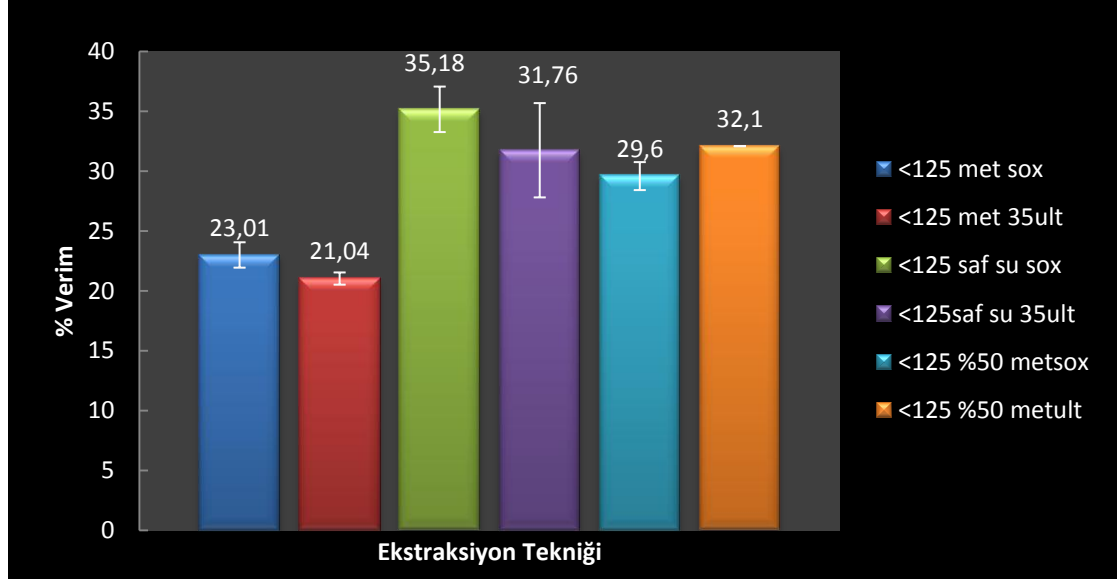
Bu ekstraksiyon deneylerinden elde edilen verim yüzdeleri aşağıdaki Şekil 4.4'te toplu olarak verilmiştir.



<125metsox:125 μ m'den küçük metanol Soxhlet ekstraksiyonu; <125metult: 125 μ m'den küçük metanol ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu; <125safsu Sox:125 μ m'den küçük saf su Soxhlet ekstraksiyonu; <125safsuult: 125 μ m'den küçük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu; <125%50metsox:125 μ m'den küçük %50 metanol-saf su Soxhlet ekstraksiyonu; <125%50metult: 125 μ m'den küçük %50 metanol-saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu; >125safsu Sox:125 μ m'den büyük saf su Soxhlet ekstraksiyonu; >125safsu35ult: 35 dakikalık 125 μ m'den büyük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu; >125safsu15ult: 15 dakikalık 125 μ m'den büyük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu ve >125safsu70ult: 70 dakikalık 125 μ m'den büyük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu,

Şekil 4.4. Parametre çalışması kısmı için yapılan ekstraksiyonlardan elde edilen verim Yüzdeleri

4.1.2.1. Çözücünün Verime Etkisi



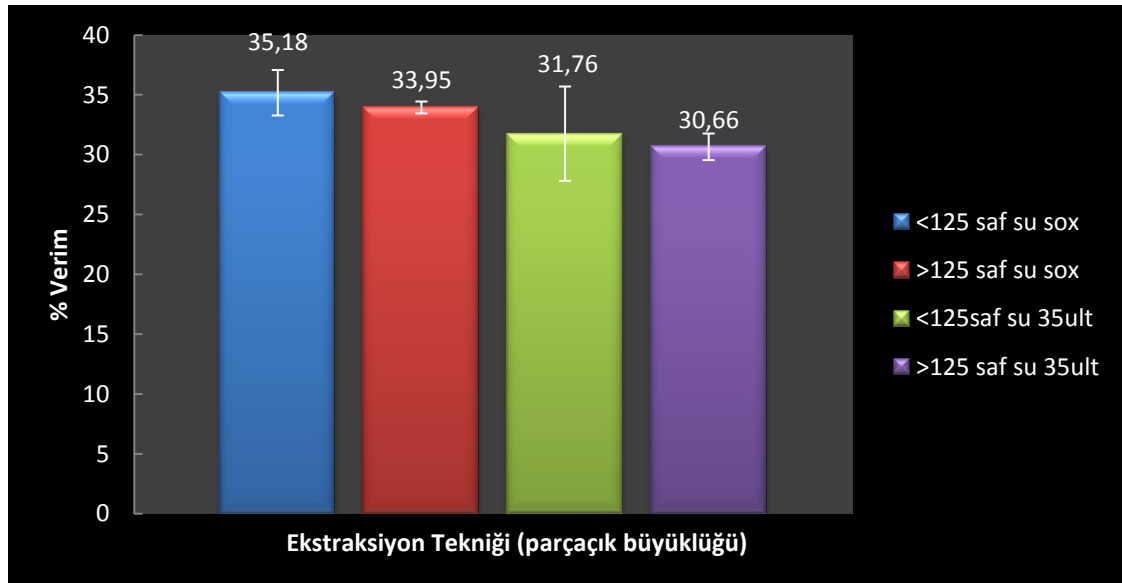
<125metsox:125 μ m'den küçük metanol Soxhlet ekstraksiyonu; <125metult: 125 μ m'den küçük metanol ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu; <125safsuox:125 μ m'den küçük saf su Soxhlet ekstraksiyonu; <125safsuult: 125 μ m'den küçük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu; <125%50metsox:125 μ m'den küçük %50 metanol-saf su Soxhlet ekstraksiyonu; <125%50metult: 125 μ m'den küçük %50 metanol-saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu,

Şekil 4.5. Elde edilen verim yüzdelere çözücünün etkisi

Şekil 4.4'ten açıkça görüleceği üzere, elde edilen ortalama değerlere bakıldığında, her iki ekstraksiyon tekniği için en etkili çözücünün saf su olduğu (% 35,18 \pm 1,90 ve % 31,76 \pm 3,94), metanolün her ikisinde de en düşük verim değerlerini ortaya koyduğu (% 23,01 \pm 1,06 ve % 21,04 \pm 0,51) söylenebilir. % 50 metanol-saf su çözücü karışımı kullanıldığında ise ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonun, Soxhlet ekstraksiyonuna göre daha yüksek bir verime sahip olduğu görülmektedir (% 32,1 \pm 0,91'e karşılık % 29,6 \pm 1,17). Metanol çözücüsünün düşük polaritesinin ekstraksiyon verimlerini her iki teknikte de etkilediği açıkça görülmektedir. Saf su çözücü olarak kullanıldığı her durumda, ekstraksiyon verimini saf metanole göre yükseltmiştir. Suyun çözücü olarak (saf veya karışım halinde) kullanıldığı durumlarda elde edilen verim yüzdeleri % 29,60 ile % 35,18 arasında değişmektedir. Bu durum, polaritesi metanole göre daha yüksek olan saf suyun, bitkisel yapıda fazla miktarda yer alan polar bileşik gruplarını çözmede çok daha etkin olduğunu gözler önüne sermektedir.

Her iki teknikle, farklı çözücüler kullanılarak elde edilen verim ortalama değerleri arasındaki farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p < 0,05$). Buna göre, verim açısından çözücü etkinliğinin Soxhlet tekniği için metanol < % 50 metanol-saf su < saf su; ultrasonik dalga destekli ekstraksiyon için metanol < % 50 metanol-saf su = saf su şeklinde değiştiği belirlenmiştir.

4.1.2.2. Parçacık Büyüklüğünün Verime Etkisi



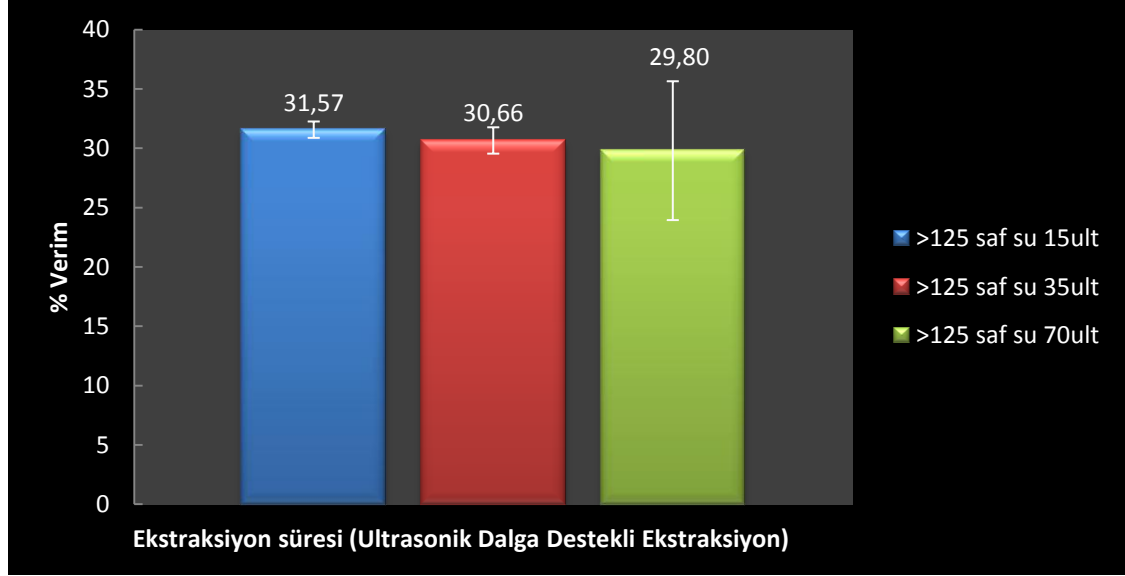
<125safsusox: 125 μm 'den küçük saf su Soxhlet ekstraksiyonu; 125safsusox: 125 μm 'den büyük saf su Soxhlet ekstraksiyonu; <125safsuult: 125 μm 'den küçük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu; >125safsu35ult: 35 dakikalık 125 μm 'den büyük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu,

Şekil 4.6. Elde edilen verim yüzdelere parçacık büyüklüğünün etkisi

Bu deneyler çözücü olarak sadece saf su kullanılarak gerçekleştirildi. Şekil 4.4'e bakıldığında, parçacık büyüklüğü arttıkça ekstraksiyon verimlerinde hafif düşüşler olduğu görülmektedir. <125 μm parçacık büyüklüğünde Soxhlet için verim % 35,18 \pm 1,90 olarak elde edilmişken, parçacık büyüklüğü >125 μm olarak kullanıldığında verim % 33,95 \pm 0,50 olarak gerçekleşmiştir. Aynı şekilde ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonda da verim % 31,76 \pm 3,94'ten % 30,66 \pm 1,12'ye düşmüştür.

İstatistiksel analizlerde, her iki teknikte de parçacık büyüklüğünün $< 125 \mu\text{m}$ 'den $> 125 \mu\text{m}$ 'ye değiştirilmesiyle elde edilen ortalamalar arasında % 95 güven seviyesinde anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

4.1.2.3. Ekstraksiyon Süresinin Verime Etkisi



>125safsu15ult: 15 dakikalık $125 \mu\text{m}$ 'den büyük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu>125safsu35ult: 35 dakikalık $125 \mu\text{m}$ 'den büyük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu; ve >125safsu70ult: 70 dakikalık $125 \mu\text{m}$ 'den büyük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu,

Şekil 4.7. Elde edilen verim yüzdelere ekstraksiyon süresinin etkisi

Bu deneyler de, ekstraksiyon süresinin daha önemli olduğu ultrasonik dalga destekli ekstraksiyon tekniği kullanılarak gerçekleştirildi. Parçacık büyüklüğü $>125 \mu\text{m}$ olarak uygulandı. Yine Şekil 4.4.'ten görüleceği üzere, ekstraksiyon süresi uzadıkça verimde hafif düşüşler meydana gelmektedir. 15 dk'lık ekstraksiyon süresi için verim % $31,57 \pm 0,69$ iken, 35 dk'lık ekstraksiyonda % $30,66 \pm 1,11$ 'e ve 70 dk'lık ekstraksiyonda ise % $29,80 \pm 5,85$ 'e düşmüştür. Bu durumun, başlangıçta ekstraksiyon ortamına geçen çeşitli kimyasal türlerin, ekstraksiyon süresinin uzamasıyla birlikte çekirdekleşme/topaklaşma ya da bazı türlerin dimerleşmesi gibi etkilerle tekrar katı numune parçacıkları üzerine birikmesi sonucu ortaya çıktığı düşünülebilir. Daha açık

bir yorum yapabilmek için her bir ekstraksiyon işleminin başından sonuna kadar belirli aralıklarla pH ölçümlerinin yapılmasının faydalı olabileceği söylenebilir.

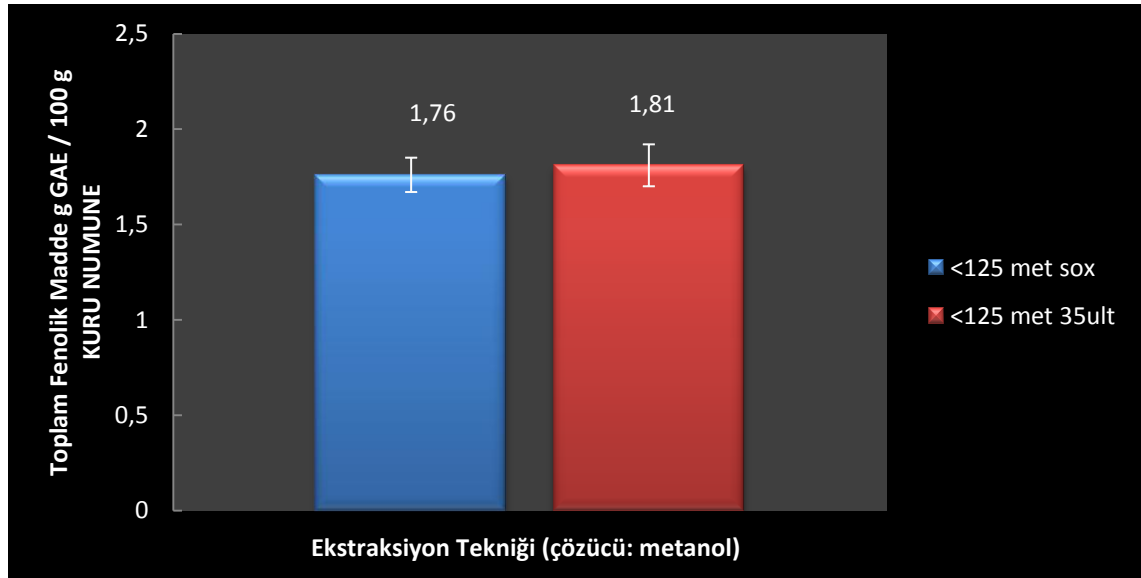
Yapılan ANOVA analizinde ekstraksiyon süresine göre elde edilen ortalamalar arasında % 95 güven seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

4.2. Toplam Fenolik Madde Tayini Deneylerinden Elde Edilen Bulgular

Toplam fenolik madde içeriklerinin belirlenmesi çalışmaları da, ekstraksiyon verimi çalışmalarında olduğu gibi “Ana Çalışma Kısmı” ve “Parametre Çalışması Kısmı” olmak üzere iki ayrı grupta gerçekleştirildiler. Hesaplamalarda kullanılan ve gallik asit kullanılarak hazırlanan kalibrasyon grafiği Ek Şekil 1’de verilmiştir.

