

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

***Butomus umbellatus.L ve Sparganium emersum* Rehmman
EKSTRAKTLARININ ANTIOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN TAYİNİ VE
FENOLİK ASİT İÇERİKLERİNİN HPLC-UV İLE ANALİZİ**

**İnan DURSUN
YÜKSEK LİSANS TEZİ**




**DANIŞMAN
Doç. Dr. Fikret AKDENİZ**

**OCAK – 2011
KARS**

T.C. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü KİMYA Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi İnan DURSUN' un Doç. Dr. Fikret AKDENİZ'in danışmanlığında yüksek lisans tezi olarak hazırladığı "***Butomus umbellatus.L ve Sparganium emersum Rehmann EKSTRAKLARININ ANTIOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN TAYİNİ VE FENOLİK ASİT İÇERİKLERİNİN HPLC-UV İLE ANALİZİ***" adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oybirliği.....ile kabul edilmiştir.

14/04/2011

Adı soyadı
Başkan : Doc. Dr. Fikret AKDENİZ
Üye : Doc. Dr. Hanife ÖZBAY
Üye : Yrd. Doc. Dr. Zafer OCAK

İmza




Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun/...../2011 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 sulak alanlarda yetişen iki su bitkisi olan *Butomus umbellatus*.L ve *Sparganium emersum* Rehmman ın farklı çözücü ortamında, yeni bir ekstraksiyon tekniği olan Ultrasonik Banyo ekstraksiyon tekniği kullanılarak ekstraktları elde edilmiş ve bu ekstraktların toplam fenolik içerikleri, antioksidan kapasiteleri tayin edilmiştir. Ayrıca ekstraktların fenolik asit içerikleri de HPLC-UV-DAD tekniği kullanılarak belirlenmiştir.

Bu tez çalışmasına katkıda bulunan başta danışman hocam Doç.Dr.Fikret AKDENİZ'e teşekkürlerimi sunarım. Yine bu çalışmada emeği geçen ve Ultrasonik Banyo sistemini bizden esirgemeyen Prof.Dr.İsmail ÇAKMAK'a, ultraviyole spektrofotometre ölçümlerinin alınmasında Prof.Dr. Haydar YÜKSEK'e, bitkilerin tanı, teşhis ve toplanmasında Doç.Dr. Hanife ÖZBAY'a, HPLC-UV-DAD ölçümlerinde bize yardımcı olan Doç.Dr.Murat KÜÇÜK'e, arşivindeki resimleri bizimle paylaşan Yrd.Doç.Dr Fatma GÜNEŞ'e, UV-spektrofotometre ölçümlerinin alınmasında yapmış olduğu katkılardan dolayı Arş.Gör. Onur AKYILDIRIM'a, HPLC-DAD deneylerinde emeği geçen, Arş.Gör Nesibe ARSLAN BURNAZ'a, doktora öğrencisi Zeynep İSKEFİYELİ'ye, yüksek lisans öğrencisi Kadir Tepebaş'a ve yüksek lisans öğrencisi Sezgin AYDEMİR'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bu çalışmada benim için maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve zaman ayıran değerli aileme, öncelikle annem Hatice DURSUN'a, babam İlhan DURSUN'a, kardeşim Sinan DURSUN'a ve kız kardeşim Hilal DURSUN'a teşekkürlerimi sunarım.

Ocak - 2011

İnan DURSUN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	IV
İÇİNDEKİLER	V
ÖZET	VII
SUMMARY	VIII
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	IX
ŞEKİLLER	XI
RESİMLER DİZİNİ	XV
ÇİZELGELER	XVI
1. GİRİŞ	1
2 GENEL BİLGİLER	3
2.1. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres	3
2.2. Oksijen ve Özellikleri	5
2.3. Reaktif Oksijen Türleri (ROT)	6
2.3.1. Süperoksit Radikali (O_2^-)	7
2.3.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	8
2.3.3. Hidroksil Radikali (OH^\cdot)	9
2.4. Antioksidanlar	10
2.5. Antioksidant Türleri	14
2.5.1. Yapay Antioksidanlar	14
2.5.2. Doğal Antioksidanlar	17
2.5.2.1. C-Vitamini (Askorbik Asit)	17
2.5.2.2. Tokoferoller	17
2.5.2.3. Flavonoidler	19
2.5.2.4. Fenolik Asitler	22
2.5.2.5. Fenolik Polimerler (Tanenler)	24
2.5.2.6. Karotenoidler	25
2.6. Bitki Ekstraktlarının Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Bazı Yöntemler	25
2.6.1. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Radikal Giderme Yöntemi	25
2.6.2. ORAC Oksijen Radikali Absorbans Kapasitesi Yöntemi	27
2.6.3. ABTS Yöntemi / TEAC (Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi)	27
2.6.4. β -Karoten/Linoleik Asit Model Sistemi	28
2.6.5. FRAP (Demir (III) İndirgeme Antioksidan Gücü) Metodu	28
2.6.6. Cu(II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi (CUPRAC) Yöntemi	29
2.6.7. Folin Ciocalteu (FC) Metodu: Toplam Fenolik Madde Tayini Metodu	33
2.7. Yüksek-Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	34
2.8. Antioksidan Madde Ekstraksiyonu İçin Kullanılan Teknikler	37
2.8.1. Sıvı Çözücü Ekstraksiyonları	37
2.8.1.1. Soxhlet Ekstraksiyonu	38
2.8.1.2. Basınçlı Çözücü Ekstraksiyonu ve Uygulamaları	39
2.8.2. Katı-Faz Ekstraksiyonları	41
2.8.3. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu	42

2.8.4.	Ultrasonik Ekstraksiyon Tekniği	43
2.9.	Ultrasonik Ekstraksiyonun Fenolik bileşiklere Uygulanması [Literatür Taraması]	47
2.10.	Çalışma Materyalleri Hakkında Botanik Bilgi	50
3.	DENEYSEL ÇALIŞMALAR	54
3.1.	Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar	54
3.1.1.	Deneysel Çalışmalarda Kullanılan kimyasallar	54
3.1.2.	Deneysel Çalışmalarda Kullanılan cihazlar	54
3.2.	Numune Hazırlama	54
3.3.	Ekstraksiyon Deneyleri (Ultrasonik Banyo Ekstraksiyonu)	55
3.4.	Toplam Fenolik Madde ve Antioksidan Aktivite Tayini Deneyleri	56
3.4.1.	Folin-Ciocalteu Yöntemiyle Toplam Fenolik Madde Tayini	56
3.4.2.	DPPH(2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini	57
3.4.3.	CUPRAC (Bakır(II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasite) Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini	58
3.4.4.	HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) Yöntemiyle Ekstraktların Fenolik Asit İçeriklerinin Belirlenmesi	59
3.4.4.1.	RP-HPLC-UV-DAD Koşulları	59
3.4.4.2.	Standartlar ve Kalibrasyon	60
4.	BULGULAR ve TARTIŞMA	62
4.1	Yapılan Ekstraksiyonların Verim Yüzdeleri	62
4.2	Toplam Fenolik Madde Tayini Deneylerinden Elde Edilen Bulgular	64
4.3	DPPH Radikal Giderme Antioksidan Aktivite Tayini Deneylerinden Elde Edilen Bulgular	66
4.4.	Bakır (II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi (CUPRAC) Deneylerinden Elde Edilen Sonuçlar	70
4.5.	RP-HPLC-UV-DAD Analizlerinden Elde Edilen Bulgular	72
4.5.1.	Standartlar ve Kalibrasyon	72
4.5.2.	Ekstraktların RP-HPLC-UV-DAD Analizi İçin Seyreltilmeleri	73
4.5.3.	Ekstraktlardan Fenolik Asitlerin Sıvı-Sıvı Seçimli Ekstraksiyonu	73
4.5.4.	RP-HPLC-UV-DAD Koşulları	73
4.5.5.	RP-HPLC-UV-DAD Metod Geliştirme	75
5.	TARTIŞMA ve SONUÇ	87
6.	KAYNAKLAR	91
7.	EKLER	101
ÖZGEÇMİŞ		

ÖZET

Bu çalışmada, Kars ili ve çevresinde yetişen iki su bitkisi olan *Butomus umbellatus*.L ve *Sparganium emersum* Rehmman bitkilerinden, ultrasonik banyo ekstraksiyonu tekniği kullanılarak ekstraktlar elde edildi. Ekstraksiyonlarda parçacık boyutu 125 µm-250 µm olan numuneler ve metanol, % 70 metanol- saf su (v/v), % 50 metanol- saf su (v/v) çözücülerini kullanıldı. Ekstraktların toplam fenolik madde içerikleri Folin-Ciocalteu metoduna göre belirlendi. Antioksidan aktiviteleri DPPH serbest radikal giderme antioksidan aktivitesi ve CUPRAC Bakır(II) indirgeyici antioksidan kapasite yöntemiyle tayin edildi. Ekstraktlar RP-HPLC-UV-DAD analizi ile fenolik madde içerikleri açısından incelendi.

Butomus umbellatus.L ve *Sparganium emersum* Rehmman bitkilerinin metanollü ekstraktlarında toplam fenolik içeriğinin, diğer çözücülerle elde edilen ekstraktlara göre düşük olduğu belirlendi. Metanolde su oranı artıka genel olarak iki bitki içinde ekstrakte edilebilen toplam fenolik içeriğinin arttığı belirlenmiştir. Tüm ekstraktlar DPPH serbest radikal giderme aktivitesinde kullanılan karşılaştırma maddeleri olan Butillenmiş hidrokstitoluen (BHT) ve Trolox'dan daha düşük aktivite sergilediler. *Butomus umbellatus*.L bitkisine ait ekstraktların CUPRAC değerleri ile bu bitkinin toplam fenolik içerikleri karşılaştırıldığında bir paralellik olduğu görülmektedir. Ancak bu bitkiye ait ekstraktların Bakır-II iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi (CUPRAC) değerleriyle, DPPH radikal giderme aktivitelerinin düşük olduğu belirlendi. *Sparganium emersum* Rehmman bitkisine ait ekstraktların CUPRAC değerleri ile bu bitki için DPPH radikal giderme aktivitelerinin karşılaştırıldığında bir paralellik olduğu görüldü. Fakat *Sparganium emersum* Rehmman bitkisine ait ekstraktların CUPRAC değerleri ile bu bitkinin için elde edilen toplam fenolik madde içeriklerinin düşük olduğu bulundu. RP-HPLC-UV-DAD analizlerine göre tüm ekstraktların Fenolik asit içerdikleri tespit edilmiştir. Tayini yapılan fenolik asitler içinde miktar olarak en yüksek değerin Gentisik asite ait olduğu belirlendi.

2011, 133 SAYFA

Anahtar Kelimeler *Butomus umbellatus*.L, *Sparganium emersum* Rehmman, ultrasonik banyo ekstraksiyonu, toplam fenolik madde tayini, antioksidan aktivite tayini, RP-HPLC-UV-DAD analizi, fenolik asitler

SUMMARY

In this study, extracts were obtained from dried and ground samples of two aquatic plants, *Butomus umbellatus*.L and *Sparganium emersum* Rehmman, which were naturally grown in Kars province of Turkey, by using ultrasound-assisted extraction technique. In the extractions, particle size of the samples used was adjusted to the range of 125- 250 μm , and methanol, and methanol-water mixtures (70 % and 50 % respectively, by volume, v/v) were used as the extraction solvents. Total phenolic contents of the extracts were determined according to the Folin-Ciocalteu's method. Antioxidant activities of the extracts were determined by using DPPH free radical scavenging antioxidant activity, and CUPRAC cupric ion reducing antioxidant capacity methods, respectively. RP-HPLC-UV-DAD analysis was also performed to find out phenolic contents of the extracts. Total phenolic contents of methanolic extracts for both plants were found to be lower than those of methanol- water mixtures extracts. While the water content of the mixtures was getting increased, extractable phenolic content for both plants was also getting increased. In DPPH assay, all extracts showed lower radical scavenging activity in comparison with those of Butylated hydroxytoluene (BHT), and Trolox. CUPRAC, and total phenolic content values of the extracts obtained from *Butomus umbellatus*.L were in accordance with each other, but their CUPRAC, and DPPH values were found to be lower than those of *Sparganium emersum* Rehmman It was also found out that there was a parallellism between CUPRAC and DPPH values of the *Sparganium emersum* Rehmman extracts, but for these extracts, CUPRAC, and total phenolic content values were found to be lower than those of *Butomus umbellatus* L. According to the RP-HPLC-UV-DAD analyses, all extracts contain ferrulic acid. Primarily, in the extracts from *Butomus umbellatus* L., gentisic acid was determined at the highest concentration among the phenolic acids studied.

2011, 133 PAGE

Key Words *Butomus umbellatus*.L, *Sparganium emersum*,ultrasonic bad extraction total phenolic substance determine antioxidant activity determine, RP-HPLC-UV-DAD analysis, phenolic acids

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABTS	:2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiyazoline-6-sulfonik asit) radikali
ACN	Asetonitril
BHA	:Bütillenmiş hidroksi anisol
BHT	:Bütillenmiş hidroksi toluen
BÇE	: Basınçlı çözücü ekstraksiyonu
BSS	:Bağıl standart sapma
%BSS	:Yüzde bağıl standart sapma
BUM	:Butomus umbellatus L-ultrasonik banyo-Metanol ekstraktı
BU%50M	:Butomus umbellatus L- ultrasonik banyo-% 50 metanol saf su (v/v) ekstraktı
BU%70M	:Butomus umbellatus L- ultrasonik banyo-% 70 metanol saf su (v/v) ekstraktı
CL	:Kemiluminesans
CUPRAC	:Cu-II iyonu indirgeme antioksidant kapasitesi
Cu-II-Nc	:Cu-II-neokuproin reaktifi
DNA	:Deoksiribonükleik Asit
DPPH	:2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil
EC ₅₀ (IC ₅₀)	:Baslangıçtaki DPPH konsantrasyonunu yarıya düşürmek için gerekli olan antioksidant ekstraktı konsantrasyonu (genellikle µg/ml)
FC	:Folin-Ciocalteu
FRAP	:Fe-III iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi
GA	:Gallik asit
GAE	:Gallik asit eşdeğeri
GC	:Gaz kromatografisi
HAT	:Hidrojen atom transferi
HCl	:Hidroklorik asit
HCOOH	:Formik asit
HPLC	:Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HPLC-UV	:Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi ile Birleştirilmiş Ultra Viole Spektrofotometrisi
H ₃ PO ₄	:Fosforik asit
RP-HPLC-UV-DAD	:Ters Faz Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi -Ultra Viole Spektrofotometre ve DAD (Diode array detectors) dedektörü bağlı cihaz.
LDL	:Düşük yoğunluklu lipoprotein
% I	:Radikal giderme yüzdesi
KMBA	:Ketomethiobutirik asit
MeOH	:Metanol
Nc	:Neocuproin (2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline)
ORAC	:Oksijen radikal absorbans kapasitesi
PG	:Propil gallat
SA	:Süperkritik akışkan
SAE	:Süperkritik akışkan ekstraksiyonu
SE%50M	:Sparganium emersum-ultrasonik banyo-% 50 metanol-saf su (v/v) ekstraktı
SE%70M	:Sparganium emersum-ultrasonik banyo-% 70 metanol-saf su (v/v)

	ekstraktı
TBHQ	:Tersiyer butil hidrokinon
TEAK	:Troloks eşdeğer antioksidan kapasitesi
TOCS	:Toplam oksidan yakalama aktivitesi
TPTZ	:2,4,6-tri[2-pridil]-s-triazin
TROLOX	: 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametil-kroman-2-karboksilik asit
UV	: Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Moleküler oksijenin elektron yapısı	5
Şekil 2.2.	Delta ve sigma oksijenin moleküler elektron yapısı	6
Şekil 2.3	Butillenmiş hidroksi anisol (BHA)'nın kimyasal yapısı	15
Şekil 2.4.	2,6-di-ter-butil-p-hidroksitoluen (BHT) 'nın kimyasal yapısı.	15
Şekil 2.5.	ter-butil-hidroksikinon (TBHQ)'nın kimyasal yapısı.	16
Şekil 2.6.	Propil gallat (PG)'ın kimyasal yapısı	17
Şekil 2.7.	Askorbik asidin yapısı (vitamin C)	17
Şekil 2.8.	Tokoferol ve tokotrienollerin genel yapıları.	18
Şekil 2.9.	(a)Flavonoidlerin genel yapısı ve (b) Bazı önemli flavon ve flavonoller.	19
Şekil 2.10.	Benzoik asit türevi bazı fenolik asitler.	22
Şekil 2.11.	Sinnamik asit türevi bazı fenolik asitler	23
Şekil 2.12.	Fenolik polimerlerin yapısı	24
Şekil 2.13.	β -karotenin yapısı	25
Şekil 2.14.	DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikalinin yapısı.	26
Şekil 2.15.	Antioksidan-DPPH radikali tepkime mekanizması	26
Şekil 2.16.	ABTS. ⁺ katyonunun yapısı	28
Şekil 2.17.	FRAP reaktifi ile antioksidan bileşik arasındaki etkileşim.	29

Şekil 2.18.	Cu(II)' nin antioksidan madde ile Cu (I)' e indirgemesi	30
Şekil 2.19.	HPLC cihazı akış şeması.	34
Şekil 2.20	BÇE cihazının kısımlarının şeması	41
Şekil 2.21	Toplanan ekstraktın doğrudan analiz sistemine verilmediği (off line) tipte bir SFE sistem için bir akış düzeni	43
Şekil 2.22	Kavitasyon kabarcıklarının oluşumu	45
Şekil 4.1.	Ekstraksiyonlardan elde edilen verim yüzdeleri	63
Şekil 4.2.	Toplam fenolik madde tayini için kullanılan kalibrasyon grafiği	64
Şekil 4.3.	Ekstraktların karşılaştırmalı toplam fenolik madde içerikleri	65
Şekil4.4.	<i>Sparganium emersum</i> bitkisinin ultrasonik banyo ekstraktlarının ve karşılaştırma maddelerinin farklı konsantrasyonlarının DPPH radikalini temizleme yüzdeleri.	67
Şekil.4.5.	<i>Butomus umbellatus.L</i> bitkisinin ultrasonik banyo ekstraktlarının ve karşılaştırma maddelerinin farklı konsantrasyonlarının DPPH radikalini temizleme yüzdeleri.	67
Şekil4.6.	<i>Butomus umbellatus.L</i> ve <i>Sparganium emersum</i> bitkilerine ait ultrasonik banyo ekstraktların ve karşılaştırma maddelerinin DPPH radikalini giderme konsantrasyonları (% IC ₅₀ değerleri)	68
Şekil 4.7.	CUPRAC deneylerinde kullanılan, Trolox standardı ile elde edilen kalibrasyon grafiği ($\lambda=450$ nm)	70
Şekil. 4.8.	<i>Butomus umbellatus.L</i> ve <i>Sparganium emersum</i> bitkilerine ait ekstraktların CUPRAC değerinin (mg TEAK/100g kuru numune) karşılaştırılması	71
Şekil 4.9.	HPLC-UV-DAD tarafından 280 nm de fenolik standartların piklerinin analizi için elde edilen kromatogramlar.	75
Şekil 4.10.	HPLC-UV-DAD ile 280 nm de BUM'e ait kromatogramlar	77
Şekil 4.11.	HPLC-UV-DAD tarafından 280 nm'de 15 fenolik maddelerin standartlarının seçimli ekstraksiyon yapılmadan önceki	78

kromatogramları.

Şekil 4.12.	HPLC-UV-DAD tarafından 280 nm'de 15 fenolik maddenin standartları seçimli ekstraksiyon yapıldıktan sonra piklerinin analizi için elde edilen kromatogramlar.	78
Şekil 4.13.	HPLC-UV-DAD tarafından 280 nm'de (a) iç standartsız, (b) ve (c) iç standart eklemeli ekstraktların seçimli ekstraksiyon sonrası BUM'a ait kromatogramları	81
Ek Şekil 1	Gallik asitin kromatogramı ve maksimum dalga boyu(274 nm)	101
Ek Şekil 2.	Protokatekuik asit kromatogramı ve maksimum dalga boyu(260nm)	101
Ek Şekil 3.	Protokatekualdehit kromatogramı ve maksimum dalga boyu(280 nm)	101
Ek Şekil 4.	Gentisik asit kromatogramı ve maksimum dalga boyu(324 nm)	102
Ek Şekil 5.	p-hidroksi benzoik asit kromatogramı ve maksimum dalga boyu(260 nm)	102
Ek Şekil 6.	Vanillik asit kromatogramı ve maksimum dalga boyu(260 nm)	102
Ek Şekil 7	Klorojenik asit. kromatogramı ve maksimum dalga boyu(324 nm)	103
Ek Şekil 8.	Kafeik asit kromatogramı ve maksimum dalga boyu(324 nm)	103
Ek Şekil 9.	Siringik asit kromatogramı ve maksimum dalga boyu(274 nm)	103
Ek Şekil 10.	Vanilin kromatogramı ve maksimum dalga boyu(280 nm)	104
Ek Şekil 11.	Siringaldehit kromatogramı ve maksimum dalga boyu(274 nm)	104
Ek Şekil 12.	p-Kumarik asit kromatogramı maksimum dalga boyu(274 nm)	104
Ek Şekil 13	Benzoik asit kromatogramı ve maksimum dalga boyu(240 nm)	105
Ek Şekil 14.	Ferulik asit kromatogramı ve maksimum dalga boyu(324 nm)	105
Ek Şekil 15.	Sinapik asit kromatogramı ve maksimum dalga boyu(324 nm)	105
Ek Şekil 16.	Galik asitin konsantrasyona karşı alan grafiği	106
Ek Şekil 17.	Protokatekuik asit için konsantrasyona karşı alan grafiği	106
Ek Şekil 18.	Protokatekualdehit ve Gentisik asit için konsantrasyona karşı alan grafiği	106

Ek Şekil 19.	P-Hidroksi benzoik asit için konsantrasyona karşı alan grafiği	107
Ek Şekil 20.	Klorojenik asit için konsantrasyona karşı alan grafiği	107
Ek Şekil 21	Vanilik asit için konsantrasyona karşı alan grafiği	107
Ek Şekil 22.	Kafeik asit için konsantrasyona karşı alan grafiği	108
Ek Şekil 23	Siringik asit için konsantrasyona karşı alan grafiği	108
Ek Şekil 24.	Vanilin için konsantrasyona karşı alan grafiği	108
Ek Şekil 25.	Siringaldehit için konsantrasyona karşı alan grafiği	109
Ek Şekil 26.	P-Kumarik asit için konsantrasyona karşı alan grafiği	109
Ek Şekil 27.	Benzoik asit için konsantrasyona karşı alan grafiği	109
Ek Şekil 28	Ferulik asit için konsantrasyona karşı alan grafiği	110
Ek Şekil 29.	Sinapik asit için konsantrasyona karşı alan grafiği	110
EkŞekil 30.	BUM için HPLC-UV-DAD tekniği ile 280 nm'de (a) iç standartsız, (b) ve (c) iç standart eklenmiş ekstraktların seçimli ekstraksiyon sonrası elde edilen kromatogramları	111
Ek Şekil 31.	BU%70M için HPLC-UV-DAD tekniği ile 280 nm'de (a) iç standartsız, (b) ve (c) iç standart eklenmiş ekstraktların seçimli ekstraksiyon sonrası kromatogramları	112
Ek Şekil 32.	BU%50M için HPLC-UV-DAD tekniği ile 280 nm'de (a) iç standartsız, (b) ve (c) iç standart eklenmiş ekstraktların seçimli ekstraksiyon sonrası elde edilen kromatogramları	113
Ek Şekil 33	SEM için HPLC-UV-DAD tekniği ile 280 nm'de (a) iç standartsız, (b) ve (c) iç standart eklenmiş ekstraktların seçimli ekstraksiyon sonrası elde edilen kromatogramları	114
Ek Şekil 34.	SE%70 için HPLC-UV-DAD tarafından 280 nm'de (a) iç standartsız, (b) ve (c) iç standart eklenmiş ekstraktların seçimli ekstraksiyon sonrası elde edilen kromatogramları	115
Ek Şekil 35.	SE%50M için HPLC-UV-DAD tekniği ile 280 nm'de (a) iç standartsız, (b) ve (c) iç standart eklenmiş ekstraktların seçimli ekstraksiyon sonrası elde edilen kromatogramları	116
Ek Şekil36	Gentisik asit için 274 nm ve 324 nm dalga boylarındaki alanların oranına karşı % Gentisik asit grafiği	115

RESİMLER DİZİNİ

Resim 2.1.	Soxhlet ekstraksiyon sistemi	38
Resim 2.2	<i>Butomus umbellatus</i> L bitkisi	51
Resim 2.3.	<i>Butomus umbellatus</i> L. Bitkisine ait bir başka fotoğraf	52
Resim 2.4.	<i>Sparganium emersum</i> Rehmman bitkisi	53

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.	Flavonoid alt grupları, kimyasal özellikleri, adları ve kaynağıyla bilinen gıda flavonoidleri	21
Çizelge 2.2.	Literatürde mevcut bazı diğer antioksidan kapasitesi ölçüm yöntemlerinin çeşitli özelliklerine göre sınıflandırılması	31
Çizelge 3.1.	Standarlar ve numuneler için kullanılan metotta gradiyent koşullar	60
Çizelge 3.2.	Yıkama metodu	60
Çizelge 4.1.	Ekstraksiyonlardan elde edilen verim yüzdeleri	63
Çizelge 4.2.	Ekstraktların toplam fenolik madde içerikleri (mg GAE/100 g kuru numune)	64
Çizelge 4.3.	Ekstraktların ve karşılaştırma maddelerinin IC ₅₀ değerleri.	66
Çizelge 4.4.	Bakır-II iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi (CUPRAC) deneylerinde elde edilen sonuçlar	71
Çizelge 4.5.	HPLC-UV-DAD metodunun parametreleri	76
Çizelge 4.6.	15 fenolik madde standardının ekstraksiyonlarının % geri kazanım	79
Çizelge 4.7.	Seçimli ekstraksiyon sonrasında fenolik madde standartlarının kalibrasyon grafiklerinden elde edilen değerlere göre fenolik maddelerin mM cinsinden değerleri	82
Çizelge 4.8.	Seçimli ekstraksiyon sonrasında fenolik madde standartlarının yüzde geri kazanımlarına göre elde edilen değerlerden fenolik maddelerin mM cinsinden değerleri	83

1. GİRİŞ

Yüksek aktiviteli bileşikler olan serbest radikaller radyoaktif ışımaya çevre kirliliği, tütünün yanması sonucu oluşan duman, bitkilerin korunması için kullanılan ilaçlar, bozulmuş besinlerde ve insan vücudunda gerçekleşen metabolik olaylarda meydana gelmektedir. İnsan vücudunda yüksek aktiviteye sahip bu bileşiklerin artması ile dengelerin değişmesi sonucu, serbest radikal saldırısı ile hücre zarının zarar görmesi durumu oksidatif stres (gerginlik) olarak adlandırılır. Oksidatif stres; insan vücudunda yüksek aktiviteye sahip reaktif oksijen ve reaktif azot türlerinin yüksek oranlarda üretilmesiyle doku tahribatına, hücre mutasyonuna ve ölümüne, proteinlere etki ederek yapısının bozulmasına yol açmaktadır.

Serbest radikallerin oluşumu sonucu meydana gelen oksidatif stres hücre tahribatı ve yaşlanma, çeşitli kalp-damar hastalıkları (ateroskleroz ve yüksek tansiyon), şeker hastalığı (diabet), sinir sistemi hastalıkları (Alzheimer ve Parkinson hastalıkları), kıkırdak doku iltihabından oluşan hastalıklar, solunum yollarında meydana gelen hastalıklar ve çeşitli kanser türleri gibi hastalıkların oluşmasına etkin rol oynamaktadır [1].

Serbest radikallerin etkisinden korunmak için organizmalar antioksidatif korunma sistemlerine sahiptir. Eğer bu antioksidatif koruyucu sistemler iyi görev yapmaz ise, serbest radikallerin organizmada miktarının arttığı görülür. Antioksidanlar, serbest radikallerin organizmaya verdiği zararı önleyen ve durduran, yaşamsal bileşenlerin zarar görmesini önleyen moleküllerdir. Antioksidanların, serbest radikallerin başlatmış olduğu zincir reaksiyonunu durdurucu etkisi vardır. Günümüzde yapay antioksidanların yan etkilerinin görülmesi nedeniyle gıda kimyası ve tıbbın, bitkilerden elde edilen doğal antioksidanlara olan ilgisi önemli derecede artmıştır [2].

Bitkilerden elde edilen bileşenler içinde birçok tıbbi etkiye sahip gruplar bulunmaktadır. Bu gruplardan en önemli olanlarından birisi de antioksidan etki gösteren moleküllerdir. Antioksidan etki gösteren moleküller de kendi içinde farklı olmakla birlikte çeşitli türlere ayrılmaktadır. Bitkilerden elde edilen özütlerde bulunan ve antioksidatif özellik gösteren en önemli polifenolik bileşik grupları içerisinde fenolik asitler, flavonoidler,

flavanoidler, flavanoller, antosiyaninler, taninler, lignanlar ve kateşinler gibi birçok grup olduğu bilinir [3].

Araştırma gruplarınca ortaya konan çalışmalarda fenolik grupların, birçok hastalığın gelişmesini önlemede ve tedavisinde önemli bir etken olduğu belirtilmiştir. Örneğin fenolik bileşiklerin, hücrede meydana gelen, kanın akışının kontrol eden ve düzenleyen azot monoksit (nitrik oksit) oluşumunu düzenlemede [4], kanserli hücre oluşumunun baskı altına alınmasında [5], kalp-damar hastlıklarının önlenmesinde ve tedavisinde [6, 7] önemli oldukları ortaya konmuştur.

Diğer taraftan, özellikle yağlı gıdaların oksidatif bozunmalara karşı korunması ve raf ömrünün daha uzun olmasını sağlamak için son zamanlarda besin maddelerine katılan butillenmiş hidroksianisol (BHA) ve butillenmiş hidroksitoluen (BHT) gibi yapay antioksidan maddelerin kanserojen etkilere sahip olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir [8-10]. Yapılan çalışmalardaki tespitler, doğal antioksidan kaynaklarına ve antioksidan etki gösteren değişik bileşik grupları tespit etmeye yönelik çalışmalara olan ilgiyi önemli derecede arttırmıştır [11].

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Günümüzde birçok hastalığın oluşumunun serbest radikaller (özellikle oksijen ve azot kaynaklı radikaller) ve bu radikallerin oluşturduğu oksidatif stres'ten kaynaklandığı tahmin edilmektedir [12, 13].

Serbest radikaller, atomik veya moleküler halde eşleşmemiş tek elektrona sahip yapılara verilen isim olarak bilinirler. Diğer moleküller ile kolaylıkla elektron alışverişi gerçekleştiren bu gruplara “oksidan moleküller” veya “reaktif oksijen türleri (ROT)”de denilmektedir [14].

Serbest radikallerin meydana gelmesinde, zararlı güneş ışınlarının (UV), X ışınlarının, sigarada bulunan zararlı maddelerin, alkollerin ve yağların oluşumu ve yıkımı olaylarının, sanayi atıklarının, yükseltgeme eğilimi büyük olan metallerin, araçların egzozundan çıkan gazların, ozonun (O₃), kirli havanın ve pis suyun da etkili olabildiği bilinmektedir [15].

Serbest radikaller hücre içinde gelişen olayların haricinde belirli dış etmenlerden de kaynaklanabilir. Atomlar orbitallerinde hareket eden elektronlar birbirine zıt yönde (ters spinli) ve aynı orbitalde en fazla iki elektron içermelidir. Bu durumda serbest radikaller üç farklı yolla oluşabilir [16, 17].

1. Kovalent bağlı bir bileşiğin molekülünün ortak bağı homolitik parçalanması sonucu oluşan serbest radikaller. Bu bölünme sonucu, her bir atomda ortak bağdaki elektrolardan eşit şekilde kalır (Denklem 1).



2. Kovalent bir molekülden dışarıya bir tane elektron verilmesiyle veya molekülün ortak bağının heterolitik olarak parçalanması sonucu oluşan serbest radikaller. Heterolitik parçalanmada kovalent bağı oluşturan her iki elektron atomlardan herhangi birisinde kalır (Denklem 2).



3. Bir molekül veya atom dışarıdan bir elektron alarak serbest radikal haline gelebilir. Elektron alan molekül veya atom önceden yüklü halde bulunabilir (Denklem 3).



Biyolojik sistemlerde, serbest radikallerin oluşumu çoğunlukla elektron aktarımından kaynaklanmaktadır. Oluşan bu serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü halde ya da nötral halde bulunabilirler [18].

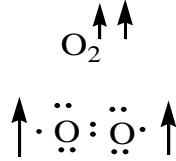
Oluşan serbest radikaller nötralize edilerek kararlı hale getirilmez ise insan vücudunda önemli ölçüde tahribata neden olabilirler. Örneğin;

- Hücre zarının proteinlerini parçalayarak hücreleri yok etmek.
- Zarların lipit ve proteinlerini yok ederek hücre zarını sertleştirip hücrenin gerçekleştirdiği işlevsel mekanizmayı durdurmak.
- Çekirdek zarını parçalayıp çekirdekteki genetik şifreye etki ederek DNA'yı olumsuz yönde etkilemek.
- Canlıların bağışıklık sistemine etki ederek bağışıklık sistemini olumsuz etkilemek gibi.

Reaktivitesi yüksek serbest radikaller, atomlar ve moleküller ile rahat bir şekilde tepkimeye girmektedir. Oluşan serbest radikallerin daha sonradan metabolizma da gerçekleşen olayların sonucunda da oluştuğu ortaya çıkmış ve günümüzde, serbest radikallerin gen mutasyonuna, hücrelerde hasara, doku tahribatına ve canlının erken yaşlanmasına yol açtığı çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur [19]. Canlılar, serbest radikallerin verdiği zarardan korunmak ve olumsuz etkilerini en aza indirmek için antioksidatif koruma sistemlerine sahiptirler [20].

2.2. Oksijen ve Özellikleri

Canlılar, solunum olayını devam ettirebilmeleri için havada bulunan oksijen molekülünü kullanmaktadırlar. Oksijen tüketiminin büyük bir miktarı solunum olayında kullanılmakta, az bir kısmı ise oksijenin ihtiyaç olduğu diğer olaylarda kullanılmaktadır. Moleküler oksijen (O_2), solunum zincirinde (elektron taşıma sistemi) enerji kaynağı olarak kullanılan moleküllerden (karbonhidratlar, yağlar ve proteinler) meydana gelen NADH ve $FADH_2$ ' den elektron alarak suya indirger. Moleküler oksijeninin oksitleme sürecinde meydana çıkan enerji, ATP'nin içinde bulunan fosfat bağında depolanır. Oksijen molekülü paralel durumda iki tane eşleşmemiş elektrona sahiptir [21]. Şekil 2.1'de moleküler oksijenin elektron yapısı gösterilmiştir.

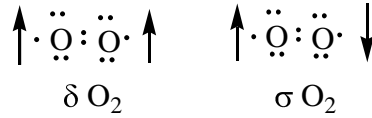


Şekil 2.1. Moleküler oksijenin elektron yapısı

Serbest radikaller, üzerinde eşleşmemiş elektron bulunduran yapılar olarak da bilinmektedirler. Fakat Hg^{+2} , Cu^{+2} , Co^{+2} , Fe^{+3} , Sn^{+2} gibi geçiş metalleri de ortaklanmamış elektronların olduğu halde bu metaller serbest radikal grubu içine alınmazlar. Ancak bu geçiş metalleri serbest radikallerin meydana gelmesinde etkin bir rol oynamaktadırlar [16, 21].

Serbest radikallerin özelliklerine bakıldığında moleküler oksijen diradikalik olarak belirtilmektedir. Diradikalik oksijen molekülünün, radikal olmayan gruplarla etkileşimi az ve yavaş gerçekleşmektedir. Ancak diradikalik oksijen molekülü, serbest radikallerle çok kolay ve hızlı bir şekilde reaksiyona girebilmektedir.

Diradikalik oksijen molekülünün üzerinde bulunan elektronlardan herhangi birisi, enerji etkisiyle dönme hareketinin tersi yönünde spin kazanmasıyla singlet oksijen oluşur. Singlet oksijenin eşleşmemiş elektronları bulunmadığından radikaller içine alınmaz. Fakat singlet oksijen, reaktif oksijen molekülüdür. Singlet oksijen delta ve sigma olmak üzere iki türü vardır. Şekil 2.2’de Delta ve sigma oksijenin moleküler elektron yapısı gösterilmektedir.

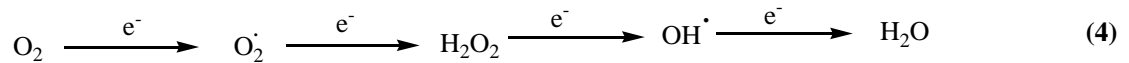


Şekil 2.2. Delta ve sigma oksijenin moleküler elektron yapısı

Organizmalarda, oksidasyon tepkimelerinin oluşmasının nedeni, geçiş metallerini (Fe^{+2} ve Cu^{+2} gibi metaller) ihtiva eden enzimler aracılığı ile moleküler oksijene bir elektron aktarımı olmasıdır. Moleküler oksijen, diradikalik yapısından dolayı yüksek derecede reaktif oksijen türleri (ROT) oluşturmaktadır [21].