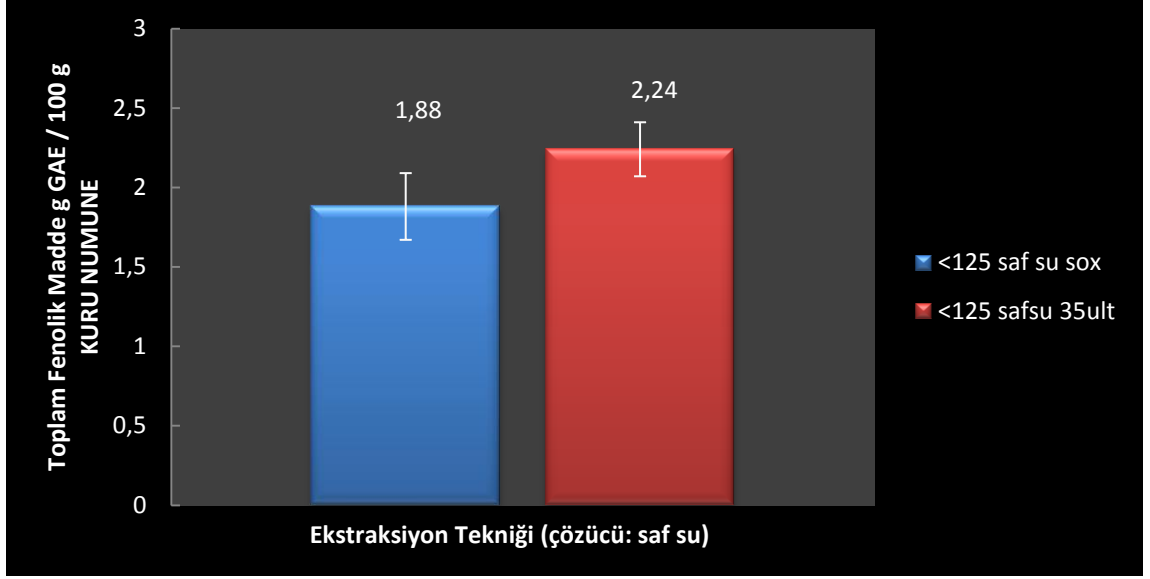
4.2.1. Ana Çalışma Kısmı Toplam Fenolik Madde Tayini Deneylerinden Elde

Edilen Bulgular



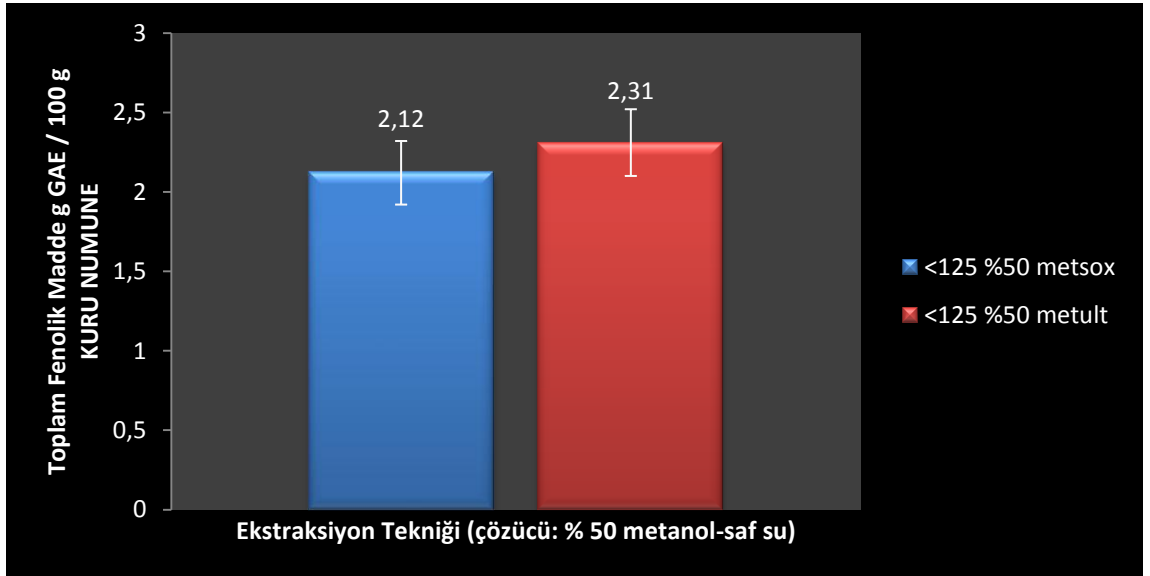
<125metsox: 125 µm’den küçük metanol Soxhlet ekstraksiyonu; <125metult: 125 µm’den küçük metanol ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu

Şekil 4.8. Çözücü olarak metanol kullanılarak elde edilen toplam fenolik madde miktarları



<125safsusox:125 μm 'den küçük saf su Soxhlet ekstraksiyonu; <125safsuult: 125 μm 'den küçük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu,

Şekil 4.9. özücü olarak saf su kullanılarak elde edilen toplam fenolik madde miktarları



<125%50metsox:125 μm 'den küçük %50 metanol-saf su Soxhlet ekstraksiyonu; <125%50metult: 125 μm 'den küçük %50 metanol-saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu,

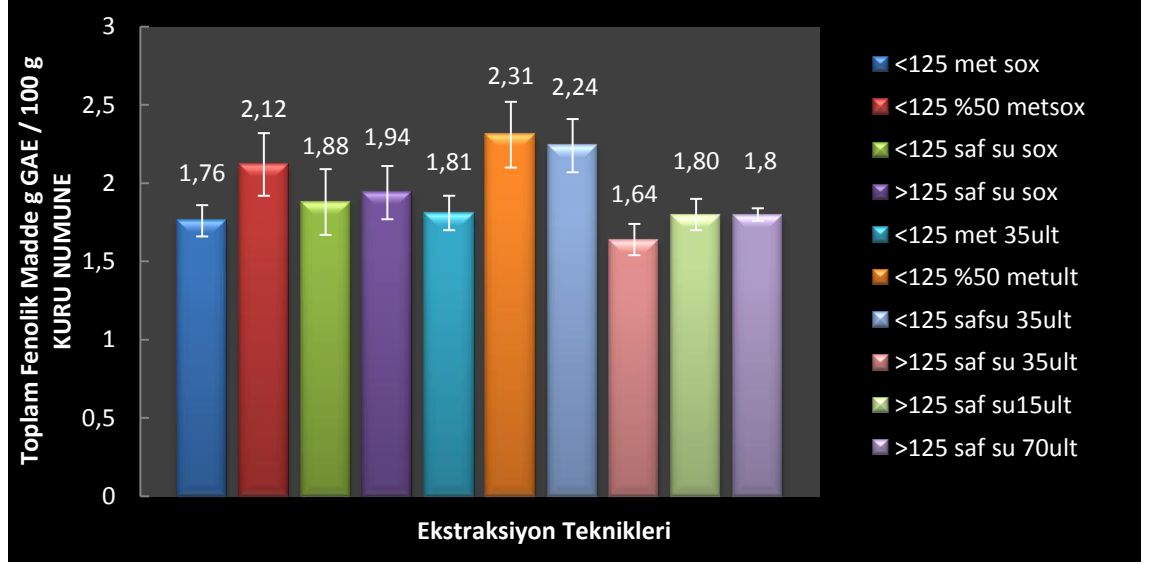
Şekil 4.10. özücü olarak %50 metanol-saf su kullanılarak elde edilen toplam fenolik madde miktarları

Şekil 4.8. Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'ye bakıldığında istatistiksel analiz yapılmadan elde edilen ham sonuçlara göre ilk söylenebilecek husus, üç farklı çözücü ortamında da ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonun toplam fenolik madde içeriğinin daha yüksek değerlerde olduğudur (Metanol-Saf Su-% 50 metanol çözücü sırasına göre Soxhlet ve Ultrasonik Dalga Destekli Ekstraksiyon toplam fenolik madde değerleri: 1,76±0,10-1,81±0,11 g GAE/100 g kuru numune; 1,88±0,21-2,24±0,17 g GAE/100 g kuru numune ve 2,12±0,20-2,31±0,21 g GAE/100 g kuru numune). Bu da, fenolik maddelerin ekstraksiyonunda ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonun, verim değerlerinde genelde daha iyi değerler sergileyen geleneksel Soxhlet ekstraksiyonuna göre daha başarılı olduğunu göstermektedir. Buradan, ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonlarda elde edilen ekstraktların daha iyi antioksidan aktivite değerleri sergilemeleri beklenebilir. Çünkü literatürde yer alan bazı çalışmalara göre, antioksidan aktivite ile toplam fenolik madde miktarları arasında doğrusal bir ilişki vardır [44, 45].

Ancak yapılan istatistiksel analizlere göre, her üç çözücü ile elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde değerleri arasında teknikler açısından anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0,05$). Bu da toplam fenolik madde ortalamaları arasındaki farkların büyük oranda rasgele hatalardan kaynaklandığını, teknikler açısından anlamlı bir fark oluşmadığını göstermektedir.

4.2.2. Parametre Çalışma Kısmı Toplam Fenolik Madde Tayini Deneylelerinden

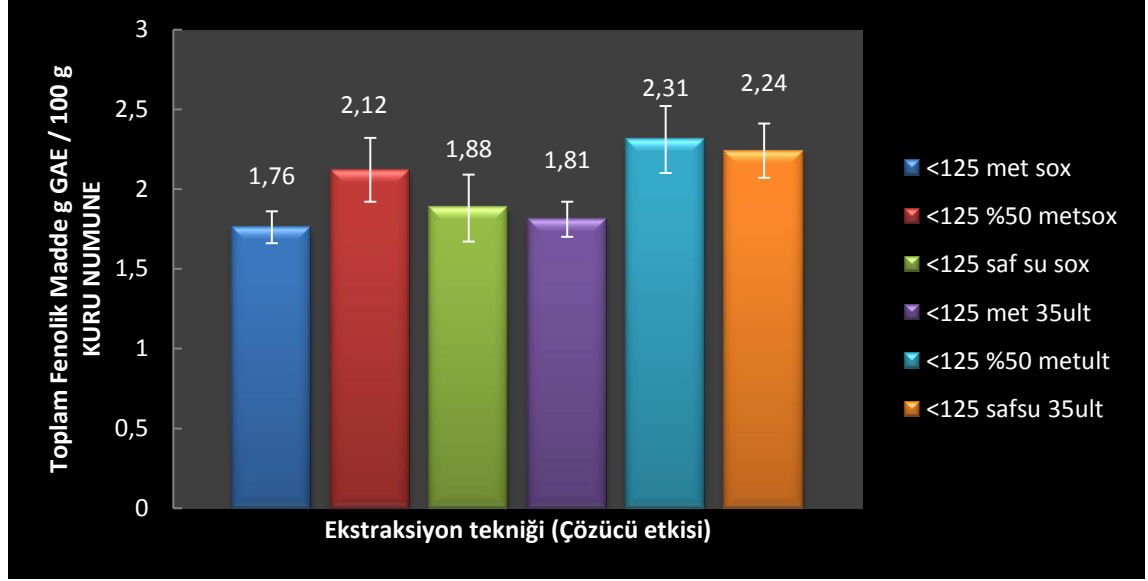
Elde Edilen Sonuçlar



<125metsox: 125 μ m'den küçük metanol Soxhlet ekstraksiyonu; <125metult: 125 μ m'den küçük metanol ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu; <125safsu sox: 125 μ m'den küçük saf su Soxhlet ekstraksiyonu; <125safsuult: 125 μ m'den küçük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu; <125%50metsox: 125 μ m'den küçük %50 metanol-saf su Soxhlet ekstraksiyonu; <125%50metult: 125 μ m'den küçük %50 metanol-saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu; >125safsu sox: 125 μ m'den büyük saf su Soxhlet ekstraksiyonu; >125safsu35ult: 35 dakikalık 125 μ m'den büyük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu; >125safsu15ult: 15 dakikalık 125 μ m'den büyük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu ve >125safsu70ult: 70 dakikalık 125 μ m'den büyük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu,

Şekil 4.11. Parametre çalışmaları kısmından elde edilen toplam fenolik madde miktarları

4.2.2.1. Çözücünün Toplam Fenolik Madde İçeriği Üzerine Etkisi



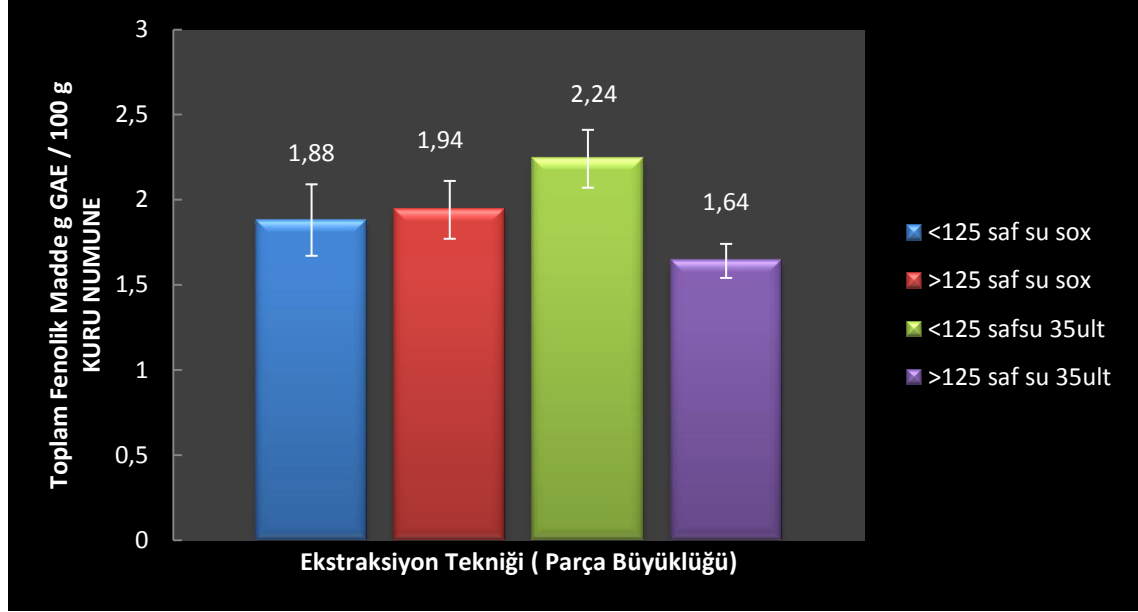
<125metsox:125 µm'den küçük metanol Soxhlet ekstraksiyonu; <125%50metsox:125 µm'den küçük %50 metanol-saf su Soxhlet ekstraksiyonu; <125safsuox:125 µm'den küçük saf su Soxhlet ekstraksiyonu; <125metult: 125 µm'den küçük metanol ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu; <125%50metult: 125 µm'den küçük %50 metanol-saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu; <125safsuult: 125 µm'den küçük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu,

Şekil 4.12. Toplam fenolik madde içeriği üzerine çözücünün etkisi

Her iki ekstraksiyon tekniğinde de toplam fenolik madde miktarı metanol<saf su<% 50 metanol-saf su sıralamasına göre artış göstermiştir. Soxhlet ekstraksiyonunda bu değerler sırasıyla (g GAE/100 g Kuru Numune olarak) $1,76 \pm 0,10$; $1,88 \pm 0,21$ ve $2,12 \pm 0,20$ iken, Ultrasonik Dalga Destekli Ekstraksiyonda $1,81 \pm 0,11$; $2,24 \pm 0,17$ ve $2,31 \pm 0,21$ olarak elde edilmiştir. *L. rotundifolius* bitkisinden fenolik bileşik içeriği yüksek ekstrakt elde etmek için mevcut üç çözücü seçeneği içinde % 50 metanol-saf su karışımının en iyi tercih olabileceği düşünülebilir. % 50 metanol-saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonunda elde edilen $2,31 \pm 0,21$ g GAE/100 g kuru numune değeri, aynı zamanda tüm ekstraksiyonlar içerisinde elde edilen en yüksek toplam fenolik madde içeriği değeridir.

ANOVA testinde hem Soxhlet hem de Ultrasonik Dalga Destekli Ekstraksiyonda çözücülere göre toplam fenolik madde miktarı ortalamaları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0,05$).

4.2.2.2. Parça Büyüklüğünün Toplam Fenolik Madde İçeriği Üzerine Etkisi



<125safsusox:125 μm 'den küçük saf su Soxhlet ekstraksiyonu; >125safsusox:125 μm 'den büyük saf su Soxhlet ekstraksiyonu; <125safsuult: 125 μm 'den küçük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu >125safsu35ult: 35 dakikalık 125 μm 'den büyük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu,

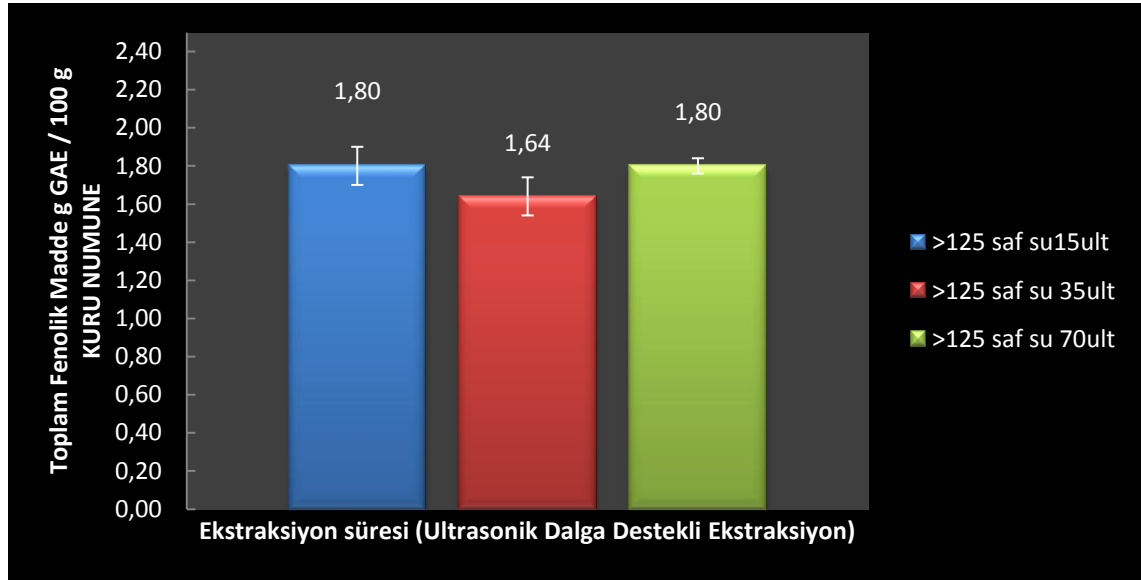
Şekil 4.13. Toplam fenolik madde içeriği üzerine parça büyüklüğünün etkisi

Soxhlet ekstraksiyonunda parça büyüklüğü <125 μm 'den >125(<250) μm 'ye çıkarıldığında toplam fenolik madde miktarı (g GAE/100 g kuru numune olarak) $1,88\pm 0,21$ 'den $1,94\pm 0,17$ 'ye yükselmiştir. Ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonda ise bu değer $2,24\pm 0,17$ 'den belirgin bir düşüşle $1,64\pm 0,10$ 'a inmiştir. Bu düşüş, 35 dk'da gerçekleştirilen her iki ekstraksiyonda, çözücünün daha iri parçacıklı numunenin iç kısımlarına daha küçük parçacıklı numunede olduğu kadar etki edemediği gerçeği ile ilişkilidir. Soxhlet ekstraksiyonunda, ekstraksiyon zamanı çok daha uzun olduğundan (6-8 saat), toplam fenolik madde değerleri birbirlerine oldukça yakın değerler olarak elde edilmiştir. Hatta <125 μm 'lik numunedeki toplam fenolik madde miktarı bir miktar daha yüksek olduğu ortadadır. Bunun sebebinin, genellikle çok ince tanecikli numunelerin Soxhlet ekstraksiyonları sırasında meydana gelen ve çözücü etkinliğini düşüren “topaklaşma” olabileceği düşünülebilir.

Yapılan “t” test sonuçlarına göre, parçacık büyüklüğünün <125 μm 'den >125(<250) μm 'ye çıkarılması, Soxhlet ekstraktlarının toplam fenolik madde değerlerinde anlamlı bir farka yol açmamıştır ($p>0,05$). Ancak Ultrasonik Dalga Destekli ekstraktlarda

anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,05$). Yani ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonda parça büyüklüğünün azalması, toplam fenolik madde miktarına olumlu katkı yapmıştır.

4.2.2.3. Ekstraksiyon Süresinin Toplam Fenolik Madde İçeriği Üzerine Etkisi



>125safsu15ult: 15 dakikalık 125 μm 'den büyük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu
>125safsu35ult: 35 dakikalık 125 μm 'den büyük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu; ve
>125safsu70ult: 70 dakikalık 125 μm 'den büyük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu,

Şekil 4.14. Toplam fenolik madde içeriği üzerine ekstraksiyon süresinin etkisi

Ekstraksiyon süresi arttıkça toplam fenolik madde içeriği önce $1,80\pm 0,10$ g GAE/100 g kuru numune değerinden $1,64\pm 0,10$ 'a düşmekte, daha sonra yeniden $1,80\pm 0,04$ 'e yükselmektedir.

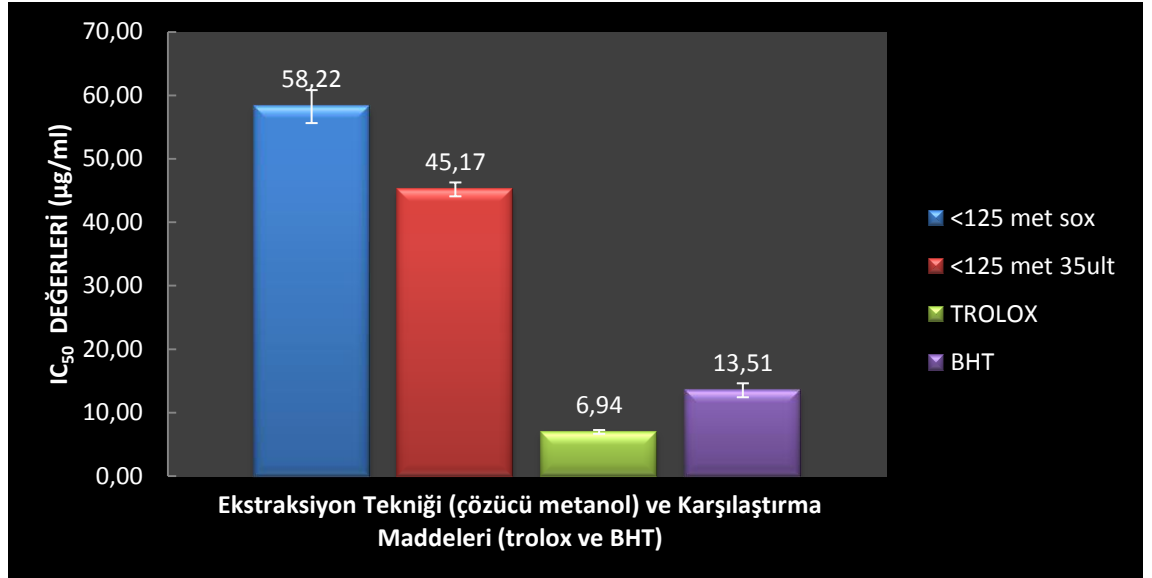
ANOVA testlerinde, üç farklı ekstraksiyon süresi için elde edilen toplam fenolik madde ortalamaları arasında anlamlı bir farklılığın olmadığı bulundu ($p>0,05$).

4.3. Antioksidan Aktivite Değerlerinin Tayini Deneylerinden Elde Edilen Bulgular

4.3.1. DPPH Radikal Süpürme Deneylerinden Elde Edilen Bulgular

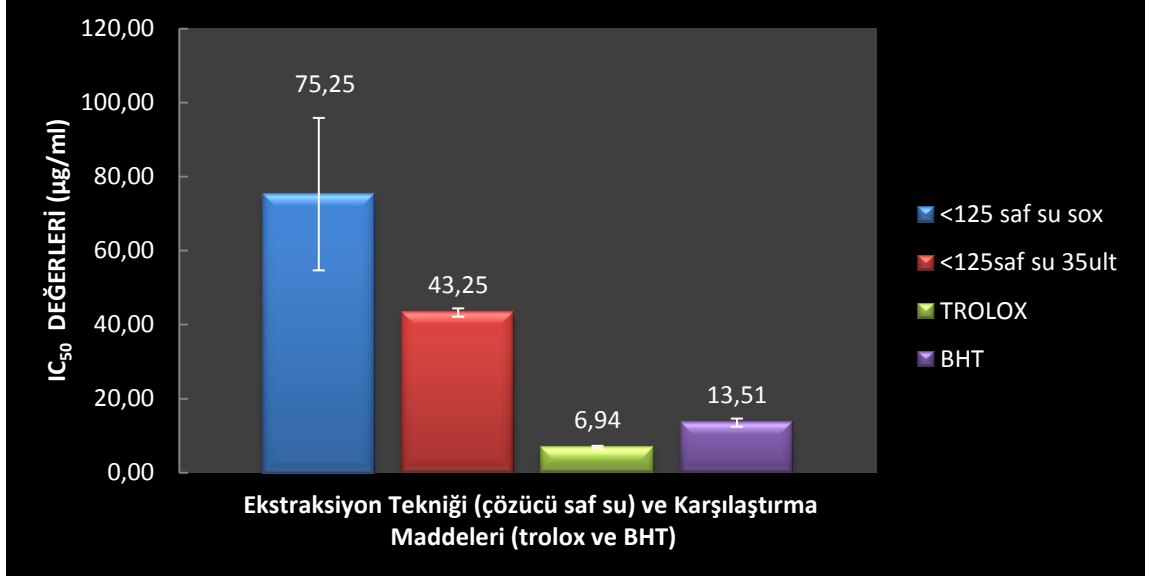
4.3.1.1. Ana Çalışma Kısımında Elde Edilen Bulgular

Bu deneylerden elde edilen verilerden yararlanılarak çizilen, ortamdaki radikallerin yarısını süpürebilmek için gerekli olan antioksidan veya ekstrakt konsantrasyonu değerlerini (IC_{50}) ifade eden sütun grafikler ile, antioksidan veya ekstraktların ortamdaki radikalleri süpürme oranlarını ifade eden % süpürme/inhibisyon (% I) grafikleri aşağıdaki Şekil 4.9-Şekil 4.12’de verilmiştir.



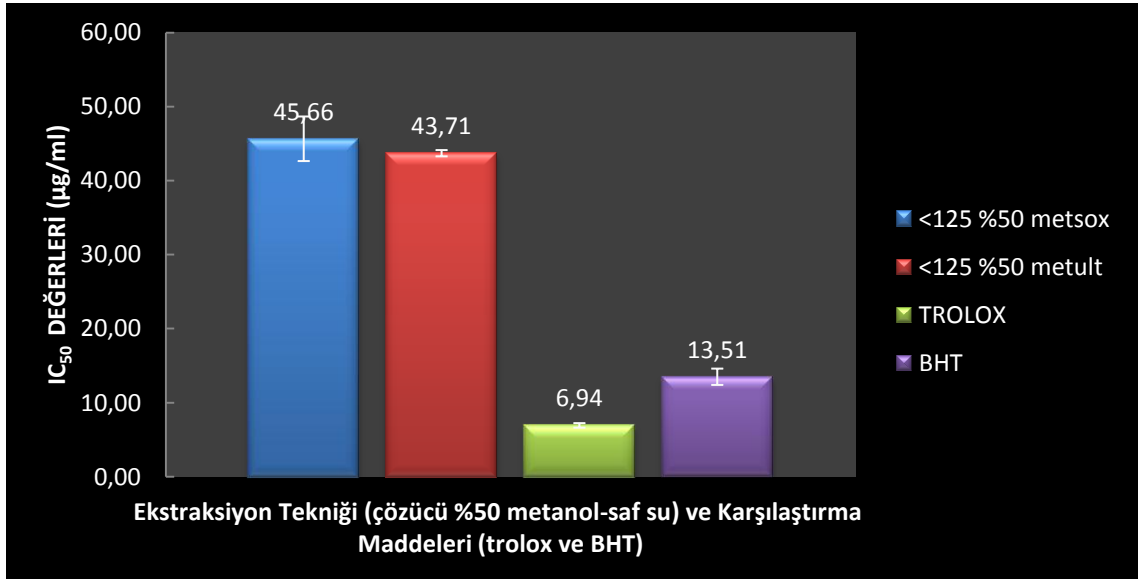
<125metsox: 125 μm 'den küçük metanol Soxhlet ekstraksiyonu; <125metult: 125 μm 'den küçük metanol ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu,

Şekil 4.15. Metanol çözücüsü kullanılarak elde edilen IC_{50} değerleri



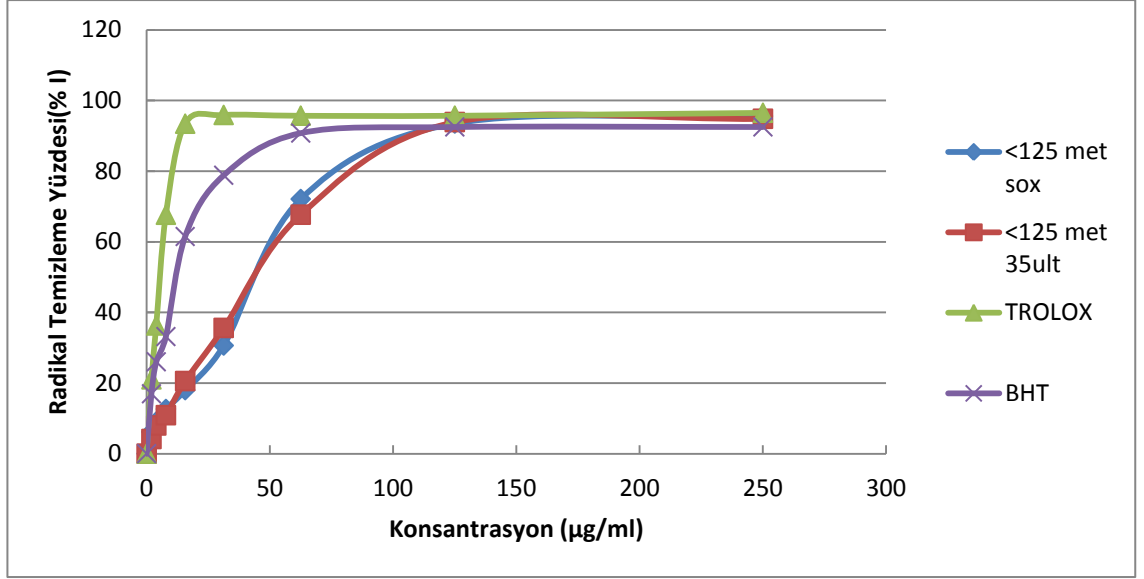
<125safsusox:125 µm'den küçük saf su Soxhlet ekstraksiyonu; <125safsuult: 125 µm'den küçük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu,

Şekil 4.16. Saf su çözücüsü kullanılarak elde edilen IC₅₀ değerleri



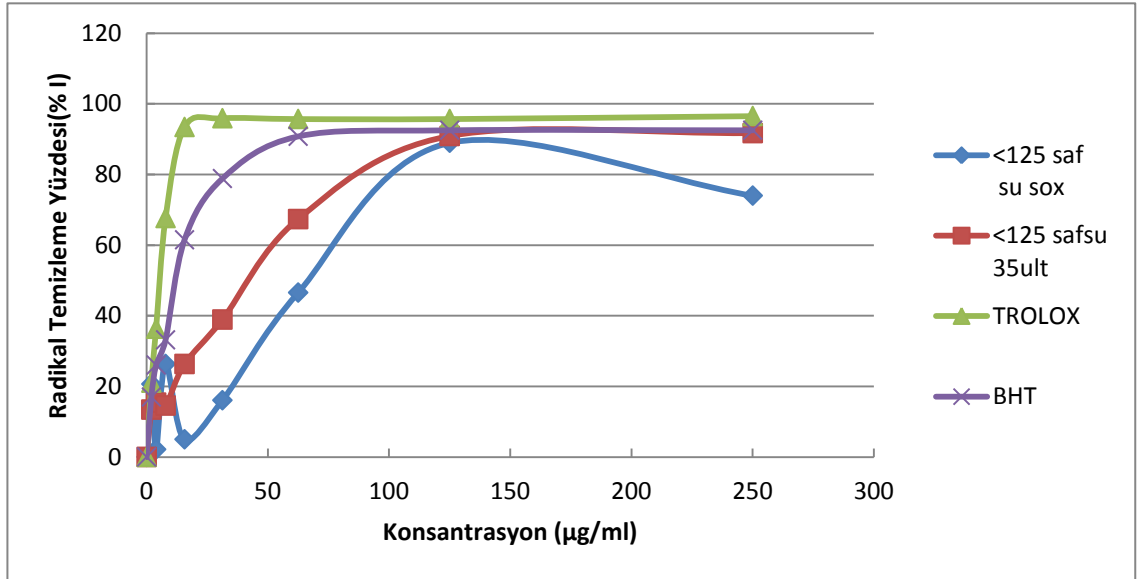
<125%50metsox:125 µm'den küçük %50 metanol-saf su Soxhlet ekstraksiyonu; <125%50metult: 125 µm'den küçük %50 metanol-saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu,