2.3. Reaktif Oksijen Türleri (ROT)

Organizmalarda gerçekleşen metabolizma sonucu ortamda düşük miktarlarda süperoksit radikali (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^\cdot) oluşmaktadır. Oluşan bu reaktif oksijen türleri, buldukları ortamda dengelerin değişmesine neden olmaktadır. Aşağıda moleküler oksijenin bir dizi tepkime ile suya kadar indirgenmesi sonucu ortaya çıkan reaktif oksijen türleri gösterilmektedir (Denklem 4).

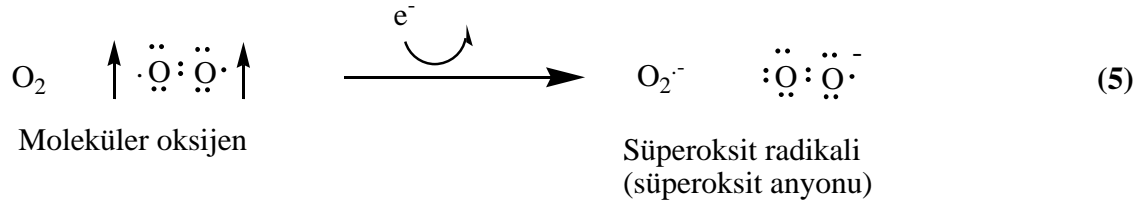


Oluşan reaktif oksijen türleri, aynı ortamda bulunan diğer serbest radikallere etki ederek radikalik oluşum tepkimelerini başlatmakta ve bunların hücre içinde karbon merkezli organik radikaller (R^\cdot), peroksit radikalleri (ROO^\cdot), alkoksi radikalleri (RO^\cdot), kükürtlü

radikaller (RS \cdot), sülfonil radikalleri (RSO \cdot) gibi değişik radikaller oluşturmaya yol açmaktadırlar [14, 21].

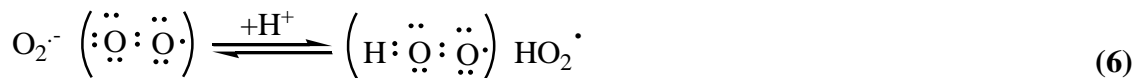
2.3.1. Süperoksit Radikali (O $_2$) $^{\cdot-}$

Süperoksit radikali (O $_2$) $^{\cdot-}$, serbest radikallerin oluşumunu tetiklemektedir. Süper oksitlerin oluşum yerlerinin hücrelerde mitokondride olduğu bilinmektedir [22]. Mitokondride gerçekleşen elektron transferinde sadece bir elektronun taşınması sonucu süperoksit radikali meydana gelmektedir (Denklem 5):



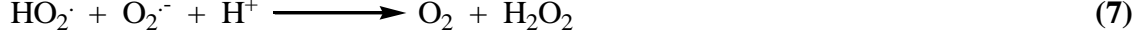
Süperoksit (O $_2$) $^{\cdot-}$, dismutaz tepkimesi sonucu diğer bir reaktif oksijen türü olan hidrojen peroksiti (H $_2$ O $_2$) oluşturur. Dismutaz tepkimesi sonucu oluşan hidrojen peroksit (H $_2$ O $_2$) geçiş metallerinin etkisiyle aktivitesi yüksek olan hidroksil (OH \cdot) radikalini meydana getirmektedir. Yaşlanma sonucunda mitokondride süperoksit (O $_2$) $^{\cdot-}$ ve hidrojen peroksit (H $_2$ O $_2$) radikallerinin üretimi giderek artmaktadır [23].

Süperoksit (O $_2$) $^{\cdot-}$ radikalinin etkinliği ve zarar verici etkisi oldukça azdır. Bu zayıf radikal, hidrojen peroksit (H $_2$ O $_2$) gibi kuvvetli bir radikale kaynak olmakta ve süperoksidin, geçiş metallerinin iyon hallerini indirgemektedir. Süperoksit (O $_2$) $^{\cdot-}$ radikali düşük pH'da daha etkin bir radikaldir (Denklem 6):



Süperoksit (O $_2$) $^{\cdot-}$ radikali ile perhidroksi (HO $_2$) \cdot radikali bir proton ile birlikte dismutasyon tepkimesine girerler ve biri okside olurken diğeri indirgenir. Dismutasyon

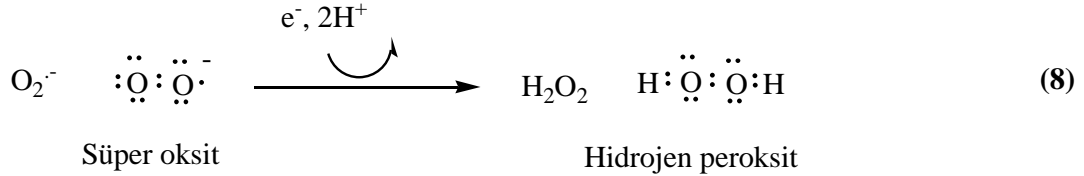
tepkimesi sonucu ortamda moleküler oksijen (O₂) ve hidrojen peroksit (H₂O₂) oluşmaktadır (Denklem 7) [14, 22, 24].



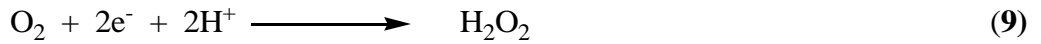
Süperoksit (O₂)⁻ radikali enzimler vasıtasıyla meydana gelebileceği gibi nanoenzimatik elektron alış verişiyle de meydana gelebilmektedir. Süperoksit (O₂)⁻ oksijen merkezli bir radikal olup, seçici özelliğe sahiptir. Süperoksit (O₂)⁻ askorbik asit'in sulu çözeltisini oksitleyebilmektedir. Bunun yanında ferriketilendiamintetraasetik asit (Fe₃EDTA) ve sitokrom C gibi demir kompleksli bileşikler de indirgeme özelliğine sahiptir. Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi, Süperoksiti (O₂)⁻ hidrojen peroksit (H₂O₂) ve moleküler oksijene(O₂) dönüştürmede kataliz görevi almaktadır [25].

2.3.2. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

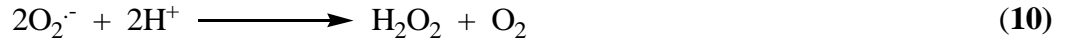
Hidrojen peroksit (H₂O₂), Süperoksitin(O₂)⁻ dışarıdan bir elektron alarak iki proton(H⁺) ile birleşmesi sonucu meydana gelir (Denklem 8):



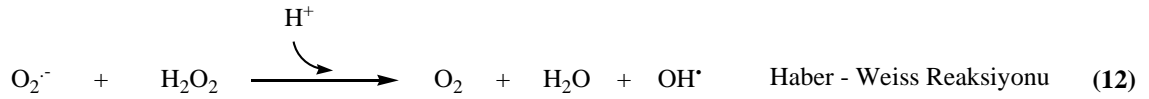
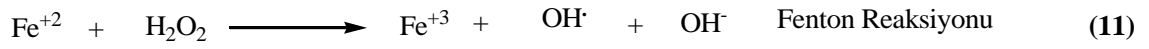
Hidrojen peroksit (H₂O₂), oluşumu moleküler oksijenin dışarıdan iki elektron alması ve iki tane proton (H⁺) ile birleşmesinden de oluşmaktadır (Denklem 9):



Canlı organizmalarda hidrojen peroksitin (H₂O₂) oluşması, süperoksitin (O₂)⁻ dismutasyonu ile gerçekleşmektedir. Süperoksitin (O₂)⁻ dismutasyonunda, iki süperoksit radikalının iki elektron ve iki proton (H⁺) ile birleşmesi sonucu moleküler oksijen ve hidrojen peroksit oluşmaktadır (Denklem 10):



Dismutasyon tepkimesinde radikal olmayan ürünlerin oluştuğu bilinmektedir. Bu tepkime iki türlü oluşabilmektedir: ya spontan (kendiliğinden) ya da süperoksit dismutaz enzimi yardımıyla katalizlenmek suretiyle. Spontan dismutasyonun ortam pH'sının 4,8' olduğu durumda en hızlı gerçekleştiği bilinmektedir. Enzimatik olarak gerçekleşen dismutasyon da ise daha yavaş gerçekleştiği ve ortamın pH'sının nötr veya bazik olduğunda daha etkili olduğu bilinmektedir. Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen türleri (ROT) grubuna alınmaktadır ve bu molekül serbest radikallerin oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır. Hidrojen peroksit, Fe^{+2} veya diğer geçiş metallerinin varlığında "Fenton tepkimesi" sonucu ve süperoksit radikalinin ($\text{O}_2^{\cdot-}$) varlığında da bir proton alarak "Haber-Weiss" tepkimesi yoluyla reaktivitesi ve zarar verme eğilimi çok büyük olan hidroksil radikalini (OH^{\cdot}) oluşturur (Denklem 11, 12).

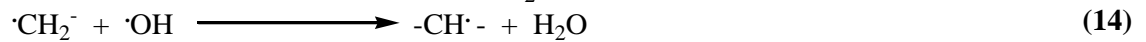


Süperoksitin ($\text{O}_2^{\cdot-}$) etkinliği düşük olduğu için lipidlerde çözünürlüğü sınırlı gerçekleşmekte fakat etkinliği yüksek olan hidrojen peroksit (H_2O_2) lipidlerde kolay bir şekilde çözünebilmektedir. Bu etkiden dolayı hidrojen peroksit (H_2O_2) diğer bölgelere kolaylıkla geçerek, Fe^{+2} ve diğer geçiş metallerinin bulunduğu bölgelerde "fenton tepkimesi" sonucu bu bölgelerin hasar görmesine neden olabilmektedir [14, 21].

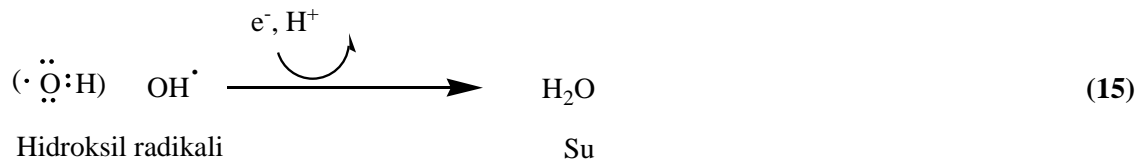
2.3.3. Hidroksil Radikali (OH^{\cdot})

Hidroksil (OH^{\cdot}) radikalının yüksek etkinlikte bir reaktif olduğu bilinmektedir. Hidroksil (OH^{\cdot}) radikali "fenton" veya "Haber-Weiss" tepkimeleri sonucu hidrojen peroksitten oluşmaktadır. Ayrıca hidroksil (OH^{\cdot}) radikali, yüksek enerjili radyasyonun suya etkisi ile suyun iyonlarına ayrışması sonucu da oluşabilmektedir.

Hidroksil (OH^\cdot) radikalinin ömrü çok kısadır ve reaktif oksijen türlerinin (ROT) en etkin olanlarından birisidir. Hidroksil (OH^\cdot) radikalının oluştuğu bölgelerde, tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton sağlayarak tiyil adı verilen radikaller (RS^\cdot), organik radikaller (R^\cdot), organik peroksitler (RCOO^\cdot) gibi hasar verici çeşitli radikallerin oluşmasına yol açtığı bilinmektedir (Denklem 13, 14) [14,21].



Hidroksil radikali çevresinden aldığı bir elektron ve bir proton (H^+) ile birlikte su molekülünü oluşturur (Denklem 15) [14, 21].



2.4. Antioksidanlar

Antioksidanlar, canlı organizmalarda serbest radikallerin vermiş oldukları olumsuz etkileri gideren ve vücudun iç dengesinin korunmasına yardımcı olan, canlıların kendilerine özgü savunma sistemleridirler [26].

Antioksidanları özellikleri bakımından altı grup içinde değerlendirmek mümkündür: (1) serbest haldeki yağ radikallerini inaktive durumuna getiren gerçek özellikteki antioksidanlar (örneğin fenolik bileşikler), (2) hidroperoksitlerin serbest radikallere dönüşmesini engelleyen hidroksiperoksitlerin kararlılığını arttıran bileşikler (örneğin fenolik asitler gibi), (3) gerçek özellikteki antioksidanların etkisini artıran sinerjistik maddeler (sitrik asit, askorbik asit gibi), (4) ağır metallerle etki ederek zararsız duruma dönüştüren metal şelat yapıcılar (fosforik asit, sitrik asit gibi), (5) singlet oksijeni triplet oksijen durumuna çeviren sönmüleyiciler (karotenler), (6) radikalik özellik göstermeyen

fakat bir yolla hidroperoksitleri indirgeyen hidroperoksit indirgeyiciler (aminoasitler ve proteinler gibi) [27].

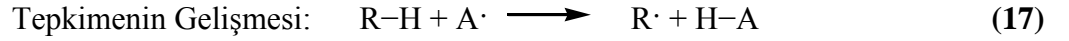
Bir antioksidan madde, “reaktif oksijen türlerinin (ROT) canlılarda ve gıdalarda oluşturdukları bozunmaları yavaşlatan, durduran veya tamamen ortadan kaldıran maddeler” olarak da tanımlanmaktadır. Antioksidanlar, oksidasyonu iki şekilde durdurabilme özeliğine sahiptirler. Bu özelliklerden birincisi serbest radikalleri süpürme yeteneğidir. Bu tür bileşikler “primer antioksidan” olarak bilinirler. İkinci tür antioksidan etki gösteren maddeler ise doğrudan radikal süpürme yeteneğine sahip değildirler. Bu maddeler bir tür mekanizma yardımı sonucu ortaya çıkarlar. Geçiş metallerinin bağlanması, hidroperoksitlerin radikal etki göstermeyen türlere dönüşmesi, UV ışığı tutmak, singlet oksijenin deaktivasyonu, oksijenin ortamdan giderilmesi gibi reaksiyonlar bu şekilde işleyen mekanizmalara örnek olarak verilebilirler. Bu özellikteki bileşiğe “sekonder antioksidan” adı verilir. Primer antioksidanlara ise fenolik asitler, flavonoidler, tokoferoller örnek olarak verilebilir. Bu bileşikler, besinlerin ve canlı organizmaların serbest radikallerin etkisinden korunmaları için tüketilmektedirler. Sekonder özellik gösteren antioksidanlar ise genelde ortamda başka bir bileşenin yardımı ile etkilerini gösterirler. Örneğin, sitrik asit gibi bloke edici maddeler ancak ortamda metal iyonu bulunuyor ise ve C vitamini gibi indirgeyici maddeler de ancak ortamda tokoferoller ya da diğer primer antioksidanlar bulunuyor ise sekonder antioksidan etkisi gösterebilirler [28].

Bununla beraber antioksidanlar oksijene etki ederek, gıdalardaki bozunma etkilerini durduran maddeler olarak da bilinirler. Antioksidanlar, oksitlenmeyi kontrol altına alarak ürünün kalitesini korumak, tadının bozulmasını engellemek ve koruyucu ajan olarak davranmak gibi etkilerle gıdaların raf ömrünü uzatmakta ve gıda sektöründe önemli bir yer tutmaktadırlar [29]. Gıdalarda gerçekleşen oksidasyonlar sonucu, ürünlerin renginin değişerek kahverengi hale gelmesi, kötü kokunun oluşması, kötü tat (acılık), fiziki kalite ve vitaminlerin özelliklerinin azalması gibi problemler oluşur. Bu oluşan sorunlardan dolayı Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu (CAC), antioksidanları “gıdada yağın acılaşmasını ve renk değişimleri gibi oksidasyon tepkimeleri sonucunda oluşan bozunmaları önleyerek raf ömrünü uzatan maddeler” olarak tanımlamıştır [30].

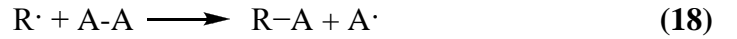
Lipitler ile oksijen arasında UV ışığının etki etmesiyle otoksidasyon denilen serbest radikal zincir tepkimesi gerçekleşmektedir. Başlangıçta ilk önce tepkime serbest radikalleri oluşturmaktadır. (Denklem 16):



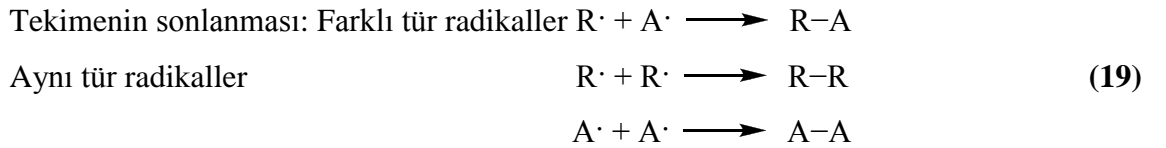
Daha sonra tepkimenin ilerleyerek serbest radikallerin meydana gelmesi ve bunların farklı radikalleri oluşturması görülmektedir (Denklem 17):



Oluşan farklı radikal başka kararlı moleküllere etki ederek tekrar radikal oluşturmaktadır (Denklem 18).



Sonunda da, oluşan farklı iki radikal birbiri ile birleşerek kararlı hale gelebilmektedirler (Denklem 19):



Otoksidasyon tepkimeleri, geri dönüşümü gerçekleşmeyen olaylardır. Tepkimenin başlayabilmesi için minimum enerjiye gereksinim vardır ve bu enerji de tepkimeyi destekleyen prooksidan etkenler tarafından karşılanmaktadır [31, 32].

Besinlerde gerçekleşen lipit oksidasyonları, sadece vitaminlerin, tadın bozulması ve renk değişimine neden olmakla kalmaz, bunun yanında serbest radikalleri de oluşturabilirler. Bu radikaller zararlı ve istenmeyen tepkimeleri başlatabilmektedirler. Bu tepkimeleri durdurmak veya en az seviyeye getirmek için, antioksidanlar geçtiğimiz yarım asır boyunca kullanılmaya başlanmıştır [33].

Gıdaların bozulmasını önlemek ve oksidasyon oluşumunu engellemek için kullanılan yapay antioksidanların en önemlileri: BHA (Butillenmiş hidroksi anisol), BHT (Butillenmiş hidroksitoluen), PG (Propil gallat) ve TBHQ (Tersiyer butil hidrokinon) dur. Bu antioksidanlar, oksidasyon başlamadan önce gıdalarla karıştırıldığında oksidasyon tepkimesini durdurucu ve önleyici etki göstermektedirler [29].

Ayrıca antioksidanların, besinlerde bozunmaların başlamasını durduramadıkları veya tamamen bozulmuş olan bir besinin tadını düzeltemedikleri ve hidroliz veya mikrobiyal etkilerden oluşacak bozunmayı durduramadıkları belirtilmektedir. Fakat BHA gibi bazı fenolik özellikteki bazı antioksidanların anti-mikrobiyal etkilerinin de bulunduğu ve küflenmeye karşı etkili oldukları tespit edilmiştir [34].

Bir uygulamada en ideal antioksidanı seçmek için;

- Antioksidan ilave edilecek gıdanın türü (örneğin hayvansal ya da bitkisel yağlara),
- Uygulanacak olan antioksidanın iyi dağılması için çözünürlüğü,
- Besinlerde rengi bozma durumu
- Gıdanın pH değeri
- Gıdaya yapılan işlemin türü, geçtiği prosesler (kızartma, fırında pişirme, püskürtmeli-kurutma gibi),
- Tadın nötral olması

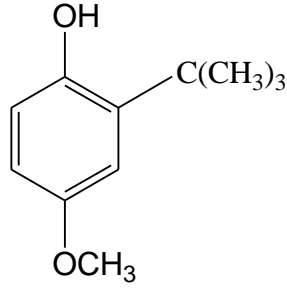
gibi faktörlerin dikkate alınması gerekmektedir.

Besinlerde antioksidanların doğru ve etkili bir biçimde kullanılabilmesi için, gerçekleşen oksidasyonların işleyiş mekanizması ve antioksidanın bozulmayı engelleme yeteneği gibi özelliklerinin çok iyi bir şekilde bilinmesi gerekir [35].

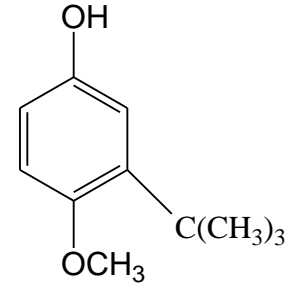
2.5. Antioksidan Türleri

2.5.1. Yapay Antioksidanlar

Yapay antioksidan olarak bilinen BHA (Butillenmiş hidroksianisol) ve BHT (Butillenmiş hidroksitoluen) bunlardan ikisidir. BHA, yapısal olarak iki izomere sahip bir karışımdır ve bunlar, 3-tertiyerbutil-4-hidroksianisol ve 2-tertiyerbutil-4-hidroksianisol bileşikleridir. Bu izomerler grimsi katı parçacıklar halinde bulunur. BHT ise beyaz kristal şeklinde bulunur. BHT ve BHA yağı seven özellikte olduklarından yağlarda iyi çözünebilmektedirler. Fakat suda ki çözünlükleri oldukça düşüktür. BHA' nın gıdalar içinde çözünmesi BHT'den daha iyidir. Genellikle gıdalarda bulunan yağ oranına bakılarak, sadece birisi veya bunların bir karışımı yaklaşık 200 ppm oranında kullanılır. BHA özellikle uçucu yağların renk, tat ve kokularının değişmemesinde, özellikle de küçük molekülü yağ asitlerinin oksidasyonunu kontrol etmede etkili bir rol oynar. Genel olarak bu izomer antioksidanlar tahıllar ve tatlı ürünlerinin korunması için kullanılmaktadır. BHA ve BHT beraber kullanıldıklarında sinerjistik etki oluşmaktadır. BHA (Butillenmiş hidroksianisol) ve BHT (Butillenmiş hidroksitoluen) in fazla tüketilmesi, vücutta aşırı bir şekilde alerjik etkilere sebep olabilmektedir. Günümüzde yapılan bazı çalışmalarda bu iki maddenin kanserojenik etkilerine dikkat çekilmiştir. Bu antioksidanların, Ulusal Gıda Araştırma Konseyinin açıklamaş olduğu verilere göre gıdalarda kullanımlarında 1970'den itibaren azalma olmasına rağmen, günümüzde hala en fazla kullanılan antioksidanlar olduğu belirtilmektedir [36].

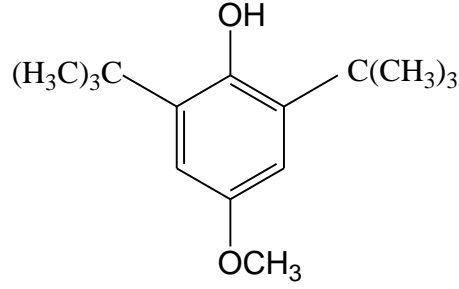


4-metoksi-2-ter-butilfenol
(2-BHA)



4-metoksi-3-ter-butilfenol
(3-BHA)

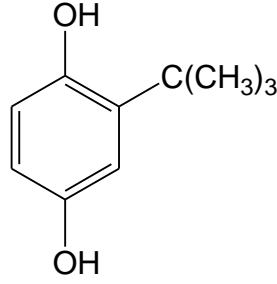
Şekil 2.3 Butillenmiş hidroksianisol (BHA)'ün kimyasal yapısı.



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

TBHQ (Tersiyer bütihidrokinon) yapay antioksidanı, kızartma yağlarını oksidasyona karşı korumak için çokça kullanılmaktadır. Grimsi bir toz olan TBHQ, katı ve sıvı haldeki yağlarda iyi çözünebilmektedir. Propil gallatın tersine, demir ve bakır iyonlarıyla kompleksler vermez ve gıdaların kızartma işleminde gıda içinde çok iyi bir şekilde dağılabilmektedir.

Tek başına veya BHA ile ya da BHT ile beraber de kullanılabilir. PG ile kullanıldığında azaltıcı bir etki yaratığından dolayı bu karşım pek kullanılmaz. Sitrik asit ile beraber kullanıldığında kararlı bir özellik kazanmaktadır. Bu antioksidan Avrupa ülkelerinde yasaklanmıştır. Gıdalardaki kullanım sınırı, yağ miktarı ile orantılı olarak yaklaşık olarak en fazla % 0,02'dir [36].

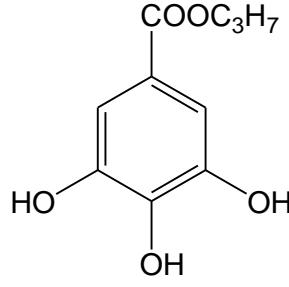


Şekil 2.5. tert-butil-hidroksikinin (TBHQ)'nın kimyasal yapısı.

Gallatlar önemli yapay antioksidanlardır. Gallik asit'in en fazla kullanılan esterleri, propil gallat (PG), oktil gallat, dodesil gallat ve lauril gallattır. Bu antioksidanlar suda iyi çözünmezler, yağda sadece oktil ve dodesil gallatlar iyi çözünür. PG, beyaz kristal veya toz halinde ticari olarak satılmaktadır. Erime noktası 148 °C olup, bu sıcaklığın üzerine çıktığında özelliğini kaybetmektedir. Bu antioksidan maddenin yirminci yüz yılın ortasından beri gıdalarda kullanımı giderek yaygınlaşmıştır. Ticari olarak gallik asit ile propil alkolün esterleşmesiyle üretilmektedir. PG, özellikle hayvansal yağlar ve bitkisel yağların kararlı olmasında kullanılır. Ancak bitkisel yağlarda TBHQ'dan daha az etkiye sahiptir.

PG demir iyonları ile koyu renkli bir çözelti oluşturmakta ve özellikle, yağda ve maddelerde istenmeyen mavi-siyah renk oluşturduğu için, kullanılırken sitrik asitle karıştırılarak gıdalara eklenmektedir. Sitrik asit ile birlikte kullanılmasındaki amaç, demir ve bakır iyonlarının başlattığı oksidatif tepkimeleri önlemek veya yavaşlatmaktır.

PG, BHA ve BHT ile birlikte kullanıldığında sinerjik etki oluşturmakta ancak TBHQ ile kullanımına izin verilmemektedir. Gallatlar, et ve et ürünlerinde, sosis, salamlar ve çeşitli baharatlarda kullanılmaktadır. Toplum sağlığı ve temizlik bakımından olumsuz bir durum günümüze kadar bilinmemektedir [36].



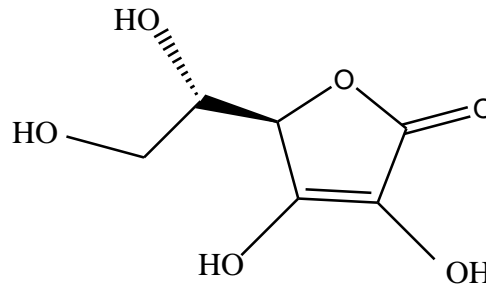
Şekil 2.6. Propil gallat (PG)'ın kimyasal yapısı

2.5.2. Doğal Antioksidanlar

2.5.2.1. C-Vitamini (Askorbik Asit)

Canlı organizmaların yaşamları boyunca en çok ihtiyaç duydukları vitamin olan C-vitamininin (Şekil 2.7), diğer adıyla askorbik asitin, sudaki çözünürlüğü yüksek ve serbest radikalleri doğrudan söndürebilen güçlü bir antioksidandır. Askorbik asitin çeşitli gıda maddelerinde acılaşmayı ve ekşimeyi, meyvelerde renk değişimini ve bozunmayı durdurucu özellik gösterdiği bilinmektedir. Bitkilerden doğal olarak elde edilebileceği gibi kimyasal olarak da üretilmektedir [37].

Askorbik asit gerçek özellikteki antioksidanlar ile birlikte kullanıldığında bu antioksidanların etkisini artıran sinerjistik olarak görev yapmaktadır [27].

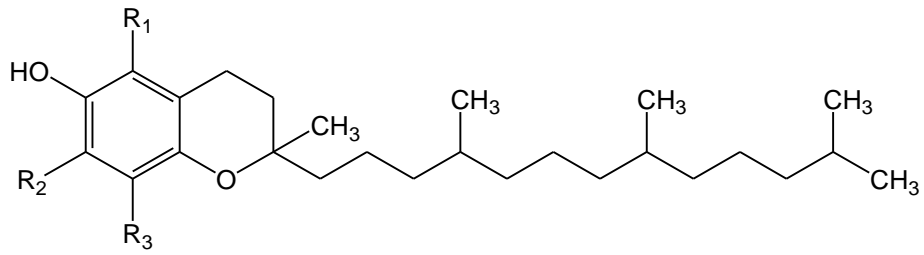


Şekil 2.7. Askorbik asidin yapısı (vitamin C)

2.5.2.2. Tokoferoller

En iyi bilinen ve en geniş kapsamlı kullanılan antioksidanlardır. Tokoferoller ve tokotrienoller olmak üzere iki gruba ayrılırlar ve her iki grup için dört izomer (α -, β -, γ -

ve δ -) vardır. Hemen hemen tüm gıdalarda eser miktarda dahi olsa bulunurlar. Bu gruptaki en önemli antioksidan E vitamininin en aktif formu olan α -tokoferoldür [34]. Tokoferoller, hidroksil grubunun hidrojenini lipid peroksil radikaline vererek antioksidatif aktivite göstermektedirler. α -Tokoferolün aynı zamanda hidroperoksitlerin dekompozisyonunu yavaşlattıkları bilinmektedir. Tokoferoller ısıya karşı oldukça dayanıklıdırlar. α -Tokoferolün oksidatif kararlılığı artırmada ve sıcaklık arttıkça oksidasyon hızını azaltmada etkili olduğu bildirilmiştir [38]. Tokoferol ve tokotrienollerin genel yapıları Şekil 2.8’de verilmiştir.

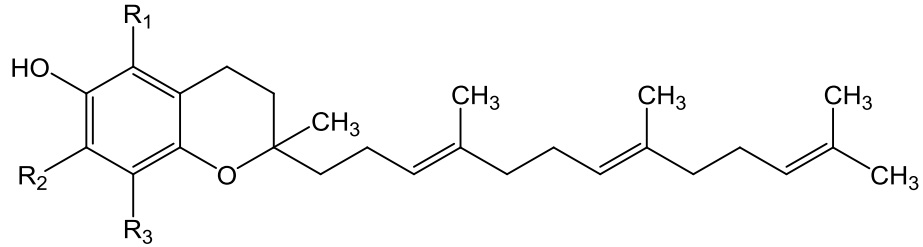


$R_1 = R_2 = R_3 = \text{Metil}$, α -Tokoferol

$R_1 = R_3 = \text{Metil}$, $R_2 = \text{H}$, β -Tokoferol

$R_1 = \text{H}$, $R_2 = R_3 = \text{Metil}$, γ -Tokoferol

$R_1 = R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{Metil}$, δ -Tokoferol



$R_1 = R_2 = R_3 = \text{Metil}$, α -Tokotrienol

$R_1 = R_3 = \text{Metil}$, $R_2 = \text{H}$, β -Tokotrienol

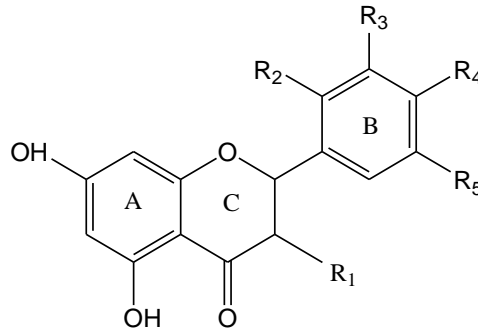
$R_1 = \text{H}$, $R_2 = R_3 = \text{Metil}$, γ -Tokotrienol

$R_1 = R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{Metil}$, δ -Tokotrienol

Şekil 2.8. Tokoferol ve tokotrienollerin genel yapıları.

2.5.2.3. Flavonoidler

Flavonoidler, bitkilerde çok miktarda bulunurlar ve insanlar tarafından sıklıkla tüketilen difenilpropanlardır. Flavonoidlerin en önemli kaynaklarının sebzeler, meyveler ve içecekler olduğu bilinir. Flavonoidler, kimyasal yapı bakımından C6-C3-C6 karbon iskeleti ile gösterilirler. Bu iskelet iki aromatik halka, üç karbonlu bir alifatik zincir ile birbirine bağlanmış durumdadır. Flavonoidler antioksidatif aktivitelerini, ksantin oksidaz, lipoksijenaz ve siklooksijenaz gibi enzimleri inhibe ederek, metal iyonları ile etkileşip kompleks oluşturarak, diğer antioksidanlar ile tepkimeye girerek ve süper oksit anyonları ve lipid peroksil radikallerine etki ederek göstermektedirler. Birçok bitki dokularında bulunan flavonoidler flavon, flavanol, izoflavon, antosiyaninler ve kalkonları içermektedir [39]. Bazı önemli flavon ve flavonoller aşağıda Şekil 2.9’da gösterilmişlerdir [40].



(a)

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Flavonlar:					
Apigenin	H	H	H	OH	H
Luteolin	H	H	OH	OH	H
Flavonoller:					
Kuersetin	OH	H	OH	OH	H
Mirisetin	OH	H	OH	OH	OH
Kamferol	OH	H	H	OH	H

(b)

Şekil 2.9. (a) Flavonoidlerin genel yapısı ve (b) Bazı önemli flavon ve flavonoller.

Flavonol (quercetin) ve flavanoller (kateşin) insanların kullandıkları besinlerin temel bileşeni olarak bilinmektedirler. Flavanoller, antimutajenik ve antikarsinojenik aktivite gibi biyolojik özellikler göstermektedirler. Bu bileşiklerin antioksidatif etkileri, kansere neden olan işlemlerde oksijen radikallerini ve lipid peroksidasyonunu yavaşlatıcı ve engelleme bakımından önemli bir yer tutmaktadır [41, 42].

Yapılan çalışmalar sonucunda bu grupta yer alan antioksidan moleküllerinin öncelikle, kalp damar sistemi hastalıklarını önleyici ve diğer birçok hastalığın ortaya çıkmasını engelleyici etkiler gösterdikleri belirlenmiştir [43].

Flavonoidlerin B halkasına bağlanan hidroksil grubunun artması durumunda antioksidan etkisinin arttığı ortaya konmuştur [44].

Polifenollerin altgrubu olarak bilinen flavonoidler, B halkasının C halkasına bağlandığı bağın yeri ve C halkası üzerindeki fonksiyonel grupların oksidasyon durumları dikkate alınarak bazı alt guruplara ayrılmaktadırlar.

Çizelge 2.1. Flavonoid altgrupları, kimyasal özellikleri, adları ve kaynağıyla bilinen gıda flavonoidleri [45].

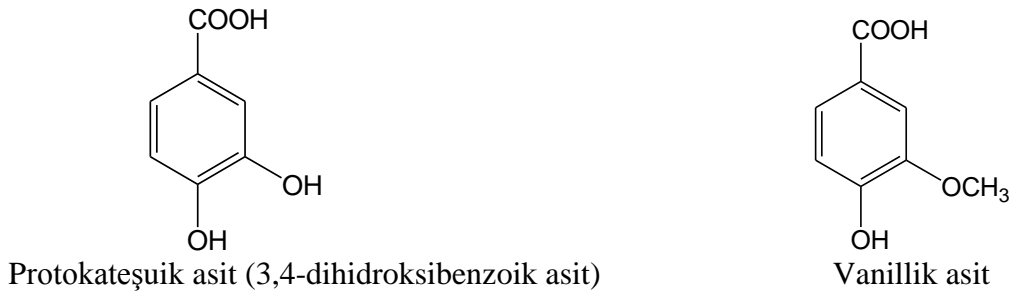
Flavonoid alt grupları	B halkasının C halkasına olan bağının pozisyonu	C halkasının doymamışlık derecesi	C halkasının fonksiyonel grupları	Bilinen besin flavonoidleri	Bulunduğu besin kaynakları
Flavanol	2	Yok	3- hidroksi 3-o-gallat	Kateşin Epikateşin Epigallokateşin Epikateşin-3-gallat Epigallokateşin-3-gallat	Çaylar, kırmızı üzüm ve kırmızı şarap
Flavanonlar	2	Yok	4-okso	Eriodiktol Hesperetin Naringenin	Sitrus gıdalar
Flavonlar	2	2-3 çift bağ	4-okso	Apigenin Luteolin	Yeşil yapraklı baharatlar
İzoflavonlar	3	2-3 çift bağ	4-okso	Daidzein Genistein Glisitein Biochanin A Formonnetin izoramnetin	soya fasulyesi, soya
Flavonoller	2	2-3 çift bağ	3-hidroksi, 4-okso	Kamferol Mirisetin kuersetin	Hemen hemen tüm gıdalarda
Antosiyanidinler	2	1-2, 3-4 çift bağ	3-hidroksi	siyanidin delfinidin Malvidin Pelargonidin Petunidin Peonidin	Çilek, kiraz

2.5.2.4. Fenolik Asitler

Fenolik asitler bitkilerde çok miktarda bulunurlar. Fenil propanoidler olarak da bilinirler. Hidroksisinnamik asit ve hidroksi benzoikasit içeren iki ana gruba ayrılmaktadırlar. Fenolik asitlerin genelini hidroksi sinnamik asitler oluşturur [46].

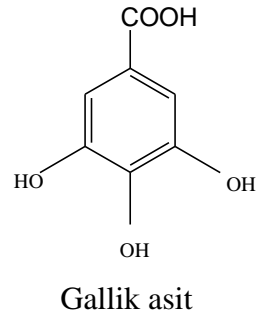
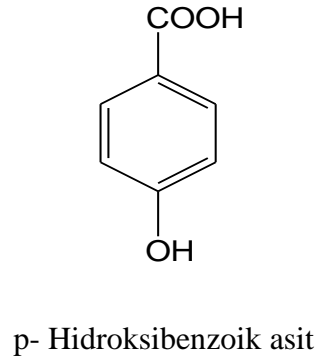
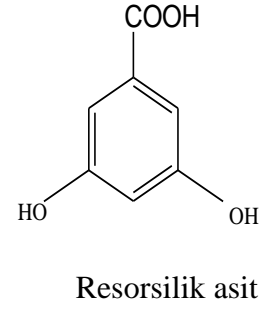
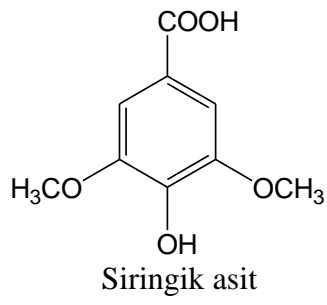
Fenolik asitler, fenolik bileşiklerin önemli bir grubunu oluşturmaktadırlar. Önemli fenolik asitler p-hidroksibenzoik asit, 3,4-dihidroksibenzoik asit, 3,4-dihidroksibenzoik asit, vanillik asit, siringik asit, p-kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit, sinapik asit, klorojenik asit ve rosmarinik asittir. Fenolik asitler, organik asitler halinde veya glikozitlerin esterleri şeklinde bulunurlar [40]. L-fenilalanin veya L-tirosinden p-kumarik asit, ferulik asit, kafeik asit, sinapik asit ve klorojenik asit oluşmaktadır. Bu asitlerin yapısında $-CH=CH-COOH$ gruplarının bulunması, hidrojen verebilme özelliklerini artırmakta ve bunun yanında benzoik asitlere göre radikalleri daha kararlı hale getirmektedirler. Hidroksi benzoik asitler, yapılarındaki hidroksi ve metoksi gruplarının yerlerinin pozisyonları ve sayılarına bağlı olarak çeşitlenmektedir.

Bu gruplardan en önemlilerine gallik asit, vanillik asit, siringik asit, resorsilik asit, protokatekuik asit örnek olarak verilebilir. Hidroksillenmeye ve hidroksil radikallerine yüksek reaktivite gösteren monohidroksi benzoatlar etkin hidroksil gidericilerdir. Aromatik halka ile karboksilat grubunun arasına metilen grubunun bağlanmasıyla meydana gelen fenilasetik asitlerin orto ve meta hidroksi türevleri, yaklaşık olarak 1mM'a yakın konsantrasyonda antioksidan aktivite gösterirler. Dihidroksi benzoik asitlerin türevlerinin antioksidan aktiviteleri, hidroksillerin şekline bağlı olarak, orto-, para-durumlarında yüksek aktivitede olurken, meta, para-durumunda düşük aktivitede olmaktadır [5].

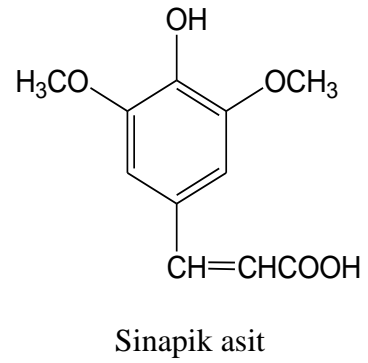
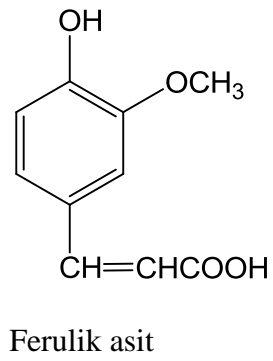
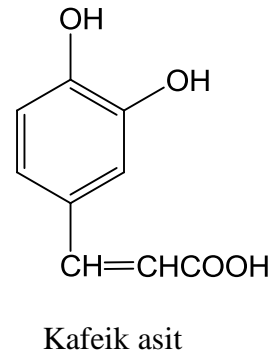
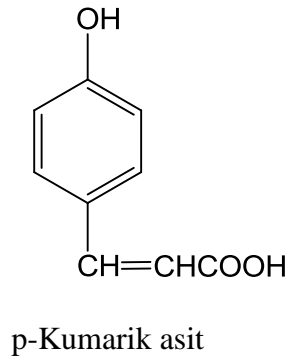


Şekil 2.10. Benzoik asit türevi bazı fenolik asitler.

Şekil 2.10 Devam ediyor..



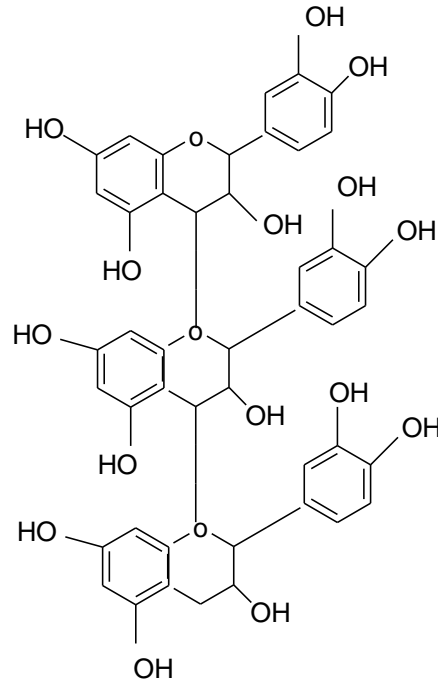
Şekil 2.10. Benzoik asit türevi bazı fenolik asitler.



Şekil 2.11. Sinnamik asit türevi bazı fenolik asitler

2.5.2.5. Fenolik Polimerler (Tanenler)

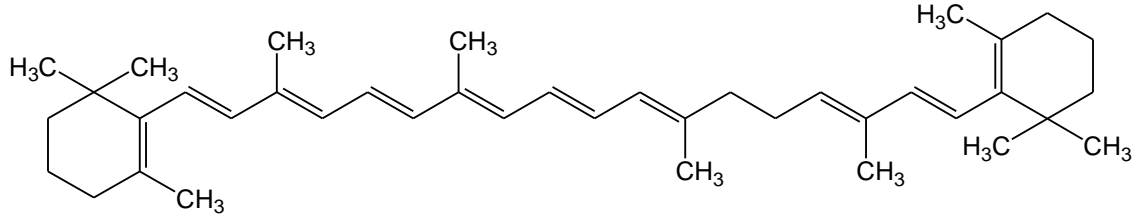
Fenolik polimerler yüksek molekül kütlesine sahiptirler. Tanenler, kondense ve hidroliz olabilen olmak üzere iki kısımda incelenirler [47]. Kondense tanenler, polimerik flavonoidlerdir [48]. Hidrolizlenebilir tanenler, gallik asit ve benzer bileşiklerin karbohidratlarla esterleşmesiyle oluşurlar [47]. Bunlardan en önemlileri, besin tanenleri olan kateşin ve epikateşinin fenolik polimerleridir. Bu polimerler koyu renkli görünümünde ve ekşimsi tada sahip bileşiklerdir [46].



Şekil 2.12. Fenolik polimerlerin yapısı

2.5.2.6. Karotenoidler

Karotenoidler, hayvanlar için önemli olmalarına rağmen bitkilerde oluşurlar. Karotenoidlerin yapısında çok miktarda çift bağ bulunmaktadır ve bu çifte bağların konjuge olmalarından dolayı renkli yapıya sahiptirler. Kırmızı renkten açık sarıya kadar renkli, bir çok bitkilerde ve hayvanlarda mevcut olan, yapısında azot bulunmayan, suda çözünürlüğü az olan, fakat organik çözücülerde ve yağlarda iyi çözünebilen renkli pigmentlerdir. Bu renkli pigmentler bitkilere renkliliği kazandırmaktadırlar. Karotenoidler, sebze, meyve ve çiçeklerin karakteristik renklerinin oluşumunu sağlamaktadır. Havuç, mısır, domates, tereyağı, süt, yumurta sarısı ve renkli birçok bitkide bol miktarda bulunur. Karotenoidlerden en iyi bilineni A-provitamini olarak da tanınan β -karoten'dir. A vitamini tek başına anti-oksidan özellik göstermez fakat β -karoten kediliğinden antioksidan aktivite gösterir [49].

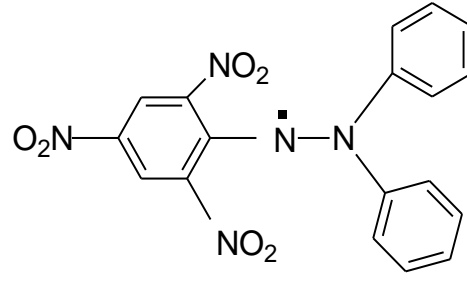


Şekil 2.13. β -karotenin yapısı

2.6. Bitki Ekstraktlarının Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Bazı Yöntemler

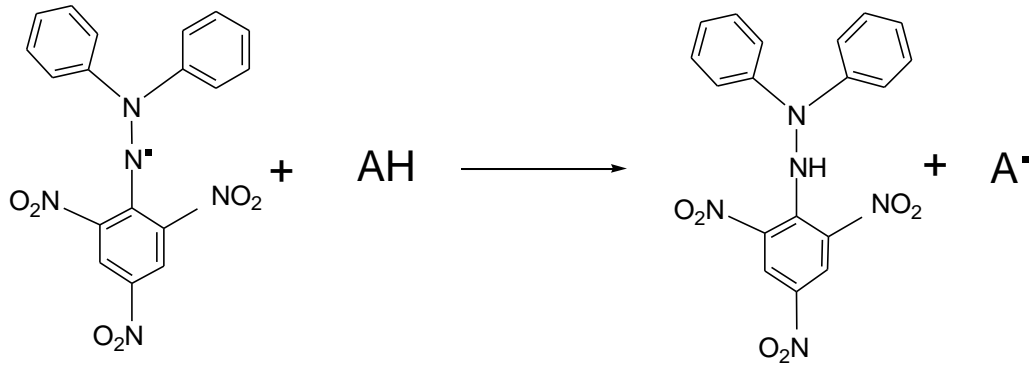
2.6.1. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Radikal Giderme Yöntemi

Bu yöntem antioksidanların radikal giderme kabiliyetlerini değerlendiren kolay ve geçerli bir yöntem olarak bilinmektedir [50].



Şekil 2.14. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikalinin yapısı.

Antioksidan-DPPH radikali tepkime mekanizması aşağıda Şekil 2.15 te ki gibi işlemektedir.



Şekil 2.15. Antioksidan-DPPH radikali tepkime mekanizması

DPPH, hoş görünümlü mor bir renge sahip bir radikaldir. Antioksidandan bir proton (H^+) koparıp kendisini indirgeyerek α, α -difenil- β -pikrilhidrazil molekülüne dönüşür ve bu tepkime sonucu hoş görünümlü rengi açılır. Bu yöntemle ilgili en çok uygulanan metod olan delokalizasyon metodu, DPPH'ın antioksidanlarla tepkimeye girmesi sonucu konsantrasyonunda meydana gelen azalmanın, 515-517 nm dalga boyunda bir spektrometre ile absorbans farkı olarak ölçülmesi ilkesine dayanır [51, 52].

DPPH analiz metodunda belirli miktarda DPPH çözeltisi ve örnek çözeltisi karıştırılıp, tepkime başlatıldıktan sonra 50 dakika veya karışımın absorbansı sabitleninceye kadar

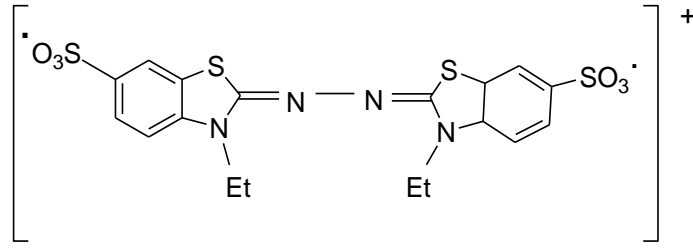
geçen süre sonrası, spektrometreyle 517 nm de absorbans ölçülür. İndirgeme tepkimesi süresince çözeltilerdeki DPPH'nin karakteristik özelliği olan hoş görünümlü mor rengin giderek açılmasıyla sarımsı bir renk oluşur [52]. Çözeltide kalan DPPH, antioksidan konsantrasyonu ile orantılıdır. Antioksidan başlangıçta konsantrasyonu yüksek olan DPPH'ı yukarıdaki reaksiyon gereğince süpürür. Bu radikalın konsantrasyonunu yarıya düşüren antioksidan değeri EC₅₀ (ya da IC₅₀) olarak verilir. DPPH metodu basit ve hızlı olduğundan antioksidan aktivitesi belirlemede sıklıkla kullanılan bir yöntemdir [52].

2.6.2. ORAC Oksijen Radikali Absorbans Kapasitesi Yöntemi

Bu yöntem Cao ve ekibi tarafından geliştirilmiştir [53]. Canlı organizmalarda en çok karşılaşılan radikal türü olan peroksil ile işlem gördüğünden dolayı günümüzde oldukça sık kullanılmaktadır. Bu metodda da engelleme derecesi sabit alınıp engelleme zamanına bakılarak veya engelleme zamanı sabit alınıp engelleme derecesine bakılarak antioksidan aktiviteyi direk olarak hesaplayabilmek mümkündür [54]. Bu yöntem peroksille işlem gördüğünden dolayı peroksiller hariç diğer radikalleri belirlemede kullanılabilir.

2.6.3. ABTS Yöntemi / TEAK (Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi)

ABTS yöntemi, troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi olarak da bilinir. Miller ve diğerleri tarafından geliştirilmiştir [56]. Bu yöntem, renkli olan 2,2'-azinobis(3- etilbenzotiazolin-6-sulfonat) (ABTS) radikalik katyonunun absorbansının, proton (H⁺) veren antioksidanlar tarafından giderilmesine dayanan bir yöntemdir. Absorbans değerindeki absorbans farkından yararlanılarak toplam antioksidan kapasitesi troloks (E vitamini türevi) cinsinden verilir. Aktivitesi tayin edilecek örneğin 1 mM'lık çözeltisinin aktivesine eşdeğer olan troloksun mM konsantrasyonu (TEAC) aktiviteyi belirtir. Gerçek metodda ABTS.⁺ katyonunun kendine özgü absorbsiyon spektrumu 660, 734 ve 820 nm'de maksimum vermektedir [55, 56].



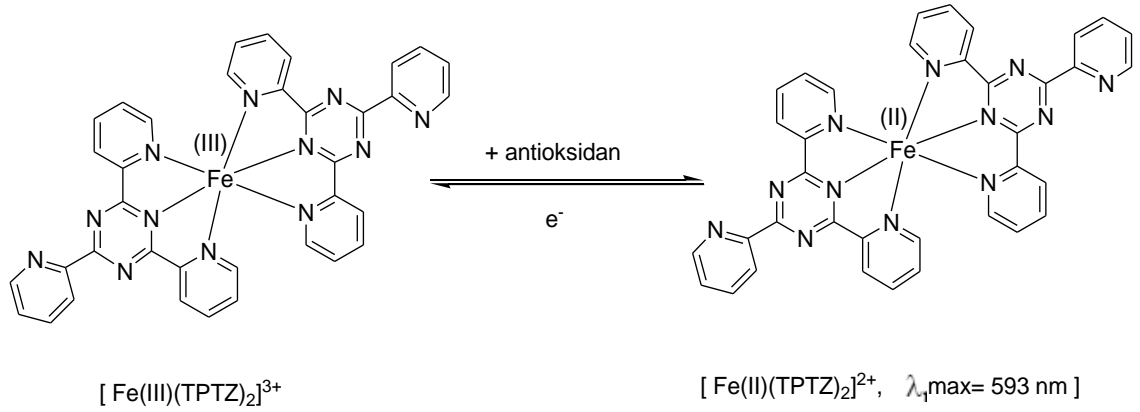
Şekil 2.16. ABTS.+ katyonunun yapısı

2.6.4. β -Karoten/Linoleik Asit Model Sistemi

Bu yöntemde, sabit ve belirli bir sıcaklıkta, serbest radikal zincir tepkimesi yoluyla linoleik asidin oksidasyonu sonucu meydana gelen peroksitler yoluyla, ortamdaki β -karotenden kaynaklanan rengin değişmesi ilkesine dayanarak tayin yapılmaktadır [56]. Linoleik asitle β -karotenin oksidasyonu sonucu serbest radikaller meydana gelir. Diallilik metilen gruplarından bir protonun alınmasıyla oluşan linoleik asit serbest radikalleri yüksek derecede çift bağ içeren β -karoten molekülüne saldırır. β -karoten bu olayla okside olur ve kısmen bozunur. Sistem, rengin oluşmasına neden olan kromofor grubunu ve bundan kaynaklanan kendine özgü rengini kaybeder. Gerçekleşen olay spektrofotometrik olarak izlenir ve karşılaştırma için BHA veya BHT gibi yapay doğal antioksidanlar kullanılır [57].

2.6.5. FRAP (Demir(III) İndirgeme Antioksidan Gücü) Metodu

Bu metod, demir(III)'ün indirgenme özelliği kullanılarak antioksidan aktivitesini ölçmek için geliştirilen ve kullanılan bir yöntemdir. Renksiz haldeki demir(III)tripridiltriazin (Fe(III)-TPTZ), antioksidanlarla pH=3,6 ortamında indirgenerek demir(II)tripridiltriazin'e (Fe(II)-TPTZ) dönüşür. Bu dönüşüm olayında renksiz (Fe(III)-TPTZ), (Fe(II)-TPTZ)'e dönüşerek mavi renkli bir çözelti oluşturur. Oluşan rengin şiddeti spektrofotometrede absorbans değeri belirlenerek antioksidan gücü ölçülür [58, 59].

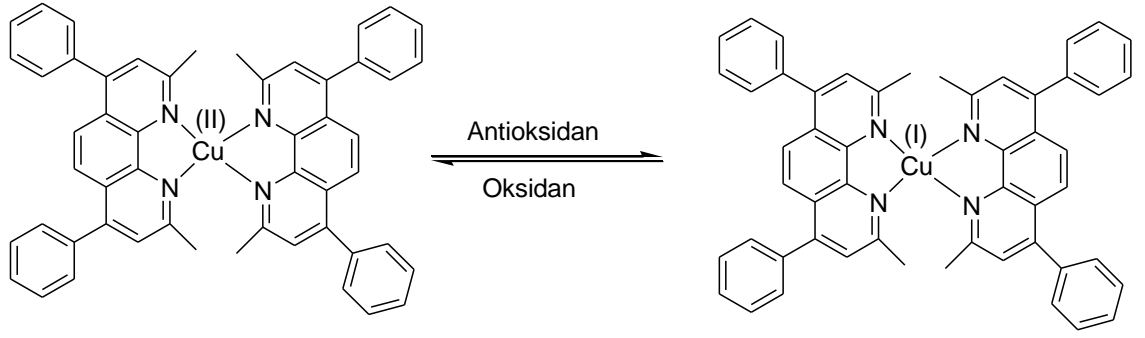


Şekil 2.17. FRAP reaktifi ile antioksidan bileşik arasındaki etkileşim.

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

Apak ve arkadaşlarının geliştirdiği bu yöntemde [60], 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (Neocuproin-Nc)'in Cu(II) ile oluşturduğu bakır(II)-neocuproin kompleksi (Cu(II)-Nc), bakır(I)-neocuproin [Cu(I)-Nc]'e dönüşmekte ve bu olayda bakırın indirgenmesinden yararlanılarak Cu(II)-Nc'in 450 nm'deki maksimum absorpsiyonu ölçülmek suretiyle antioksidan aktivitesi bulunmaktadır. Bu metoda, "bakır(II) iyonu indirgeme antioksidan kapasite yöntemi" denilmiş ve bu kısa bir şekilde CUPRAC metodu olarak ifade edilmiştir.

Bu teknik, sulu Cu(II) klorür çözeltisi, alkolde hazırlanmış neocuproin (2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline) çözeltisi, sulu amonyum asetat (pH=7 tamponu) çözeltilerinin karıştırılması, antioksidan ekstraktlarının eklenmesi ve belirli bir süre sonra spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda absorpsiyon ölçülmesiyle gerçekleştirilir. Bazı antioksidanların renk oluşumu hızlı gerçekleşirken (askorbik asit, gallikasit ve kuersetin gibi), bazıları ise yavaş gerçekleşmekte (naringin, naringenin gibi), bu olayı hızlandırmak için 50 °C'de 20 dakika tepkimenin oluşması sağlanmaktadır. Bu yöntemde de, troloks veya benzer bir madde karşılaştırma amacıyla kullanılmaktadır [60].



Şekil 2.18. Cu(II)' nin antioksidan madde ile Cu (I)' e indirilmesi

Çizelge 2.2'de literatürde mevcut bazı diğer antioksidan kapasitesi ölçüm yöntemlerinin çeşitli özelliklerine göre sınıflandırılması gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Literatürde mevcut bazı diğer antioksidan kapasitesi ölçüm yöntemlerinin çeşitli özelliklerine göre sınıflandırılması [51,52, 61,62].

Yöntem	Radikal kaynağı	Biyolojik ilgisi	Reaksiyon mekanizması	Ölçüm prensibi	Gerekli cihaz
Toplam radikal kapalı antioksidan parametresi (TRAP)	Peroksil (ROO [•])	Doğrudan	Hidrojen atom transferi (HAT)	Peroksil radikalının antioksidan madde tarafından inhibe edilmesi optik olarak yada floresans şiddetine bakılarak ölçülür.	Floresans spektrofotometre
Toplam oksidan yakalama aktivitesi (TOCS)	Hidroksil, peroksil, peroksinitril	Doğrudan	Hidrojen atom transferi (HAT)	KMBA (Ketomethiobutirik asit) substratı radikal madde ile etilen olur. Antioksidan madde radikal ile reaksiyona girerek etilen oluşumunda değişikliğe yol açar. Etilen inhibasyonu ölçülür.	Gaz kromatografisi sıvık yüzey
Kemiluminesans (CL)	Peroksil (ROO [•])	Doğrudan	HAT Hidrojen atom transferi (HAT)	Radikal maddenin işaretleyici bileşenlerle verdiği CL emisyon şiddetinin antioksidan madde tarafından azaltılması ölçülür.	Kemiluminesans (CL) dedektör

Çizelge 2.2'nin devamı

Foto Kemiluminesans (PCL)	Süper oksit ($O_2^{\cdot-}$)	Belirtilmemiş	Belirtilmemiş	Süperoksit radikali fotokimyasal olarak oluşturulur ve CL ile kombine edildikten sonra antioksidan madde tarafından CL emisyon şiddetinin azaltılması ölçülür	Işıma duyarlı CL dedektör
Düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonu	Peroksil (ROO^{\cdot})	Doğrudan	Hidrojen atom transferi (HAT)	Lipit peroksidasyonu sonucu oluşan konjuge dien yada peroksitler 234 nm de ölçülür	UV-Vis spektrofotometre
H_2O_2 yakalama	H_2O_2	Doğrudan	Belirtilmemiş	Antioksidan madde tarafından hidrojen peroksit (H_2O_2) oksidasyonunun engellenmesi ölçülür	UV-Vis spektrofotometre
HO^{\cdot} yakalama	HO^{\cdot}	Doğrudan	Belirtilmemiş	H_2O_2 nin fenton reaksiyonları sonucunda oluşturduğu hidroksil (HO^{\cdot})radikalinin antioksidan madde tarafından yakalanması ölçülür	UV-Vis spektrofotometre
$O_2^{\cdot-}$ yakalama	$O_2^{\cdot-}$	Doğrudan	Belirtilmemiş	Süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) radikalinin enzimatik antioksidanlar tarafından yakalanması ölçülür	UV-Vis spektrofotometre

2.6.7. Folin-Ciocalteu (FC) Metodu: Toplam Fenolik Madde Tayini Metodu

Besinlerin bünyesinde mevcut olan toplam fenolik madde miktarının hesaplanabilmesi, antioksidan aktiviteyi oluşturan hidroksil grupları hakkında bilgi elde edilmesi açısından çok önemlidir. Folin-Ciocalteu (FC) yöntemi, doğal maddelerin toplam fenolik madde miktarı ölçümü için kullanılan bir yöntemdir. Bu tekniğin temel mekanizması oksidasyon tepkimelerine dayandığı için, diğer bir antioksidan aktivite ölçüm metodu olarak da kullanılabilir.

Folin-Ciocalteu reaktifi ile fenolik maddeler etkileştirilerek bunların okside olması ve belirli bir süre beklemek suretiyle tepkimenin tamamlanması sağlanır. Oluşan renkli karışımın 745-765 nm de absorbanları okunur [52].

Folin-Ciocalteu reaktifi, fenolik özellik göstermeyen maddeler tarafından da indirgenmekte olup sadece fenolik bileşenlere karşı spesifik değildir. Folin-Ciocalteu reaktifinin, fenolik bileşikler ile tepkime verebilmesi için ortamın pH'sı sodyum karbonat ile yaklaşık 10'a ayarlanır. Fenolik bileşiklerdeki protonların ayrılması ile fenolat anyonları oluşur ve bu suretle Folin-Ciocalteu reaktifini indirgeme özelliğine sahip olurlar [53].

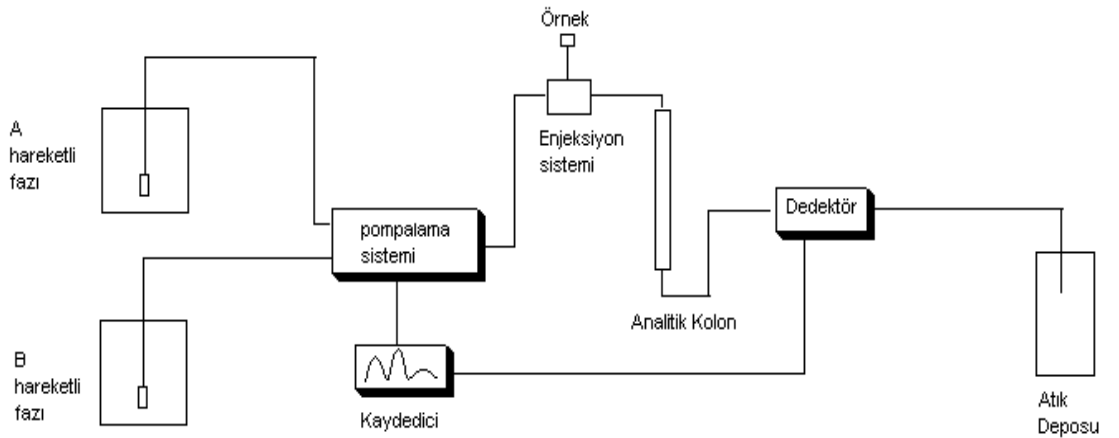
Folin-Ciocalteu yöntemi, hassasiyeti ve kesinliğinin yüksek olduğu bilinen bir yöntemdir. Fakat tepkime, pH'ı düşük bölgelerde yavaş gerçekleşmekte ve özeliğini yitirmektedir. Ortamda ekstrakte olmuş proteinlerin de olabilmesi bu yöntemin dezavantajıdır. Bundan dolayı spesifik bir metot olduğu kabul edilmemektedir. Ayrıca analiz sırasında ortamda kolayca indirgenen maddelerle çok rahat tepkimeye girmektedir. Bunun için ekstrakte olan proteinler ve kolayca yükseltgenen maddelerin ortamda bulunmaması son derece önemlidir [51]. Bu yöntemde karşılaştırma referans standardı olarak genellikle gallik asit kullanılır. Literatürde farklı standartlar da kullanılmaktadır [52].

2.7. Yüksek-Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Bir ayırma tekniği olan yüksek performanslı sıvı kromatografisinde (HPLC), bir çözücüde çözülmüş olan bileşikler, hareketsiz sıkı bir faz içeren kolon içinden, yüksek basınçlı pompa ile gönderilen hareketli faz yardımı geçmeye zorlanırlar. Hareketli faz içindeki bileşenler, durgun ve sıkı faza karşı farklı ilgilerinden dolayı değişik hızlarda ilerleyerek kolondan farklı zamanlarda çıkmaktadır. Kolonun çıkışına yerleştirilen uygun bir dedektör yardımıyla farklı zamanlarda kolondan ayrılan maddeler sırasıyla belirlenerek kaydedilir. Yüksek hızlı ayırımların yapıldığı bu işleme, yüksek performanslı (basınçlı) sıvı kromatografisi denmektedir [63].

Yüksek performanslı sıvı kromatografi sisteminin birimleri ve özellikleri şu şekilde sıralanabilir:

- a) Hareketli/ Taşıyıcı Faz Depoları
- b) Taşıyıcı Faz Hareket Birimi; Pompa sistemi
- c) Enjeksiyon (Örnek Yükleme) Sistemi
- d) Ayırma Birimi; Analitik Kolon(lar)
- e) Ölçüm Birimi; Dedektör(ler)
- f) Yazım Birimi; kaydedici, İntegratör
- g) Atık Deposu



Şekil 2.19. HPLC cihazı akış şeması [63].

Hareketli fazın akış hızı ayırma süresince aynı olmalıdır. Durgun fazda bozunma ve tikanıklık, basınçta ve akış hızında değişikliğe neden olabilir. Pompa sisteminin düzgün çalışabilmesi için bu sistemin içerisinde hava kabarcığının olmamasına dikkat edilmelidir. Pompa yürütücü fazı deposundan alarak ilk önce enjeksiyon sistemine gönderir. Enjeksiyon sistemi otomatik veya manuel olmak üzere iki farklı şekilde olabilmektedir. Manuel olan bir sistemde örnek enjeksiyonu işleminin kolaylıkla yapılabilmesi ve çözücü akışının enjeksiyondan etkilenmemesi için analiz edilecek örnek çok uçlu bir valfe gönderilir. Bu valf yardımıyla örneğin bulunduğu hareketli fazın kolana doğru taşınması sağlanır.

HPLC analitik kolonlar, 2-8 mm iç çapına sahip, mikropartiküllerden veya peliküllerden yapılmış dolgulu kolonlardır. Bu kolonlar paslanmaz çelikten veya kartuş şeklinde olabilmektedir. Bu sistemde gerekli koşullar iyi ayarlandığında, kolonda birbirinden ayrılan kompleks karışım, hareketli faz yardımıyla ölçüm birimi olan dedektöre taşınır. Dedektörün, maddenin derişimi ile orantılı bir özeliğini ölçülebilmesi için uygun koşullar sağlanmalıdır. Dedektör yardımıyla analiz edilecek maddelerin derişimi belirlenir [64].

Bu ayırma metodunda bileşenleri birbirinden ayırmak için yararlanılan önemli faktörlerden birisi de hareketli fazdır. Farklı polaritedeki organik çözücüler ile numunenin birlikte kolondan yürütülmesiyle daha iyi bir ayırma sağlanabilir. Ayırmada kullanılan hareketli fazın akış hızı genelde 10-60 ml/saat hızındadır. Bu akış hızını meydana getirebilmek için hareketli faza uygulanan basınç 30-400 atm arasında değişmektedir. Uygulanan basınç hareketli fazın viskozitesine, kolonun geçirme özelliğine, kolon dolgu maddesinin tanecik boyutuna bağlı olarak değişir. Kolonun boyunun artmasıyla ve kolonun dolgu maddesinin tanecik boyutunun azalmasıyla hareketli fazın akış hızında azalma meydana gelir. Hareketli fazın akış hızının değişmemesi için basıncın artırılması gerekir. Hareketli fazın akış hızı, dedektör çıkışına yerleştirilen hacmi belirli kaba sıvının dolmasıyla geçen zaman ölçülerek bulunur [63].

HPLC ile yapılacak ayırmalar değişik yöntemler uygulanarak yapılır. Ayırmada kullanılan yöntem yapılan çalışmanın türüne, analiz edilecek numunelerin özelliklerine bağlıdır [65].

Genelde HPLC ayırma yöntemleri dağılma tipinde çalışmaktadır. Dağılma kromatografisi sabit ve hareketli fazın birbirine göre polar oluşuna bağlı olarak iki kısma ayrılır. Normal faz (NP), sabit haldeki fazın hareketli olan fazdan daha polar olduğu durumdur. Bunun içinde polarlığı az olan bileşikler durgun fazdan ilk olarak çıkmaktadırlar. Durgun fazda ilerleyen analitin tutulması hareketli fazın polarlığının artmasıyla azalır. Ters fazda ise (RP) sabit haldeki faz daha az polariteye sahiptir. Bu durumda polaritesi yüksek olan analitler sabit fazı daha çabuk terketmektedirler. Ayırmada hareketli fazın hidrofob özelliği artıkça analitin kolonda tutunması azalır. Genellikle HPLC sistemlerinde ters faz (RP) kullanılmaktadır. Ters faz uygulamalarında da en yaygın olarak C18 kolonlar kullanılır [66].

Analitler kolonda ilerleyerek farklı zamanlarda kolondan ayrılır. Bu ayrılan analitler bir spektrometrik sistem yardımıyla analiz edilir. Ayrılan analitler UV ve görünür bölge ışınını geçirebilen bir numune hücresinden geçirilir. Numune hücresinden belirlenen dalga boyundaki ışınlar geçiriliyorken analitlerin yaptıkları absorpsiyonlar bir dedektör yardımıyla belirlenerek kaydedilir. Genellikle dedektör olarak diyot serili dedektör (DAD) kullanılmaktadır. Çift ışınlı bir cihazda, ışık kaynağından çıkan ışın demeti bir ayırıcı yardımıyla ikiye ayrılır. Bu ışınlardan biri analit içermeyen referans hücresinden, diğer ışın ise analit içeren hücreden geçirilerek, analitlerin absorpsiyonları bu ikisini farkı olarak hesap edilir. Böylece HPLC kromatogramları elde edilir [67].

HPLC, fenolik maddelerin ayrılmasında kullanılan önemli bir metottodur. Ters fazlı (RP) kolon kullanımı fenolik bileşikleri ayırmada daha fazla yaygındır. Gıdalardan elde edilen fenolik analitler genellikle UV görünür dalga boyunda UV-Vis dedektörü ve DAD (diyot serili dedektör) ile ölçülmektedir [68].

HPLC de polifenolik maddelerin belirlenmesinde, kolondan geçerkenki alıkonma zamanı temel alınmaktadır ve bu alıkonma zamanları bileşiklerin kimyasal yapısına

bağlıdır. Hidroksitlenmiş ve glikozitlenmiş fenolik analitlerin kolonda alıkonma zamanı kısa gerçekleşirken, metillenmiş fenolik analitlerin kolonda alıkonma zamanı ise uzundur. [69].

HPLC tekniğinde bir standardın konsantrasyonuna karşı oluşan pik alanları kullanılarak kalibrasyon eğrileri ve her bir standart'ın kolondan ayrılıp gelme zamanları belirlenir. Çeşitli standartların kalibrasyonu için sıralanan dalga boyları kullanılır. Bitki ekstraktlarının fenolik bileşimlerinin pikleri elde edildikten sonra, kalibrasyon eğrileriyle karşılaştırılarak bu bileşimlerin konsantrasyonları hesaplanır.

2.8. Antioksidan Madde Ekstraksiyonu İçin Kullanılan Teknikler

Bu teknikler, sıvı çözücü ekstraksiyonları, katı faz ekstraksiyonları, süperkritik akışkan ekstraksiyonları ve ultrasonik esaslı ekstraksiyonlar olmak üzere dört kısımda ele alınabilirler [70].