Şekil 4.17. %50 Metanol-saf su çözücüsü kullanılarak elde edilen IC₅₀ değerleri



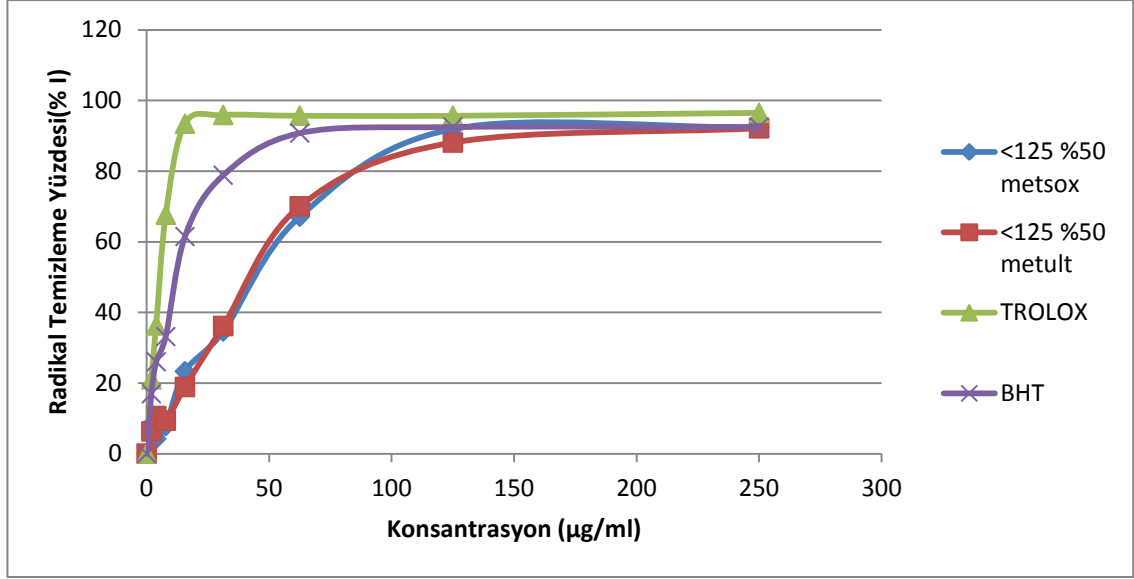
<125metsox:125 µm'den küçük metanol Soxhlet ekstraksiyonu; <125metult: 125 µm'den küçük metanol ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu,

Şekil 4.18. Metanol çözücüsü kullanılarak elde edilen % inhibisyon eğrileri



<125safsusox:125 µm'den küçük saf su Soxhlet ekstraksiyonu; <125safsuult: 125 µm'den küçük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu

Şekil 4.19. Saf su çözücüsü kullanılarak elde edilen % inhibisyon eğrileri



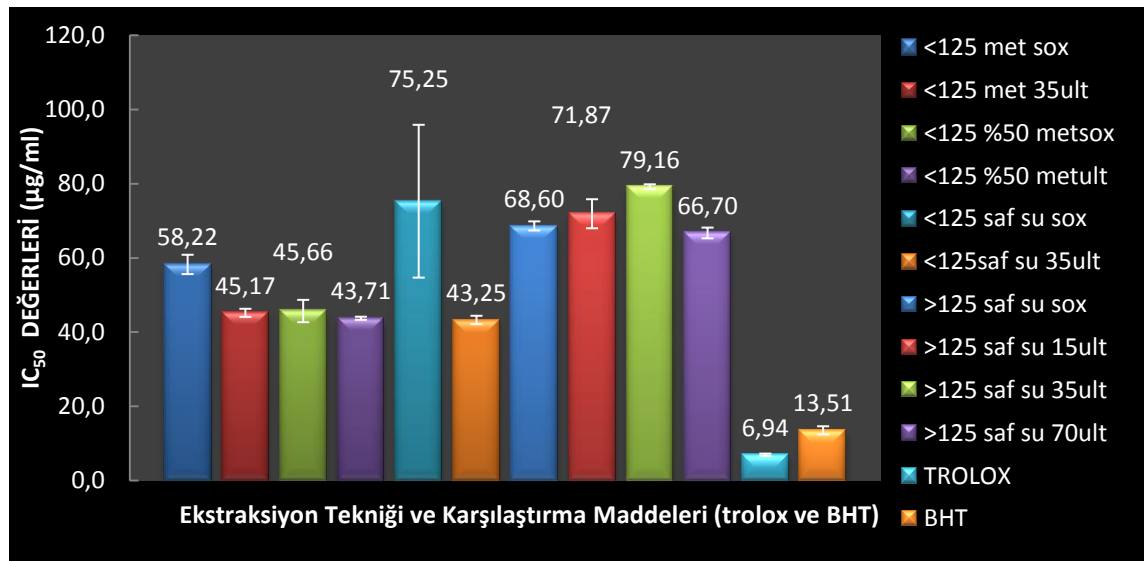
<125%50metsox:125 µm'den küçük %50 metanol-saf su Soxhlet ekstraksiyonu; <125%50metult: 125 µm'den küçük %50 metanol-saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu

Şekil 4.20. %50 metanol-saf su çözücüsü kullanılarak elde edilen % inhibisyon eğrileri

Şekil 4.15-Şekil 4.18 incelendiğinde en iyi IC₅₀ ve % I değerlerini karşılaştırma maddeleri olan BHT ve Trolox'un ortaya koyduğu görülmektedir. Genel olarak her üç çözücü türünde de ultrasonik dalga destekli ekstraksiyon, Soxhlet ekstraksiyonundan daha yüksek antioksidan aktivite sergilemiştir (daha düşük IC₅₀ değeri daha yüksek antioksidan aktiviteye karşılık gelmektedir). Elde edilen sonuçlar, kısım 4.2.1'de verilen toplam fenolik madde değerleri ile birlikte düşünüldüğünde bir her iki sonuç grubu arasında bir paralellik olduğu görülmektedir. Toplam fenolik madde içeriği yüksek olan ultrasonik dalga destekli ekstraktlar, Soxhlet ekstraktlarından daha iyi radikal süpürme aktiviteleri sergilemişlerdir. Yani bu sonuçlar, kısım 4.2.1'de ifade edilen toplam fenolik madde içeriği daha yüksek olan ekstraktlardan daha iyi antioksidan aktivite değeri elde edilebileceği düşüncesine destek verir niteliktedir. En iyi radikal süpürme değeri saf su çözücüsü kullanılarak gerçekleştirilen ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonda elde edilirken (43,25±1,13 µg/mL), en düşük değer ise yine saf su çözücüsü kullanılarak gerçekleştirilen Soxhlet ekstraksiyonundan elde edilmiştir (75,25±20,59 µg/mL). Hemen hemen tüm ekstraktlar, 150-200 µg/mL konsantrasyon aralığında % 90'lar civarında % süpürme değerleri (% I) sergilemiştir.

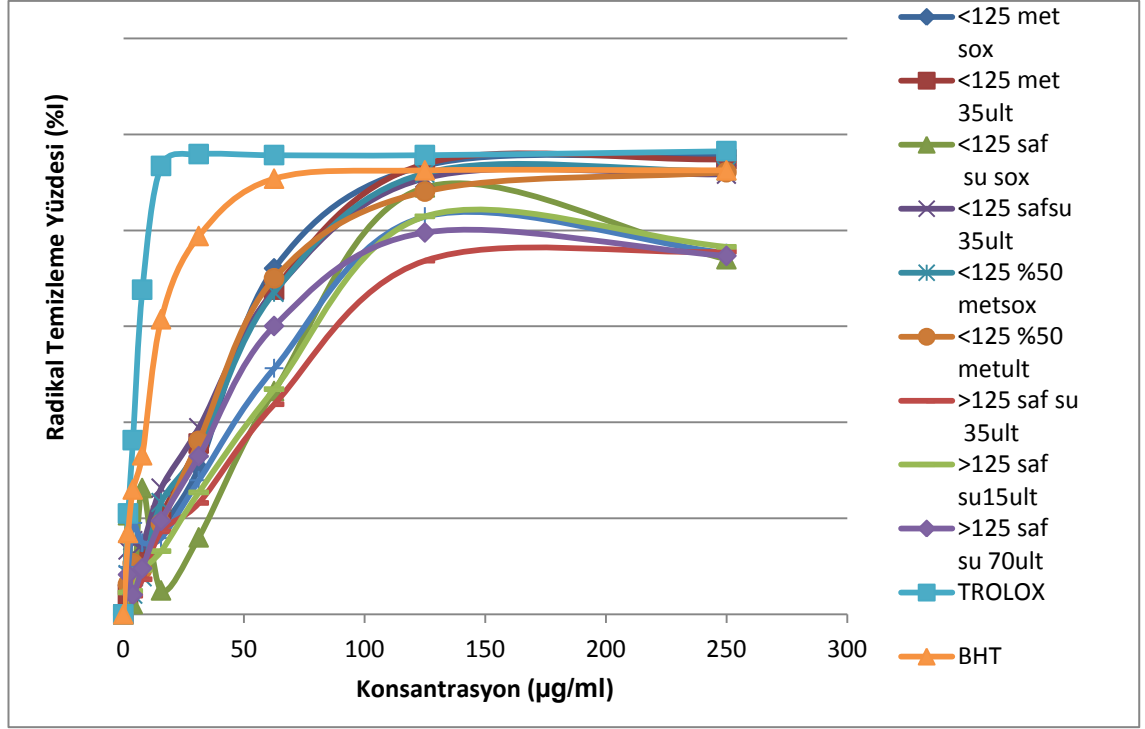
İstatistiksel analizlerde, çözücü olarak metanol kullanıldığında elde edilen IC₅₀ değerleri arasında uygulanan ekstraksiyon teknikleri açısından anlamlı bir fark elde edilmişken (p<0,05), % 50 metanol-saf su ve saf su çözücülerindeki farklar anlamlı çıkmamıştır (p>0,05). Diğer bir deyimle DPPH uygulamasında, ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonla elde edilen metanolik ekstraktlar, antioksidan aktivite değeri açısından metanolik Soxhlet ekstraktlarından daha iyi sonuçlar ortaya koymuştur.

4.3.1.2. Parametre Çalışması Kısımından Elde Edilen Bulgular



<125metsox:125 µm'den küçük metanol Soxhlet ekstraksiyonu; <125metult: 125 µm'den küçük metanol ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu; <125safsu35ult:125 µm'den küçük saf su Soxhlet ekstraksiyonu; <125safsuult: 125 µm'den küçük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu; <125%50metsox:125 µm'den küçük %50 metanol-saf su Soxhlet ekstraksiyonu; <125%50metult: 125 µm'den küçük %50 metanol-saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu; >125safsu35ult:125 µm'den büyük saf su Soxhlet ekstraksiyonu; >125safsu35ult: 35 dakikalık 125 µm'den büyük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu; >125safsu15ult: 15 dakikalık 125 µm'den büyük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu ve >125safsu70ult: 70 dakikalık 125 µm'den büyük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu,

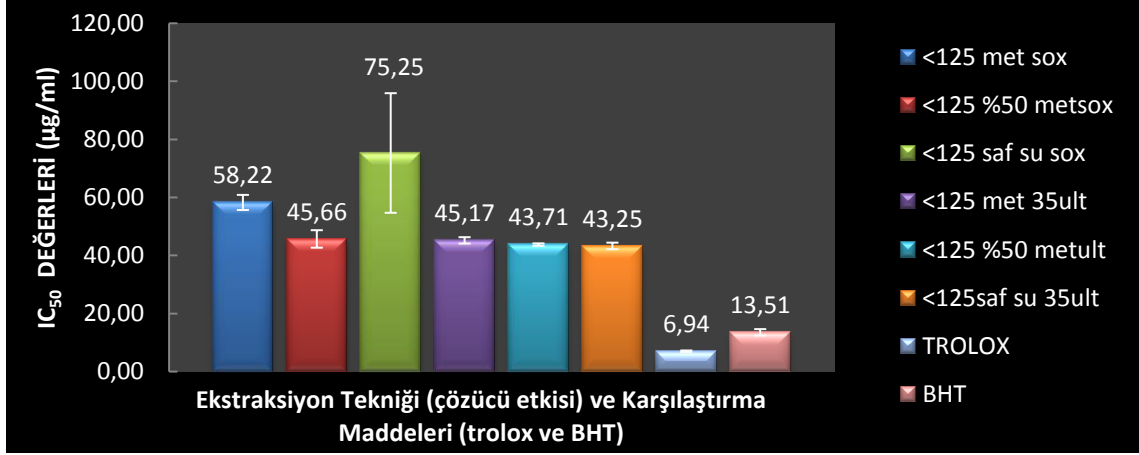
Şekil 4.21. Parametre çalışması kısmından elde edilen IC₅₀ değerleri



<125metsox:125 µm'den küçük metanol Soxhlet ekstraksiyonu,;<125metult: 125 µm'den küçük metanol ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu; <125safsu35ult:125 µm'den küçük saf su Soxhlet ekstraksiyonu; <125safsuult: 125 µm'den küçük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu; <125%50metsox:125 µm'den küçük %50 metanol-saf su Soxhlet ekstraksiyonu; <125%50metult: 125 µm'den küçük %50 metanol-saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu; >125safsu35ult:125 µm'den büyük saf su Soxhlet ekstraksiyonu; >125safsu35ult: 35 dakikalık 125 µm'den büyük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu; >125safsu15ult: 15 dakikalık 125 µm'den büyük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu ve >125safsu70ult: 70 dakikalık 125 µm'den büyük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu,

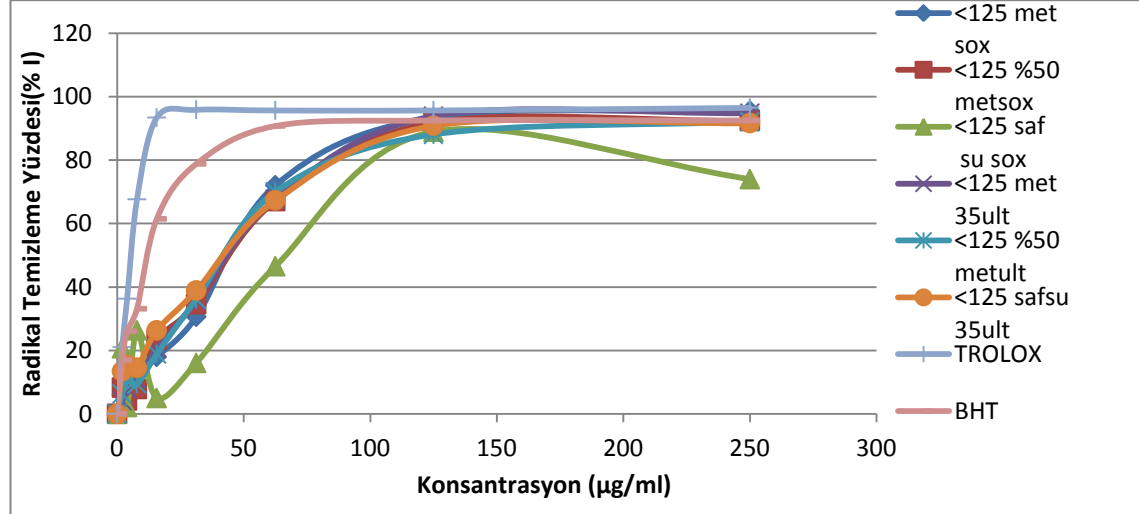
Şekil 4.22. Parametre çalışması kısmından elde edilen % inhibisyon değerleri

I) Çözücünün DPPH Radikal Süpürme Antioksidan Aktivite Değerleri Üzerine Etkisi:



<125metsox:125 µm'den küçük metanol Soxhlet ekstraksiyonu; <125%50metsox:125 µm'den küçük %50 metanol-saf su Soxhlet ekstraksiyonu; <125safsusox:125 µm'den küçük saf su Soxhlet ekstraksiyonu; <125metult: 125 µm'den küçük metanol ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu; <125%50metult: 125 µm'den küçük %50 metanol-saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu; <125safsuult: 125 µm'den küçük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu,

Şekil 4.23. DPPH radikal süpürme antioksidan aktivite değerleri üzerine çözücünün etkisi



<125metsox:125 µm'den küçük metanol Soxhlet ekstraksiyonu; <125%50metsox:125 µm'den küçük %50 metanol-saf su Soxhlet ekstraksiyonu; <125safsusox:125 µm'den küçük saf su Soxhlet ekstraksiyonu; <125metult: 125 µm'den küçük metanol ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu; <125%50metult: 125 µm'den küçük %50 metanol-saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu; <125safsuult: 125 µm'den küçük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu,

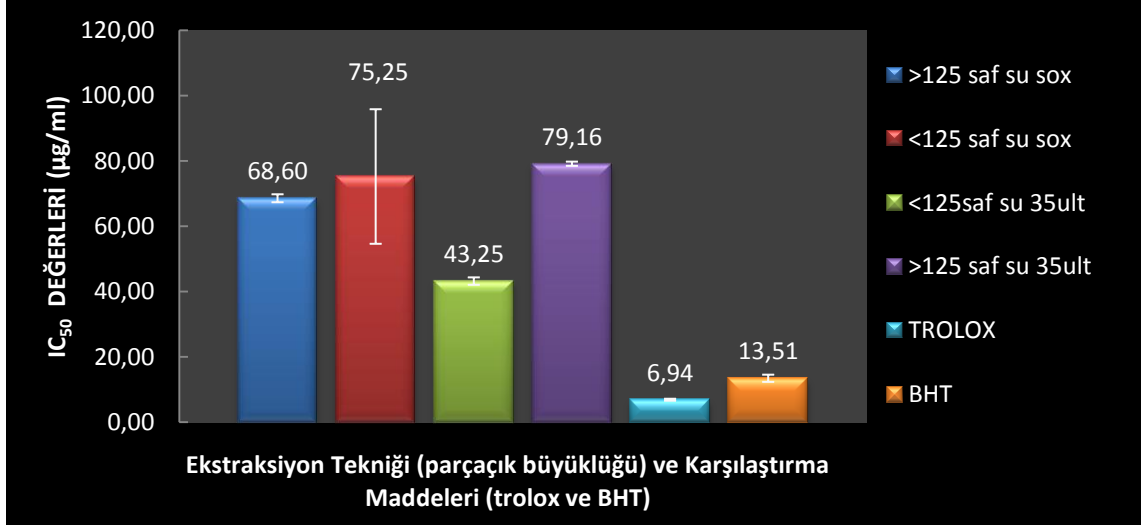
Şekil 4.24. DPPH % inhibisyon antioksidan aktivite değerleri üzerine çözücünün etkisi