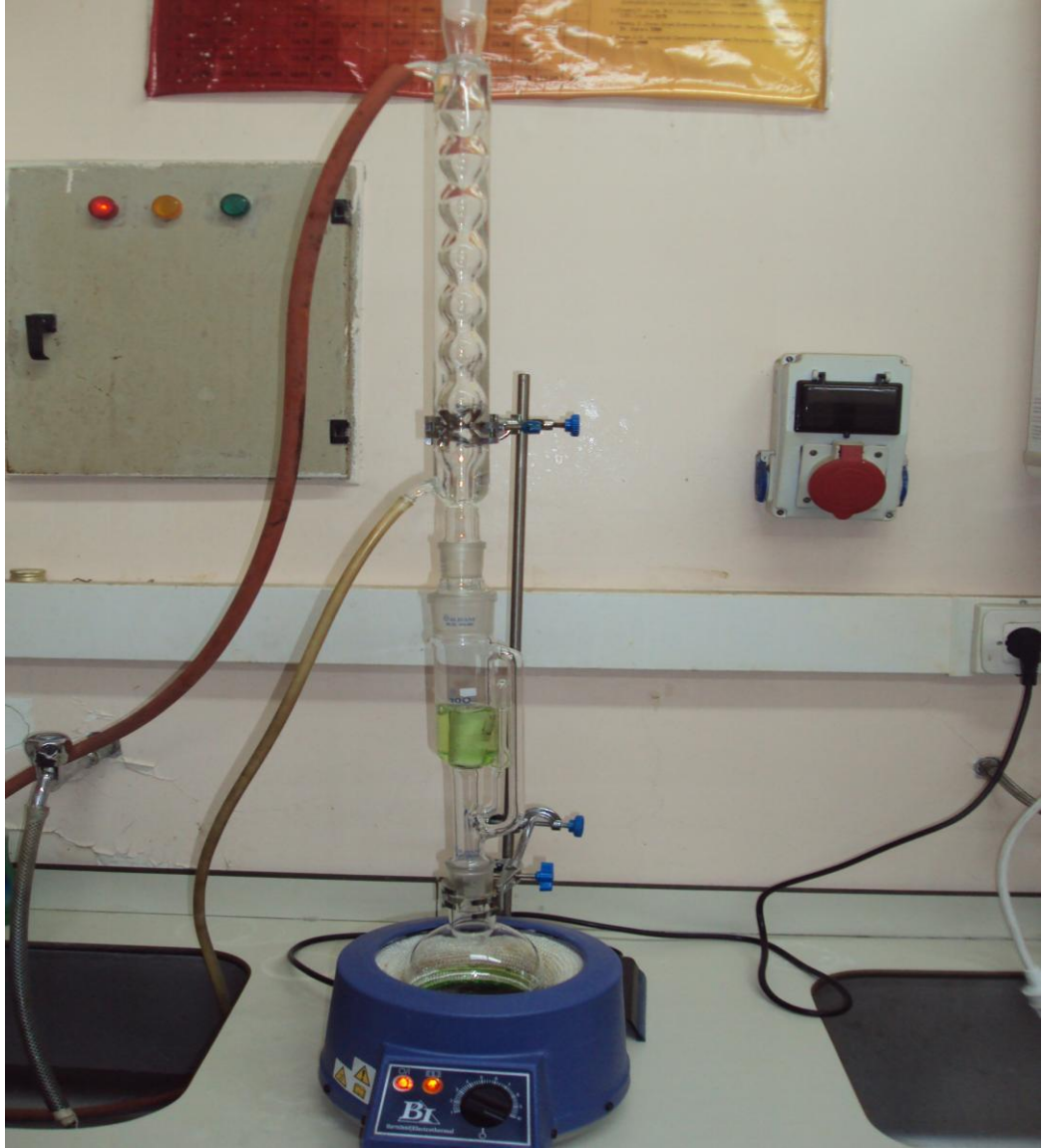
2.8.1. Sıvı Çözücü Ekstraksiyonları

Tıbbi özellikteki bitkiler ve gıdalarda bulunan fenolik bileşikler, polifenoller ve polihidroksi fenoller olarak da bilinmektedir. Günümüzde yapay antioksidanların çeşitli zararlı etkilerinden dolayı yapay antioksidanlara olan ilgi giderek azalmaktadır. Bu eksikliği gidermek için son yıllarda doğal antioksidanlara olan ilgi ve bunların bitkilerden elde edilmesi çalışmaları giderek artmaktadır. Bitkilerden elde edilen doğal kaynaklı antioksidanlar sadece gıdalar için koruyucu etki göstermemekte, aynı zamanda sağlık üzerine de olumlu etkiler göstermektedirler. Çoklu OH grubu bulunduran polifenoller hidrofilik özellik gösterirler ve metanol ve su gibi çözücü ortamında ekstrakte edilebilirler [71].

Ekstraksiyon çözücüsü, ortamdaki maddelerden analiti kolay çözmeli, diğer maddeleri ya hiç çözmemeli ya da çok düşük düzeyde çözmelidir. Çözücü seçimi daha sonraki adımlar için uygun olmalıdır. Kullanılan çözücünün polaritesi hedef bileşenin polaritesine yakın olmalıdır. Bu nedenle apolar özellikte ve lipofilik özellikteki

maddelerin ekstraksiyonu için apolar olan hekzan, pentan gibi çözücüler kullanılmaktadır. Diğer yandan polar bileşiklerin ekstraksiyonu için daha polar olan asetonitril, metanol, etilasetat su gibi çözücüler kullanılmaktadır. Ayrıca geniş bir polaritede ekstrakt elde edilmek istenirse polar-apolar çözücü karışımları tercih edilmelidir. Diğer bir yöntem ise önce polar çözücüde daha sonra ise apolar çözücüde ekstraksiyon işlemleri yapmaktır [72,73].

2.8.1.1. Soxhlet Ekstraksiyonu



Resim 2.1 Çalışmada kullanılan Soxhlet ekstraksiyon sistemi

Soxhlet ekstraksiyonu genellikle, kuru numunelerin ekstraksiyonunda kullanılan bir tekniktir. Numune filtre kağıdından yapılmış bir kartuş içinde Soxlet ekstraktörüne yerleştirilir. Ekstraksiyonda çözücü olarak genellikle organik çözücüler kullanılır. Cam balona konulan çözücü bir mantolu ısıtıcı yardımıyla ısıtılır ve böylece çözücü buharlaştırılır. Çözücü buharı geri soğutucuya geldiğinde yoğunlaşarak filtre kağıdına sarılı numunenin üzerine damlalar halinde düşer. Numunenin bulunduğu ekstraksiyon tüpünün çözücüyle dolmasıyla, geri devir kolunun seviyesine ulaşılır ve burada sifon oluşarak çözücü cam balona boşalır.

Ekstraksiyonda gerçekleşen bu olaylar ekstraksiyon tüpünün içerisindeki çözücü renksiz oluncaya kadar devam eder. Ekstraksiyonda döngü sırasında, ekstraksiyon tüpünde bulunan numunedeki hedef bileşen çözücüde çözünür. Sifon ile çözücü ve hedef bileşen cam balona geçer. Isıtılan cam balonda yalnızca çözücü buharlaştığı için hedef bileşen tekrardan döngüye katılmaz Bu olay, Soxlet ekstraksiyon tekniğinin en önemli özeliğidir. Burada, yalnızca saf çözücü katı numuneyi ekstrakte etmek için buharlaşır ve yoğunlaşarak döngüye katılır. Böylece Soxlet ekstraktörüyle yapılan ekstraksiyon verimi daha yüksek olmaktadır. Bu ekstraksiyon metodunda kolaylıkla buharlaşabilen çözücüler kullanıldığından dolayı hedef bileşen ile çözücü birbirinden kolaylıkla ayrılmaktadırlar.

2.8.1.2. Basınçlı Çözücü Ekstraksiyonu ve Uygulamaları

Basınçlı çözücü ekstraksiyonu (BÇE), genelde katı numunelerdeki hedef bileşenleri ekstrakte etmek için kullanılan bir tekniktir. Bu teknikte numunedeki hedeflenen bileşenleri iyi bir şekilde çözebilmek için çözücüye yüksek sıcaklık ve yüksek basınç uygulanarak çözücünün çözme özelliği değiştirilmektedir. Sıcaklığın etkisiyle viskozitenin düşürülmesi sonucu çözücünün ıslatabilme yeteneği artırılmaktadır. Normal şartlarda su ile ekstrakte edilemeyen hedef bileşenler, BÇE tekniği kullanılarak sıcaklığın ve basıncın etkisiyle suyun çözme özelliğinin değiştirilmesiyle kolaylıkla ekstrakte edilebilmektedir. Çözücü olarak çoğunlukla suyun kullanılması, toksik olmaması, çevreye zarar vermemesi ve suyun ucuz bir çözücü olması tekniğin avantajlarından bazılarıdır [74].

Geleneksel ekstraksiyon tekniklerine alternatif olarak geliştirilen BÇE tekniği, ekstraksiyon süresi, çözücü tüketimi, ekstraksiyon verimi ve uygulanan yöntemin tekrarlanabilirliği bakımından da diğer ekstraksiyon tekniklerine göre üstünlükler sunmaktadır [75].

Bu teknik, çözücülerin kritik noktalarına ulaşmadan, yüksek basınç ve yüksek sıcaklıkta ekstraksiyon işleminin gerçekleştirilmesi nedeniyle literatürde:

- Basınçlı çözücü ekstraksiyonu ,
- Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu,
- Basınçlı akışkan ekstraksiyonu,
- Basınçlı sıcak çözücü ekstraksiyonu
- Yüksek basınçlı çözücü ekstraksiyonu
- Yüksek basınç yüksek sıcaklıkta çözücü ekstraksiyonu
- Subkritik çözücü ekstraksiyonu

gibi farklı isimlerle anılmaktadır.

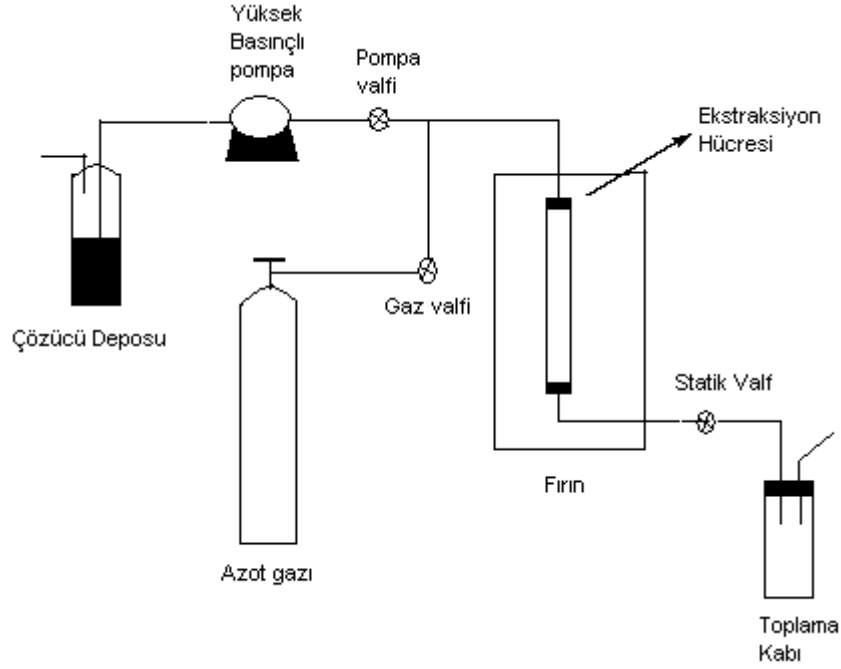
Bu teknikte çözücü olarak su kullanıldığı zaman ise;

- Subkritik su ekstraksiyonu,
- Sıcak su ekstraksiyonu,
- Basınçlı sıcak su ekstraksiyonu,
- Yüksek sıcaklıkta su ekstraksiyonu,
- Süper ısıtılmış su ekstraksiyonu

gibi isimler almaktadır.

BÇE, yüksek basınçın etkisiyle çözücünün kendi kaynama noktası üzerinde dahi sıvı halde bulunmasına ve böylece yüksek sıcaklıkta ekstraksiyonun gerçekleşmesine olanak tanıyan bir teknik olarak tanınmaktadır. Bu teknik ile 3-20 dakikada 3-20 MPa basınç

ve 40-200 °C sıcaklıkta, bu koşullara dayanıklı kapalı bir ortamda numunenin ekstraksiyonu kolaylıkla yapılmaktadır. BÇE tekniği suyun çözme özelliğini artırarak fitokimyasalların ekstraksiyonunun daha etkili bir şekilde gerçekleşmesini sağlamaktadır [76].



Şekil 2.20. BÇE cihaz sisteminin şeması

2.8.2. Katı-Faz Ekstraksiyonları

Katı-faz ekstraksiyonu, bir çok geleneksel ekstraksiyon metoduna göre daha hızlı gerçekleşen ve daha duyarlı bir ekstraksiyon tekniğidir. Katı-faz ekstraksiyonu tekniği ile numune hazırlama oldukça basittir. Bu teknikte katı faz için, C₈, C₁₈, C₁₈-ters-faz, iyon değiştirici, poliamid gibi ekstraksiyon kartuşları kullanılmaktadır. Bu ekstraksiyonda, hareketli faz olarak da metanol, asetonitril, etilasetat tetrahidrofur, metanol-dimetilsülfoksit karışımı gibi çözücüler kullanılmaktadır.

Katı-faz ekstraksiyonunda bir analitteki fenollerin dedektör duyarlığında ve seviyelerindeki değişim farklı teknikleri gerektirebilir. Örneğin kan portakalı suyundaki

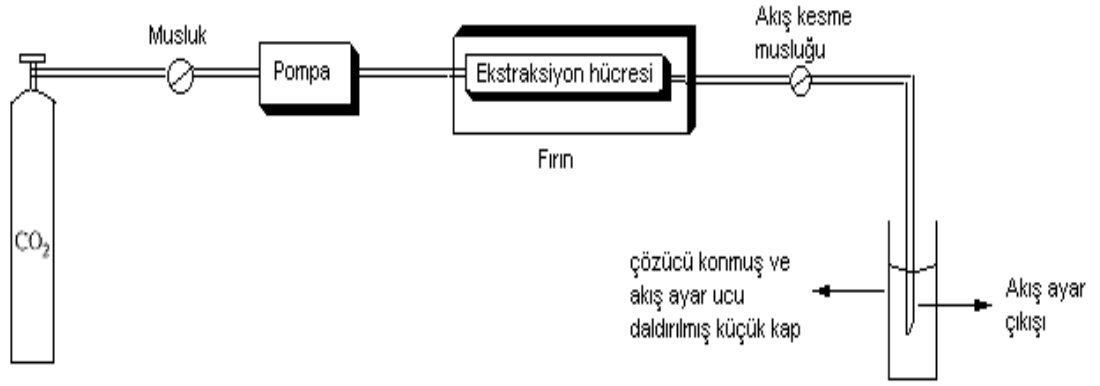
flavonon glikozitler basit ekstraksiyonla geri kazanılırken, trans-sinamik asit ters-faz katı ekstraksiyonuyla örnek hazırlama ve numune konsantrasyonu tek bir adımda olacak şekilde geri kazanılabilmektedir [70, 77, 78].

2.8.3. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu

Kendi kritik sıcaklık ve basıncının üstünde sıcaklık ve basınçta olan, gaza benzer özellik gösteren, bulunduğu kabın hacmini alan ve sıkışma özeliği gösteren akışkanlara ‘süperkritik akışkan’ denilmektedir. Süperkritik akışkanlar sıvı olarak kabul edilmezler, fakat sıvılara benzer bir öz kütle (0,1-1 g/ml) ve çözücü özelliğindedirler [79].

Bir gazın basıncını artırmak suretiyle sıvılaştırılabileceği en son sıcaklık derecesine o gazın ‘Kritik Sıcaklığı’, bu noktadaki basınca da ‘Kritik Basıncı’ adı verilir. Kritik sıcaklık ve kritik basınç değerlerinin üzerinde bulunan bir gaza ise ‘süper kritik akışkan’ denmektedir. Kritik değerlerinin üzerinde bulunan gazlar, basıncı artırmak suretiyle sıvılaştırılamazlar.

Süperkritik akışkan ekstraksiyonu kullanımının geleneksel ekstraksiyonlara göre bazı üstünlükleri bulunmaktadır. Süperkritik akışkan ekstraksiyonu (SAE) daha kısa bir sürede yapılmakta, akışkanın viskozitesi düşük olduğundan dolayı daha iyi bir kütle transferi özeliği sağlanmaktadır. Süperkritik akışkanlar oda sıcaklığında genellikle gaz halde oldukları için, sıvı ekstraksiyonlarından sonra çoğunlukla uygulanması gereken konsantrasyon işlemi ortadan kalkmakta veya daha basit bir işlemle yapılmaktadır. Süperkritik akışkan ekstraksiyonu, esansiyel yağlar, tıbbi bileşikler, yağlar, karotenler, alkaloidler, diğer koku ve tat verici bileşikler gibi polar nitelikte olmayan çeşitli bileşik gruplarına uygulanmaktadır [80].



Şekil 2.21. Toplanan ekstraktın doğrudan analiz sistemine verilmediği (off-line) tipte bir SAE sistemi için akış düzeni [66].

Geleneksel ekstraksiyon metotları, uzun ekstraksiyon süresine sahip olmaları ve son derece reaktif fenolik türlerin bozunmalarını engelleyici bir önlem içermediklerinden katı ve yarı-katı numunelere uygulamaları sınırlı olmaktadır. Süperkritik akışkan ekstraksiyonu, fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu ve geri kazanımı için bir çok avantaj sunmaktadır [81].

2.8.4. Ultrasonik Ekstraksiyon Tekniği

Geleneksel ekstraksiyon tekniklerinin bazı yetersizlikleri üzerine alternatif ekstraksiyon teknikleri geliştirilmiştir. Bu teknikler arasında mikro dalga ekstraksiyonu [82], enzimatik ekstraksiyon [83] ve ultrason yardımlı ekstraksiyon sayılabilir [84]. Ultrason yardımlı ekstraksiyon tekniğinin kullanımı son yıllarda giderek artmaktadır. Ultrasonun çalışma prensibi, meydana gelen dalgaların esnek özellikte olması ve bulunduğu ortamda rahat yayılması sonucu oluşur. Fiziksel olan titreşimler, fiziksel basınç dalgalarını oluşturarak, enerjiyi ortama veya ortamda ise dalga yardımıyla ortamda bulunan maddelere iletmektedir. Hareket halindeki madde enerjisini diğer maddelere iletir ve bu yolla diğer maddeler de bu enerjiyi etrafındaki maddelere ileterek ilk konumuna geri döner. Maddelerin yaklaştığı bölgelerde basınç artışı meydana gelmekte, maddeler uzaklaştığında basınç ilk haline dönmektedir.

Belirli bir zamandaki basınç miktarı (Pa), zaman aralığı (t) ve frekansa (f) bağlıdır (Denklem 20):

$$P_a = P_A \sin 2\pi ft \quad (20)$$

Bu denklemdeki, P_A basınç genliğini belirtmektedir [85].

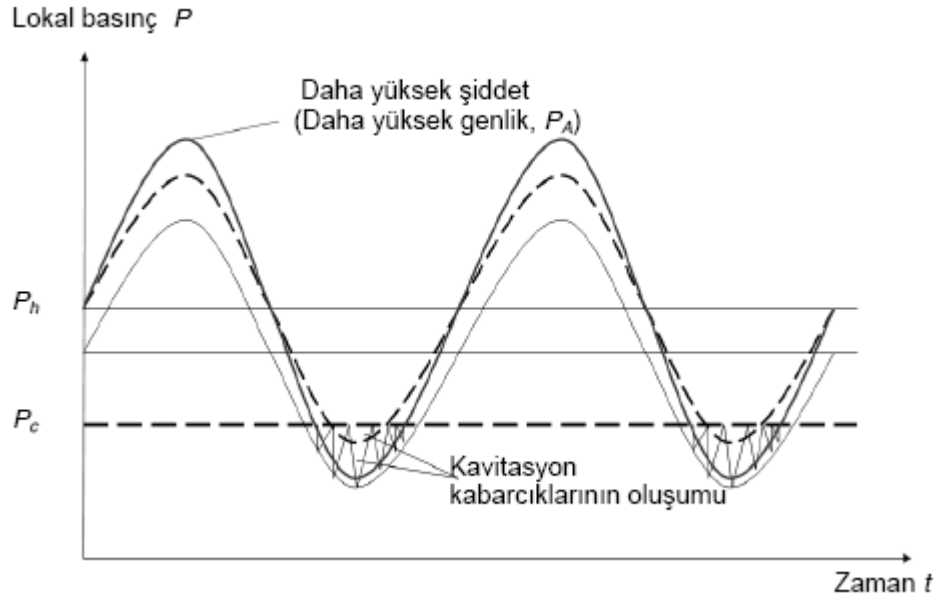
Ultrasonun etkinliğini değiştiren parametrelerden biri ise ses şiddetidir. Şiddet ($W.cm^{-2}$), dalga tarafından birim yüzeye birim zamanda taşınan enerji miktarıdır. Ses şiddeti meydana gelen dalganın enerjisinin göstergesi olarak kullanılır. Dalganın genliği değiştirilerek farklı şiddetlerde dalga meydana getirilir.

Ultrasonik ses üreten cihazlar yardımıyla ses dalgası meydana getirilmektedir. Bu cihazlar belirli frekans aralığında (20-50 kHz) çalışır ve alternatif akımı kullanarak mekanik haldeki titreşimlere dönüştürür. Belirli frekansta elde edilen titreşim hareketlerinin çevreye iletilmesi sağlanır. Uygulama sıvı ortamda yapıyor ise akustik bölge ortamında bulunan maddelerin titremesine neden olur. Sıvı ortamın basıncı (hidrostatik basınç, P_h) sıvıya uygulanan ultrasonik basınçla beraber artmaktadır (Denklemler 20 ve 21):

$$P = P_h + P_a \quad (21)$$

Burada P_a , uygulanan akustik basıncı, P_h ise hidrostatik basıncı ifade eder.

Ortama uygulanan basınç artırıldığında moleküller birbirine yaklaşarak sıkışma meydana gelmektedir. Basınç azalır ise moleküller birbirinden uzaklaşır. Uygulanan basınç kritik değerin (P_c) altına düştüğünde, moleküllerin arasındaki uzaklık molekülleri bir arada tutmak için gerekli olan değeri aşar ve sıvı kırılarak boşluklar meydana gelir ve bu boşluklar “kavitasyon kabarcıkları” olarak adlandırılır. Şekil 2.23’de kavitasyon kabarcıklarının oluşumu gösterilmiştir [85, 86].



Şekil 2.22 Kavitasyon kabarcıklarının oluşumu [85, 86].

Sıvı ortamda oluşan bu boşluklar (kavitasyonlar) veya kabarcıklar ilk kez meydana geldikten sonra, basınç kritik değerden daha düşük seviyelere kadar iner. Basınç da osilasyon sonucu sıkışma anında en yüksek değere sahip olduğunda meydana gelen kavitasyon kabarcıklarının hepsinin veya bir bölümünün çökmesi sonucu çok yüksek bir enerji meydana getirerek şok dalgaları ve mikro-jetler oluşturulur [87, 88]. Oluşturulan şok dalgaları ve mikro jetlerin yardımıyla hücre çeperleri yıkılarak, dokuda bulunan ekstrakte edilebilir maddelerin elde edilmesi daha kolay olmaktadır. Ekstraksiyon anında çözücü ortamına bu ekstrakte edilebilir maddelerin kütle transferi yoluyla etkin bir şekilde geçişi gerçekleşir [89].

Sıvı içerisindeki ultrasonik dalgalar artırılarak sıvı içerisinde hareket oluşturulur. Bu durum bir karıştırma görevi yapar ve böylece kütle transferine karşı direnç azaltılır [90]. Sıvıda meydana gelen karışma, ultrasonik dalgaların meydana getirdiği ses rüzgarının etkisiyle oluşmaktadır. Gerçekleşen bu olayda, katı ile sıvı ara yüzeyinde ultrason etkisiyle mikro boyutta karışma gerçekleşmektedir [91].

Ultrasonik ekstraksiyon anında oluşan ekstraksiyon etkinliğinin, moleküler boyutta hareketin ve çözücünün çözme özeliğinin artmasından kaynaklandığı düşünülmektedir

[92]. Ultrasonik ekstraksiyonun, geleneksel ekstraksiyon yöntemlerine göre, ekstraksiyon süresinin kısa olması, hedeflenen biyoaktif bileşik kaybının daha az olması gibi avantajları bulunmaktadır [89, 93].

Ultrasonik ekstraksiyon yönteminin kullanımını diğer ekstraksiyon yöntemlerine göre giderek artmaktadır. Ultrasonik ekstraksiyon tekniğinde yüksek enerjinin etkisi ve ekstraksiyonda kullanılan çözücü ihtiyacının az miktarda olması, tekniği diğer ekstraksiyon tekniklerine göre iyi bir alternatif haline getirmektedir. Bunun yanında ultrasonun özellikle düşük molekül ağırlıklı bileşiklere daha iyi etki ettiği bilinmektedir [94].

Ultrasonik ekstraksiyon, numunelerden hedeflenen biyoaktif maddelerin ekstrakte edilmesinde başarıyla kullanılır. Ultrasonun etkisiyle ekstraksiyon verimi, hücre çeperlerinin yıkılması, parçacık boyutunun azaltılması ve oluşan kavitasyon kabarcıklarının etkisiyle gerçekleştirilen kütle transferine bağlı olmaktadır [95].

Bu teknik, geleneksel ekstraksiyon tekniklerine göre daha ucuz, kolaylıkla hazırlanabilen ve çevreye zararı olmayan ekstraksiyon tekniklerinden birisidir. Ultrasonik ekstraksiyonunun numunelere etki etme prensibi, ekstraksiyon anında uygulanan dalganın etkililiği ve ekstraksiyon çözücüsünde oluşturulan akustik kavitasyonların etkisi temeline dayalıdır. Bir diğer taraftan, ekstraksiyon çözücüsüne uygulanan ultrasonun etkisiyle çözücüde mekanik bir etki ortaya çıkar ve bu etki numuneye çözücünün daha etkili bir şekilde girmesini sağlar. Oluşan bu etki, hedeflenen bileşenlerin katı numuneden çözücüye geçişlerine neden olur [96]. En önemli hususlardan bir tanesi ise katı ile sıvı yüzeyi arasındaki teması arttırmasıdır. Ayrıca ultrasonik ekstraksiyon esnasında çözücüye ekstraksiyona yardımcı olacak kimyasal ilavesi gerekmemekte ve numunede hedeflenen maddelerin kimyasal özelliklerini bozacak bir etki oluşmamaktadır [97].

Ultrasonik ekstraksiyon uygulanırken ultrasonik dalgaların dağılımı önemlidir bunun için ekstraksiyon sisteminin uygun bir şekilde kurulması gerekmektedir. Ultrasonik dalga kaynağının yakınlarında ses dalgasının gücü en fazladır. Ayrıca katı parçacıkların

miktarının çok olması durumunda ultrason etkisi azalmaktadır. Uygulanan ultrason dalgasının numune içerisinde sabit kalmaması için ve ekstraksiyon etkinliğini arttırmak için sistem karıştırılmalıdır. Ultrasonik dalga kaynağı olarak ultrasonik banyo ve özel üretilmiş probalar kullanılmaktadır [98].

2.9. Ultrasonik Ekstraksiyonun Fenolik Bileşiklere Uygulanması [Literatür Taraması]

Ultrasonik ekstraksiyon daha kısa sürede gerçekleştirilmekte ve fenolik bileşenlerin ekstraksiyonunu artırmaktadır [99].

Hindistan cevizi kabuğu iyi bir fenolik madde kaynağıdır. Ekstraksiyon süresi bu fenolik bileşikler elde etmede son derece önemlidir. Düşük sıcaklıklarda (100 °C), uzun ekstraksiyon periyodunda (> 50 dakika) elde edilen hindistan cevizi kabuğu tozu ekstraktının fenolik içeriğinin maksimum olduğu belirlenmiştir. Sıcaklığın düşmesi ekstraktın fenolik içeriği üzerine çok az etki ettiği gözlenmiştir. Ayrıca yüksek sıcaklıkta genellikle fenolik ekstraktlarda kanserojenik bir madde olan furfural oluşumu gözlenmektedir. Düşük maliyetle, ekstraktlarda en yüksek fenolik içeriği elde edebilmek için uygulanması gereken optimum koşullar olarak, 60 dakikalık ultrason ekstraksiyon süresi ve 100 °C sıcaklık belirlenmiştir. Ultrason uygulanan ekstraksiyonun, diffüzyon kontrollü bir proses olduğu ortaya konulmuştur [100].

Yapılan bir çalışmada buğday kepeğindeki fenolik bileşenlerin ekstraksiyonu işleminin optimizasyonu sonucunda en uygun işlemin, % 64'lük etanolle 60 °C' de 25 dakika süreyle uygulanan ultrasonik ekstraksiyon olduğu belirlenmiştir [101].

Paniwnyk ve arkadaşları, yaptıkları bir çalışmada *Rosmarinus officinalis* bitkisindeki antioksidanların ekstraksiyonuna ultrasonun etkisini inceleyerek, ultrasonik ekstraksiyon yönteminin bu amaçla kullanımının uygunluğunu tartışmışlardır. Araştırılan antioksidanlara ait HPLC sonuçları geleneksel çözücü ekstraksiyonlarıyla karşılaştırılmıştır. Ekstraksiyon çözücüsüne bağlı olarak düşük sıcaklıklarda ultrason kullanımının daha etkili bir ekstraksiyon şekli olduğu gözlemlenmiştir. Bu yöntemin gelişiminin daha da muhtemel olacağı sonucuna varılmıştır [102].

Başka bir çalışmada ise, kurutulmadan dondurulan soya içeceklerindeki izoflavonların hızlı tespiti için yeni bir metot geliştirilmiştir. Metot gelişimi esnasında birkaç parametre incelenmiştir: Çözücü olarak metanol ve etanol seçilmiş, numune çözücü oranı 5:1'e 0,2:1, sıcaklık 10-60 °C ve ekstraksiyon süresi 5-30 dakika alınmıştır. Soya içeceklerindeki izoflavonların ekstraksiyonları için en önemli parametrenin numune/çözücü oranı olduğu ortaya konulmuştur. En uygun metodun, çözücü olarak etanol, 20 dakika ekstraksiyon süresi ve 45 °C de ultrasonik banyo üzerinde 0,2:1 numune/çözücü oranı kullanılarak uygulanan metod olduğu ortaya konulmuştur. Ayrıca numuneler dondurulup kurutulmuş ve geleneksel metodla ekstrakte edilerek optimize edilen metod ile kıyaslanmış, toplam ve tek tek izoflavonların konsantrasyonunda belirgin bir fark bulunmamıştır. İzoflavonların konsantrasyonu 6,7-58,2 mg/L aralığında bulunmuştur [103].

Yapılan başka bir çalışmada, besin esaslı bir çözücü olan etanol kullanımıyla portakal kabuğundaki (*Citrus sinensis* L.) polifenol flavanonlarının ekstraksiyonları incelenmiştir. İstatistiksel analizler göstermiştir ki, en uygun koşullar 40 °C sıcaklık, 150 watt ses gücü ve 4:1 (v/v) etanol/su oranıdır. Geleneksel metotla karşılaştırıldığında, optimize edilmiş yöntemle daha yüksek toplam fenolik içerik (275 mg gallikasit eşdeğeri/100 gr yaş ağırlık), daha yüksek flavanon konsantrasyonları (70,3 mg naringin ve 205,2 mg hesperidin/ 100 g yaş ağırlık) ve ekstraksiyon verimi (% 10,9) elde edildiği görülmüştür. Bundan da ötesi, DPPH ve ORAC testlerinden elde edilen antioksidan aktivite sonuçları, antioksidanca zengin bitki ekstraktlarının hazırlanması için ultrason ekstraksiyonunun uygun bir yöntem olduğunu ortaya koymuştur [104].

Turunçgillerin yan ürünlerinden olan flavonoidlerin başarısız geri kazanım sebeplerinden biri de etkili ekstraksiyon yöntemlerinin eksikliğidir Bu çalışmada, numuneler güney Amerikada yetişen turunçgillerin (misket limonu, portakal, mandalina) kabuklarından seçilmiş, teknik olarak sulu ultrason esaslı ekstraksiyon kullanılmış ve oldukça yüksek verimler elde edilmiştir (40,25 ±12,09 mg flavonoid / 1 gram kabuk). Farklı kaynaklardan elde edilen flavonoid numuneleri bileşimleri HPLC-MS kullanılarak tespit edilmiştir. En karmaşık kaynak olarak portakal kabuğu,

hesperidin, neohesperidin, diosmin, nobiletin ve tangeritin içeriği ile tespit edilmiştir. Mandalina kabuğunun en basit kaynak olduğu ve sadece hesperidin ve neohesperidin içerdiği belirlenmiştir [105].

Dondurularak kurutulmuş soya fasulyesinden dört izoflavon türevi (daidzin, glisitin, genistin, malonil genistin) ekstraksiyonunun etkililiği, çeşitli çözücüler ve ekstraksiyon sıcaklıkları kullanılarak araştırılmış ve geleneksel karıştırmalı ekstraksiyon ile ultrason yardımlı ekstraksiyon karşılaştırılmıştır. Soya izoflavonları ekstraksiyonlarının etkililiği ultrason ile geliştirilmiştir. Fakat bu etki kullanılan çözücüye bağlıdır. Numune miktarı/çözücü hacmi oranı ve ekstraksiyon zamanının uzunluğunun optimizasyonu da araştırılmıştır. İzoflavonlar soya fasulyelerinden, ultrason esaslı ekstraksiyon ile 60 C de ve % 50 etanollü çözücü kullanılarak 20 dakikada kantitatif olarak ekstrakte edilebilmiştir [106].

Yapılan bir çalışmada *Rosmarinus officinalis* bitkisinden ultrason yardımlı antioksidan madde ekstraksiyonunda artan sıcaklık ve ekstraksiyon süresinin, kullanılan tüm teknikler ve tüm çözücüler için ekstraksiyon oranını artırdığı gösterilmiştir. Ses dalgaları ile ekstraksiyon, termal metodlarla karşılaştırıldığında, 15 dakikalık bir süre içerisinde ekstrakte edilen tüm materyaller açısından daha etkili bir tekniktir. Ayrıca ultrason ile ekstraksiyon, zayıf bir geleneksel ekstraksiyon çözücüsü olan etanol kullanıldığında ortaya koyduğu büyük oranda yükselmiş verim değerleriyle çözücüye bağımlılığı azaltmış gibi görünmektedir. Bu teknik daha ekonomik olup, çevreye zararı olmayan, sağlıklı, güvenli koşullarda yapılan bir ekstraksiyon yöntemi olarak ön plana çıkmaktadır. Suyun etanole katılmasının ekstraksiyon etkililiğini azalttığı belirlenmiştir. Ses dalgaları ile ekstraksiyon, ultrasonik banyo kullanılarak elde edilen karşılaştırılabilir düzeylerdeki karnosikasit seviyeleri ile birlikte antioksidan etki gösteren maddelerin ekstraksiyonu için büyük potansiyele sahip bir metod olarak ön plana çıkmıştır. Böylece büyük ölçekli ekstraksiyon prosesleri için bir potansiyel ortaya koymuştur [107].

2.10. Çalışma Materyalleri Hakkında Botanik Bilgi

Butomus umbellatus L.

Familiya: *Butomaceae*

Yaygın İsimleri: Şemsiye çiçekli hasırsazı, Çiçekli hasırsazı, Su menekşesi, bataklık gülü, sığır sazi.

Botanik yapısı: Sularda ve bataklıklarda yaşayan çok yıllık rizomlu otsulardır. Gövdeler dik duruşlu, yaprakları kılınç şeklinde, kesitte üç köşeli, çiçekler 1m'ye kadar uzamış sapın ucunda şemsiye durumunda, er dişi, ikiden fazla simetri ekseni bulunan ve birbirine benzer bölümlere ayrılabilen çanak yaprağa benzer çiçekleri pembe rengindedir. Kuzey yarım kürede yayılım gösterir ve 1 cins ve 1 tür içerir. Süs bitkisi olarakta kullanılır. *B. umbellatus* ülkemizde doğal olarak sığ sularda ve bataklıklarda yayılış gösterir [108].

Yapraklar 50-110 cm. veya daha fazla uzunlukta, 3-10cm genişlikte ve üç köşelidir. Sepaller (çanak yapraklı), pembe renkli, koyu damarlı, dış yüzü yeşilimsi mat kırmızımsı mavi damarlıdır [109].

B. umbellatus bitkisinin anavatanı ve yayılış alanları Doğu ve Batı Sibirya, Avrupa, Asyadır. Bu bitki sulak alanlarda yetiştiği için ve hoş görüntüsünden dolayı sulak alanlarda ve süs havuzlarında peyzaj amaçlı olarak kullanılmaktadır. Bitkinin çiçeklenme zamanı eylül- mayıs ayları ve çiçeklilik süresi birkaç aydır. Işığ seven ve killi, kumlu, balçıklı topraklarda yetişen su ihtiyacı fazla olan bir bitkidir. Bu nedenle göller,gölcükler, arklar, sazlıklar, sığ sularda 0-2300 metreler arası yayılım gösterir. Yetiştigi şehirler Adana, Adıyaman, Antalya, Bolu, Bursa, Denizli, Diyarbakır, Erzurum, Eskişehir, Giresun, Hakkari, Iğdır, İstanbul, Kars, Kayseri, Kocaeli, Konya, Samsun, Sivas, Tekirdağ, Şanlı Urfa ve Van'dır [110].



Resim 2.2. *Butomus umbellatus* L bitkisi (Richard A. Howard Image Collection, courtesy of Smithsonian Institution izniyle) [111].



Resim 2.3. *Butomus umbellatus* L. Bitkisine ait bir başka fotoğraf (Yrd.Doç.Dr.Fatma Güneş arşivi) [112].

Sparganium emersum Rehmman

Familyası : Sparganiaceae

Yaygın isimler: Yılan sığırsazı, tek gövdeli kozakamışı olarak bilinir.

Botanik yapısı: Bataklıklarda yetişen rizomlu çok yıllık otsulardır. Yapraklar iki sırada linear dizilimlidir. Kozmopolit olan familya, 1 cins ve yaklaşık 20 tür içerir [113].

Ülkemizde 3 türü bulunur [108].

Gövde dik duruşlu, bazen yüzücü, 20-60 cm.dir. Yapraklar yüzücü 2-6 mm genişlikte, yassı ve açık yeşil, çoğunlukla yarı şeffaf olup çiçekler basittir [109].

Özellikleri: Göl kenarları, sığ su birikintilerinde gelişir. Çiçeklenme zamanı 5-8. aylardır.

Ülkemizde Kars Putka Gölünde ve Kars çayında doğal olarak yetişir [113].



Resim 2.4. *Sparganium emersum* Rehmman bitkisi (Yrd.Doç.Dr.Fatma Güneş arşivi)
[112].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

3.1.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar

Sigma (Almanya): Benzoik asit, gallik asit, gentisik asit, kafeik asit, klorojenik asit, p-hidroksi benzoik asit, p-kumarik asit, protokatekuik asit, p-vanillin, sinapik asit, siringik asit, siringaldehit, vanillik asit, Troloks, BHT (Butillenmiş hidroksitoluen), metanol (HPLC derecede).

Fuluka (Almanya): Ferulik asit, protokatekaldehit, Folin-Ciocalteu reaktifi (2N), DPPH (1,1'-difenil-2-pikrilhidrazil) reaktifi, Neokuproine, Bakır(II) klorür dihidrat, asetonitril (HPLC derecede), asetik asit (HPLC derecede).

Riadel-de haën (Amanya): Amonyum asetat, etilasetat (HPLC derecede).

Merck (Almanya): Sodyum karbonat

3.1.2. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

Çalışmada, SARTORIUS CP 224s analitik terazi, BİOHIT PROLINE otomatik mikro pipetler (20-200 µL ve 100- 1000 µL), YELLOW LINE model vorteks cihazı, Azot gazı ve tüpü, HANNA model pH metre, IKA A11 BASIC model degirmen, RETSCH AS 200 model elek, HEIDOLPH LABORAT 4000 evaporatör, BANDELIN SONOREX model 50/60 Hz 180/640 watt (Germany) ultrasonik banyo, P6 INSTRUMENT T80 UV/VIS spektrometre, 1 cm'lik 1,5 ml'lik kuvars küvetler kullanıldı.

3.2. Numune Hazırlama

B. umbellatus ve *S. emersum* bitkilerine ait numuneler Haziran 2009 döneminde Kars ilinde, Kars çayından Kafkas Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünden Doç.Dr. Hanife ÖZBAY tarafından teşhis edilerek toplandı. Numuneler güneş ışığından korunarak en kısa sürede laboratuvar ortamına alındılar. Numuneler çamurdan arındırılmak için su ile yıkandı ve doğrudan güneş almayacak şekilde serin ve kuru

havada nemi kalmayacak şekilde kurutuldu. Kuruyan numuneler bıçak yardımı ile ilk önce 1-2 cm oluncaya kadar küçültüldü. Daha sonra numuneler IKA A11 BASIC model bir değirmende öğütülerek küçük parçacıklar haline getirildi. Numune parçacıkları RETSCH AS 200 model bir elek sallayıcıda elenerek μm türünden, parçacık büyüklüğüne göre ayrıldılar.

Numuneler renkli şişelere alındı şişelerin boş kısımlarındaki hava azot gazı ile değiştirilerek hava almayacak şekilde kapakları kapatıldı ve numuneler deneylerde kullanılmak üzere $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ de karanlık bir ortamda muhafaza edildi.

3.3. Ekstraksiyon Deneyleri (Ultrasonik Banyo Ekstraksiyonu)

Daha önceden öğütülüp hazırlanmış olan üç farklı parçacık boyutundaki numunelerden parçacık boyutu $125\mu\text{m}$ - $250\mu\text{m}$ olan numuneler kullanıldı. Ekstraksiyon, Wang ve arkadaşlarının bir çalışmasında [101] kullanılan ultrasonik ekstraksiyon tekniğinin modifiye edilmiş hali ile gerçekleştirildi. Ekstraksiyonda, 250 mL'lik bir erlene 0,1 mg hassasiyetle tartılmış yaklaşık 10 gram numune ile 100 mL % 50 metanol-saf su (v/v) çözücüsü konuldu. Sıcaklık 25 - $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ aralığında olacak şekilde ve erlenin ağzı sıkı bir şekilde kapatılarak BANDELIN SONOREX (50/60 Hz, 180/640 watt Germany) model bir ultrasonik banyoda 20 dakika süreyle ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi. Bu sürenin sonunda ekstrakte olan numune mavi banddan süzülerek süzüntü bir boş erlene alındı. Mavi bandda kalan numune ikinci kez 100 mL % 50 metanol-saf su (v/v) çözücüsü ile birlikte boş bir erlene alınarak ultrasonik banyoda 10 dakika süreyle tekrar ekstrakte edildi ve bu süre sonunda ekstrakt yine mavi banddan süzülerek, süzüntü boş bir erlene alındı. Daha sonra mavi bandda kalan numune üçüncü kez 100 mL % 50 metanol-saf su (v/v) çözücüsü ile birlikte erlene alınarak ultrasonik banyoda 5 dakika süreyle ekstrakte edildi. Son yapılan ekstraksiyondan elde edilen ekstrakt da mavi banddan süzüldü. Süzüntülerin hepsi birleştirilerek, partikül kalmaması için son bir defa daha mavi banddan süzüldü ve döner buharlaştırıcıda kurutuldu.

Elde edilen kuru ekstraktların miktarı 0,1 mg hassasiyetle tartılarak belirlendi ve tekrar % 50 metanol-saf su (v/v) çözücüsü ile konsantrasyonu bilinen bir stok çözelti elde

edildi. Elde edilen stok çözelti ışık almayacak şekilde bir cam kap içine alındı. Çözeltinin boş kalan kısımlarındaki atmosfer azot gazıyla değiştirilerek kapağı sıkıca kapatılarak ileri analizler için + 4 °C’de soğutucuda saklandı. Bu şekilde % 50 metanol-saf su (v/v), % 70’lik metanol-saf su (v/v) ve metanol çözücülerıyla üç farklı stok çözelti elde edildi.

3.4. Toplam Fenolik Madde ve Antioksidan Aktivite Tayini Deneyleri

3.4.1. Folin-Ciocalteu Yöntemiyle Toplam Fenolik Madde Tayini

Toplam fenolik madde tayini Folin-Ciocalteu metoduna göre yapıldı. Ekstraktların toplam fenolik içerikleri için, Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak, Slinkard ve Singleton’un metodu [114] küçük değişiklikler yapılarak uygulandı. Standart olarak kullanılan gallik asit metanolde çözülerek, konsantrasyonları 15,63; 31,25; 62,5; 125, 250, 500 ve 1000 µg/mL olan 7 standart gallik asit çözeltisi elde edildi. Hazırlanan gallik asit standart çözeltilerinin her birinden alınan 50 µL’lik kısma 2,5 mL saf su ilave edildi. Üzerine 2 N’lik hazır satın alınan Folin-Ciocalteu çözeltisinden 1:10 oranında seyreltilmek suretiyle hazırlanan 0,2 N’lik çözeltilerden 250 µL ilave edildi ve karıştırılarak oda sıcaklığında 3 dakika bekletildi. 7,5 g Na₂CO₃’ın 92,5 g suda çözülmesi ile hazırlanan % 10’luk Na₂CO₃ çözeltisinden 750 µL ilave edildi. Vorteksenerek şiddetli bir şekilde karıştırılan karışım, oda sıcaklığında 2 saat bekletildi ve P6 Instrument T80 UV/VIS spektrometre cihazı kullanılarak 765 nm’de absorbans değerleri okundu.

Deneyler üç paralel olacak şekilde tekrar edildi ve kör olarak saf su kullanıldı. Kör absorbansı A1 ve üç paralelin absorbans ortalaması A2 olmak üzere (Denklem 22)

$$\Delta A = A2 - A1 \quad (22)$$

eşitliğinden absorbans farkları hesaplandı. Gallik asit standartlarının konsantrasyonları absorbans farklarına karşı grafiğe geçilerek, kalibrasyon grafiği elde edildi.

Aynı işlemler, ekstraktların kendi çözücüleriyle seyreltilmeleri suretiyle hazırlanan 1000 µg/ml konsantrasyona sahip çözeltilere de uygulanarak absorbans değerleri belirlendi. Kalibrasyon grafiği kullanılarak ekstraktların toplam fenolik madde içeriği mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/100 g hava kurusu numune olarak verildi.

3.4.2. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini

Numune ekstraktları, Cuendet ve arkadaşlarının metodunda [115] küçük değişiklikler yapılarak DPPH serbest radikal giderme antioksidan aktivite değerleri yönünden incelendiler. Orijinal numune ekstraktlarından hazırlanan 15,63; 31,25; 62,5; 125, 250, 500 ve 1000 µg/ml konsantrasyona sahip ekstraktlar kullanıldı. Bu numune ekstraktlarından alınan 750 µL'lik miktarlarla, metanolde hazırlanmış DPPH radikalinin 1.10^{-4} M'lık çözeltisinden 750 µL'lik kısımlar alınarak vortekslemek suretiyle karıştırıldı. Hazırlanan karışımlar karanlık bir ortamda, oda sıcaklığında ve radikal gidermenin tamamlanması için 50 dakika bekletildikten sonra P6 Instrument T80 UV/VIS spektrometre cihazı kullanılarak, 517 nm dalga boyunda absorbansları ölçüldü. Her bir numuneden üç ayrı paralel hazırlanarak absorbansları ölçüldü ve numunenin her bir konsantrasyonu için bir tüp içerisinde sadece numune çözeltisini ve ekstrakt çözücüsünü içeren bir karışımın absorbansı da kör olarak aynı dalga boyunda okundu. Kontrol tüpleri üç paralel olarak hazırlandı ve kontrol tüplerine 750 µl'lik 1.10^{-4} M'lık DPPH çözeltisi ve 750 µl DPPH çözeltisinin çözücüsü olan metanol konuldu ve 50 dakika sonra 517 nm'de absorbansları okundu. Deneyler, karşılaştırma maddeleri olarak kullanılan BHT ve troloks standartlarından 15,63; 31,25; 62,5; 125, 250, 500 ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarında hazırlanan çözeltilere de aynı şekilde uygulanarak absorbansları ölçüldü. Elde edilen absorbansların değerlerinin ortalamasından körlerin ortalaması çıkarıldı. Bu değerden % Radikal giderme (% I) değerleri:

$$\% \text{ Radikal Giderme} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad (23)$$

(Denklem 23) kullanılarak hesaplandı. Burada A_0 , kontrol tüplerinin (sadece DPPH çözeltisi içeren) absorbans ortalamalarını, A_1 , numune tüplerinin (ekstrakt ve DPPH

çözeltisi içeren) absorbans ortalamalarını ifade etmektedir. Temizleme yüzdeleri, kullanılan ekstrakt ve karşılaştırma maddeleri konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirildi. Bu grafiklerden kontrol tüplerinin % I değerlerini yarıya (% 50) düşüren ekstrakt ve karşılaştırma maddeleri konsantrasyon değerleri (IC₅₀) hesaplandı. Sonuçlar µg/mL olarak verildi.

3.4.3. CUPRAC (Bakır(II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasite) Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Tayini

Çözeltilerinin Hazırlanması:

10⁻² M Cu (II) klorür çözeltisi: CuCl₂.2H₂O'den 0,4262 g tartım alınıp su ile 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

Amonyum asetat çözeltisi: 1 M (pH=7). NH₄Ac'dan 19,27 g tartım alınıp su ile 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

Neocuproine çözeltisi: 7,5x10⁻³ M Neokuproin (2,9 dimethyl 1-10 phenantrolin)'den 0,039 g tartım alınıp % 96'lık metil alkolle 25 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

Bu deneyler, Apak ve arkadaşlarının [60] yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. Bir cam tüp içerisine bakır (II) çözeltisi, neokuproin çözeltisi ve amonyum asetat tamponundan sırasıyla 1'er mL eklendi. Üzerine (x) mL örnek çözeltisi (veya standart madde) ve (1-x) mL H₂O ilave edildi. Toplam hacim 4,1 mL olacak şekilde çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan çözeltiler vorteks ile iyice karıştırıldı. Tüpler kapakları sıkıca kapatılarak karanlık ortamda ve oda koşullarında 1 saat bekletildi. Bu süre sonunda 450 nm'de köre karşı absorbansları okundu. Troloks'un metanoldeki çözeltileri (3,9; 7,8; 15,63; 31,25; 62,5; 125; 250 µg/mL) kullanılarak bir kalibrasyon doğrusu çizildi. Ardından her bitkinin troloks eşdeğeri cinsinden antioksidan kapasiteleri grafikteki denklemden hesaplandı (TEAK mg/100 g bitki). Normal ölçümler için şema şu şekildedir.

1 mL Cu(II) + 1 mL Nc + 1 mL NH₄Ac + x mL örnek + (1,1-x) H₂O Vtoplam: 4,1 mL; reaktif ilavesinden 1 saat sonra bir reaktif köre karşı 450 nm’de absorbanlar okundu.

3.4.4. HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) Yöntemiyle Ekstraktların Fenolik Asit İçeriklerinin Belirlenmesi

DAD (diyot serili dedektör) veya UV (ultraviyole) dedektörlü HPLC-RP (yüksek performanslı sıvı kromatografisi-ters faz), bitkilerden elde edilen ekstraktların fenolik madde içeriğinin tayini için kullanılan bir yöntemdir. Ekstraktların fenolik bileşenlerini ayırmak için C18 kolonları ve hareketli faz olarak asetonytril (CH₃CN, ACN), metanol (MeOH) ve modifiye edici olarak az miktarda asit içeren su kullanılır. Hareketli fazda fenolik asitlerin protonlaşmasını sağlamak için asetik asit (CH₃COOH), fosforik asit (H₃PO₄), formik asit (HCOOH) gibi asit modifiye ediciler kullanılarak fenolik bileşenlerin piklerinin daha belirginleşmesi ve çözünürlüklerinin artırılması sağlanır [116].

3.4.4.1. RP-HPLC-UV-DAD Koşulları

RP-HPLC-UV-DAD analizleri, Agilent marka (Almanya) degazer, Quat pompa ve ultraviyole dedektör (1100 serisi) ve DAD (diyot serili dedektör 1200 serisi) donanımlı bir HPLC’de yapıldı. HPLC cihazı Chemstation programı (Agilent) ile kontrol edildi. Tüm analizler için bir Hichrom C18 kolon (250 mm × 4.6 mm i.d., 5 µm partikül) kullanıldı. Hareketli faz (A) metanol, (B) 50/50 (v/v) asetonytril/su içindeki % 0,5 (v/v) asetik asit çözeltisi, (C) % 2 (v/v) asetik asitin sudaki çözeltisi, (D) asetonytril çözeltilerinden oluşmaktaydı. Elüsyonda takip eden gradiyent kullanıldı ve gradiyent koşulları Çizelge 3.1’de verildi. Enjeksiyon hacmi 20 µL ve akış hızı 1,2 ml/dakika olarak ayarlandı dedektör 280 nm dalga boyunda çalıştırıldı. Metot 33 dakikada sonlanacak şekilde ayarlandı.

Çizelge 3.1. Standartlar ve numuneler için kullanılan metotta gradiyent koşullar

Zaman (dakika)	Çözücü (B) %	Çözücü (C) %	Çözücü (D) %	Akış hızı (ml/dakika)	Basınç (atm)
0,00	10,00	90,00	0,00	1,2	275
5,00	19,00	81,00	0,00	1,2	275
14,00	19,00	81,00	0,00	1,2	275
17,00	30,00	70,00	0,00	1,2	275
18,00	30,00	70,00	0,00	1,2	275
20,00	40,00	60,00	0,00	1,2	275
23,00	45,00	55,00	0,00	1,2	275
25,00	42,00	58,00	0,00	1,2	275
27,00	10,00	0,00	90,00	1,2	275
30,00	10,00	0,00	90,00	1,2	275
33,00	10,00	90,00	0,00	1,2	275

Ayrıca kolonda yapılan ayırma işleminden sonra kolonun temizlenmesi için bir yıkama metodu hazırlanarak kolonda kalabilecek maddelerin uzaklaştırılması hedeflenmiştir. Bu yıkama metodu gradiyent olarak hazırlanmış ve Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Yıkama metodu

Zaman (dakika)	Çözücü (A) %	Çözücü (B) %	Çözücü (C) %	Akış hızı (ml/dakika)	Basınç (atm)
0,00	0,00	10,00	90,00	1,2	275
3,00	70,00	5,00	25,00	1,2	275
7,00	70,00	5,00	25,00	1,2	275
8,00	0,00	10,00	90,00	1,2	275
10,00	0,00	10,00	90,00	1,2	275

3.4.4.2. Standartlar ve Kalibrasyon

Standartların tüm stok çözeltileri % 40’lık (v/v) metanol-su karışımında 20 mM konsantrasyonda hazırlandı. 15 standardın stok çözeltilerinin her birinden 500 µL (standart karışımının toplam hacmi 7,5 ml) alınarak 2,5 mL % 40 metanol çözücüsü ilave edilerek son hacim 10 ml’ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti % 40 metanol çözücüsüyle seyreltilerek 3 farklı konsantrasyona sahip çözelti hazırlandı. Her bir standardın maksimum absorbans yaptığı dalga boyunda konsantrasyonlarına karşılık oluşan pik alanları kullanılarak kalibrasyon eğrileri elde edildi. Tüm standartların kalibrasyonu için uygulanan dalga boyu 280 nm idi ve ayrıca her standardın maksimum

absorbans yaptığı dalga boyları sıralı olarak kullanıldı. Kafeik asit için 240 nm, protokatekuik asit, p-OH Benzoik asit, vanilik asit için 260 nm, gallik asit, sirinđik asit için 274 nm, protokatekaldehit, vanilin için 280 nm, sirinđaldehit, p-kumarik asit için 308 nm, gentisik asit, klorogenik asit, kafeik asit, ferulik asit, sinapik asit için 324 nm dalga boyları sečilerek kullanıldı.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Yapılan Ekstraksiyonların Verim Yüzdeleri

B. umbellatus ve *S. emersum* bitkilerinin numunelerinin ultrasonik banyoda ve değişik oranda metanol-saf su çözücüleri kullanılmak suretiyle yapılan ekstraksiyon deneylerinin her birinin ekstraksiyon verimi hesaplandı ve aşağıdaki Çizelge 4.1’de verildi.

Ekstraksiyonların verim yüzdeleri için (Denklem 24),

$$\% \text{ Verim} = [\text{Kuru Ekstrakt miktarı}/\text{Havada Kuru Numune Miktarı}] \times 100 \quad (24)$$

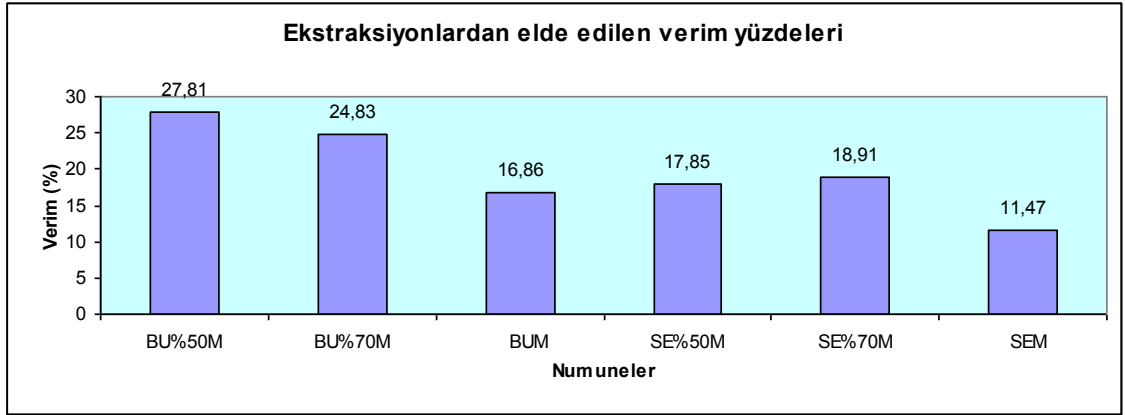
kullanılarak hesaplandı.

Çizelge 4.1. Ekstraksiyonlardan elde edilen verim yüzdeleri

Ekstrakt*	% Ekstraksiyon verimi
BU %50M	27,81
BU %70M	24,83
BUM	16,86
SE %50M	17,85
SE %70M	18,91
SEM	11,47

BU%50M: *Butomus umbellatus* L.-%50 metanol-saf su(v/v); BU%70M: *Butomus umbellatus* L -%70 metanol-saf su(v/v); BUM: *Butomus umbellatus* L- metanol; SE %50M: *Sparganium emersum* - %50 metanol-saf su(v/v); SE %70M: *Sparganium emersum* - %70 metanol- saf su(v/v); SEM: *Sparganium emersum* – metanol

Ayrıca, ekstraksiyonlardan elde edilen verim yüzdelerini birbirleri ile karşılaştırabilmek için çizilen sütun grafik Şekil 4.1’de verilmiştir.



BU%50M: *Butomus umbellatus* L.-%50 metanol-saf su(v/v); BU%70M: *Butomus umbellatus* L.-%70 metanol-saf su(v/v); BUM: *Butomus umbellatus* L- metanol; SE %50M: *Sparganium emersum* - %50 metanol-saf su(v/v); SE %70M: *Sparganium emersum* - %70 metanol- saf su(v/v); SEM: *Sparganium emersum* – metanol

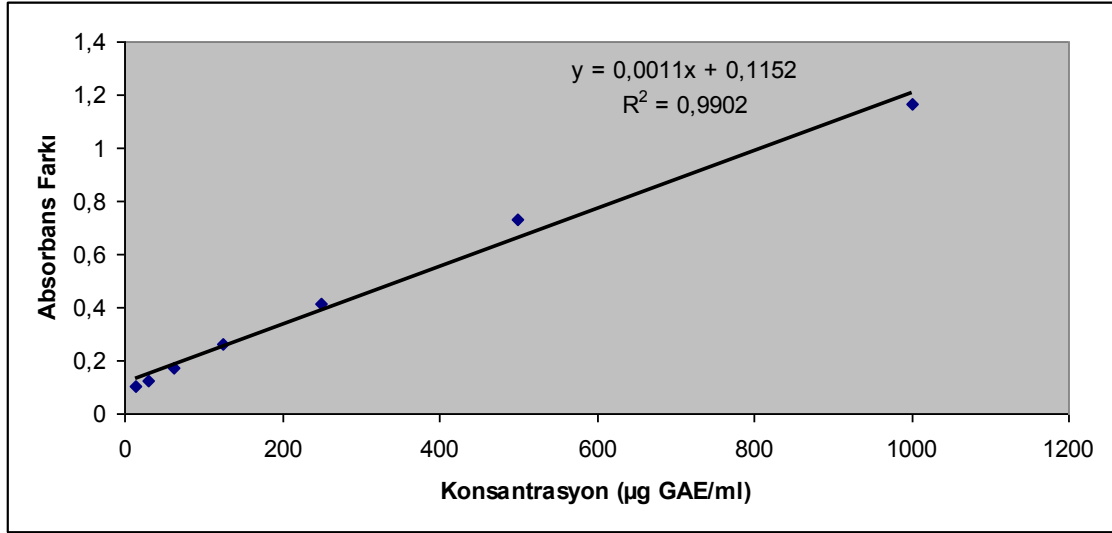
Şekil 4.1. Ekstraksiyonlardan elde edilen verim yüzdeleri

Çizelge 4.1’de *B. umbellatus* bitkisinden elde edilen ultrasonik banyo ekstraksiyon verimlerine bakıldığında, ekstraksiyon çözücüsündeki saf su yüzdesinin artması ile ekstraksiyon veriminin arttığı dikkat çekmektedir. En yüksek ekstraksiyon verimi % 50 metanol-saf su çözücüsü ile elde edilmiştir. En düşük ekstraksiyon verimi ise metanol çözücüsünden elde edilmiştir.

S. emersum bitkisinden elde edilen ultrasonik banyo ekstraksiyon verimlerine bakıldığında, % 70 metanol-saf su çözücüsü ile yapılan ekstraksiyonda verimin en yüksek olduğu görülmektedir. İkinci yüksek değerin % 50 metanol-saf su çözücüsü ile yapılan ekstraksiyonda elde edildiği görülmektedir. En düşük ekstraksiyon verimi değeri ise metanol çözücüsünde gerçekleşmiştir. Dikkat çeken diğer bir durum ise *B. umbellatus* ve *S. emersum* bitkilerinin metanol ile yapılan ultrasonik banyo ekstraksiyonlarındaki verim değerlerinin diğer çözücülere göre daha düşük olmasıdır.

4.2. Toplam Fenolik Madde Tayini Deneylerinden Elde Edilen Bulgular

Numune ekstraktlarının, Folin-Ciocalteu yöntemine göre ölçülen toplam fenolik madde içerikleri için hazırlanan kalibrasyon grafiği Şekil 4.2’de ve bu grafiğe göre elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2’de verildi. Kalibrasyon grafiği gallik asit kullanılarak hazırlandı.



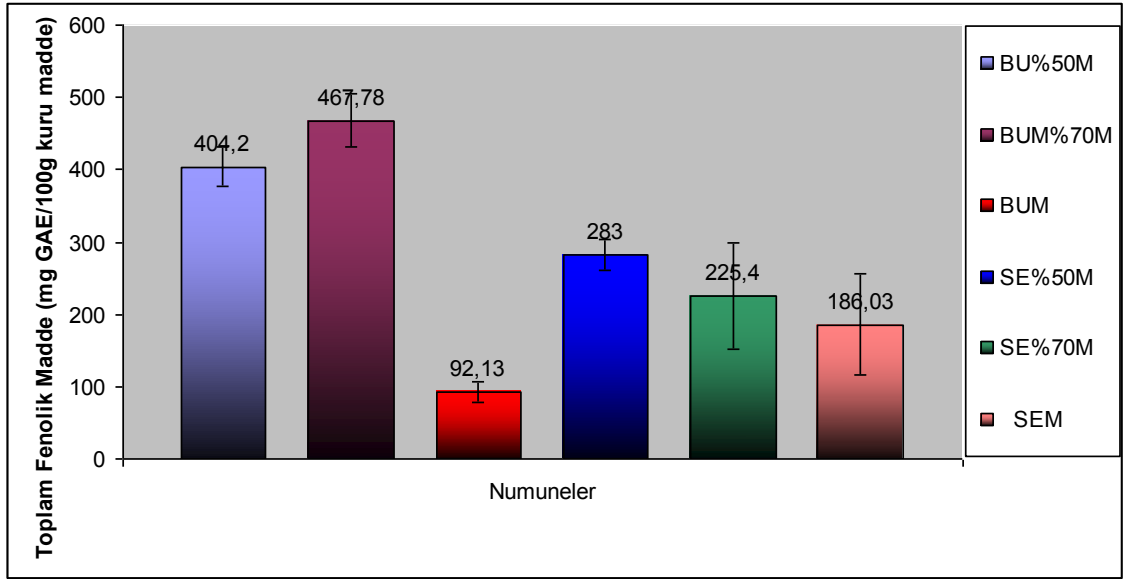
Şekil 4.2. Toplam fenolik madde tayini için kullanılan kalibrasyon grafiği

Çizelge 4.2. Ekstraktların toplam fenolik madde içerikleri (mg GAE/100 g kuru numune)

Ekstrakt*	Toplam Fenolik Madde (mg GAE/100 g kuru numune)
BU %50M	404,20 ±27,75
BU %70M	467,78 ±36,69
BUM	92,13 ±13,90
SE %50M	283,00 ±20,95
SE %70M	225,40±72,75
SEM	186,03 ±70,80

BU%50M: *Butomus umbellatus* L.-%50 metanol-saf su(v/v); BU%70M: *Butomus umbellatus* L -%70 metanol-saf su(v/v); BUM: *Butomus umbellatus* L- metanol; SE %50M: *Sparganium emersum* - %50 metanol-saf su(v/v); SE %70M: *Sparganium emersum* - %70 metanol- saf su(v/v); SEM: *Sparganium emersum* – metanol

Toplam fenolik madde içeriklerini daha kolay karşılaştırmak ve yorum yapabilmek için Çizelge 4.2’de verilen değerlerden Şekil 4.3 sütun grafik olarak hazırlanıp verilmiştir.



Şekil 4.3. Ekstraktların karşılaştırmalı toplam fenolik madde içerikleri ($\lambda = 765\text{nm}$)

Çizelge 4.2 ve Şekil 4.3’de, *B. umbellatus* bitkisinin ultrasonik banyo ekstraktlarının toplam fenolik içeriklerine bakıldığında, % 70 metanol-saf su (v/v) çözücüsüyle yapılan ekstraksiyonda toplam fenolik madde içeriklerinin en yüksek olduğu görülmektedir. Toplam fenolik madde içeriklerinin metanol çözücüsü ile yapılan ekstraksiyonda en düşük değerde elde edildiği gözlemlendi.

Sparganium emersum bitkisinin ultrasonik banyo ekstraksiyonlarının toplam fenolik madde içeriklerine bakıldığında, % 50 metanol-saf su (v/v) çözücüsünde elde edilen değerlerin en yüksek olduğu görülmektedir. Toplam fenolik madde içeriği açısından metanol çözücüsü ile yapılan ekstraksiyonun *B. Umbellatus*’da olduğu gibi en düşük değerde olduğu gözlemlendi. Ekstraksiyonlarda, çözücü içerisindeki su yüzdesinin artmasının *S. emersum* bitkisinden elde edilen toplam fenolik madde miktarının artmasında önemli rol oynadığı görülmektedir. *B. umbellatus* bitkisinde ekstraksiyon çözücüsündeki su yüzdesinin artması, ilk önce fenolik madde içeriğinin artmasına, daha sonra ise hafif şekilde azalmasına neden olmaktadır. Ekstraktlardan elde edilen en yüksek toplam fenolik madde içeriği *B.umbellatus* bitkisinin, % 70 metanol-saf su (v/v) çözücüsü ile yapılan ultrasonik banyo ekstraksiyonunda elde edildi. En düşük fenolik madde içeriği ise *B. umbellatus* bitkisinin metanol çözücüsü ile yapılan ultrasonik banyo ekstraksiyonunda elde edilmiştir.

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

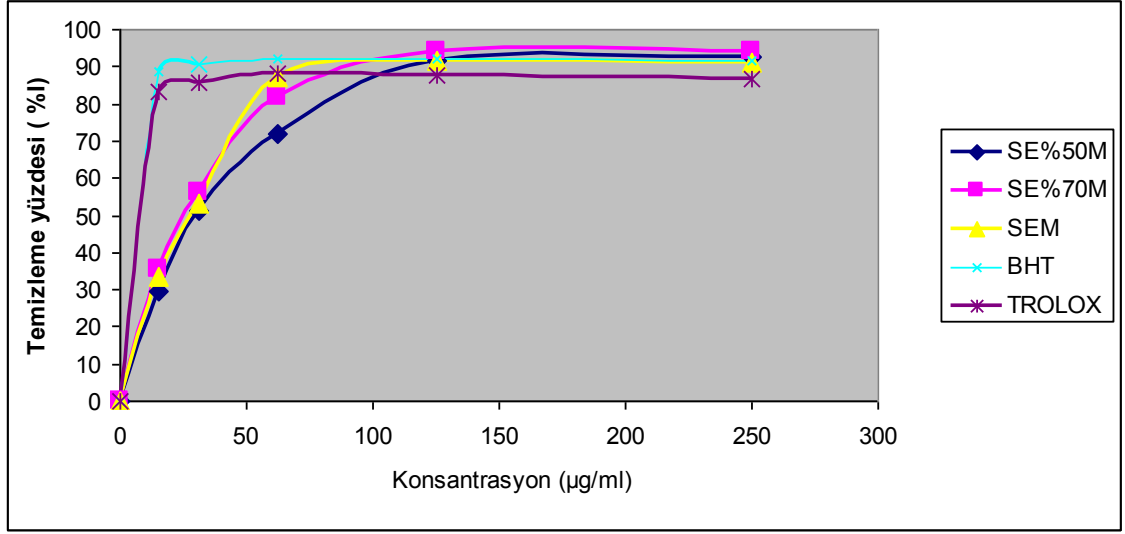
B. umbellatus ve *S. emersum* bitkilerinin ait ekstraktların ve karşılaştırma maddelerinin (BHT ve TROLOX), DPPH'ın derişimini yarıya indirmek için gerekli olan derişimleri (IC₅₀ değerleri) hesaplanarak izelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Ekstraktların ve karşılaştırma maddelerinin IC₅₀ değerleri.

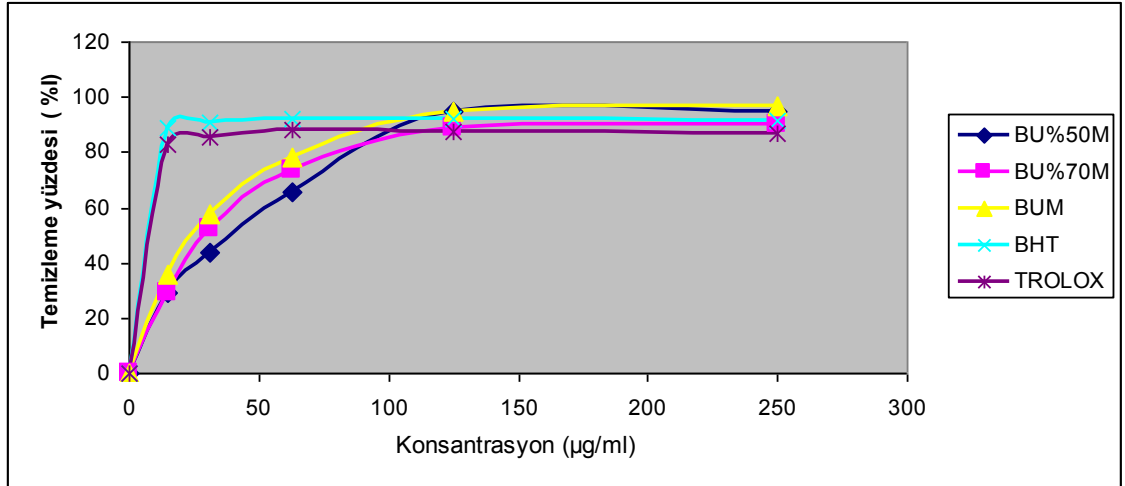
Ekstrakt*	IC ₅₀ Değeri (µg/ml)
BU%50M	50,79 ± 3,18
BU%70M	51,90 ± 6,23
BUM	32,88 ± 0,89
SE%50M	37,83 ± 0,38
SE%70M	38,71 ± 4,74
SEM	32,28 ± 0,27
BHT	3,26 ± 0,30
TROLOX	5,69 ± 0,12

*BU%50M: *Butomus umbellatus* L.-%50 metanol-saf su(v/v);BU%70M: *Butomus umbellatus* L -%70 metanol-saf su(v/v); BUM: *Butomus umbellatus* L- metanol; SE %50M: *Sparganium emersum* - %50 metanol-saf su(v/v); SE %70M: *Sparganium emersum* - %70 metanol- saf su(v/v); SEM: *Sparganium emersum* – metaol

B. umbellatus ve *S. emersum* bitkilerinin ait ultrasonik banyo ekstraktlarının ve karşılaştırma maddelerinin değişik derişimdeki DPPH radikalini giderme yüzdelerini (% I) gösteren grafikler *S. emersum* için şekil 4.4'de, *B. umbellatus* için şekil 4.5'de verilmiştir.

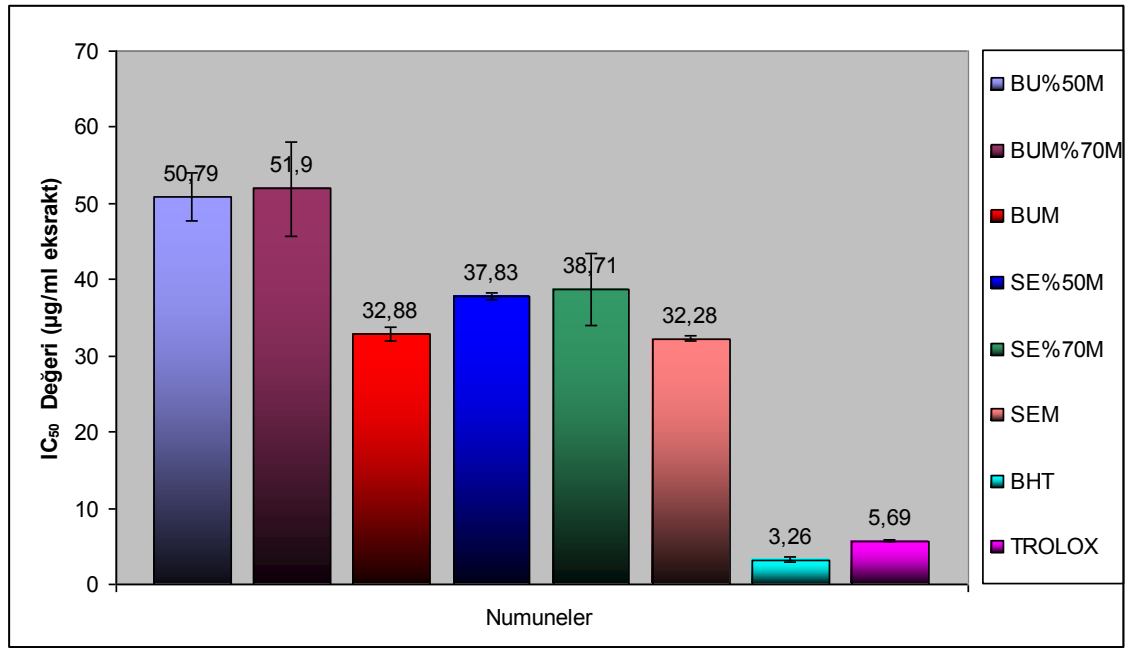


Şekil 4.4. *S. emersum* bitkisinin ultrasonik banyo ekstraktlarının ve karşılaştırma maddelerinin farklı konsantrasyonlarının DPPH radikalini temizleme yüzdeleri.