Şekil 4.21 ve Şekil 4.22'ya bakıldığında Soxhlet ekstraktları için en iyi IC₅₀ değeri çözücü olarak % 50 metanol-saf su karışımı kullanıldığında elde edilmiş (45,66±3,01 µg/mL), bu değeri sırasıyla 58,22±2,60 µg/mL'lik değerle metanol ekstraktı ve 75,25±20,59 µg/mL'lik değerle de saf su ekstraktı izlemiştir. Saf su ilavesi ile karışımın yükselen polaritesi, antioksidan aktivite değerine olumlu bir etki yapmış gibi görülmektedir. Burada suyun çözelti ortamına daha polar olan bileşikleri çektiği söylenebilir. Ancak kullanılan en polar çözücü olan saf su ile gerçekleştirilen ekstraksiyondan elde edilen antioksidan aktivite değerinin en düşük değer olması yukarıdaki açıklamaya uymamaktadır. Bu durum, saf suyun kaynama sıcaklığının kullanılan diğer çözücü türlerine göre oldukça yüksek olması ile açıklanabilir. Muhtemelen uzun süre yüksek sıcaklık koşullarında kalan, antioksidan aktiviteye sahip ancak termal olarak kararsız pek çok bileşik yapısal olarak bozunmakta ve etkinliklerini kaybetmektedir. Bu durum ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonlarda elde edilen IC₅₀ değerleri incelendiğinde daha iyi görülmektedir. Ultrasonik ekstraktlardan en iyi IC₅₀ değeri saf su ile gerçekleştirilen ekstraktlardan elde edilmiştir (43,25±1,13 µg/mL). Bu değeri sırasıyla 43,71±0,42 µg/mL'lik değerle % 50 metanol-saf su çözücüsü ve 45,17±1,09 µg/mL'lik değerle de metanol çözücüsü izlemiştir. Ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonun nispeten ılımlı koşulları (düşük sıcaklık, kısa ekstraksiyon süresi) termal olarak kararsız bileşiklerin bozulmadan ekstraksiyon ortamında kalmalarını sağlamış ve bu da radikal süpürme aktivitesi değerlerine olumlu yansımıştır.

İstatistiksel olarak, her iki teknikle üç farklı çözücü kullanılarak elde edilen IC₅₀ değerleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (p>0,05). Yani çözücü polaritesi değişiminin, antioksidan aktivite değerlerine belirgin bir katkısı yoktur.

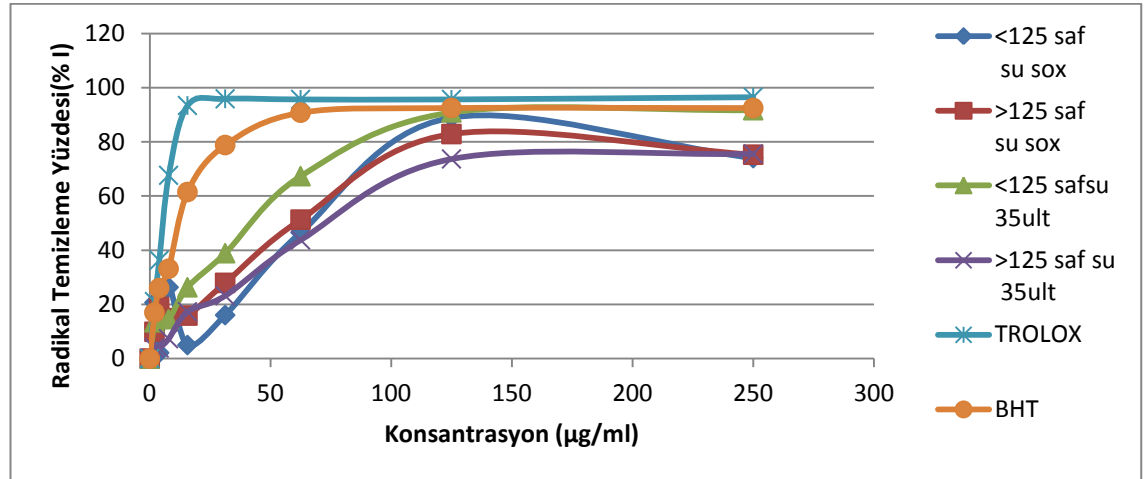
II) Parça Büyüklüğünün DPPH Radikal Süpürme Antioksidan Aktivite Değerleri

Üzerine Etkisi:



<125safsusox:125 µm'den küçük saf su Soxhlet ekstraksiyonu; >125safsusox:125 µm'den büyük saf su Soxhlet ekstraksiyonu; <125safsuult: 125 µm'den küçük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu >125safsu35ult: 35 dakikalık 125 µm'den büyük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu,

Şekil 4.25. DPPH radikal süpürme antioksidan aktivite değerleri üzerine parça büyüklüğü etkisi



<125safsusox:125 µm'den küçük saf su Soxhlet ekstraksiyonu; >125safsusox:125 µm'den büyük saf su Soxhlet ekstraksiyonu; <125safsuult: 125 µm'den küçük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu >125safsu35ult: 35 dakikalık 125 µm'den büyük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu,

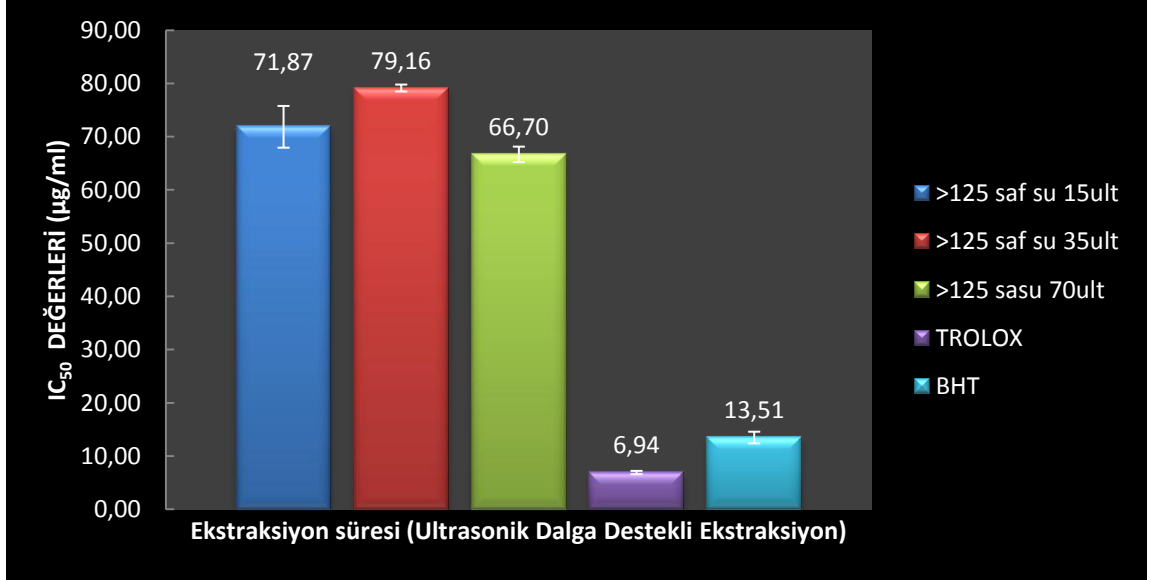
Şekil 4.26. DPPH % inhibisyon antioksidan aktivite değerleri üzerine parçacık büyüklüğünün etkisi

Çalışmanın bu kısmında elde edilen değerlere bakıldığında, Soxhlet ekstraksiyonları için parçacık büyüklüğünün artması ile antioksidan aktivite değerlerinde paralel bir artış gözleniyorken ($75,25 \pm 20,59 \mu\text{g/mL}$ 'den $68,60 \pm 1,22 \mu\text{g/mL}$ 'ye yükselme), ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonda ise tersi bir durum ($43,25 \pm 1,13 \mu\text{g/mL}$ 'den $79,16 \pm 0,65 \mu\text{g/mL}$ 'ye düşme) izlenmektedir. Normal beklentinin parçacık büyüklüğünün artışı ile çözücünün azalan ekstraksiyon etkinliğine paralel olarak antioksidan aktivitede oluşacak bir düşüş olmasına rağmen, Soxhlet değerlerinin bunun tersini ortaya koyması ilgi çekici olabilir. Bu durum muhtemelen, küçük parça büyüklüğü durumunda erken ekstrakte olan antioksidan etkili ancak termal olarak duyarlı bileşiklerin uzun süreli Soxhlet şartlarında bozunmasından kaynaklanmaktadır. Parça büyüklüğü arttıkça, bu tür bileşiklerin ekstraksiyonu daha geç zaman aralıklarına kaymakta ve bozunumları gecikmektedir. Bu da antioksidan aktiviteye pozitif yönde küçük bir katkı sağlamaktadır. Ultrason destekli ekstraksiyonda ise parça boyutunun büyümesi antioksidan etkili bileşiklerin çözelti ortamına taşınımını geciktirmekte, böylece antioksidan aktiviteyi olumsuz yönde etkilemektedir.

Yapılan istatistiksel analizlerde, Soxhlet ekstraksiyonunda parçacık büyüklüğü değişimi açısından anlamlı bir fark bulunmazken ($p > 0,05$), ultrasonik dalga destekli ekstraksiyondaki değerler arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonda parçacık büyüklüğünün artışı, antioksidan aktiviteyi olumsuz yönde etkilemiştir.

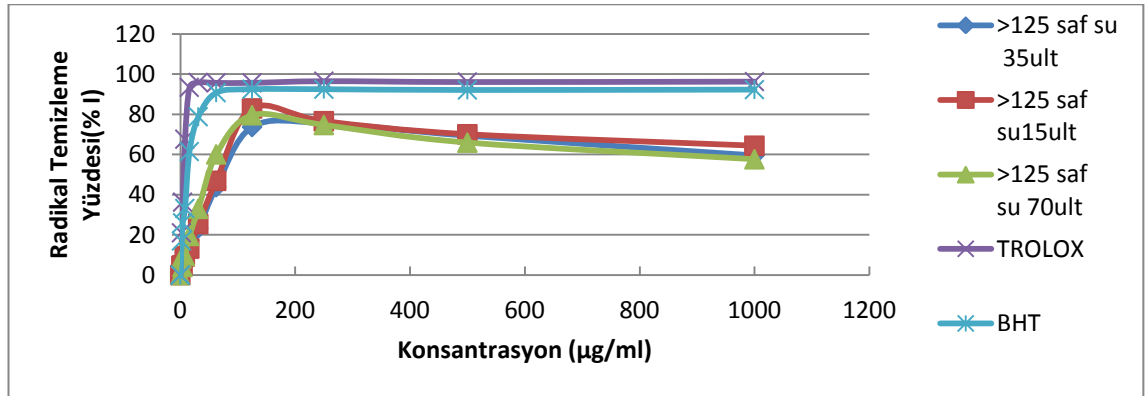
1) Ekstraksiyon Süresinin DPPH Radikal Süpürme Antioksidan Aktivite Değerleri

Üzerine Etkisi:



>125safsu15ult: 15 dakikalık 125 µm'den büyük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu
>125safsu35ult: 35 dakikalık 125 µm'den büyük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu ve
>125safsu70ult: 70 dakikalık 125 µm'den büyük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu,

Şekil 4.27. DPPH radikal süpürme antioksidan aktivite değerleri üzerine ekstraksiyon süresinin etkisi



>125safsu15ult: 15 dakikalık 125 µm'den büyük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu
>125safsu35ult: 35 dakikalık 125 µm'den büyük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu ve
>125safsu70ult: 70 dakikalık 125 µm'den büyük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu,

Şekil 4.28. DPPH % inhibisyon antioksidan aktivite değerleri üzerine Ekstraksiyon süresine etkisi

Bu deneylerde, ekstraksiyon süresinin artması ile radikal süpürme değerleri önce düşmekte, sonra yükselmektedir (sırasıyla $71,87 \pm 3092 \mu\text{g/mL}$; $79,16 \pm 0,65 \mu\text{g/mL}$ ve $66,70 \pm 1,45 \mu\text{g/mL}$). Bu durum, ekstraktlara ait toplam fenolik madde değerleri ile de uyum içindedir. Toplam fenolik madde içeriği en düşük olan >125safsu35ult ekstraktı ($1,64 \pm 0,10 \text{ g GAE/100 g}$ kuru numune) aynı zamanda bu üç ekstrakt içinde en düşük antioksidan aktiviteyi ortaya koymuştur. Bu nedenle toplam fenolik madde içeriği değişimi için yapılan yorumlar burada da geçerlidir.

Gerçekleştirilen tek yönlü ANOVA testinde, ekstraksiyon süresine göre elde edilen ekstraktların antioksidan aktivite ortalama değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar olduğu bulunmuştur ($p > 0,05$). Hangi ortalamaların farklı olduğunu belirlemek için “en küçük anlamlı fark” testi yapıldı. Antioksidan aktivite değerleri ekstraksiyon süresine göre en iyi değerden en düşük değere doğru şu şekilde sıralandı:

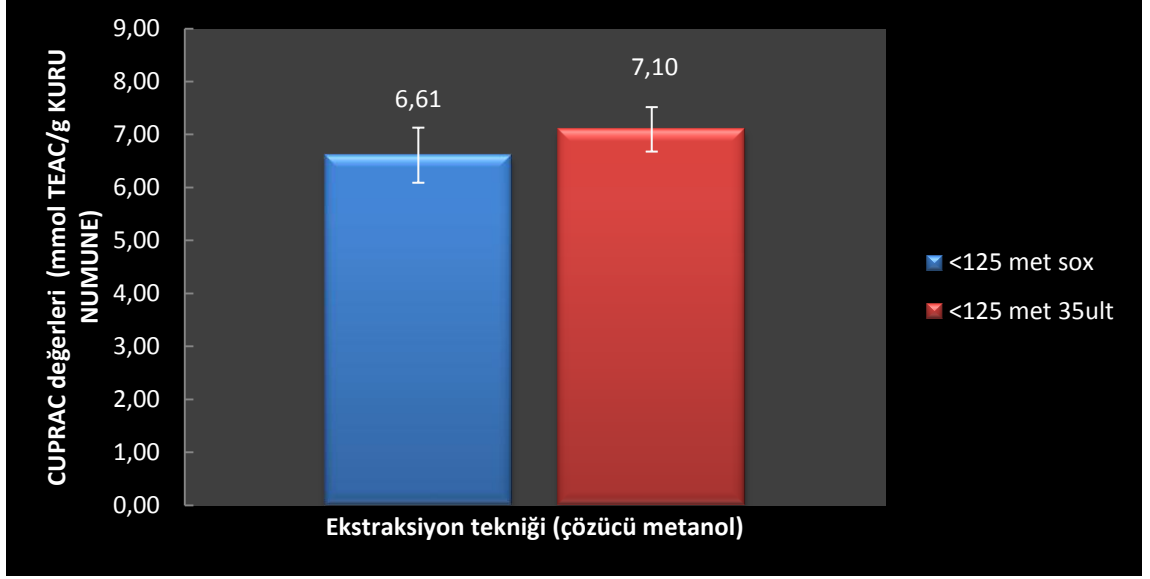
70 dk’lık ekstrakt > 15 dk’lık ekstrakt > 35 dk’lık ekstrakt.