Şekil 4.5. *B. Umbellatus* bitkisinin ultrasonik banyo ekstraktlarının ve karşılaştırma maddelerinin farklı konsantrasyonlarının DPPH radikalini temizleme yüzdeleri.

Ekstraktların DPPH radikalini giderme aktiviteleri yönünden birbirleriyle karşılaştırılmalarının daha kolay yapılabilmesi için çizilen sütun grafik Şekil 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.6. *B. Umbellatus* ve *S. emersum* bitkilerine ait ultrasonik banyo ekstraktlarının ve karşılaştırma maddelerinin, DPPH radikalini % 50 oranında giderme konsantrasyonları (IC₅₀ değerleri)

DPPH radikali, diğer antioksidan aktivite tayinlerinde kullanılan radikallerden daha kararlı yapıya sahiptir. Basit ve nispeten daha kısa sürede gerçekleştirildiği için antioksidan aktivite belirlemede çok kullanılan bir yöntemdir. DPPH'ı gidererek bu radikalin konsantrasyonunu yarıya düşüren değer IC₅₀ (ya da EC₅₀) olarak verilir [53].

Çizelge 4.3 ve Şekil 4.6'ya bakıldığında karşılaştırma maddeleri olan BHT'nin ve Trolox'un düşük değerler (değerin düşük olması ekstraktın antioksidan aktivitesinin yüksek olduğunu belirtmektedir) sergilediği görülmektedir. Yapılan deneylerde karşılaştırma maddelerinden olan BHT'nin IC₅₀ değeri 3,26±0,3 µg/ml, Trolox'un IC₅₀ değeri 5,69±0,12 µg/ml olarak belirlenmiştir. BHT'nin Trolox'tan daha yüksek radikal giderme etkisi olduğu sonuçlardan görülmektedir. *B. Umbellatus* ve *S. emersum* bitkilerine ait ultrasonik banyo ekstraktlarının IC₅₀ değerleri karşılaştırma maddelerinin IC₅₀ değerlerinden daha yüksek değerlerde bulundu.

Değerlerde dikkat çeken bir durum, *B. umbellatus* ve *S. emersum* bitkilerine ait ultrasonik banyoda metanol çözücüsüyle elde edilen ekstraktların en düşük IC₅₀ değerlerini sergilemiş olmalarıdır (sırasıyla BUM için IC₅₀ 32,88 ± 0,89 µg/ml ve SEM

için IC_{50} $32,28 \pm 0,27 \mu\text{g/mL}$). Oysa *B. Umbellatus* ve *S. emersum* bitkilerinin ultrasonik banyoda metanol çözücüsüyle elde edilen ekstraktlarının en düşük değerlerde toplam fenolik madde içerdikleri (BUM için $92,13 \pm 13,90$ ve SEM için $186,03 \pm 70,80$ mg GAE/100 g kuru numune) Çizelge 4.2 ve Şekil 4.3'ten görülmektedir. Diğer bir deyişle, düşük toplam fenolik madde içermelerine rağmen yüksek antioksidan aktivite göstermektedirler. Bu durum, metanolik ekstraktların diğer çözücülerle elde edilen ekstraktlara göre daha yüksek oranda antioksidan aktivitesi yüksek bileşenlerden oluştuğu gerçeğini ortaya koymaktadır.

B. umbellatus'un ekstraksiyonunda % 70 metanol - saf su (v/v) (BU%70M) çözücüsü kullanılarak yapılan deneyde, toplam fenolik madde miktarının en büyük değerinde ($467,78 \pm 36,69$ mg GAE/100 g kuru numune) olmasına rağmen, IC_{50} değerinin de en büyük ($51,90 \pm 6,23 \mu\text{g/mL}$) değerinde olduğu, yani antioksidan aktivitesinin en düşük olduğu belirlendi.

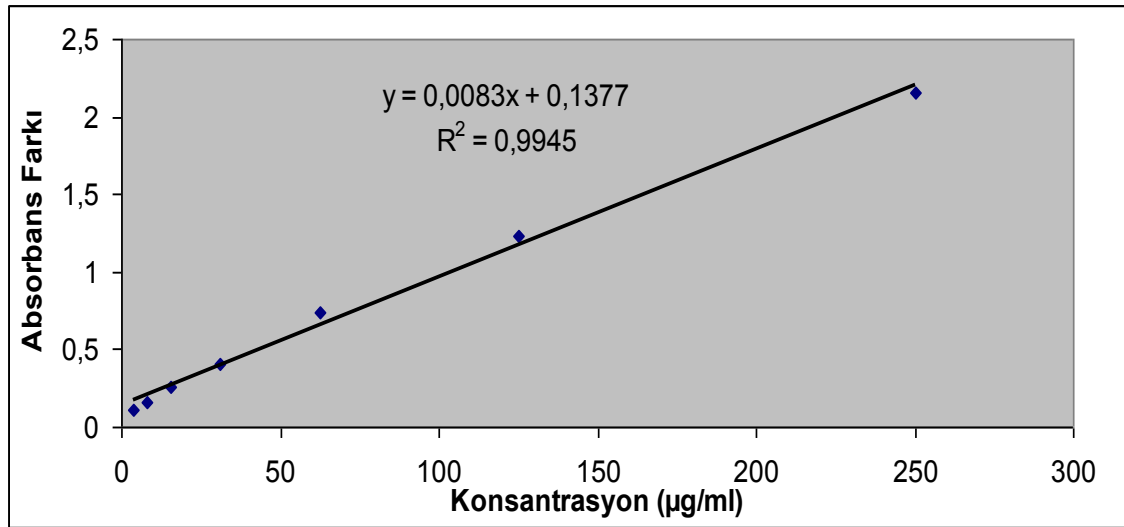
S. emersum bitkisinin ultrasonik banyo ekstraktlarından SE%50M ve SE%70M'in DPPH antioksidan aktivite % 50 giderme konsantrasyonlarının (IC_{50} değerleri) bir birine yakın bir değerinde (sırasıyla SE%50M için IC_{50} değeri $37,83 \pm 0,38 \mu\text{g/ml}$, SEM için IC_{50} değeri $38,71 \pm 4,74 \mu\text{g/mL}$) olduğu gözlemlendi.

Şekil 4.4 ve 4.5'e bakıldığında, karşılaştırma maddelerinin çok daha düşük konsantrasyonlarda daha fazla radikal giderme yüzdeleri gösterdiği açıkça görülmektedir. Örneğin $62,5 \mu\text{g/ml}$ konsantrasyonunda karşılaştırma maddelerinin radikal giderme yüzdeleri Trolox için % 88,21 ve BHT için % 92,17 iken, ekstraktlar için radikal giderme yüzdeleri SE%50M için % 72,02, SE%70M için % 81,78, SEM için % 87,14 olarak elde edilmiştir. $125 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyon değerinde trolox % 87,67, BHT % 91,96 değerlerini sergileyirken, SE%50M % 91,43, SE%70M % 93,99, SEM % 91,85 ve BU%50M % 65,48, BU%70M % 73,84, BUM ise % 78,56 radikal giderme yüzdeleri ortaya koymuşlardır. Burada dikkat çeken bir durum, ekstraktların yüksek konsantrasyonlarda yüksek radikal giderme yüzdeleri sergilemeleridir.

B. umbellatus ve *S. emersum* bitkilerinin ultrasonik banyoda metanol çözücüsüyle elde edilen ekstraktlarında radikal giderme yüzdelerinin yüksek, % 50 metanol- saf su (v/v) çözücüsü ile elde edilen ekstraktlarında ise radikal giderme yüzdelerinin düşük olduğu bulunmuştur.

4.4. Bakır (II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi (CUPRAC) Deneylerinden Elde Edilen Sonuçlar

B. umbellatus ve *S. emersum* bitkilerine ait ekstraktların Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi (CUPRAC) için elde edilen kalibrasyon grafiği ve deneylerden elde edilen sonuçlar Şekil 4.7’de ve Çizelge 4.4’de verilmiştir. Kalibrasyon grafiği Trolox’un metanollü çözeltileri ile hazırlandı.



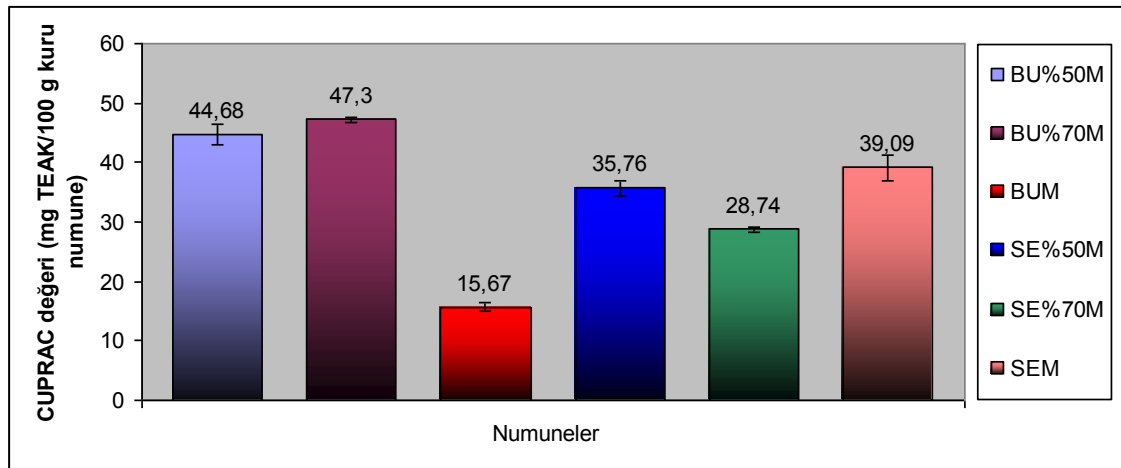
Şekil 4.7. CUPRAC deneylerinde kullanılan, Trolox standardı ile elde edilen kalibrasyon grafiği ($\lambda=450$ nm)

Çizelge 4.4. Bakır-II iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi (CUPRAC) deneylerinde elde edilen sonuçlar

Ekstrakt*	CUPRAC değeri(mg TEAK/100g kuru numune)
BU%50M	44,68±1,64
BU%70M	47,30±0,30
BUM	15,67±0,77
SE%50M	35,76±1,29
SE%70M	28,74±0,39
SEM	39,09±2,06

*BU%50M: *Butomus umbellatus* L.-%50 metanol-saf su (v/v);BU%70M: *Butomus umbellatus* L -%70 metanol-saf su(v/v);BUM: *Butomus umbellatus* L- metanol; SE %50M: *Sparganium emersum* - %50 metanol-saf su(v/v); SE %70M: *Sparganium emersum* - %70 metanol- saf su(v/v); SEM: *Sparganium emersum* – metanol

Bakır-II İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi (CUPRAC) deneylerinden elde edilen sonuçları daha iyi karşılaştırmak için hazırlanan sütun grafik Şekil 4.8’de verilmiştir.



Şekil 4.8. *B. Umbellatus* ve *S. emersum* bitkilerine ait ekstraktların CUPRAC değerinin (mg TEAK/100g kuru numune) karşılaştırılması

Çizelge 4.4 ve Şekil 4.8 ye bakıldığında. *B. Umbellatus* bitkisinin BU%70M ekstraktlarından elde edilen değer en yüksek değer olduğu (47,4mg TEAK/100g kuru numune) belirlenmiştir. Bu bitkinin metanol çözücüsü ile yapılan ekstraksiyonunda CUPRAC değerinin en düşük değer (15,07mg TEAK/100g kuru numune) olduğu görülmektedir.

S. emersum bitkisi için bakır-II İyonu indirgeme antioksidan kapasitesi deneylerinin sonuçlarına bakıldığında, en yüksek değeri metanol çözücüsüyle elde edilen ekstraktın sergilediği (39,09 mg TEAK/100g kuru numune) görülmektedir. Bu bitkinin SE%70M ekstraktının CUPRAC değerinin en düşük oldu (28,744 mg TEAK/100g kuru numune) belirlendi.

4.5. RP-HPLC-UV-DAD Analizlerinden Elde Edilen Bulgular

4.5.1. Standartlar ve Kalibrasyon

Standartların tüm stok çözeltileri % 40 metanol-su karşımında 20 mM konsantrasyonda hazırlandı. 15 standardın stok çözeltilerinin her birinden 500 µL (standart karışımın toplam hacmi 7,5 mL) alınarak 2,5 mL % 40 metanol-su çözücüsü ilave edildi ve böylece son hacim 10 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti % 40 metanol-su çözücüsüyle seyreltilerek 3 farklı konsantrasyona sahip çözelti hazırlandı. Her bir standardın maksimum absorbans yaptığı dalga boyunda konsantrasyonlarına karşılık oluşan pik alanları kullanılarak kalibrasyon eğrileri elde edildi. Tüm standartların kalibrasyonu için uygulanan dalga boyu 280 nm ve ayrıca her standardın maksimum absorbans yaptığı sıralı dalga boyları kullanılarak pik alanları belirlendi. Kafeik asit için 240 nm, protokatekuik asit, p-OH Benzoik asit, vanilik asit için 260 nm, gallik asit, siringik asit için 274 nm, protokatekaldehit, vanillin için 280 nm, siringaldehit, p-kumarik asit için 308 nm, gentisik asit, klorogenik asit, kafeik asit, ferulik asit, sinapik asit için 324 nm dalga boyları seçilerek kullanıldı. 15 standardın kromatogramları ve maksimum absorbans yaptıkları dalga boyları Ek Şekil 1-15'de gösterilmiştir. Standartların 3 farklı konsantrasyonu için, her bir standardın maksimum absorbans yaptığı dalga boyları kullanılarak oluşan pik alanlarına karşı konsantrasyon grafikleri elde edildi ve Ek Şekil 16-29'da verildi.

4.5.2. Ekstraktların RP-HPLC-UV-DAD Analizi İçin Seyreltilmeleri

Konsantrasyonları bilinen ekstraktlardan uygun seyreltmeler yapılarak her biri 5 mg/mL olacak şekilde hazırlanan çözeltilerin analiz sonuçları 5 mg/mL' deki mM olarak hesaplandı.

4.5.3. Ekstraktlardan Fenolik Asitlerin Sıvı-Sıvı Seçimli Ekstraksiyonu

Her bir standardın % 40 metanollü 20 mM stok çözeltisinden 500 µl alınarak standart karışımı hazırlandı. Bu karışımın toplam hacmi 10 mL, konsantrasyonu 1mM olacak şekilde ayarlandı. Standart karışımın çözücüsü döner buharlaştırıcıda uçurulduktan sonra 10 mL 0,05 M (pH yaklaşık 1,3) olan HCl çözeltisinden eklenerek şiddetli bir şekilde vorteks ile karıştırıldı. Bu işlemten sonra üzerine 10 mL etilasetat eklenerek şiddetli bir şekilde vorteks ile çalkalanarak 15 dakika süre ile ekstrakte edildi. Karışım dinlendirildikten sonra organik faz alınarak tekrar bir 10 mL etilasetat ekstraksiyonu yapıldı. Organik fazlar birleştirilerek bir döner buharlaştırıcıda uçuruldu. Daha sonra ekstraksiyona başlamadan önceki aynı konsantrasyona, ilk önce metanolde çözülerek ve üzerine % 40 metanollü su ilave edilerek ayarlandı. Uygulanan yöntem tüm ekstraktlar için gerçekleştirildi. Ekstraktların konsantrasyonları seçimli ekstraksiyon öncesinde ve sonrasında 5 mg/mL olacak şekilde ayarlandı. Tüm ekstraktlarda olmadığı belirlenen fenolik bileşen olan benzoik asit, iç standart olarak 20 mM konsantrasyonda ve 50 µl hacimde tüm ekstraktlara eklenerek seçimli ekstraksiyon uygulandı. Bu çözeltiler 2 paralel olarak alındılar. Ekstraktlar HPLC'de analiz edilmeden önce filtreden geçirildi.

4.5.4. RP-HPLC-UV-DAD Koşulları

RP-HPLC-UV-DAD analizleri, Agilent (Almanya) marka degazer, Quat pompa ve ultraviyole dedektör (1100 serisi) ve DAD (diyot serili dedektör 1200 serisi) donanımlı bir HPLC'de yapıldı. HPLC cihazı Chemstation programı (Agilent) ile kontrol edildi. Tüm analizler için bir Hichrom C18 kolon (250 mm × 4.6 mm i.d., 5 µm partikül) kullanıldı. Hareketli faz (A) metanol, (B) 50/50 (v/v) asetonitril/su içindeki % 0,5 (v/v) asetik asit çözeltisi, (C) % 2 (v/v) asetik asitin sudaki çözeltisi, (D) asetonitril

çözeltilerinden oluşmaktaydı. Elüsyonda takip eden gradiyent kullanıldı ve gradiyent koşulları Çizelge 3.1’de verildi. Enjeksiyon hacmi 20 µL ve akış hızı 1,2 ml/dakika olarak ayarlandı dedektör 280 nm dalga boyunda çalıştırıldı. Metod 33 dakikada sonlanacak şekilde ayarlandı.

Çizelge 3.1. Standartlar ve numuneler için kullanılan metotta gradiyent koşulları

Zaman (dakika)	Çözücü (B) %	Çözücü (C) %	Çözücü (D) %	Akış hızı (ml/dakika)	Basınç (atm)
0,00	10,00	90,00	0,00	1,2	275
5,00	19,00	81,00	0,00	1,2	275
14,00	19,00	81,00	0,00	1,2	275
17,00	30,00	70,00	0,00	1,2	275
18,00	30,00	70,00	0,00	1,2	275
20,00	40,00	60,00	0,00	1,2	275
23,00	45,00	55,00	0,00	1,2	275
25,00	42,00	58,00	0,00	1,2	275
27,00	10,00	0,00	90,00	1,2	275
30,00	10,00	0,00	90,00	1,2	275
33,00	10,00	90,00	0,00	1,2	275

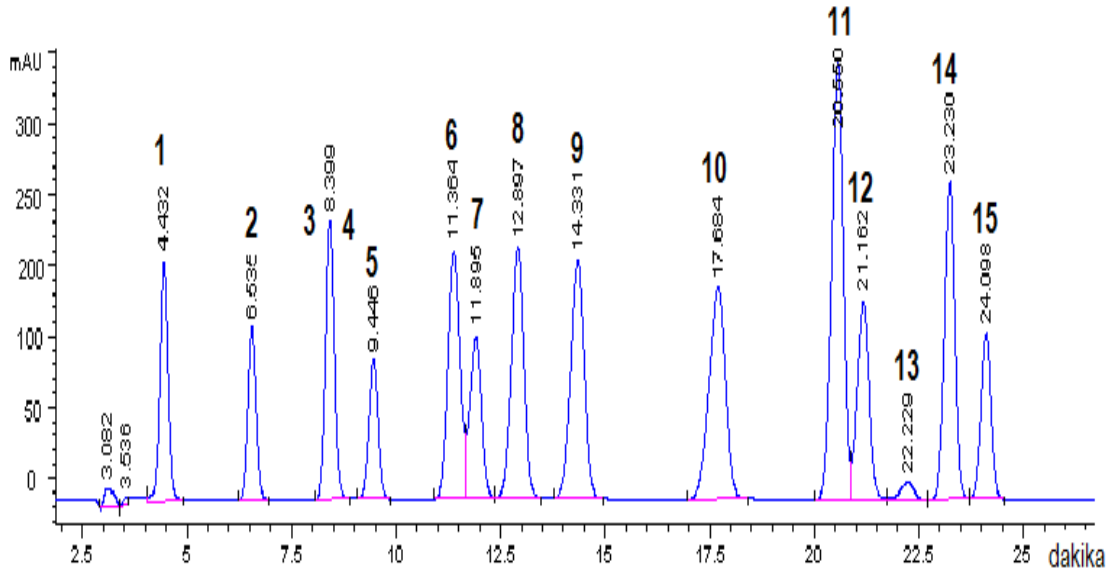
Ayrıca kolonda yapılan ayırma işleminden sonra kolonun temizlenmesi için bir yıkama metodu hazırlanarak kolonda kalabilecek maddelerin uzaklaştırılması hedeflenmiştir. Bu yıkama metodu gradiyent olarak hazırlanmış ve Çizelge 3.1’de verilmiştir. Yıkama metodunun süresi 10 dakikadır.

Çizelge 3.2. Yıkama metodu

Zaman (dakika)	Çözücü (A) %	Çözücü (B) %	Çözücü (C) %	Akış hızı (ml/dakika)	Basınç (atm)
0,00	0,00	10,00	90,00	1,2	275
3,00	70,00	5,00	25,00	1,2	275
7,00	70,00	5,00	25,00	1,2	275
8,00	0,00	10,00	90,00	1,2	275
10,00	0,00	10,00	90,00	1,2	275

4.5.5. RP-HPLC-UV-DAD Metod Geliştirme

Uygun şartlara getirilen HPLC-UV-DAD metodu ile 15 fenolik standardın uygun bir şekilde birbirinden ayrılması sağlanmıştır. Ayırma işleminde tüm standartların 25 dakikada birbirinden ayrılması sağlanmıştır. 15 standart fenolik asidin ayrılmasına ilişkin örnek kromatogram Şekil 4.9'da görülmektedir. Bu metot ile Protokatekaldehit ve Gentisik asit, kolondan çıkış zamanları aynı olduğu için birbirinden ayıramamıştır. Bu nedenle bu iki standart aynı kromatogramda görülmektedir.



Şekil 4.9. HPLC-UV-DAD ile 280 nm de fenolik standartların piklerinin analizi için elde edilen kromatogramlar. Her bir standardın konsantrasyonu 0,2 mM dir.

1= Gallik Asit, 2= Protokatekuik Asit, 3= Protokatekaldehit, 4= Gentisik Asit, 5= p-OH Benzoik Asit, 6= Klorojenik Asit, 7= Vanillik Asit, 8= Kafeik Asit, 9= Siringik Asit, 10= Vanillin, 11= Siringaldehit, 12= p-Kumarik Asit, 13= Benzoik Asit, 14= Ferulik Asit, 15= Sinapik Asit

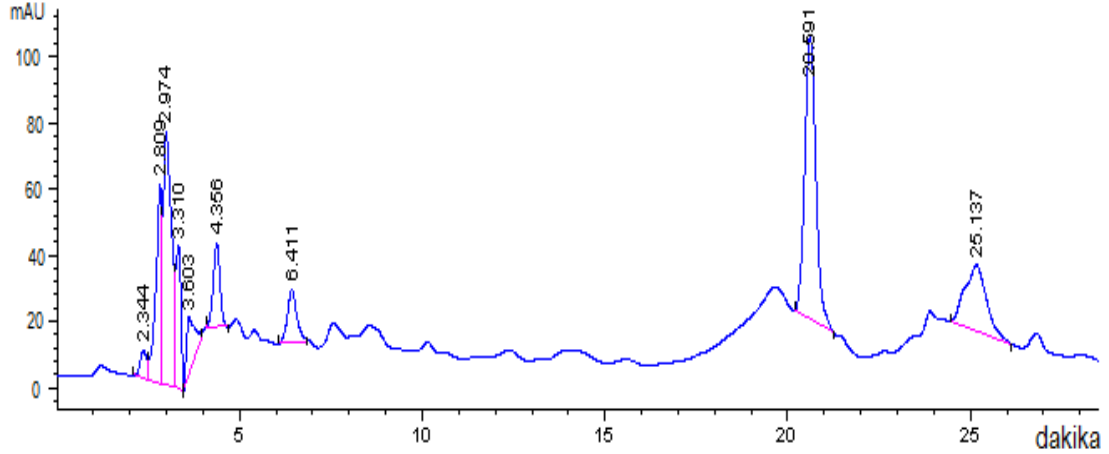
Geliştirilen metotta alıkonma zamanları ve pik alanlarının tekrarlanabilirliği açısından 15 fenolik asit standardından 3 paralel olacak şekilde hazırlanan çözelti karışımlarının kolondan yürütülmesiyle elde edilen gelme zamanları (RT), pik alanları için standart sapma (SS) ve yüzde bağıl standart sapma (%BSS) parametreleri hesaplandı ve Çizelge 4.5'te verildi.

Çizelge 4.5. HPLC-UV-DAD metodunun parametreleri

No	RT	Bileşik	SS (RT)	RT %BSS	Alan	SS(Alan)	Alan %BSS
1	4,32	Gallik asit	0,0 02	0,06	2641,8	29	1,10
2	6,35	Protokatekuik asit	0,0 09	0,01	2193,7	14,75	0,74
3	8,17	Protokatekaldehit	0,001	0,12	9089,2	49,7	0,16
4	8,17	Gentisik asit					
5	9,22	p-OH benzoik asit	0,0 11	0,73	4789,1	49,7	1,04
6	10,97	Klorojenik asit	0,0 79	0,37	4036,8	73	1,81
7	11,53	Vanilik asit	0,0 43	0,10	5928,9	38,85	0,66
8	12,52	Kafeik asit	0,0 13	0,89	6655,1	14,25	0,21
9	13,80	Siringik asit	0,1 21	0,89	7774,8	59,85	0,77
10	17,13	Vanilin	0,1 11	0,66	9743,6	24,05	0,25
11	20,23	Siringaldehit	0,0 1	0,05	10847,0	82,7	0,80
12	20,80	p-Kumarik asit	0,1 18	0,57	5029,5	38,55	0,77
13	21,92	Benzoik asit	0,0 38	0,17	977,7	7,15	0,73
14	22,99	Ferulik asit	0,0 5	0,22	8039,7	55,4	0,69
15	23,91	Sinapik asit	0,0 65	0,27	2927,7	22,95	0,78

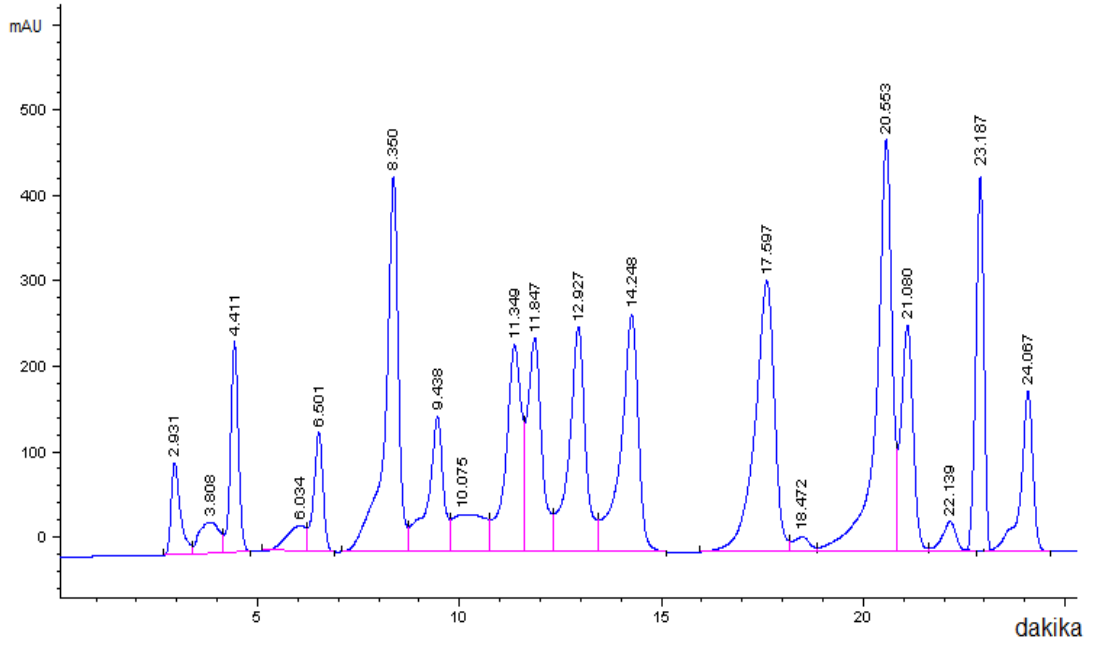
Optimize edilen metotta 280 nm’de fenolik asit içeriği araştırılan ekstraktların HPLC-UV-DAD da elde edilen kromatogramlarının iyi çıkmaması ve pik alanlarının yeteri kadar yüksek çözünürlükte elde edilememesi nedeniyle yeni bir yaklaşıma ihtiyaç

duyulmuştur. Bu kromatogramlara bir örnek olması açısından BUM'e ait kromatogramlar Şekil 4.10'da gösterilmiştir.

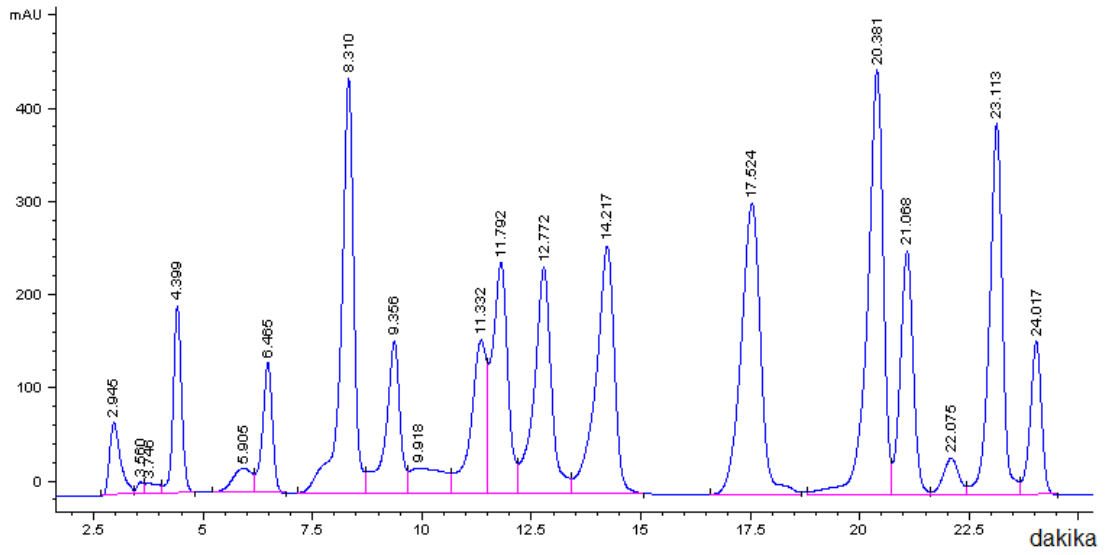


Şekil 4.10. HPLC-UV-DAD ile 280 nm de elde edilen BUM'e ait kromatogramlar

Şekil 4.10'da görüldüğü gibi BUM'un kromatogramındaki piklerin belirgin olmaması ve kalabalık çıkmasından dolayı, daha belirgin ve daha temiz bir kromatogram elde edebilmek için fenolik maddelere uygulanabilen uygun bir seçimli ekstraksiyon yöntemi belirlendi. Daha önce anlatılan "ekstraktlardan fenolik asitlerin sıvı-sıvı seçimli ekstraksiyonu tekniği" kullanılarak 15 fenolik asit standarda ekstraksiyon işlemi uygulandıktan sonra optimize edilen koşullarda bu 15 fenolik asidin HPLC-UV-DAD ile 280 nm de yürütülmeleri suretiyle kromatogramları alınmıştır. Seçimli ekstraksiyon yapılmadan önce elde edilen fenolik asit standartlarına ait HPLC-UV-DAD kromatogramları Şekil 4.11'da, seçimli ekstraksiyon uygulandıktan sonraki kromatogramları ise Şekil 4.12'de verilmiştir.



Şekil 4.11. HPLC-UV-DAD ile 280 nm’de 15 fenolik asit standardının seçimli ekstraksiyon yapılmadan önceki kromatogramları. Her bir fenolik asit standardın konsantrasyonu 1 mM’dir.



Şekil 4.12. HPLC-UV-DAD ile 280 nm’de 15 fenolik asit standardının seçimli ekstraksiyon yapıldıktan sonra elde edilen kromatogramları. Her bir fenolik asit standardının seçimli ekstraksiyonu öncesindeki konsantrasyonu 1 mM’dir.

15 fenolik asit standardının ekstraksiyonsuz ve seçimli ekstraksiyonlarından sonra HPLC-UV-DAD ile elde edilen verilerden yararlanarak geri kazanım değerleri hesaplandı ve Çizelge 4.6'da verildi. Bu yöntem ile 15 fenolik asit standardı için genel olarak uygun geri kazanımlar elde edilmiştir.

Çizelge 4.6. 15 fenolik madde standardının ekstraksiyonlarının % geri kazanımı

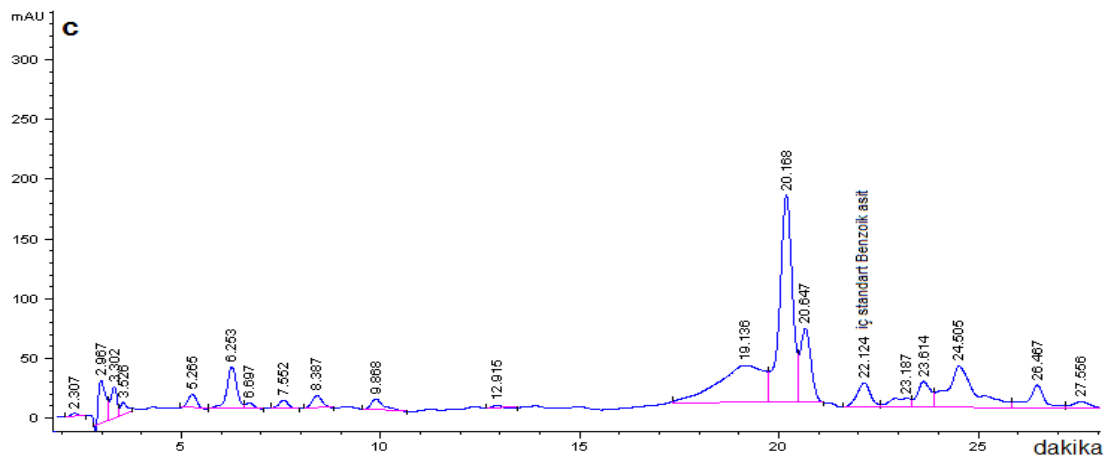
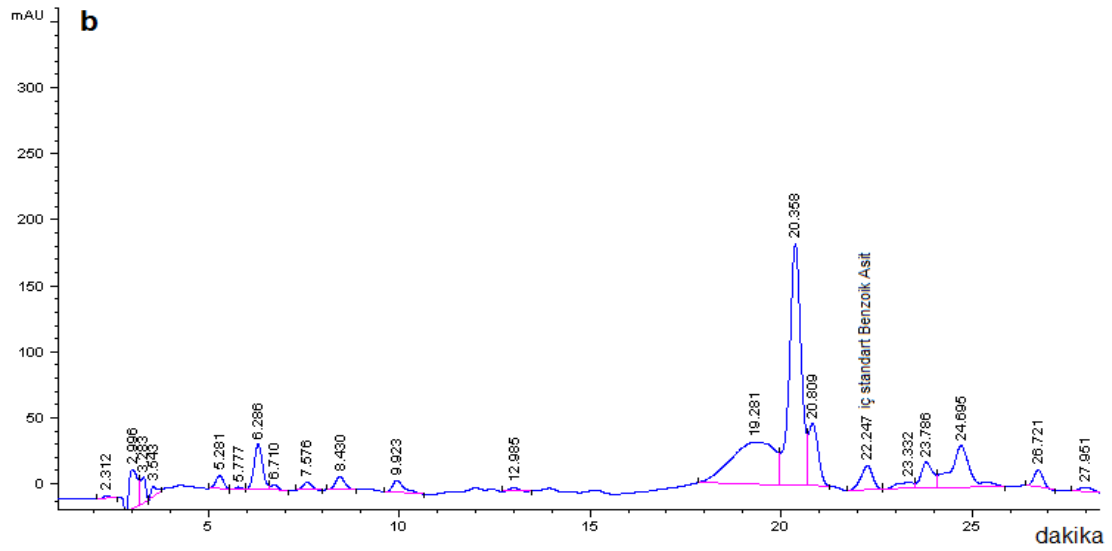
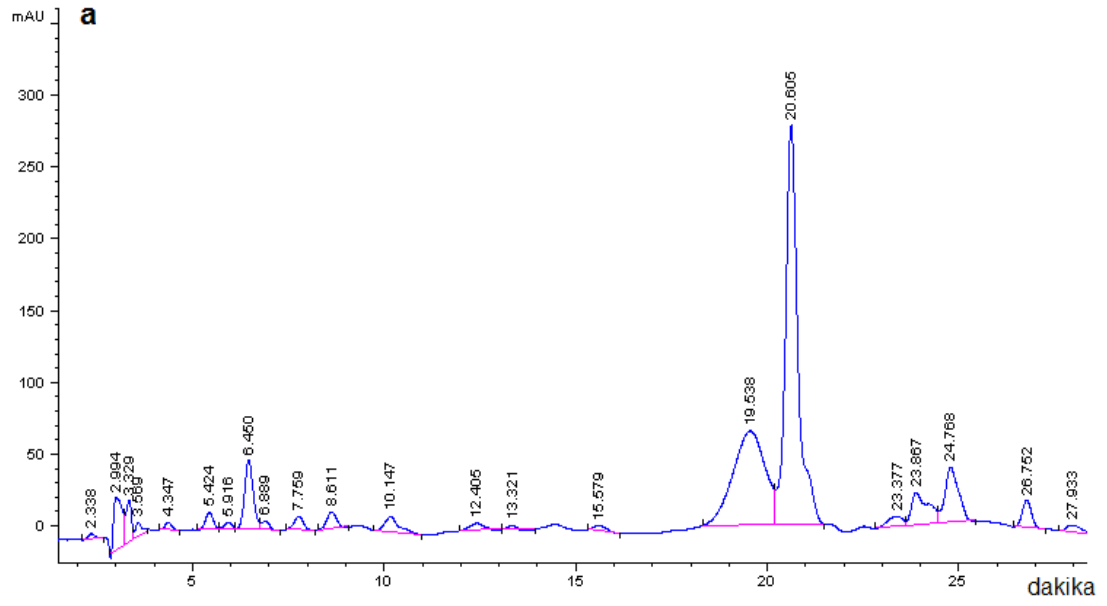
Bileşik No	Bileşik Adı	% Geri Kazanım
1	Gallik asit	79,83
2	Protokatekuik asit	98,23
3	Protokatekaldehit	- *
4	Gentisik asit	- *
5	p-OH benzoik asit	86,33
6	Klorogenik asit	63,86
7	Vanilik asit	96,24
8	Kafeik asit	98,22
9	Siringik asit	91,78
10	Vanilin	90,41
11	Siringaldehit	86,78
12	p-Kumarik asit	97,72
13	Benzoik asit	98,99
14	Ferulik asit	92,65
15	Sinapik asit	74,07

*:Protokatekaldehit ve Gentisik asit girişim yapmaları nedeniyle bunlara ait % geri kazanımları hesaplanamamıştır

Ekstraktların fenolik asit içerikleri seçimli ekstraksiyon uygulandıktan sonra HPLC'de 280 nm'de optimize edilen koşullarda yürütülerek incelendi. 280 nm dalga boyunda veriler, 15 fenolik asit standardı için kolonda alıkonma zamanlarına ve maksimum absorpsiyon yaptıkları dalga boylarına göre incelenmiştir.