4.3.2. Cu-II İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi (CUPRAC) Deneylerinden

Elde Edilen Bulgular

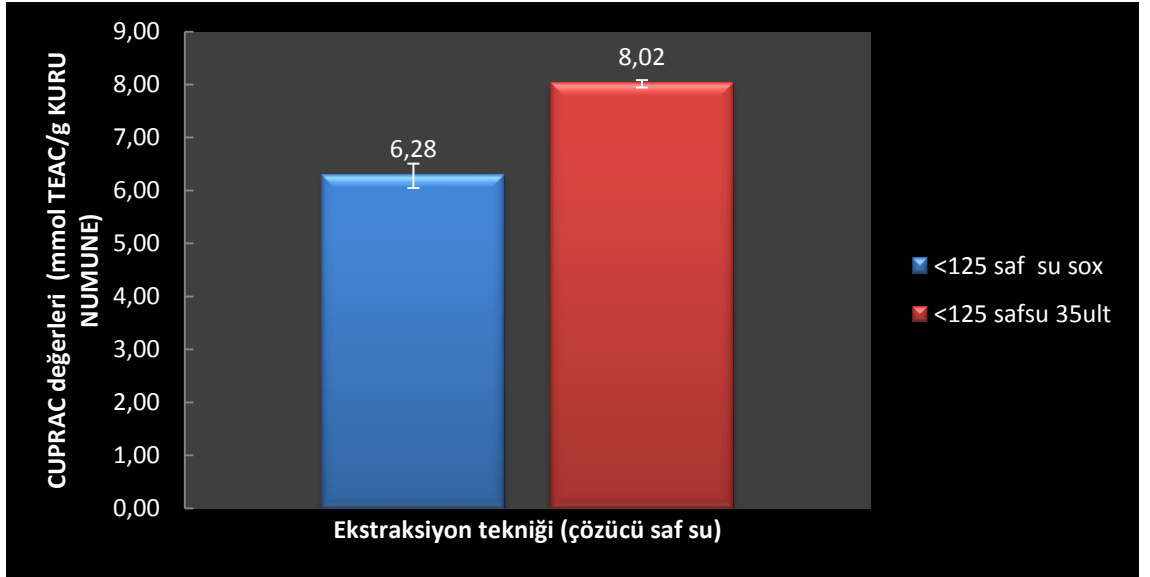
4.3.2.1 Ana Çalışma Kısmından Elde Edilen Bulgular

Bu testlerde elde edilen değerlerden yararlanılarak çizilen ve 1 g kuru numunedeki antioksidan etkili bileşiklerin mmol cinsinden karşılaştırma maddesi olan trolox eşdeğerlerinin verildiği grafikler aşağıdaki Şekil 4.17-Şekil 4.19’da verilmiştir. Bu testlerde daha yüksek olan değer daha yüksek antioksidan aktiviteye karşılık gelmektedir. Hesaplamalarda kullanılan kalibrasyon grafiği Ek Şekil 2’de verilmiştir.



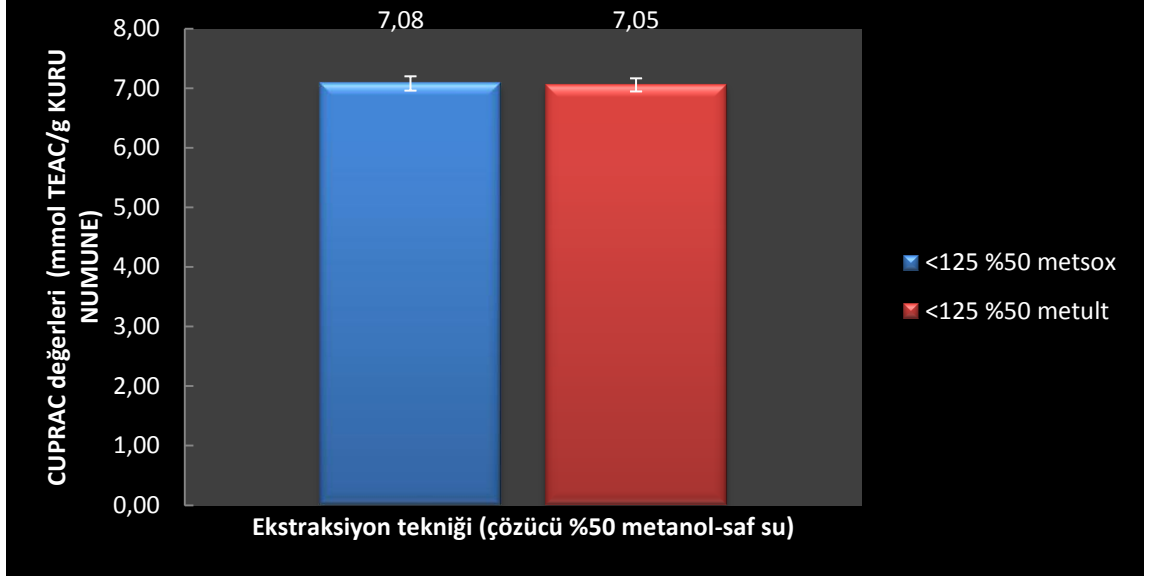
<125metsox:125 μm 'den küçük metanol Soxhlet ekstraksiyonu; <125metult: 125 μm 'den küçük metanol ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu,

Şekil 4.29. Metanol çözücüsü kullanılarak elde edilen CUPRAC değerleri



<125safsusox:125 μm 'den küçük saf su Soxhlet ekstraksiyonu; <125safsuult: 125 μm 'den küçük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu,

Şekil 4.30. Saf su çözücüsü kullanılarak elde edilen CUPRAC değerleri



<125%50metsox:125 µm'den küçük %50 metanol-saf su Soxhlet ekstraksiyonu; <125%50metult: 125 µm'den küçük %50 metanol-saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu,

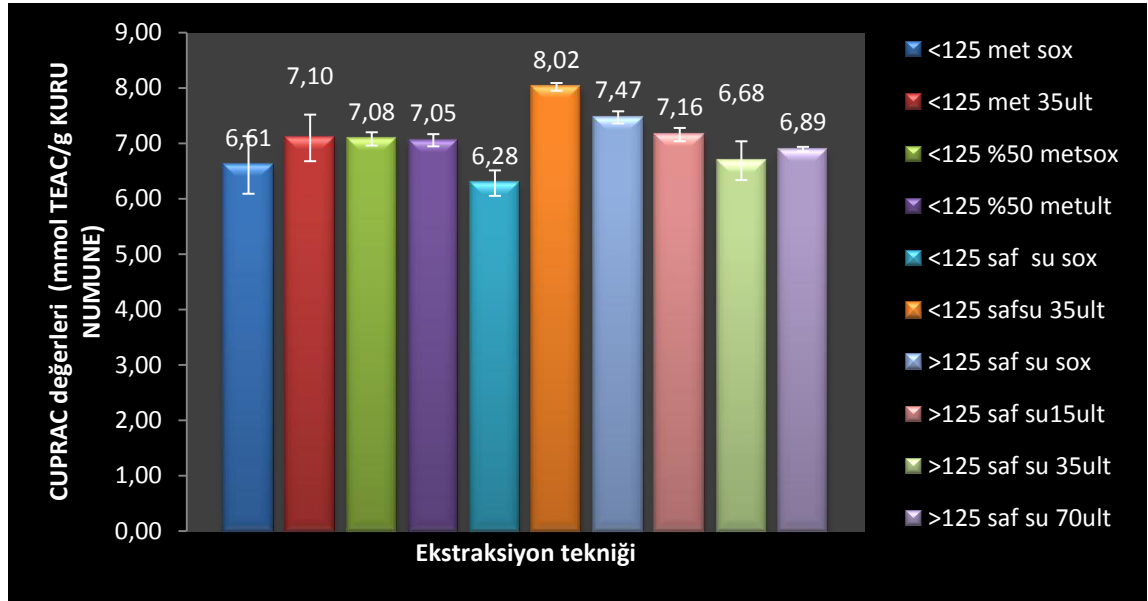
Şekil 4.31. %50 metanol-saf su çözücü karışımı kullanılarak elde edilen CUPRAC değerleri

Şekil 4.29 ve Şekil 4.30'dan ultrasonik dalga destekli ekstraktların CUPRAC değerlerinin Soxhlet ekstraktlarından daha yüksek olduğu görülmektedir. Toplam fenolik madde içeriği değerlerine bakıldığında da bu beklenen bir durumdur. Ancak çözücü olarak % 50 metanol-saf su karışımı kullanıldığında, Soxhlet ekstraktlarının hafifçe daha yüksek değer sergiledikleri görülmektedir. Bu durum kullanılan diğer yöntem olan DPPH radikal süpürme yönteminden elde edilen sonuca ters gibi görünse de, beklenebilir bir sonuç olduğu söylenebilir. Çünkü çözücü olarak % 50 metanol-saf su kullanıldığında, her iki yöntemde elde edilen Soxhlet ve ultrasonik dalga destekli ekstraktların antioksidan aktivite değerlerinin birbirine oldukça yakın değerler oldukları (DPPH için $45,66 \pm 3,01$ - $43,71 \pm 0,42$ µg/mL; CUPRAC için $7,08 \pm 0,12$ - $7,05 \pm 0,11$ mmol TEAC/1 g kuru numune), ek olarak yöntemler arasındaki mekanizma, yapısal farklılıklar gibi unsurlar düşünüldüğünde de elde edilen sonucun mantıklı olduğu ifade edilebilir.

Anlamlılık testlerinde, CUPRAC değerleri açısından, çözücü olarak saf su kullanıldığında elde edilen ultrasonik dalga destekli ekstraktlar, Soxhlet ekstraktlarından

daha iyi değerler ortaya koymuştur ($p < 0,05$). Diğer ozücü turlerinde, teknikler arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0,05$).

4.3.2.2. Parametre alışması Kısımından Elde Edilen Bulgular



<125metsox:125 μ m'den kuuk metanol Soxhlet ekstraksiyonu; <125metult: 125 μ m'den kuuk metanol ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu; <125safsu35ult:125 μ m'den kuuk saf su Soxhlet ekstraksiyonu; <125safsuult: 125 μ m'den kuuk saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu; <125%50metsox:125 μ m'den kuuk %50 metanol-saf su Soxhlet ekstraksiyonu; <125%50metult: 125 μ m'den kuuk %50 metanol-saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu; >125safsu35ult: 35 dakikalık 125 μ m'den buyuk saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu; >125safsu15ult: 15 dakikalık 125 μ m'den buyuk saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu ve >125safsu70ult: 70 dakikalık 125 μ m'den buyuk saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu,

şekil 4.32. Ekstraksiyonlardan elde edilen CUPRAC değerleri

I) Çözücünün Cu-II İyonu İndirgeme Antioksidan Gücü (CUPRAC) Değerleri Üzerine

Etkisi



<125metsox:125 μm 'den küçük metanol Soxhlet ekstraksiyonu; <125%50metsox:125 μm 'den küçük %50 metanol-saf su Soxhlet ekstraksiyonu; <125safsuox:125 μm 'den küçük saf su Soxhlet ekstraksiyonu; <125metult: 125 μm 'den küçük metanol ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu; <125%50metult: 125 μm 'den küçük %50 metanol-saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu; <125safsuult: 125 μm 'den küçük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu,

Şekil 4.33. CUPRAC değerlerine çözücünün etkisi

Şekil 4.32'den metanol, % 50 metanol-saf su ve saf su çözücü sıralamasına göre Soxhlet ekstraktlarından elde edilen CUPRAC değerleri, mmol TEAC/1 g kuru numune cinsinden $6,61\pm 0,52$ - $7,08\pm 0,12$ - $6,28\pm 0,23$ şeklindedir. Ultrasonik dalga destekli ekstraktlar için bu sıralama $7,10\pm 0,42$ - $7,05\pm 0,11$ - $8,02\pm 0,07$ olarak elde edilmişlerdir. Göze çarpan ilk husus, Soxhlet tekniğinde % 50 metanol-su karışımı en yüksek CUPRAC değerlerini ortaya koymuş iken, Ultrasonik Dalga Destekli Ekstraksiyon tekniğinde ise en iyi değer saf su çözücüsü ile elde edilmiş olmasıdır. Bu değerleri Soxhlet ekstraktları için metanol ve saf su çözücüsüyle elde edilen ekstraktlar takip ediyorken, ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonda sıralama metanol ve % 50 metanol-saf su şeklinde olmuştur. Toplam fenolik madde içeriği değerleri incelendiğinde de bu sunucun Soxhlet ekstraktları için beklenen bir sonuç olduğu görülmekle beraber, aynı durum ultrasonik dalga destekli ekstraktlar için söylenemez (Aynı çözücü sıralamasıyla Soxhlet için $1,76\pm 0,10$ - $2,12\pm 0,20$ - $1,88\pm 0,21$; Ultrasonik dalga destekli ekstraksiyon için $1,81\pm 0,11$ - $2,31\pm 0,21$ - $2,24\pm 0,17$ g GAE/100 g kuru numune). Soxhlet ekstraksiyonlarında metanol ve saf su kullanılarak elde edilen ekstraktlarda toplam

fenolik madde miktarı ile antioksidan aktivite arasındaki ilişkinin ters olduğu da göze çarpmaktadır. Yani saf su ekstraktının fenolik madde içeriği metanol ekstraktınınkinden daha yüksek iken, antioksidan aktivite değeri (burada CUPRAC) daha düşük düzeyde kalmıştır. Daha önce tartışılan DPPH yönteminde de aynı durumun ortaya çıkmış olmasına binaen, çözücülerin kaynama noktalarının farklı olması ve termal kararsızlığa sahip bileşiklerin bozunmalarının böyle bir sonuca sebep olabileceği düşünülebilecek muhtemel sebepler arasında sayılabilir.

İstatistiksel olarak ortalamaların karşılaştırılması için yapılan tek yönlü ANOVA testinde, Soxhlet ekstraktlarının CUPRAC değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmadığı ($p>0,05$), ancak ultrasonik dalga destekli ekstraktlar için karşılaştırılan ortalamaların birbirinden farklı olduğu sonucu elde edilmiştir ($p<0,05$). Yapılan “en küçük anlamlı fark” testinden, ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonlarda çözücüye göre antioksidan aktivite sıralaması en iyi değerden en düşük değere doğru şu şekilde elde edilmiştir:

Saf su > Metanol = % 50 metanol-saf su.

1) Parça Büyüklüğünün Cu-II İyonu İndirgeme Antioksidan Gücü (CUPRAC) Değerleri

Üzerine Etkisi



<125safsusox: 125 μm 'den küçük saf su Soxhlet ekstraksiyonu; >125safsusox: 125 μm 'den büyük saf su Soxhlet ekstraksiyonu; <125safsuult: 125 μm 'den küçük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu >125safsu35ult: 35 dakikalık 125 μm 'den büyük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu,

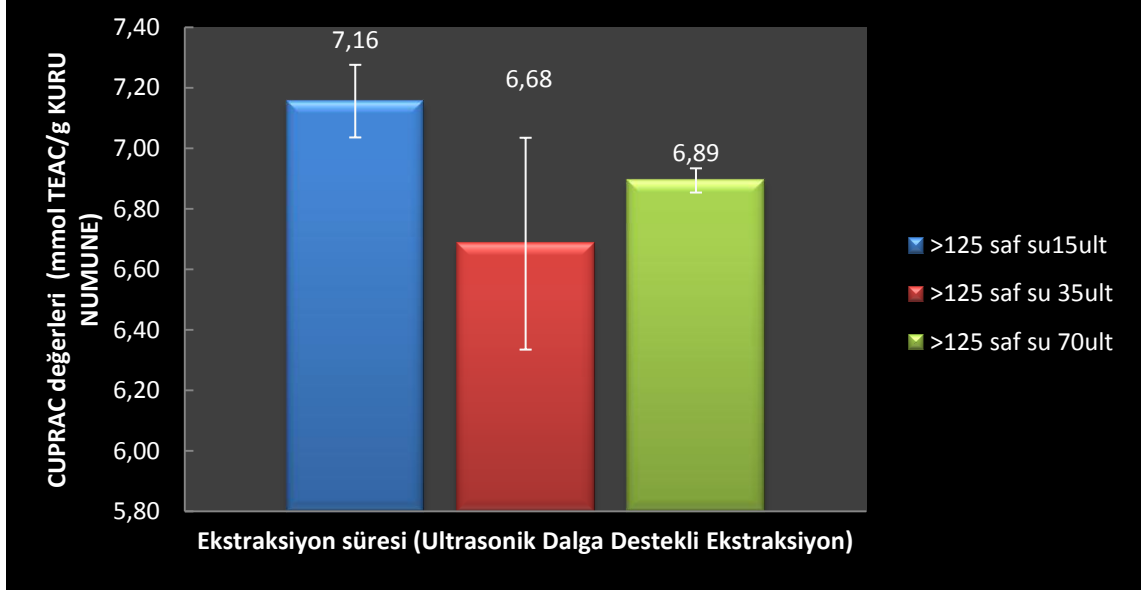
Şekil 4.34. Parçaçık büyüklüğünün CUPRAC değerlerine etkisi

Bu deneylerden elde edilen sonuçlara bakıldığında, Soxhlet ekstraktlarında parça büyüklüğü arttıkça antioksidan aktivite de artmış (<125safsusox için CUPRAC değeri $6,28 \pm 0,23$ iken, >125safsusox için $7,47 \pm 0,11$ mmol TEAC/1 g kuru numune), ultrasonik dalga destekli ekstraktlarda ise bu durumun tersi bir şekilde azalmıştır (<125safsu35ult için bu değer $8,02 \pm 0,07$ iken, >125safsu35ult için $6,69 \pm 0,35$ mmol TEAC/1 g kuru numune). Bu durum, DPPH radikal süpürme yönteminde elde edilen sonuçlarla paralellik arz etmektedir. Dolayısıyla Soxhlet ekstraktlarında parçacık boyutunda meydana gelen artışın antioksidan aktivite değerleri üzerine olumlu yansımış olması, kısım 4.3.1.2'deki yoruma benzer şekilde, termal olarak kararsız antioksidan etkili parçacıkların katı numune yapısından çözelti ortamına geçiş sürelerinin uzaması ve bu nedenle de parçalanmak için yeterli süre bulamamaları ile açıklanabilir. Ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonlarda ise parça büyüklüğünün artması ve ekstraksiyonun aynı sürede gerçekleştirilmiş olmasının, antioksidan etkili bileşiklerin katı numune yapısından çözelti ortamına geçiş zamanlarını artırarak antioksidan aktivite değerlerinin azalmasına yol açmış olma ihtimali vardır.

Yapılan anlamlılık testlerinde, her iki teknikte de ortalamalar arasında anlamlı farklılıkların olduğu bulunmuştur ($p < 0,05$). Buna göre Soxhlet ekstraksiyonunda en iyi CUPRAC değeri $125 \mu\text{m}$ 'den büyük parça boyutunda elde edilmişken, ultrasonik dalga destekli ekstraktlarda en iyi değer $125 \mu\text{m}$ 'den küçük parça boyutunda elde edilmiştir.

I) Ekstraksiyon Süresinin Cu-II İyonu İndirgeme Antioksidan Gücü (CUPRAC)

Değerleri Üzerine Etkisi



>125safsu15ult: 15 dakikalık 125 µm'den büyük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu
>125safsu35ult: 35 dakikalık 125 µm'den büyük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu ve
>125safsu70ult: 70 dakikalık 125 µm'den büyük saf su ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu,

Şekil 4.35. Ekstraksiyon süresinin CUPRAC değerlerine etkisi

Bu kısımda elde edilen sonuçlara göre, ekstraksiyon zamanının artması CUPRAC değerlerinde de azalmaya yol açmıştır. Şekil 4.35'de bu durum açıkça görülmektedir (15, 35 ve 70 dk'lık ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonlarda elde edilen CUPRAC değerleri sırasıyla $7,16 \pm 0,12$, $6,69 \pm 0,35$ ve $6,89 \pm 0,04$ dur). Bu kısımda elde edilen sonuçlar, uygulanan diğer yöntem olan DPPH radikal süpürme yöntemi ile paralellik arz etmektedir. Ancak bu durumun farklı olabileceği de unutulmamalıdır. Çünkü antioksidan tayin mekanizmalarının birbirinden farklı olduğu, bir yönteme duyarlı bileşik gruplarının diğer bir yönteme duyarlı olmayabileceği ya da deneylerdeki tasarım ve uygulama farklılıklarının incelenen aynı bir sistem için farklı sonuçlar verebileceği çeşitli araştırma gruplarınca ifade edilmektedir [46, 47].

Yapılan anlamlılık testlerinde, ekstraksiyon süresi açısından ortalamalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilememiştir ($p > 0,05$).

5. SONUÇ

L. rotundifolius. bitkisinden Soxhlet ve ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonlarla elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde içerikleri ve antioksidan aktiviteleri çeşitli yöntemlerle ölçüldü. Ayrıca ekstraktlar çözücü, parça büyüklüğü ve ekstraksiyon süresi gibi parametrelerin toplam fenolik madde ve antioksidan aktiviteyi nasıl etkilediğine ilişkin hususlar açısından da incelendiler. Elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel olarak bir fark olup olmadığı, “t istatistiği” ve “Tek Yönlü ANOVA” kullanılmak suretiyle belirlendi. Buna göre:

- Ekstraksiyon verimleri açısından çözücü metanol olduğunda Soxhlet ekstraksiyonu ultrasonik dalga destekli ekstraksiyona göre daha iyi bir değer sergilemiş ($p < 0,05$), diğer çözücülerde ise teknikler arası anlamlı bir fark gözlenemedi ($p > 0,05$).
- Ekstraksiyonların verim yüzdeleri çözücüler açısından değerlendirildiğinde de saf suyun en iyi değerleri, metanol’ün ise en düşük değerleri sergilediği belirlenmiştir ($p < 0,05$). İstatistiksel değerlendirmede ekstraksiyon verimi açısından çözücü etkinliklerinin, Soxhlet ekstraksiyonları için metanol $< % 50$ metanol-saf su $< \text{saf su}$; ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonlar için metanol $< % 50$ metanol-saf su = saf su sıralamasına göre arttığı ortaya konulmuştur. Buna göre çözücü polaritesi arttıkça, ekstraksiyon veriminin de arttığı söylenebilir.
- Parça büyüklüğünde meydana gelen artış, her iki ekstraksiyon türünde de verim değerlerinde görünüşte bir azalmaya yol açmıştır. Ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0,05$).
- Sadece ultrasonik dalga destekli ekstraksiyon uygulanarak gerçekleştirilen ekstraksiyon süresinin verim üzerine etkilerinin incelendiği deneylerde, ekstraksiyon süresinin artmasıyla ortalama verim değerlerinde hafif düşmeler meydana geldiği görülmüştür. Ancak bu farklılıklar da istatistiksel hesaplamalar sonucunda anlamlılık sergilemediler ($p > 0,05$).

- Toplam fenolik madde tayini deneylerinden elde edilen sonuçlara göre, kullanılan her üç çözücü türünde de ultrasonik dalga destekli ekstraksiyon Soxhlet ekstraksiyonuna göre daha yüksek değerler ortaya koymuştur. Ancak bu farklılıklar da istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$).
- Toplam fenolik madde içeriğinin çözücü, parça büyüklüğü ve ekstraksiyon süresine göre nasıl değiştiğinin incelendiği deneylerin sonuçlarına bakıldığında, çözücü açısından her iki ekstraksiyon tekniğinde de en iyi değerleri % 50 metanol-saf su çözücüsü sergilemiştir. Ancak bu farklılıklar anlamlı değildir ($p>0,05$).
- Parça büyüklüğünün toplam fenolik madde üzerine etkisinin incelendiği deney sonuçlarının istatistiksel analizinden Soxhlet tekniğinde anlamlı bir fark bulunamamışken ($p>0,05$), ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonda ise parçacık büyüklüğü arttıkça toplam fenolik madde miktarı da anlamlı olarak azalmıştır ($p<0,05$).
- Ekstraksiyon süresi uzadıkça toplam fenolik madde içeriği önce hafifçe azalmakta sonra da yeniden eski seviyeye ulaşmaktadır, fakat bu değişimler de anlamlı değildir ($p>0,05$).
- Ekstraktların antioksidan aktivite tayinleri iki ayrı yöntem uygulanarak gerçekleştirildi. DPPH radikal süpürme yönteminde en iyi antioksidan aktivite değerlerini, kullanılan karşılaştırma maddeleri olan BHT ve Trolox sergilemiştir. Genel olarak ultrasonik dalga destekli ekstraksiyon, Soxhlet ekstraksiyonundan daha yüksek antioksidan aktivite değerleri sergilemekle beraber, sadece çözücü metanol olduğunda elde edilen farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Diğer çözücülerde her iki teknik arasında anlamlı bir farklılık tespit edilemedi ($p>0,05$).
- DPPH radikal süpürme antioksidan aktivite değerleri mutlak sayısal değerlere bakıldığında çözücüye göre şu şekilde değişmektedir: Soxhlet ekstraktları için en iyi değer % 50 metanol-saf su karışımı kullanıldığında elde edilmiştir. Bu değeri sırasıyla metanol ve saf su izlemiştir. Ultrasonik ekstraktlarda ise en iyi sonucu saf su ekstraktı vermiş, bunu % 50 metanol-saf su ve metanol

ekstraktlarından elde değerler izlemiştir. Fakat istatistiksel olarak çözücüler açısından gözlenen farklılıklar anlamlı değildir ($p>0,05$). Yani çözücünün DPPH radikal süpürme değerleri üzerine bir etkisi olmamıştır.

- Soxhlet ekstraksiyonlarında parça büyüklüğünün artışı, DPPH radikal süpürme antioksidan aktivite değerine hafif bir artış getirmekte ancak bu istatistiki olarak anlamlı değildir ($p>0,05$). Buna karşın ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonda parçacık boyutundaki artış antioksidan aktiviteyi olumsuz yönde anlamlı olarak etkilemiştir ($p<0,05$).
- Ekstraksiyon süresinin uzamasıyla birlikte DPPH radikal süpürme değerleri önce düşmekte, sonra yükselmektedir. 15 ve 70 dk'lık ekstraksiyon süreleri 35 dk'lık ekstraksiyon süresine göre daha iyi antioksidan aktivite sergilemiştir. Bu değerler toplam fenolik madde içerik değerleri ile de uyumludur. İstatistiksel olarak da anlamlı bulunan farklılıkların değerlendirilmesi sonucu antioksidan aktivite değerleri açısından ekstraksiyon sürelerinin sıralaması en iyi değerden en düşük değere doğru aşağıdaki gibi bulunmuştur:

70 dk'lık ekstrakt > 15 dk'lık ekstrakt > 35 dk'lık ekstrakt

- Cu-II İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi (CUPRAC) deneylerinden elde edilen sonuçlara göre, çözücü olarak saf su kullanıldığında ultrasonik dalga destekli ekstraktlar daha iyi değerler ortaya koymuştur ($p<0,05$). Diğer çözücü türlerinde teknikler arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.
- Çözücünün CUPRAC değerleri üzerine etkisi incelendiğinde, Soxhlet ekstraktları arasındaki farklılıklar anlamlı bulunmazken ($p<0,05$), ultrasonik dalga destekli ekstraktların karşılaştırılan ortalama antioksidan aktivite değerleri arasında anlamlı farklılıklar bulunmuştur ($p<0,05$). Yapılan “en küçük anlamlı fark” testi sonuçlarına göre ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonlarda çözücü etkinliği aşağıdaki sıralamaya göre belirlenmiştir:

Saf su > metanol = % 50 metanol-saf su

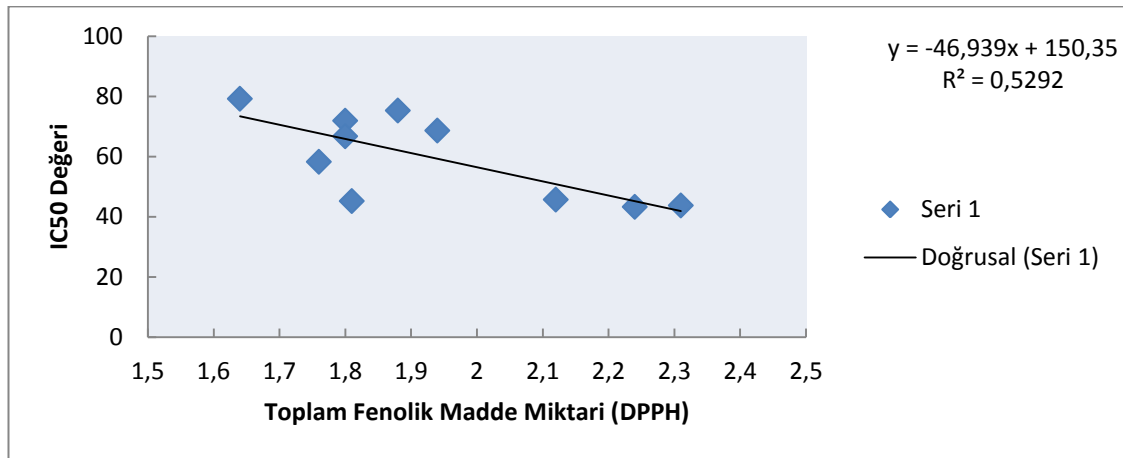
- Parça büyüklüğü arttıkça, Soxhlet ekstraktlarının CUPRAC değerleri, dolayısıyla antioksidan aktivite değerleri artmakta, ultrasonik dalga destekli

ekstraktlarda ise azalmaktadır. Her iki teknikte de elde edilen farklılıklar anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Buna göre parça büyüklüğü $< 125 \mu\text{m}$ 'den $> 125 \mu\text{m}$ 'ye çıkarıldığında Soxhlet ekstraktlarının antioksidan aktivite değerleri artmış, ultrasonik dalga destekli ekstraktlarda ise azalmıştır.

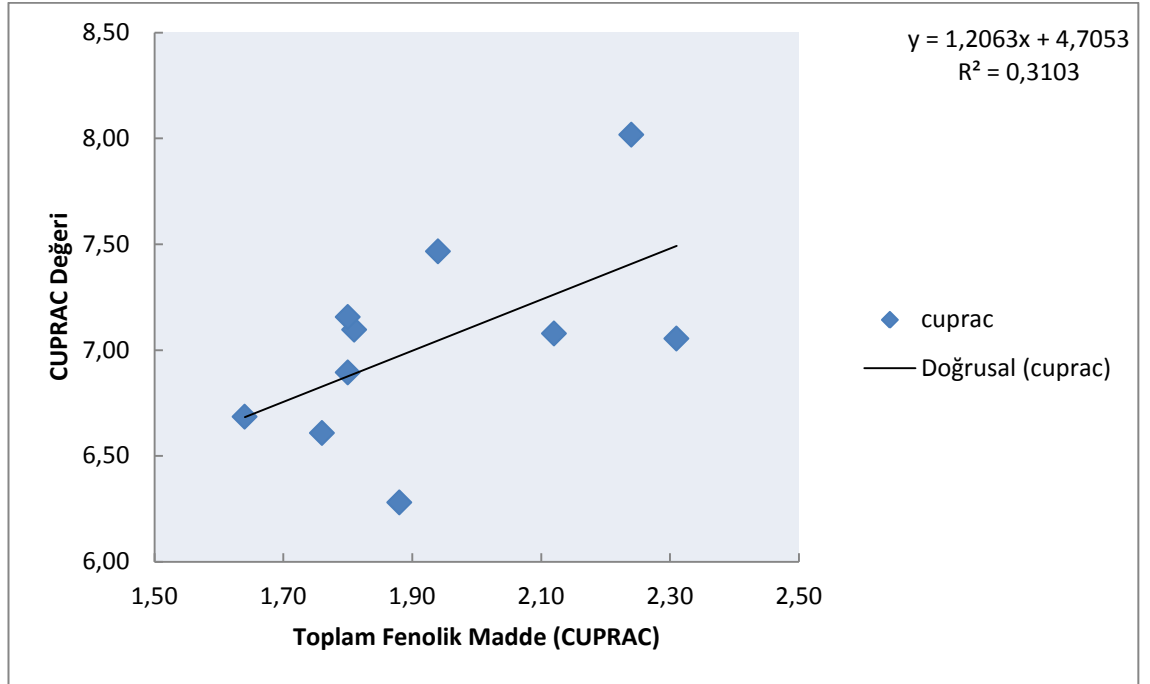
- Ekstraksiyon süresi arttıkça elde edilen CUPRAC değerleri arasında anlamlı bir farklılık gözlenememiştir ($p > 0,05$).

Bütün bu sonuçlar bir arada değerlendirildiğinde, *L. rotundifolius* bitkisinden antioksidan etkili bileşik gruplarının ekstraksiyonu için optimum ekstraksiyon şartları şu şekilde belirlenmiştir: $125 \mu\text{m}$ 'den küçük parçacık boyutu, çözücü olarak saf su ve 70 dk'lık ultrasonik dalga destekli ekstraksiyon işlemi.

Sonuçlar, değişik araştırma gruplarınca tartışma konusu yapılan toplam fenolik madde-antioksidan aktivite arasındaki ilişki açısından da değerlendirildiler. Buna göre bir grup araştırmacı, antioksidan aktivitenin toplam fenolik madde içerikleri ile doğru orantılı olduğunu iddia ediyorken [44, 45], bir diğer grup araştırmacı da, iki değişken arasında böyle bir ilişkinin olmadığını ya da en azından bu ilişkinin düşünülenenden daha karmaşık olduğunu iddia etmektedir [48, 49]. Bu ilişkiyi belirlemek amacıyla, çalışmada elde edilen toplam fenolik madde miktarlarına karşılık antioksidan aktivite değerleri hem DPPH hem de CUPRAC yöntemleri için ayrı ayrı çizilmiş ve aşağıda verilmiştir.