Ekstraktların analizi için üç paralel yürütme yapıldı bu paralellerin ikisine iç standart olarak tüm ekstraktlarda gözlemlenmeyen benzoik asitten 20 mM'lık

konsantrasyonlarda 50 µl çözeltileri eklenerek seçimli ekstraksiyon uygulandı. Örnek olarak, seçimli ekstraksiyondan sonra elde edilen BUM'a ait paralellerin HPLC-UV-DAD kromatogramları Şekil 4.13'de verilmiştir. Seçimli ekstraksiyon sonrası tüm ekstraktlara ait HPLC-UV-DAD kromatogramları Ek Şekil 30-35'te verilmiştir.



Şekil 4.13. BUM ekstraktı için HPLC-UV-DAD ile 280 nm'de elde edilen (a) iç satndartsız, (b) ve (c) iç satndart ilaveli, seçimli ekstraksiyon sonrası kromatogramlar.

Tüm ekstraktların seçimli ekstraksiyon metodu uygulandıktan sonra HPLC-UV-DAD kromatogramlarında gözlenen fenolik asitlerin mM cinsinden konsantrasyonları, 15 fenolik asit standardı için 3 farklı konsantrasyonda hazırlanan ve Ek Şekil 16-29'da gösterilen alana karşı konsantrasyonlarından elde edilen kalibrasyon grafikleri kullanılarak hesaplanmış ve Çizelge 4.7'de verilmiştir. Protokatekaldehit ve Gentisik asitin kolondan çıkma zamanları aynı olduğu için girişim yapmalarından dolayı, bu iki maddenin konsantrasyonları izobest noktası (aynı dalga boyundaki absorbans değeri) olan 240 nm dalgaboyundan yararlanılarak ve gentisik asit için 274 nm ve 324 nm dalga boylarındaki alanların oranına karşı % gentisik asit gafiği çizilerek elde edilmiş ve bu grafik Ek Şekil 36'da verilmiştir. Gentisik asitin yüzdesinden hareketle toplam alandan Protokatekaldehit yüzdesi bulunarak konsantrasyonu hesaplanmıştır.

Çizelge 4.7. Seçimli ekstraksiyon sonrasında fenolik asit standartlarının kalibrasyon grafiklerine göre elde edilen mM cinsinden konsantrasyon değerleri

Standartlar	BU%50M	BU%70M	BUM	SE%50M	SE%70M	SEM
Gallik asit	-	-	-	-	-	-
Protokatekuik asit	-	-	-	-	-	-
Protokatekaldehit	0,069	0,0295	-	0,022	-	-
Gentisik asit	0,031	0,19	0,102	0,037	-	-
p-OH benzoik asit	-	-	-	-	-	-
Klorogenik asit	-	-	-	0,055	0,028	-
Vanilik asit	-	-	-	0,0024	-	-
Kafeik asit	0,0231	0,0193	-	-	-	-
Siringik asit	-	-	-	-	-	-
Vanilin	-	-	-	-	-	-
Siringaldehit	-	-	-	-	-	-
p-Kumarik asit	-	-	-	-	-	-
Benzoik asit	-	-	-	-	-	-
Ferulik asit	0,0292	0,0444	0,0136	0,0162	0,0175	0,0126
Sinapik asit	-	-	-	-	-	-

-: ilgili standartlar gözlemlenemedi

Ayrıca tüm ekstraktlara seçimli ekstraksiyon uygulandıktan sonra, geri kazanım yüzdelerinden yararlanarak HPLC-UV-DAD kromatogramlarında gözlenen fenolik asit standartlarının mM cinsinden konsantrasyonları Çizelge 4.8’de verilmiştir. Protokatekaldehit ve Gentisik asitin kolondan çıkma zamanları aynı olduğu için, girişim yapmalarından dolayı geri kazanım yüzdeleri hesaplanamamıştır.

Çizelge 4.8. Ekstraktlardaki fenolik asitlerin, seçimli ekstraksiyon sonrasında fenolik asit standartlarının yüzde geri kazanım değerlerine göre hesaplanan mM cinsinden konsantrasyon değerleri.

Standartlar	BU%50M	BU%70M	BUM	SE%50M	SE%70M	SEM
Gallik Asit	-	-	-	-	-	-
Protokatekuik Asit	-	-	-	-	-	-
Protokatekaldehit	*	*	-	*	-	-
Gentisik Asit	*	*	*	*	-	-
p-OH Benzoik Asit	-	-	-	-	-	-
Klorogenik Asit	-	-	-	0,06	0,029	-
Vanillik Asit	-	-	-	0,00205	-	-
Kaffeik Asit	0,021	0,017	-	-	-	-
Siringik Asit	-	-	-	-	-	-
Vanillin	-	-	-	0,0026	-	-
Siringaldehit	-	-	-	-	-	-
p-Kumarik	-	-	-	-	-	-
Benzoik Asit	-	-	-	-	-	-
Ferulik Asit	0,0302	0,0465	0,0133	0,0166	0,0177	0,0123
Sinapik Asit	-	-	-	-	-	-

-: ilgili standartlar gözlemlenemedi, *:ilgili standart gözlemlendi fakat girişime uğradığı için konsantrasyonları hesaplanamadı

Çizelge 4.7 ve Çizelge 4.8’e bakıldığında ekstraktların tümünde ferulik asit olduğu görülmektedir. Ekstraktlarda miktar olarak en yüksek oranda ise gentisik asitin

bulunduğu ve ferulik asitten sonra ikinci en yaygın asit olduğu gözlemlenmiştir. Araştırılan standartlardan gallik asit, protokatekuik asit, p-OH Benzoik asit, siringik asit, vanillin, sringaldehit, p-kumarik asit, benzoik asit ve sinapik asit, ekstraktlara uygulanan yöntemlerle gözlenmemiştir.

Uygulanan sıvı-sıvı seçimli ekstraksiyon, kromatogramlarda piklerin daha temiz ve düzgün çıkmasını, bazı piklerin çözünürlüklerinin daha iyi olmasını sağlamıştır. Seçimli ekstraksiyon tekniği uygulanmadan elde edilen ve örnek olarak Şekil 4.10'da gösterilen HPLC-UV-DAD ile 280 nm de BUM'e ait kromatogramlarda bazı piklerde kuyruklanma ve yayvanlık olduğu görülmektedir. Bu nedenle aynı zamanda gelen asitlere ait pikler sağlıklı şekilde belirlenememiştir ve dalga boylarına göre gözlenen özellikler sergileyen fenolik asit standartlarının varlıklarından emin olunamamıştır. Sıvı-sıvı seçimli ekstraksiyon uygulandıktan sonra BUM'a ait paralellerin HPLC-UV-DAD kromatogramları Şekil 4.13'de verilmiştir. Ekstraktların sıvı-sıvı seçimli ekstraksiyonlarından sonra pik alanlarında bir azalma görülmektedir ve bu durum Çizelge 4.6'ya göre beklenen bir sonuçtur. Ekstraktların içerdiği fenolik asit standartlarının pik alanlarında bir azalma olmasına karşın, oluşan piklerin daha belirginleşmesi ve daha iyi çözünürlükte kromatogramların elde edilmesi açısından bir avantaj sağlanmıştır. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu sonrasında temiz ve keskin piklerin elde edilmesi ile aranan maddelerin varlığı açık bir şekilde ortaya konmuştur.

Ferulik asitin en düşük konsantrasyonlarının BUM ve SEM' de gözlemlenmesi ferulik asitin iki tane hidroksil grubu bulundurmasıyla açıklanabilir. Bu nedenle, ferulik asitin metanol çözücüsüyle yapılan ekstraksiyonlar yerine, metanol-su karışımlarıyla yapılan ekstraksiyonlarda konsantrasyonlarının daha yüksek olduğu görülmektedir. Kafeik asit'in BU%50M ve BU%70M ekstraktlarında olduğu gözlemlenmiştir Çözücüdeki su oranının yüksek olduğu BU%50M'de kafeik asit konsantrasyonunun daha yüksek olduğu görülmektedir ve bu durumun, kafeik asitin üç hidroksil grubu bulundurmasının etkisiyle olabileceği düşünülmektedir.

Vanilin, sadece SE%50M ekstraktında gözlemlenmiştir. Klorojenik asit SE%50M ve SE%70 ekstraktlarında gözlemlendi ve SE%50M ekstraktında klorojenik asit

konsantrasyonunun daha yüksek olduğu bulunmuştur. Klorojenik asit üzerinde altı tane hidroksil grubunun bulunmasından dolayı, su oranı yüksek olan çözücülerde daha iyi çözüneceği tahmin edilmektedir. Protokatekaldehit, BU%50M, BU%70M ve SEM ekstraktlarında gözlemlendi. BU%50M ekstraktında protokatekaldehitin konsantrasyonunun daha yüksek olduğu görülmektedir. Protokatekaldehit üzerinde iki hidroksil grubunun bulunması, su oranı yüksek çözücüde daha iyi ekstrakte edilebileceği düşüncesini ön plana çıkarmaktadır.

Ekstraktların Folin-Ciocalteu metoduyla toplam fenolik madde tayinleri deneylerindeki sonuçları gösteren Şekil 4.3'e bakıldığında, BU%70M ekstraktının toplam fenolik madde içeriğinin en yüksek olduğu görülmektedir ($467,78 \pm 36,69$ mg GAE/100 g kuru numune). Bu ekstraktta HPLC-UV-DAD analiziyle gözlenen fenolik asitler protokatekaldehit, gentisik asit, kafeik asit ve ferulik asittir. Ferulik asit miktar olarak en yüksek bu ekstraktta tespit edilmiştir. BUM ekstraktının toplam fenolik madde içeriğinin miktar olarak en düşük değerde ($92,13 \pm 13,90$ mg GAE/100 g kuru numune) olduğu belirlenmiştir. Bu ekstraktta HPLC-UV-DAD analiziyle gözlenen fenolik maddeler ise gentisik asit ve kafeik asittir. Bunların da miktarlarının düşük olduğu belirlenmiştir.

Folin-Ciocalteu metoduyla SE%50M ekstraktının toplam fenolik madde içeriğinin en yüksek olduğu görülmektedir ($283 \pm 20,95$ mg GAE/100 g kuru numune) ve bu ekstraktta HPLC-UV-DAD analiziyle gözlenen fenolik maddelerin protokatekaldehit, gentisik asit, klorojenik asit, vanilik asit ile ferulik asit olduğu, miktarlarında diğer ekstraktlara göre yüksek olduğu belirlenmiştir. SEM ekstraktının toplam fenolik madde içeriğinin miktar olarak en düşük değerde ($186,03 \pm 70,80$ mg GAE/100 g kuru numune) olduğu ve HPLC-UV-DAD analiziyle gözlenen fenolik asidin sadece ferulik asit olduğu ve miktarında düşük olduğu belirlendi. Ekstraktların Folin-Ciocalteu metoduyla elde edilen toplam fenolik madde içerikleri tayini deneylerindeki sonuçları ile HPLC-UV-DAD bulguları arasında genel olarak bir paralellik bulunduğu belirlenmiştir.

Ekstraktlarda aranan fenolik asitlerin konsantrasyonları önce, seçimli ekstraksiyondan sonra standartlarla elde edilen kalibrasyon grafiklerine göre, sonra da fenolik asitlerin

seçimli ekstraksiyonlarındaki geri kazanım yüzdelerine göre iki ayrı şekilde hesaplandı (Çizelge 4.7 ve 4.8.). Her iki tablodaki değerler birbirine paralellik sergilemektedirler.

Seçimli ekstraksiyondan sonra fenolik asitlerin yüzde geri kazanım değerlerine göre elde edilen Çizelge 4.8' de, BUM, BU%70M, BU%50M ekstraktlarında protokatekaldehit, BUM, BU%70M, BU%50M ve SE%50M ekstraktlarında da gentisik asit tespit edilmekle beraber, bu asitlerin birbiri ile girişim yapmalarından dolayı miktarları belirlenememiştir.

Ekstraktların 280 nm dalga boyunda ve 25 dakika içerisinde elde edilen kromatogramlarına bakıldığında, fenolik madde standartlarının gelme zamanlarına yakın ve standartların pikleriyle uyuşmayan piklerin oluştuğu gözlenmiştir. Bu uyuşmayan piklerin fenolik madde standartlarının izomer yapılarının olduğu düşünülmektedir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Yapılan bu çalışmada, Kars bölgesinde sulak alanlarda veya nemli bölgelerde yetişen *B. Umbellatus* ve *S. emersum* bitkilerinin metanol, %70 metanol- saf su (v/v), %50 metanol-saf su (v/v) çözücüleri kullanılarak ultrasonik banyo ekstraksiyonu yöntemiyle elde edilen ekstraktlarının ekstraksiyon verimleri hesaplanarak, toplam fenolik madde içerikleri, antioksidan aktiviteleri ve içeriklerindeki fenolik asitleri belirlemek amacıyla RP-HPLC-UV-DAD analizleri yapıldı.

Çalışmada her iki bitki için ultrasonik banyo yöntemiyle yapılan ekstraksiyon verimleri hesaplandı. *B. Umbellatus* bitkisinden elde edilen ekstraktların verimleri % 27,82-16,86 arasında; *S. emersum* bitkisinden elde edilen ekstraktların verimleri % 18,91-11,47 arasında bulundu. Bulgular kısmında da belirtildiği gibi çözücüdeki saf su yüzdesi metanole göre arttığında, ekstraksiyon veriminin her iki bitki için de arttığı belirlenmiştir. Dikkat çeken diğer bir husus, iki bitkiye ait metanol çözücüsüyle elde edilen ekstraktların verimlerinin diğer çözücülerle elde edilen ekstrakt verimlerine göre daha düşük olmasıdır. Ultrasonik ekstraksiyon tekniği ile elde edilen verim sonuçlarıyla literatürde belirtilen diğer ekstraksiyon tekniklerinin verim sonuçlarının bir birlerine yakın olduğu görülmektedir [103]. Ultrasonik banyo ekstraksiyonu toplam otuz beş dakika süreyle gerçekleştirildi. Literatürde belirtilen diğer ekstraksiyon tekniklerinin uzun zaman alması, kısa sürede gerçekleştirilen ultrasonik banyo ekstraksiyonunu avantajlı hale getirmektedir. Literatürde ısı işlem uygulanarak gerçekleştirilen ekstraksiyon tekniklerinde, hedeflenen maddelerin sıcaklığın etkisiyle bozunması, düşük sıcaklıklarda uygulanabilen ultrasonik ekstraksiyon tekniğini daha ön plana çıkarmaktadır.

B. umbellatus ve *S. emersum* bitkilerinin ultrasonik banyo ekstraksiyonu ile elde edilen ekstraktlarının toplam fenolik madde içeriklerine bakıldığında: *B. umbellatus* bitkisine ait ekstraktlarda $404,20 \pm 27,75$ - $92,13 \pm 13,90$; *Sparganium emersum* bitkisine ait ekstraktlarda $283,00 \pm 20,95$ - $186,03 \pm 70,80$ (mg GAE/100 g kuru numune olarak) arasında değerler elde edildi. En yüksek değer BU%70M ekstraktında, en düşük değer BUM'a ait ekstraktta elde edilmiştir. Her iki bitki içinde, saf metanol çözücüsü ile elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde içerikleri en düşük seviyede bulundu.

Dikkat çeken önemli bir husus, çözücü içerisindeki saf su yüzdesinin artmasına paralel olarak fenolik madde miktarlarında artmış olmasıdır. Ultrasonik banyo ekstraksiyonu, literatürde nispeten yeni sayılabilecek bir ekstraksiyon tekniğidir ve bundan dolayı toplam fenolik madde içeriği çözücü türü ve ekstraksiyon süresi açısından bu çalışmada belirlenen optimum koşullara ait verilerin literatüre katkısı olacağı düşünülmektedir.

DPPH radikal giderme aktivitesi ölçümlerinde, IC₅₀ değerleri *B. Umbellatus* bitkisine ait ekstraktlarda 51,9±6,23 - 32,88±0,89 µg/ml; *S. emersum* Rehmann bitkisine ait ekstraktlarda 38,71± 4,74 - 32,28±0,27 µg/ml arasında bulundu. Bulgular kısmında da bahsedildiği gibi, *B. Umbellatus* ve *S. emersum* bitkilerinin ultrasonik banyo ekstraksiyonlarında metanol çözücüsüyle elde edilen ekstraktların düşük değerlerde toplam fenolik madde içerdikleri (BUM için 92,13±13,90 ve SEM için 186,03 ±70,80 mg GAE/100 g kuru numune) belirlenmiştir. Dikkat çeken bir durum, toplam fenolik madde içeriklerinin düşük olmasına rağmen bu ekstraktların yüksek antioksidan aktivite göstermeleridir (BUM için IC₅₀ değeri 32,88±0,89 µg/ml ve SEM için IC₅₀ değeri 32,28±0,27 µg/ml). Bu durum, bu ekstraktların büyük oranda antioksidan aktivitesi yüksek fenolik bileşenlerden ya da fenolik yapıda olmayan fakat antioksidan aktivite sergileyen diğer bazı bitki bileşenlerinden meydana geldiğini düşündürmektedir.

DPPH radikal giderme aktivitesi ölçümlerinde karşılaştırma maddesi olarak BHT ve Trolox kullanıldı ve bu karşılaştırma maddelerinin sırasıyla IC₅₀ değerleri 3,26±0,3 µg/ml ve 5,69±0,12 µg/ml olduğu belirlendi. Ölçümlerden BHT'nin radikal giderme etkisinin Trolox'tan daha iyi olduğu belirlenmiştir. Tüm ekstraktlardan elde edilen DPPH radikal giderme aktivite değerlerinin karşılaştırma maddelerinden daha düşük düzeylerde olduğu belirlenmiştir. Her iki bitki için, ekstraksiyonda kullanılan her bir çözücü açısından değerlendirildiğinde, *S. emersum* bitkisinden elde edilen DPPH radikal giderme aktivite değerlerinin daha iyi olduğu görülmektedir (örneğin SE%70M için IC₅₀ değeri 38,71±4,74 µg/ml ve BU%70M için IC₅₀ değeri 51,9±6,23 µg/mL IC₅₀ değerinin düşük olması ekstraktın antioksidan aktivitesinin yüksek olduğunu belirtmektedir).

Bakır-(II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi (CUPRAC) ölçümlerinde, *B. Umbellatus* bitkisine ait ekstraktlarda $15,67 \pm 0,77$ - $47,30 \pm 0,30$; *S. emersum* bitkisine ait ekstraktlarda $28,74 \pm 0,39$ - $39,09 \pm 2,06$ CUPRAC değeri (mg TEAK/100g kuru numune) elde edilmiştir. *B. Umbellatus* bitkisine ait ekstaktların CUPRAC değerleri (Şekil 4.8) ile bu bitkinin toplam fenolik madde içeriklerinin (Şekil 4.3) uyumlu olduğu görülmektedir. Ancak bu bitki için DPPH radikal giderme aktivitesinde (Şekil 4.6.) aynı uyum gözlenememiştir. *S. emersum* bitkisine ait ekstraktların CUPRAC değerleri ile bu bitkinin DPPH radikal giderme aktivitesinin değerlerinin uyumlu olduğu belirlendi. Ancak bu bitki de ise ekstraktların toplam fenolik madde içeriklerinin düşük ve dolayısı ile aynı uyumu göstermediği ortadadır.

Literatürde, ekstraktların toplam fenolik madde içerikleri arttıkça antioksidan etkilerinin de arttığını ifade eden çalışmalar mevcuttur [117-119]. Ancak, toplam fenolik madde içeriği ile antioksidan aktivite arasında doğrusal bir ilişki olmadığını, ya da bu ilişkinin bu kadar basit olmadığını söyleyen araştırmacılar da vardır [120-123]. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar daha ziyade ikici görüşü destekler mahiyettedir.

Ekstraktlara, sıvı-sıvı seçimli ekstraksiyon tekniği uygulandıktan sonra, 15 fenolik madde standardı kullanılarak RP-HPLC-UV-DAD analizi ile içeriklerindeki fenolik maddeler belirlenmiştir. Ekstraktlarda en yaygın olarak ferulik asitin, daha sonra da gentisik asitin olduğu belirlenmiştir. İncelenen 15 fenolik madde standardından gallik asit, protokatekuik asit, p-OH Benzoik asit, siringik asit, vanillin, sringaldehit, p-kumarik asit, benzoik asit, sinapik asit ekstraktlara uygulanan yöntemle gözlenmemiştir.

Ekstraktların Folin-Ciocalteu metoduyla toplam fenolik madde tayini deneylerinde elde edilen sonuçlar ile HPLC-UV-DAD analizlerinden elde edilen bulgular arasında genel olarak bir paralellik olduğu belirlenmiştir. Ancak, BUM ve SEM'in DPPH radikal giderme aktivitesi değerlerinin yüksek olmasına karşın bu iki ekstraktın RP-HPLC-UV-DAD analizi ile düşük miktarda fenolik asit bileşeni içerdiği tespit edilmiştir. Bundan dolayı ekstraktların antioksidan aktivitelerinin sadece fenolik asit bileşenlerine bağlı olmadığı, ekstraktlarda bulunan değişik bileşenlerin bu özelliği artırıcı veya azaltıcı etki yaptığını söylemek mümkündür. Bu konuda daha ayrıntılı bir analiz verebilmek

adına, ekstraktlardaki diğer bileşenlerin GC-MS ya da LC-MS gibi güçlü bir teknik yardımıyla aydınlatılması faydalı olacaktır.

Bulgular kısmında da bahsedildiği gibi, ekstraktlardan 280 nm dalga boyunda 25 dakika içerisinde elde edilen kromatogramlara bakıldığında fenolik madde standartlarının kolondan çıkış zamanlarına yakın ve standartların pikleriyle uyuşmayan piklerin olduğu gözlenmiştir. Bu uyuşmayan piklerin fenolik madde standartlarının izomer yapılarından veya flavonoid grubu ve türevlerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Litaretürde *B. Umbellatus* ve *S. emersum* bitkilerinden elde edilen ekstraktların antioksidan aktiviteleri ve fenolik madde içeriklerinin tayinine ilişkin herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle elde edilen verilerin literatüre önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Doğal bileşiklerden antioksidan aktivite sergileyen bileşik gruplarının ekstraksiyonları üzerine yapılan çalışmaların çoğunluğu karasal bitkilerle ilgilidir. Oysa Dünya'nın giderek artan nüfusunun beslenme ve sağlık ihtiyaçlarının karşılanması ve gıda çeşitliğinin artması açısından su bitkileride gittikçe artan bir şekilde ilgi görmeye başlamıştır. Ülkemizin de önemli sulak alanlara sahip olduğu göz önüne alındığında, bu bölgedeki bitki florasının (özellikle endemik türlerin) bu açıardan değerlendirilmesi gereği ortadadır ve yakın gelecekte bu tür çalışmaların sayısının daha da artacağı tahmin edilmektedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] Gardes-Albert, M., Jore, D., Abendinzadeh, Z.;Remita, S., Rouscilles, A., UMR 8601-CNRS, , “Oxidative Stress” *Expresion of Interest for the VI. Framework Programme of the European Commisison,Annex 3, Network of Excecellece projet*, Laboratoire de chimie Physique, Universite PARIS 5 Update 2 May, (2002).
- [2] Rice-Evans C. A., Miller N. J. and Paganga G., “Antioxidant properties of phenolic compounds”, *Trends Plant Sci.*, 2 , 152-159 (1997).
- [3] Liyana-Pathirana, C. M., Shahidi, F., Alasalvar, C., Antioxidant Activity of Cherry Laurel Fruit (*Laurocerasus officinalis* Roem.) and its Concentrated Juice, *Food Chemistry*, 99, 121-8, (2006).
- [4] Leikert, J. F., Räthel, T. R., Wohlfart, P., Cheynier, V., Vollmar, A.M., & Dirsch, V.D., “Red Wine Polyphenols Enhance Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression andSubsequent Nitric Oxide Release from Endothelial Cells”, *Circulation*, 106, 1614–17,(2002).
- [5] Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G., “Structureantioxidant Activity Relationship of Flavonoids and Phenolic Acids”, *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933–956, (1996).
- [6] Hertog, M. G. L., Feskens, E. J. M., Hollman, P. C. H., Katan, M. B., Kromhout, D., “Dietary Antioxidant Flavonoids and Risk of Coronary Heart Disease: The Zutphen Elderly Study”, *Lancet*, 342, 1007–11, (1993).
- [7] Ness, A. R., Powles, J. W., “Fruit and Vegetables, and Cardiovascular Disease: Review” *International Journal of Epidemiology*, 26, 1–13, (1997).
- [8] Grice, H.C., “Safety Evaluation of Butylated hydroxyltoluene (BHT) in the Liver, Lungand Gastrointestinal Tract”, *Food and Chemical Toxicology*, 24, 1127-30, (1986).
- [9] Wichi, H.P., “Enhanced Tumor Development by Butylated hydroxyanisole (BHA) from the Prospective of Effect on Forestomach and Oesophageal Squamous Epithelium”, *Food and Chemical Toxicology*, 26, 717-23, (1998).
- [10] Williams, G.M., Iatropoulos, M.J., Whysner, J., “Safety Assessment of Butylated hydroxyanisole and Butylated hydroxyltoluene as Antioxidant Food Additives”, *Food and Chemical Toxicology*, 37, 1027-38, (1999).
- [11] Zainol, M. K., Abd-Hamid, A., Yusof, S., Muse, R., “Antioxidant Activity and Total Phenolic Compounds of Leaf, Root and Petiole of Four Accessions of *Centella asiatica* (L.) urban”, *Food Chemistry*, 81, 575–81, (2003).

- [12] Bonnefont-Rousselot, D., Beaudoux, J.L., Therond, P., Peynet, J., Legrand, A., Delattre, J., Diabetes Mellitus, Oxidative Stress and Advanced Glycation Endproducts, *Annales Pharmaceutiques Francaises.*, 62(3), 147-57, (2004).
- [13] Gromadzinska, J., Wasowicz, W., Rydzynski, K., Szeszenia-Dabrowska, N., "Oxidativestress markers in blood of lung cancer patients occupationally exposed to carcinogens", *Biological Trace Element Research.*, 91(3), 203-15, (2003).
- [14] Çavdar C., Sifil A, Çamsarı "Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidan Savunma", *Türk Nef. Diyaliz ve Transpl. Der.* 3-4;92-95, (1997).
- [15] Sies, H., "Oxidative stress from basic research to clinical application", *Am. J. Med.*, 9,31-37, (1991).
- [16] Halliwell B., Gutteridge JM, Cross CE "Free Radicals, antioxidants and human disease: Where are we now?" *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 119(6), 598-6 (1992).
- [17] Halliwell B., Gutteridge JMC "Free Radicals in Biology and Medicine", Third Edition, Oxford Science Publications, 22-24. (2001).
- [18] Akkuş, İ., "Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri", *Mimoza Yayınları*, Konya, (1995).
- [19] Storz G., and Imlay J.A., "Oxidative stress" *Curr. Opin. Microbiol.*, 2, 188-19(1999)
- [20] Tunalier Z., Öztürk N, Kosar M, Baser Khc, Duman H, Kırimer N,, "Bazı sideritis türlerinin antioksidan etki ve fenolik bileşikler yönünden incelenmesi". *Bitkisel ilaç Hammaddeleri Toplantısı* (2002).
- [21] Dreher D, Junod AF. "Role of oxygen free radicals in cancer development". *Eur J Cancer*;32A:30 (1996).
- [22] Stadtman, E.R., "Importance of Individuality in Oxidative Stress and Aging". *Free Radical Biology and Medicine*, 33 (5), 597–604.(2002)
- [23] Sohal, R.S., "Role of Oxidative Stress and Protein Oxidation in the Aging Process" *Free Radical Biology and Medicine*, 33 (1), 37–44. (2002)
- [24] İşbilir, Ş. S., "Yaprakları salata-baharat olarak tüketilen bazı bitkilerin antioksidan aktivitelerinin incelenmesi", Doktora Tezi, *Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Edirne (2008).
- [25] Ak, Tuba., "Curcuminin antioksidan ve antiradikal özelliklerinin incelenmesi".

- Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum (2006).
- [26] Akay-Diri, H., “*Salvia candidissima Vahl. Uçucu Bileşenlerinin Karakterizasyonu ve Antioksidant Aktivitelerinin Belirlenmesi*,” Yüksek Lisans Tezi, *Mugla Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Mugla, (2006).
- [27] Pokorný,J., Yanishlieva, N., Gordon, M. “*Introduction, In: Antioxidants in Food, Practical Applications*”, (Eds), **Woodhead Publishing Limited, Cambridge**, Pp: 2 (2001).
- [28] Gordon, M. H., Pokorný, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. “*The Development of Oxidatif Rancidity in Foods, In: Antioxidants in Food, Practical Applications*”, (Eds), **Woodhead Publishing Limited, Cambridge**, , Pp: 17. (2001)
- [29] Gökalp, N., "Doğal antioksidanlar", Tezsiz Yüksek Lisans Dönem Projesi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara (2006).
- [30] Müftüoğlu O., "Yaşasın hayat", *Doğan Kitapçılık* istanbul, (2003)
- [31] Richheimer, S. L., Bernart, M., "Antioxidant Activity of Lipid Soluble Phenolic Diterpenes from Rosemary", *JAOCs*, 73: 507-514, (1996).
- [32] Djarmati, Z., Jankov, R.M., Schwirtlich, E., Djulinac, B., Djordjevic, A., "High Antioxidant Activity of Extracts Obtained from Sage by Supercritical CO₂ Extraction", *JAOCs*, 68(10):731-734, (1991).
- [33] Cuvelier, M., Cuvelier, E., Berset, C., Richard, H., "Antioxidant Constituents in Sage", *Food Chemistry*, 42: 665-669, (1994).
- [34] Shi, H., Noguchi, N., and Niki, E., Intoducing Natural Antioxidants. In J. Pokorny, N. Yanishlieva and M. Gordon (eds), *Antioxidants in food*. CRC Press,USA. (2001)
- [35] Prof. Dr. Halit Keskin; Besin Kimyası (I-II), *İ.Ü. Yayınları, İstanbul*, (1987).
- [36] Çakmakçı, S. ve Çelik, İ., “Gıda Katkı Maddeleri (IV.Baskı)” *Atatürk Üni., Ziraat Fak., Ders Yayınları No:164*, Erzurum, 214s., (2004).
- [37] Hudson, B., J., “Food Antioxidants”, *Elsevier Science*, USA. (1990)
- [38] Maslarova, N.V.Y. Inhibiting Oxidation. In J. Pokorny, N. Yanishlieva, and M. Gordon (eds), *Antioxidants in food*. CRC Press, USA (2001).
- [39] Disilvestro, R.A., Flavanoids as Antioxidants. In R.E.C. Wildman(ed), *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods*. CRC Pres, USA (2001).

- [40] Yanishlieva-Maslarova, N. V., Pokorný, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. “Inhibiting Oxidation, In: Antioxidants in Food, Practical Applications”, (Eds), **Woodhead Publishing Limited**, Cambridge, Pp: 22-70.(2001).
- [41] Bilaloglu, G.V. ve Harmandar, M., “Flavanoidler” **Aktif Yayınevi İstanbul** 334-354s.(2000).
- [42] Evans, R.C., Plant polyphenols: free radical scavengers or chain-breaking (1994)
- [43] Pratt, D.E., Hudson, B.J.F., “Natural antioxidants not exploited commercially in food antioxidants: Hudson B.J.F.: ED”: **Elsevier**: Amsterdam, 17-192 (1990).
- [44] Jovanovic, S. V., Steenken, S., Tosic, M., Marjanovic, B., Simic, M. G., “Flavonoids as Antioxidants”, **Journal of American Chemical Society**, 116, 4846–51, (1994).
- [45] Beecher G.R., “Overview of dietary Flavonoids.” **J. Nutr.** 133:3248S-3254S (1996).
- [46] Cadenas, E., Packer, L., “Handbook Of Antioxidants”, **Marcel Dekker**, Second Edition”, New York, 0-8247-0547-5 (2002).
- [47] Brune, M., Rossander, L., Hallberg, L., “Iron absorption and phenolic compound: Importance of different phenolic structures”, **European Journal of Clinical Nutrition**, 43, 547-558 (1989).
- [48] Middleton, E., Kandaswami, C., “The impact of plant flavanoids on mammalian biology: Implications for immunity, in inflammation and cancer”, **The Flavonoids: Advances in Research Since 1986**, Chapman and Hall, London, 0-412-48070-0. (1993).
- [49] Keskin, H., Erkmen G., “*Besin Kimyası*”, **Güryay Matbaacılık, Beşinci basım**, İstanbul (1987).
- [50] Sanchez, M. C., Larrauri, J.A., Saura, C. F., “A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols”, **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 76, 270-276. (1998).
- [51] Huang, D., Ou, B. and Prior, R.L., “The chemistry behind antioxidant capacity assays”. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53, 1841-1856. (2005).
- [52] Prior, R.L., Wu, X., Scaich, K., “Standardized methods for the determination antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements”, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53(8), 3110-3113. (2005)
- [53] Cao, G., Alessio, H. M., Cutler, R. G., “Oxygen-Radical Absorbance Capacity Assay for Antioxidants”, **Free Radical Biology & Medicine**, 14(3), 303–11, (1993).

- [54] Dávalos, A., Bartolomé, B., Gómez-Cordovés, C., “Antioxidant Properties of Commercial Grape Juices and Vinegars”, *Food Chemistry*, 93, 325-30, (2005).
- [55] Miller, N. J., Rice Evans, C. A., Davies, M. J., Gopinathan, V., Milner, A., , “A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates”, *Clinical Science*, 84, 407-412. (1993).
- [56] Miller, N. J., Rice-Evans, C. A., “Total antioxidant status in plasma and body fluids”, *Methods of Enzymology*, 234, 279-29 (1994).
- [57] Abdille, Md.H., Singh,R.P., Jayaprakasha,G.K., Jena, B.S., “The Extracts from illenia indica Fruits”, *food chemistry*, 90, 821-96, (2005).
- [58] Benzie, I. F. F., Strain, J. J., “Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of Antioxidant Power: The FRAP Assay”, *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76, (1996).
- [59] Iris, F. F., Benzie, I. F. F., “Strain, J. J., Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay: Direct Measure of Total Antioxidant Activity of Biological Fluids and Modified Version for Simultaneous Measurement of Total Antioxidant Power and Ascorbic Acid Concentration”, *Methods in Enzymology*, 299, 15-27, (1999).
- [60] Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S. E., “Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method”, , *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970-7981 (2004).
- [61] Roginsky, V. And Lissi, E.A., “Rewives of methods to determine chain breaking antioxidant activity in food” *Food Chemistry*, 92, 235-254 (2005).
- [62] Öztan, T., “Mor havuç konsantresi ,şalgam suyu,nar suyu ve nar ekşisi üzerinde antioksidan aktivitesi tayini ve fenolik madde profilinin belirlenmesi”, yüksek lisans tezi, *İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul (2006).
- [63] Erdik, E., Obalı, M., Yüksekışık, N., Öktemer, A., Pekel, T., İhsanoğlu, E., “Denel Organik Kimya”, *Ankara Üniversitesi*, Ankara, 133-136, (2000).
- [64] Toğrul, T., “İnstrumental Analiz” , *Ankara Üniversitesi*, Ankara, 19-38, (1995).
- [65] Lindsay S., “High Performance Liquid Chromatography”, *Analytical Chemistry by Open Learning*, Wiley, New York (1987).
- [66] Skoog D.A., James Holler F. ve Nieman T.A., “Principles of Instrumental Analysis, Fifth Edition, Kılıç E., Köseoğlu F. ve Yılmaz H., Saunders College Publishing”, US, *Bilim Yayıncılık*, Ankara. (1998).
- [67] Jaffé H.H. ve Orchin M., “Theory and Applications of Ultraviolet Spectroscopy”,

John Wiley and Sons, New York (1964).