Şekil 5.1. Toplam fenolik madde ile antioksidan aktivite arasındaki ilişki (DPPH)



Şekil 5.2. Toplam fenolik madde ile antioksidan aktivite arasındaki ilişki (CUPRAC)

Şekil 5.1. ve Şekil 5.2'deki grafiklerden, oldukça düşük korelasyon katsayısı değerleri (sırasıyla 0,5292 ve 0,3103) elde edildiğinden, DPPH ve CUPRAC testlerinden elde edilen antioksidan aktivite değerlerinin toplam fenolik madde içerikleri ile doğrusal bir ilişki içinde olduğunu söylemek zordur. Elde edilen bu sonuç, toplam fenolik madde ile antioksidan aktivite arasındaki ilişkinin doğrusal olmadığını ya da bunun daha karmaşık bir durum arzettiğini ifade eden araştırmacıların görüşlerini destekler niteliktedir [48, 49].

6. KAYNAKLAR

- [1] Serpil E., vd., 2006 Examination Of Free Radical Metabolism And Antioxidant Defence System Elements In Patients With Obsessive–Compulsive Disorder Progress In Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry 30 1039–1042.
- [2] Migliore, L., Coppedè F., 2009 Environmental-Induced Oxidative Stress In Neurodegenerative Disorders And Aging Mutation Research 674 73–84
- [3] Bulkley, G.B., 1987 Radical-Mediated Reperfusion Injury: A Selective Review. 55; 66-73.
- [4] Scott, M.D., *et al*, 1989, Enhancement Of Erythrocyte Superoxide Dismutase Activity: Effects On Cellular Oxidant Defense. Blood ;74; 2542–2549.
- [5] Omarma, A., *et al*, 2004 Pathological Roles Of Reactive Oxygen Species And Their Defence Mechanisms. Saudi Pharm J;12:1–18.
- [6] Çimen, M.Y. B., 2008 Free Radical Metabolism In Human Erythrocytes Clinica Chimica Acta 390 1–11.
- [7] Yan, E., B., *et al*, 2005 Novel Method For In Vivo Hydroxyl Radical Measurement By Microdialysis In Fetal Sheep Brain In Utero. J Appl Physiol;98:2304–10.
- [8] Akkuş, İ., 1995 Serbest Radikaller Ve Fizyopatolojik Etkileri. Konya: Mimoza Yayıncılık.
- [9] Karadağ A., vd., 2009 Review Of Methods To Determine Antioxidant Capacities Food Anal. Methods 2:41–60.
- [10] Cui, K., *et al*, 2004. Role Of Oxidative Stress In Neurodegeneration: Recent Developments In Assay Methods For Oxidative Stress And Nutraceutical Antioxidants. Progress In Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry, 8, 771–799.
- [11] Gündüz, K., vd., 2004, Erythrocyte Superoxide Dismutase, Catalase Activities

And Plasmanitrite And Nitrate Levels In Patients With Behçet Disease And Recurrent Aphthous Stomatitis. *Clin Exp Dermatol*;29:176–179.

- [12] Goth, L., A., 1991 Simple Method For Determination Of Serum Activity And Referance Range. *Clin. Chem. Acta.*,196;143-152.
- [13] Rumley, A., G., Paterson J.,R., 1998, Analitical Aspects Of Sntioxidant And Free Radical Activity In Clinical Biochemistry. *Ann. Clin. Biochem.* 35;181-200.
- [14] Leninger, A., *et al*, 1993 Principles Of Biochemistry. 2th Edition Work Publishers, New York; 712-724.
- [15] Morris, P., Bernard, G., 1994 Significance Of Glutathione In Lung Diseaseand Implications For Therapy. *Am J Med Sci*;307(2);119-127.
- [16] Meister, A., 1988, Glutathione Metabolizm And Its Selective Modifcation. *J Biol Chem.*; 263(33);17205-17208.
- [17] Taniguchi, N., *et al*, 1989 Glutathione Centennial:Molecular Perspektives And Clinical Implications. Academic Press. Inc., Diego, California.
- [18] Carr, A., Frei B., 2000 The Role Of Natural Antioxidants In Preserving The Biological Activity Of Endothelium-Derived Nitric Oxide. *Free Radic Biol Med.* ;28(12):1806-14.
- [19] Stocker, R, Keaney, J., F., Jr. 2004, Role Of Oxidative Modifications In Atherosclerosis. *Physiol Rev.* ;84(4):1381-478.
- [20] Frei, B., 1999, On The Role Of Vitamin C And Other Antioxidants In Atherogenesis And Vascular Dysfunction. *Proc Soc Exp Biol Med.*;222(3):196-204.
- [21] Cadenas, E., Packer, L., 2002, “Handbook Of Antioxidants”, Marcel Dekker, Second Edition”, New York, 0-8247-0547-5.
- [22] Güneş, F., 2006, The Etnobotanycal Importance Of Lathyrus Species Proceedings Of The 4th International Congress Of Ethnobotany (Iceb 2005) Ege Yayınları,

P,585-588,İstanbul Turkey.

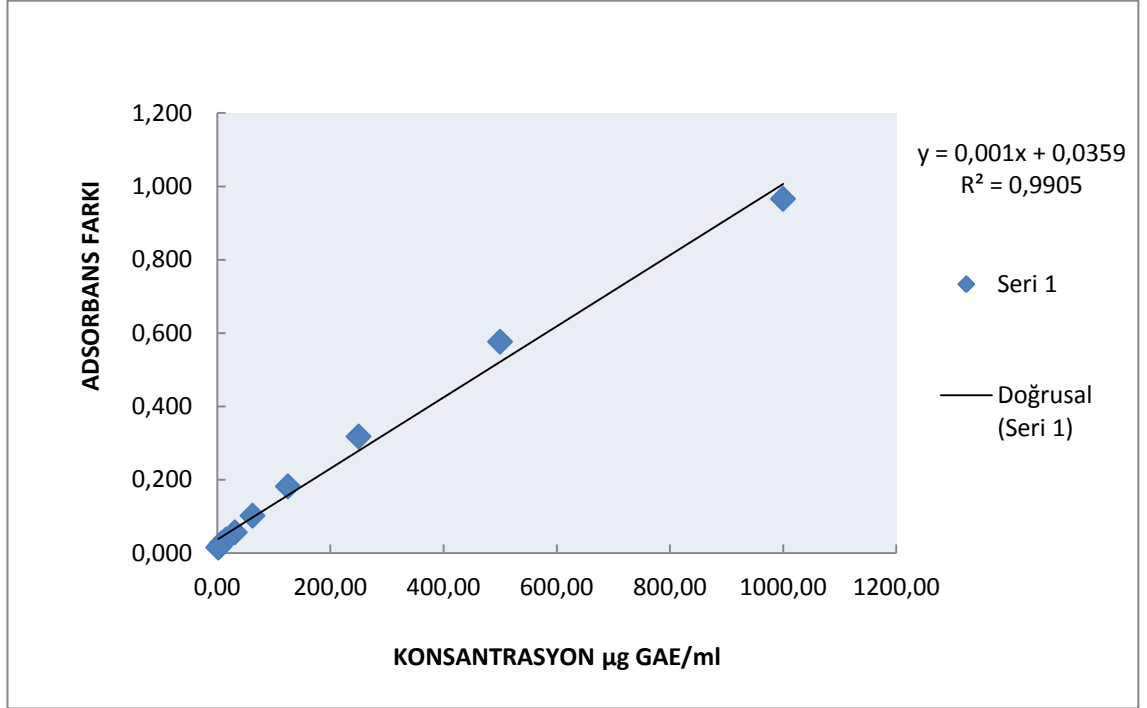
- [23] Davis, P.H., 1970 *Lathyrus* L. In: Davis, P.H. (Ed.), Flora Of Turkey, 3. University Press, Edinburg.
- [24] Davis, P. H., 1972, Flora Of Turkey And The East Aegean Islands, Vol. 4, University Pres, Edinburgh, Pp: 8.
- [25] De Castro, M.D. L., Priego-Capote, F., 2010, Soxhlet Extraction: Past And Present Panacea Journal Of Chromatography A, 1217 2383–2389.
- [26] Priego-LoPez, E., *et al*, 2003 Focused Microwave-Assisted Soxhlet Extraction: An Expeditive Approach For The Isolation Of Lipids From Sausage Products Food Chemistry 83, 144.
- [27] Soxhlet, F. 1879, Die gewichtsanalytische Bestimmung Des Milchfettes, Polytechnisches J. (Dingler's) 232, 461.
- [28] Mason, T.J., *et al*, 1996, The Uses Of Ultrasound In Food Technology. Ultrasonic Sonochemistry, 3, 253-260.
- [29] Liang, H., 1993 Modeling Of Ultrasound Assisted And Osmotically Induced Diffusion In Plant Tissue. Phd Dissertation, Purdue University, Indiana, Us.
- [30] Mulet, A., *et al*, 1999. Ultrasonic Mass Transfer Enhancement In Food Processing. In: Proceedings Of 6th Conference Of Food Engineering Aiche Annual Meeting, G. Barbosa-Canovas And Sp Lombardo (Eds.), Pp. 74–85, Dallas.
- [31] Chemat, S., *et al*, 2004, Comparison Of Conventional And Ultrasound-Assisted Extraction Of Carvone And Limonene From Caraway Seeds, Flavour And Fragrance Journal, 19, 188–195.
- [32] Mason, T.J., 1998, Power Ultrasound In Food Processing. The Way Forward. In: Ultrasound In Food Processing, Mjw Povey And Tj Mason (Eds), Pp.105-126, Chapman & Hall, London.

- [33] Vinatoru, M., 2001, An Overview Of The Ultrasonically Assisted Extraction Of Bioactive Principles From Herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8, 303–313.
- [34] Wang, J., *et al*, 2008. Optimization Of Ultrasound-Assisted Extraction Of Phenolic Compounds From Wheat Bran. *Food Chemistry*, 106, 804-810.
- [35] Wang L., And Curtis, L. Weller 2006 Recent Advances In Extraction Of Nutraceuticals From Plants, *Trends In Food Science & Technology* 17, 303.
- [36] Vinatoru, M., *et al*, 1999. Ultrasound-Assisted Extraction Of Bioactive Principles From Plants And Their Constituents, In *Advances In Sonochemistry*, Mason Tj (Ed), Volume 5, Jai Press, Uk, Pp. 209–248.
- [37] Prior, R.L., *et al*, 2005, “Standardized Methods For The Determination Antioxidant Capacity And Phenolics In Foods And Dietry Supplements”, *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 53(8), 3110-3113.
- [38] Sanchez, M., C., *et al*, 1998, “A Procedure To Measure The Antiradical Efficiency Of Polyphenols”, *Journal Of The Science Of Food And Agriculture*, 76, 270-276.
- [39] Apak, R., vd., 2008, Mechanism Of Antioxidant Capacity Assays And The Cuprac (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity) Assay *Microchim Acta*; 160: 413–419.
- [40] Apak, R., vd., 2005, Total Antioxidant Capacity Assay Of Human Serum Using Copper(II)- Neocuproine As Chromogenic Oxidant: The Cuprac Method *Free Radical Research*, September; 39(9): 949–961.
- [41] Slinkard, K., Singleton, V. L., 1977, “Total Phenol Analysis: Automation And Comparison With Manual Methods”, *American Journal Of Enology And Viticulture*, 28, 49–55.
- [42] Cuendet, M., *et al*, 1997, Iridoid Glucosides With Free Radical Scavenging Properties From *Fragraea Blumei*, *Helvetica Chimica Acta*, 80 (4), 1144-52.
- [43] Tura, D., Robards, K., 2002, Sample Handling Strategies for the Determination of

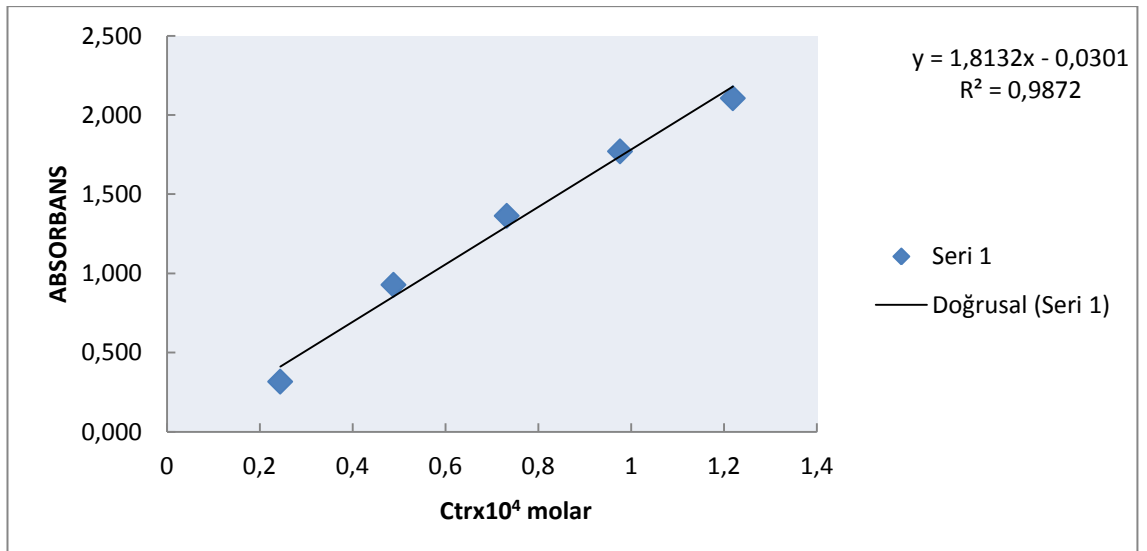
Biophenols in Food and Plants, *Journal of Chromatography A*, 975, 71–93.

- [44] Alaşalvar, C., *et al*, 2005, Compositional Characteristics and Antioxidant Components of Cherry Laurel Varieties and Pekmez, *Journal of Food Science*, 70 (1), S47-S52.
- [45] Tawaha, K., *et al*, 2007, Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Selected Jordanian Plant Species, *Food Chemistry*, 104, 1372–78.
- [46] Koleva, I.I., *et al*, 2002, Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: A Comparative Study on Three Testing Methods, *Phytochem. Anal.*, 13 (1), 8-17.
- [47] Antolovich, M., *et al*, 2002 Methods for Testing Antioxidant Activity, *Analyst*, 127: 183-198.
- [48] Khamsah, S.M., *et al*, 2006, Antioxidant Activity and Phenolic Content of *Orthosiphon Stamineus* Benth from Different Geographical Origin, *Journal of Sustainability Science and Management*, 1 (2), 14-20.
- [49] Muchuweti, M., *et al*, 2006, Total phenolic content and antioxidant activity in selected medicinal plants of Zimbabwe, *International Journal of Food Science & Technology*, 41 (1), 33-38.

7. EK ŞEKİLLER



Ek şekil 1. Toplam fenolik madde tayini için kullanılan kalibrasyon grafiği



Ek şekil 2. Cu-II İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi (CUPRAC) için kullanılan kalibrasyon grafiği

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı :Kadir TEPEBAŞ

Doğum Yeri :Arpaçay

Doğum Tarihi : 19/09/1984

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Kars Alpaslan lisesi (1999-2002)

Lisans : Kars Kafkas Üniversitesi (2004-2008)

Yüksek Lisans: Kars Kafkas Üniversitesi fen bilimleri Enstitüsü(2009-)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Akyaka İMKB lisesi KARS (2008-2009),

Pendik Faruk Nafiz Çamlıbel lisesi İstanbul (2008-2009)

Yayınları (SCI ve diğer)

1. Akdeniz, F., Dursun, İ., Tepebaş, K., Özbay H., Kekekeç, L., Yıldız, S.,“Kurutulmuş *Diospyros lotus* L. Meyvelerinden Farklı Tekniklerle Elde Edilen Ekstraktların Toplam Fenolik Madde ve Antioksidan Aktiviteleri Açısından Karşılaştırılması” XXIV. *Ulusal Kimya Kongresi*, Zonguldak, (2010).
2. Tepebaş, K., Akdeniz, F., Dursun, İ., “*Lathyrus Rotundifolius* Willd. Bitkisinden Elde Edilen Ekstraktların Toplam Fenolik Madde ve Antioksidan Aktivite Değerlerinin Tayini” XI. *Analitik Kimya kongresi*, Hatay, (2012)

3. Filiz, P., Çavlan, L., Arı, L., Samancı, Ö., Tepebaş, K., Dursun, İ., Vural, N., Biçil, M., Akdeniz, F., “Tırşik Otondan (*Arum dioskoridis Sm*) Elde Edilen Ekstrakların Fenolik Madde İçeriğinin Ve Antioksidan Aktivitelerinin Tayini” *XI. Analitik Kimya kongresi, Hatay, (2012)*

4. Akdeniz, F., Dursun, İ., Tepebaş, K., Şuekinçi, D., “Determination And Comparison Of Antioxidant Activities Of The Extracts From Dried Fruits Of *Laurocerasus Officinalis* Roem. Via Different Extracıon Techniques”, *ISOPS10th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (Book Of Abstracts), Ankara, Turkey, (2012).*