- [68] Naczki, M. and Shahidi, F., "Extraction and analysis of phenolics in food" *Journal of Chromatography A*, 1054, 95-111 (2004)
- [69] Dao, L. and Takeoka G., "Anthocyanins. In. Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals",. CRC Press LLC. (2002).
- [70] Tura, D., Robards, K., "Sample Handling Strategies For The Determination Of Biophenols In Food And Plants", *Journal Of Chromatography A*, 975, 71-93, (2002).
- [71] Alonso-Salces, R.M., Korta, E., Barranco, A., Berrueta, L.A., Gallo, B., Vicente, F., "Determination of polyphenolic profiles of basque cider apple varieties using accelerated solvent extraction", *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:3761-3767 (2001).
- [72] Waksmondza, M., Petruczynik, A., Dragan, A., Wianowska, D., Dawidowick, A.L., Sowa, I., "Influence of the extraction mode on the yield of some furanocoumarins from *Pastinaca sativa* fruits", *Journal of Chromatography B* 800: 181-187 (2004)
- [73] Klejdus, B., Vacek, J., Adam, V., Zehnalek, J., Kizek, R., Trnkova, L., Kuban, V., "Determination of isoflavones in soybean food and human urine using liquid chromatography with electrochemical detection", *Journal of Chromatography B* 806: 101-111 (2004).
- [74] Benthin, B., Danz, H., Hamburger, M. "Pressurized liquid extraction of medicinal plants", *Journal of Chromatography A* .837:211-219 (1999).
- [75] Kaufmann, B., Christen, P. "Recent extraction techniques for natural products: microwave assisted extraction and pressurised solvent extraction", *phytochemical analysis* 13: 105-113 (2002).
- [76] Ju, Z.Y., Howard, L.R. "Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* ,51 (18). 5207-5213 (2003).
- [77] Mouly, P.P., Gaydou, E.M., Faure, R., Estienne, J.M., "Blood Orange Juice Authentication Using Cinnamic Acid Derivatives. Variety Differentiations Associated with Flavanone Glycoside Content" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 373-77, (1997).
- [78] Coulibaly, K., Jeon, I. J., "An Overview of Solid-Phase Extraction of Food Flavor Compounds and Chemical Residues", *Food Reviews International.*, 12, 131-51, (1996).
- [79] Majors, R.E., "Supercritical Fluid Extraction: An Introduction", *LC-GC Magazine of Separation Science*, 9 (2), 78, (1991).

- [80] JARVIS, A.P., Morgan, D., “Isolation of Plant Products by Supercritical-Fluid Extraction”, *Phytochemical Analysis*, 8, 217-22, (1997).
- [81] Tena, M. T., Ríos, A., Valcárcel, M., “Supercritical Fluid Extraction of t-resveratrol and Other Phenolics from a Spiked Solid”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 361 (2), 143-8, (1998).
- [82] Parr, J.F., Dolic, V., Lancaster, G., Boyd, W.E., “A microwave digestion method for the extraction of phytoliths from berbarium specimens” *Review of Palaeobotany and Palynology* 116, 203–212 (2001).
- [83] Wilkes, J.G., Conte, E.D., Kim, Y., Holcomb, M., Sutherland, J.B., Miller, D.W., “Sample preparation for the analysis of flavors and offflavors in foods” *Journal of Chromatography A* 880, 3–33. (2000)
- [84] Wu, J., Lin, L., Chau, F., “Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells”. *Ultrasonics Sonochemistry* 8, 347–352.
- [85] Mason TJ, Lorimer JP. *Applied Sonochemistry: Uses of Power Ultrasound in Chemistry and Processing*, Wiley-VCH Weenheim, 303p (2002).
- [86] Tavman Ş., Kumcuoğlu S., Akkaya Z., “Bitkisel ürünlerin atıklarında anti oksidan maddelerin ultrason destekli ekstraksiyonu”. Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü 35100 Bornova-İzmir *GIDA* 34 (3): 175-182 (2009).
- [87] Neduzhii SA., “Investigation of emulsification brought by sonic and ultrasonic oscillations”. *Soviet Physics-Acustics*, 7: 221-235 (1962).
- [88] Lauterborn W, Ohl CD., “Cavitation bubble dynamics.” *Ultrasonics Sonochemistry*, 4: 65-75 (1997).
- [89] Vinatoru M., “An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs.” *Ultrasonics Sonochemistry*, 8: 303–313 (2001).
- [90] Mulet A., Carcel JA., Benedito J., Simal S., Rossello C., “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 (1999).
- [91] Pugin B., Turner AT., “Influence of ultrasound on reaction with metals.” *In: Advances in sonocchemistry*, vol .1, TJ Mason(ed.), pp.81-118, JAI pres, London (1990).
- [92] Toma, M., Vinatoru, M., Paniwnyk, L., Mason, T.J., “ Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction.” *Ultrasonics Sonochemistry* 8, 137–142 (2001).

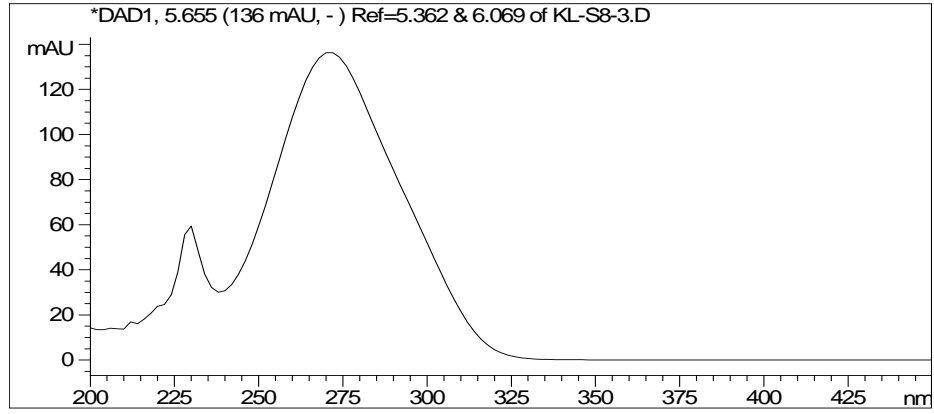
- [93] Valachovic, P., Pechova, A., Mason, T.J., “Towards the industrial production of medicinal tincture by ultrasound assisted extraction.” *Ultrasonics Sonochemistry* 8, 111–117 (2001).
- [94] Hromačková, Z., Ebringerová, A., & Valachovic, P., “Ultrasound-assisted extraction of water-soluble polysaccharides from the roots of valerian (*Valeriana officinalis* L.).” *Ultrasonics Sonochemistry*, 9, 37–42 (2002).
- [95] Paniwnyk, L., Beaufoy, E., Lorimer, J. P., & Mason, T. J., “The extraction of rutin from flower buds of *Sophora japonica*.” *Ultrasonics Sonochemistry*, 8, 299–301 (2001).
- [96] Rostagno, M. A., Palma, M., & Barroso, C. G., “Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones.” *Journal of Chromatography A*, 1012, 119–128 (2003).
- [97] Wang, L., & Weller, C. L., “Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants.” *Trends in Food Science & Technology*, 17, 300–312 (2006).
- [98] Vinatoru M, Toma M, Mason TJ., “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 (1999).
- [99] Entezari, M. H., Nazary, S. H., and Khodaparast, M. H. H. “The direct effect of ultrasound on the extraction of date syrup and its micro-organisms”, *Ultrasonics Sonochemistry*, 11: 379–384 (2004).
- [100] Rodrigues, S., Pinto, G. A. S., “Ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder”, *Journal of Food Engineering*, 80: 869–872 (2007).
- [101] Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y., Li, X., “Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran”, *Food Chemistry*, 106: 804–810 (2008).
- [102] Paniwnyk, L., Cai, H., Albu, S., Mason, T. J., Cole, R., “The enhancement and scale up of the extraction of anti-oxidants from *Rosmarinus officinalis* using ultrasound”, *Ultrasonics Sonochemistry*, 16: 287–292 (2009).
- [103] Rostagno, M. A., Palma, M., Barroso, C. G., “Ultrasound-assisted extraction of isoflavones from soy beverages blended with fruit juices”, *Analytica Chimica Acta*, 597: 265–272 (2007).
- [104] Khan, M. K., Vian, M. A., Tixier, A. S. F., Dangles, O., Chemat, F., “Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel”, *Food Chemistry*, 119: 851–858 (2010).
- [105] Londoño, J. L., Rodrigues de Lima, V., Lara, O., Gil, A., Pasa, T. B. C., Arango, G. J., Pineda, J. R. R., “Clean recovery of antioxidant flavonoids from citrus peel:

- Optimizing an aqueous ultrasound-assisted extraction method”, *Food Chemistry*, 119: 81–87 (2010).
- [106] Rostagno, M. A., Palma, M., Barroso, C. G., “Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones”, *Journal of Chromatography A*, 1012: 119–128 (2003).
- [107] Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, J. P., Mason, T. J., “Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry”, *Ultrasonics Sonochemistry*, 11: 261–265 (2004).
- [108] Seçmen, Ö., ve Gemici Y., Bekat, L. ve Leblebici, E., “Tohumlu Bitkiler Sistematiği”. *E.Ü. Fen Fakültesi Kitaplar Serisi No: 116*, Bornova, İzmir, 396 s. (1995).
- [109] Seçmen, Ö., ve Leblebici, E., “Türkiye sulak alan bitkileri ve bitki örtüsü”, *E. Ü. Fen Fakültesi Kitaplar Serisi* 158: 404 Bornova, İzmir (1997).
- [110] Davis, P.H *Lathyrus* L. In: Davis PH (ed.)(1970). “Flora of Turkey and the East Aegean Islands” vol.8 Edinburgh University Press, Edinburgh, pp. 3-4.
- [111] USDA, NRCS. 2011 The PLANTS Database ([http:// plants.usda.gov](http://plants.usda.gov), April 2011). National Plant Data Center, Baton Rouge, LA 70874-4490 USA.
- [112] Yrd.Doç.Dr.Fatma GÜNEŞ fotoğraf arşivi Kafkas Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji bölümü
- [113] Gülgün, B., (Atıl) Güneş, A., Sayman, M., Yörük, İ., “Peyzaj Mimarlığı Çalışmalarında Kullanılan Bazı Önemli Akuatik Bitkiler ve Kullanım İlkeleri” *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, No:44(1):177-188 ISSN:1018-8851 Bornova, İzmir(2007).
- [114] Slinkard, K., Singleton, V. L., “Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods”, *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 49–55, (1977).
- [115] Cuendet, M., Hostettmann, K., Potterat, O., Dyatmiko, W., Iridoid Glucosides with Free Radical Scavenging Properties from *Fragraea blumei*, *Helvetica Chimica Acta*, 80 (4), 1144-52, (1997).
- [116] Wu, Q., Wang, M., Simon, J.E., “Analytical Methods to Determine phytoestrogenic Compounds”, *Journal of Chromatography B*, 812, 325-55,(2004).
- [117] Alaşalvar, C., Al-Farsi, M., Shahidi, F., “Compositional Characteristics and Antioxidant Components of Cherry Laurel Varieties and Pekmez, *Journal of Food Science*, 70 (1), S47-S52, (2005) .

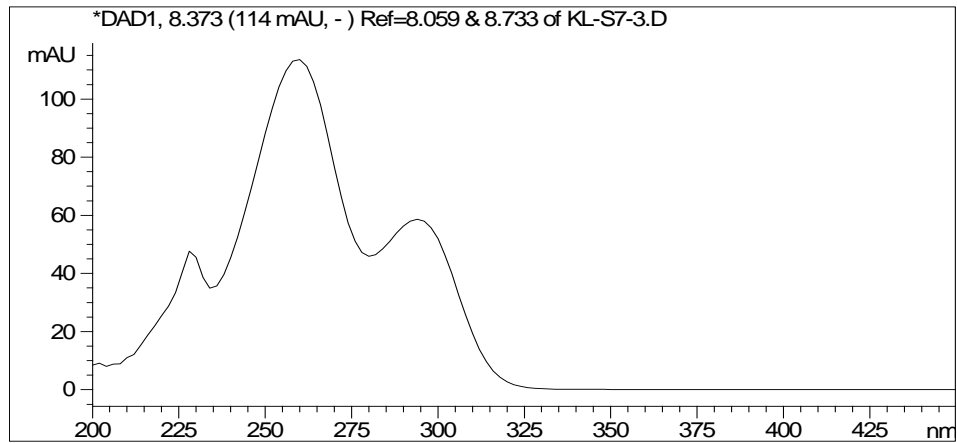
- [118] Gao, H., Shupe, T. F., Eberhardt, T. L., Hse, C. Y.,” Antioxidant Activity of Extracts from the Wood and Bark of Port Orford Cedar”, *Journal of Wood Science*, 53 (2), 147-52, (2007).
- [119] Tawaha, K., Alali, F. Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M., El-Elimat, T., “Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Selected Jordanian Plant Species”, *Food Chemistry*, 104, 1372–78, (2007).
- [120] Muchuweti, M., Nyamukonda, L., Chagonda, L. S., Ndhlala, A. R., Mupure, C., Benhura, M., “Total phenolic content and antioxidant activity in selected medicinal plants of Zimbabwe”, *International Journal of Food Science & Technology*, 41 (1), 33-8, (2006).
- [121] Khamsah, S.M., Akowah, G., Zhari, I., “Antioxidant Activity and Phenolic Content of *Orthosiphon Stamineus* Benth from Different Geographical Origin”, *Journal of Sustainability Science and Management*, 1 (2), 14-20, (2006).
- [122] Odabaşoğlu, F., Aslan, A., Cakir, A., Suleyman, H., Karagoz, Y., Bayir, Y., Halici, M., “Antioxidant Activity, Reducing Power and Total Phenolic Content of Some Lichen Species”, *Fitoterapia*, 76 216–19, (2005).
- [123] Heinonen, I. M., Lehtonen, P. J., Hopia, A. I., “Antioxidant Activity of Berry and Fruit Wines and Liquors”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (1), 25-31, (1998).

7.EKLER

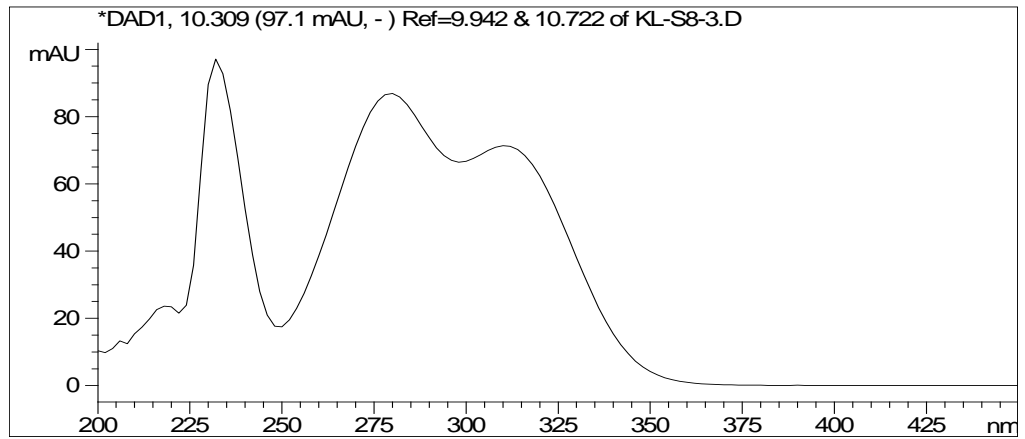
7.1. 15 Standardın kromatogramları ve maksimum absorbans yaptıkları dalga boyları



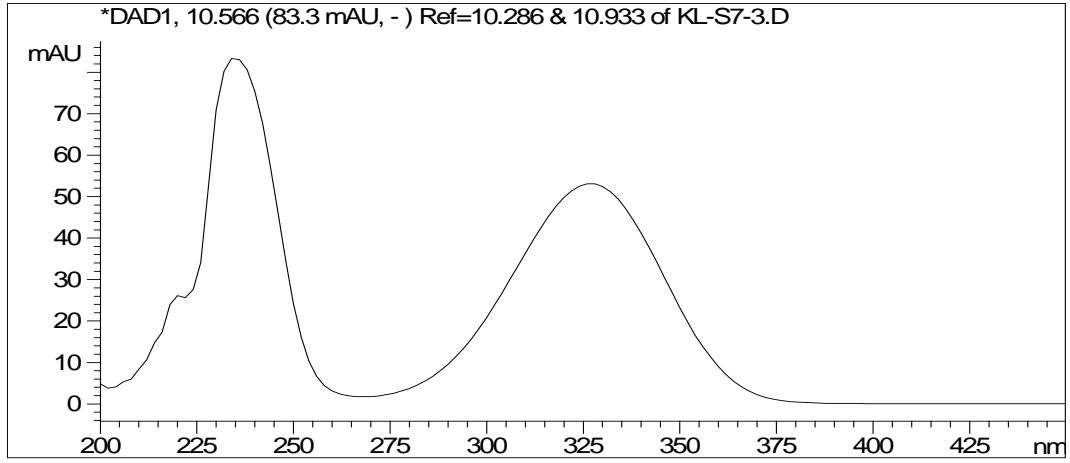
Ek şekil 1. Galik asitin kromatogramı ve maksimum dalga boyu (274 nm)



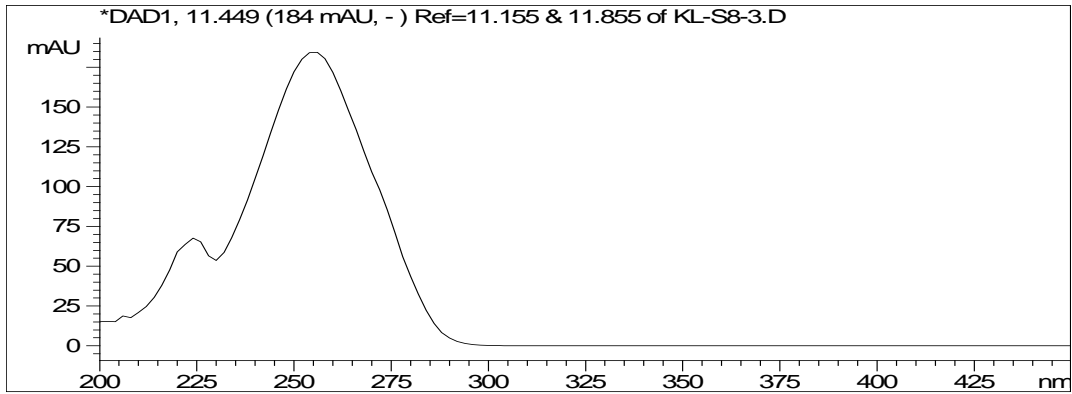
Ek şekil 2. Protokatekuik asit kromatogramı ve maksimum dalga boyu (260 nm)



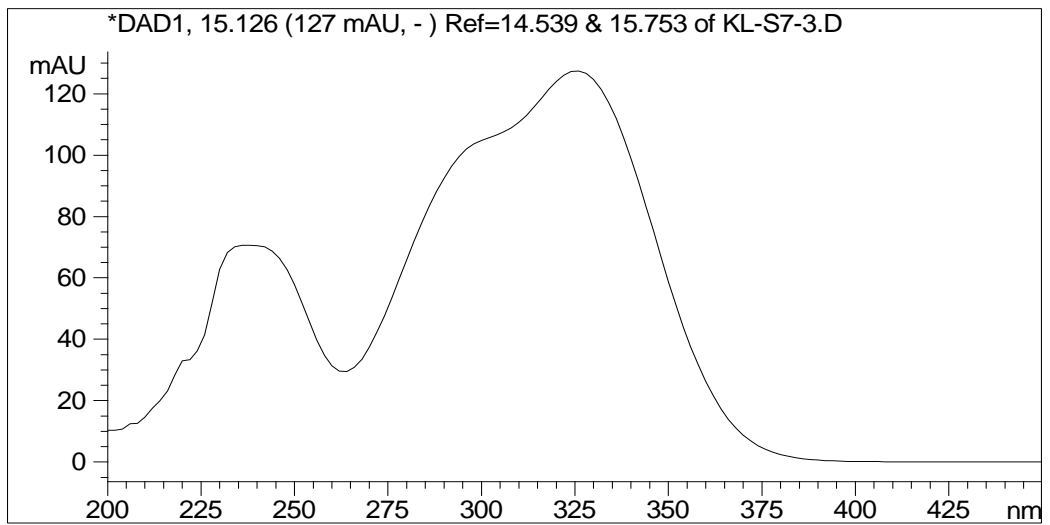
Ek şekil 3. Protokatekulaldehit kromatogramı ve maksimum dalga boyu (280 nm)



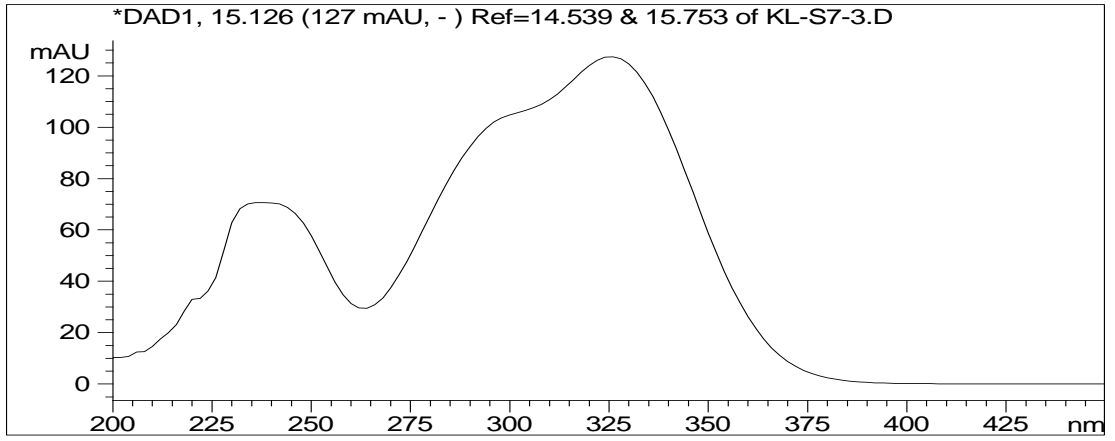
Ek şekil 4. Gentisik asit kromatogramı ve maksimum dalga boyu (324 nm)



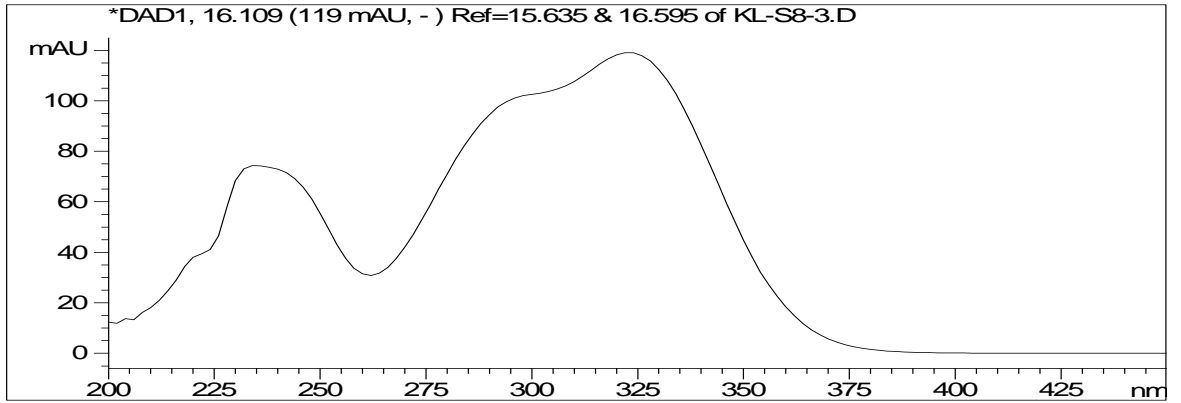
Ek şekil 5. p-Hidroksi benzoik asit kromatogramı ve maksimum dalga boyu (260 nm)



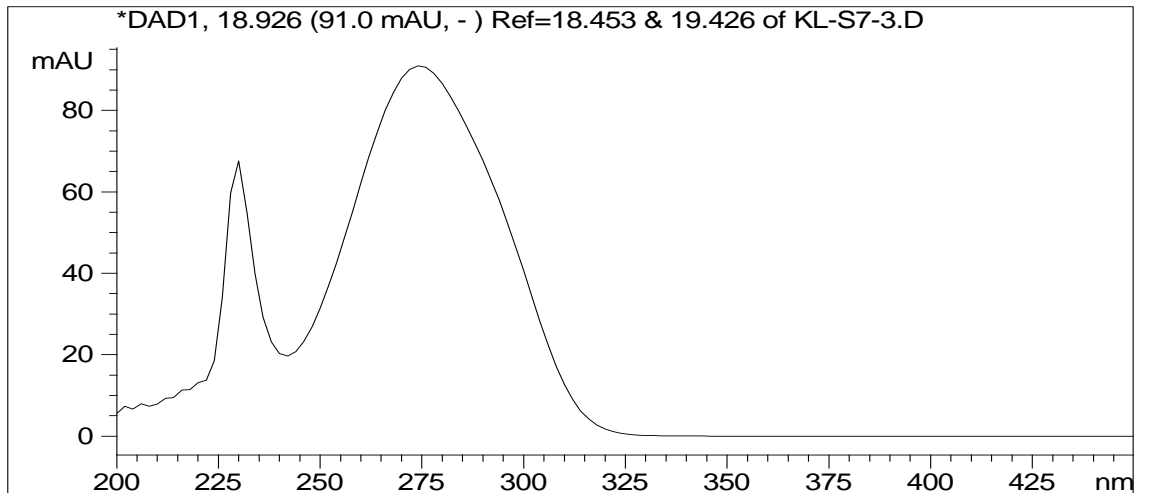
Ek şekil 6. Vanilik asit kromatogramı ve maksimum dalga boyu (260 nm)



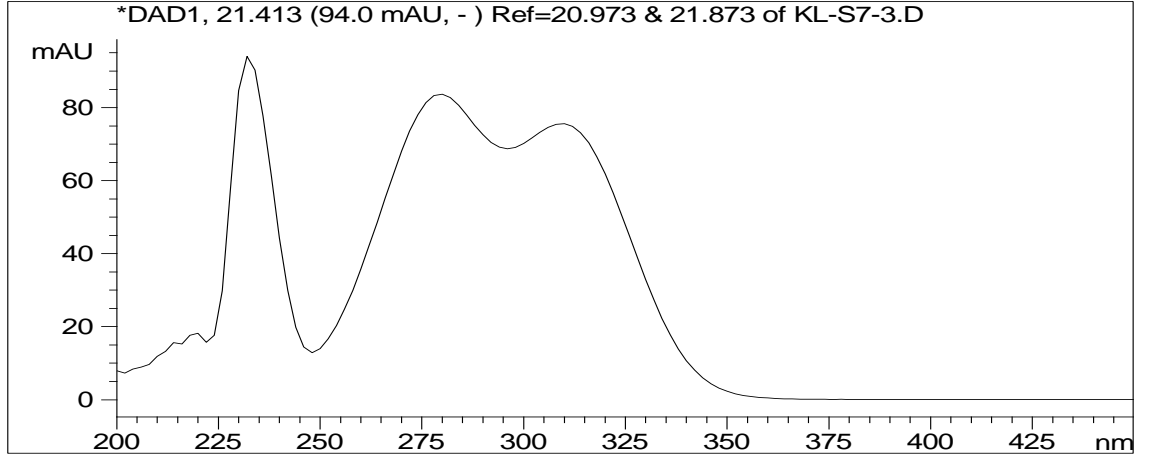
Ek şekil 7 Klorojenik asit. kromatogramı ve maksimum dalga boyu (324 nm)



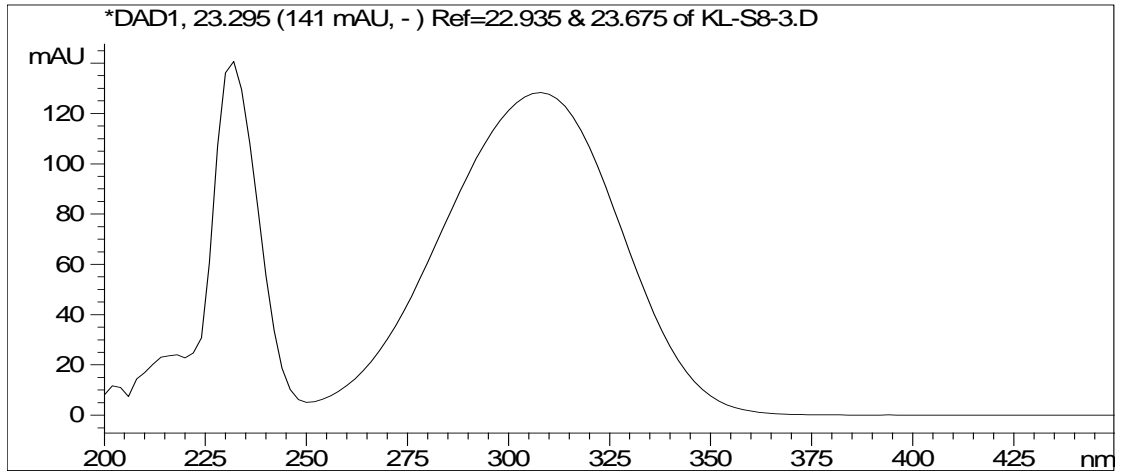
Ek şekil 8. Kafeik asit kromatogramı ve maksimum dalga boyu (324 nm)



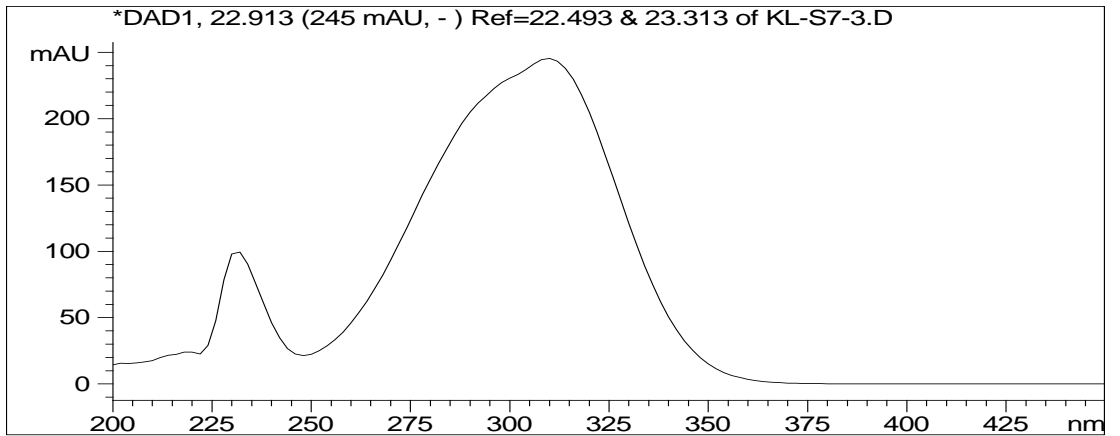
Ek şekil 9. Siringik asit kromatogramı ve maksimum dalga boyu (274 nm)



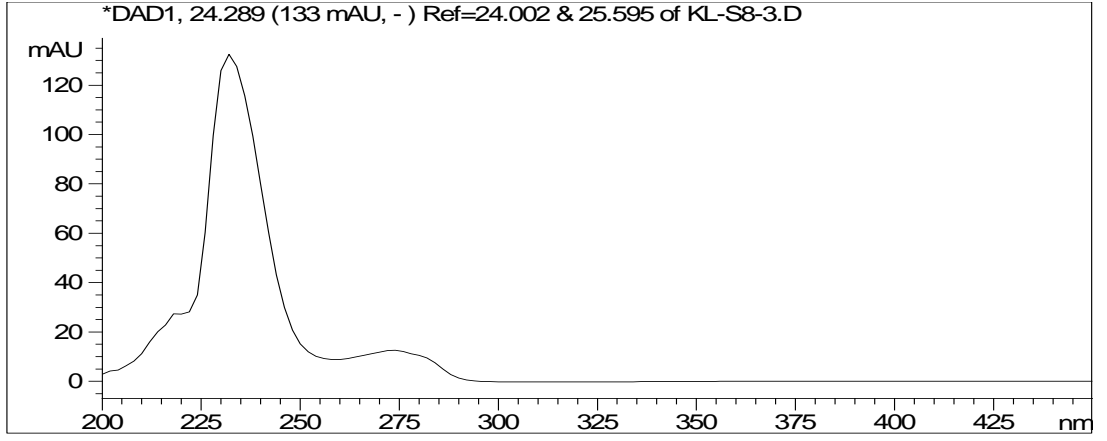
Ek şekil 10. Vanilin kromatogramı ve maksimum dalga boyu (280 nm)



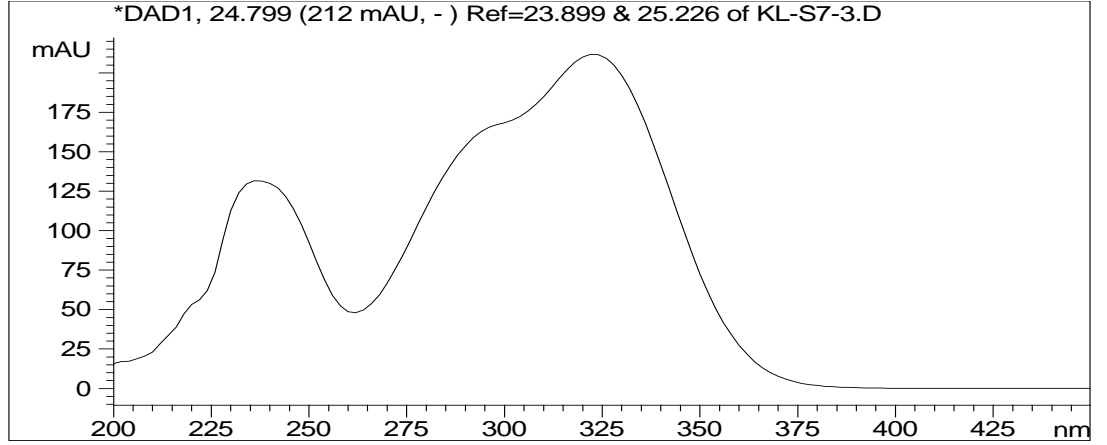
Ek şekil 11. Siringaldehit kromatogramı ve maksimum dalga boyu (308 nm)



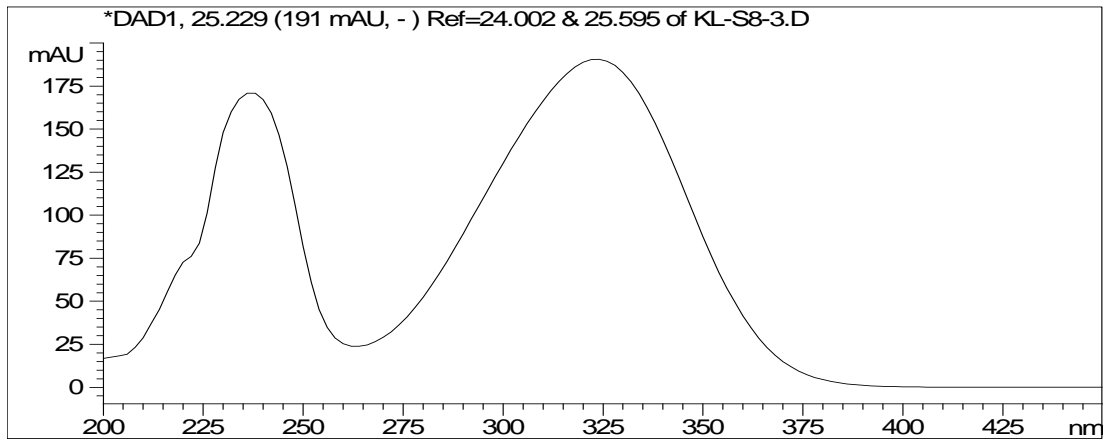
Ek şekil 12. p-Kumarik asit kromatogramı maksimum dalga boyu (308 nm)



Ek Şekil 13. Benzoik asit kromatogramı ve maksimum dalga boyu (240 nm)

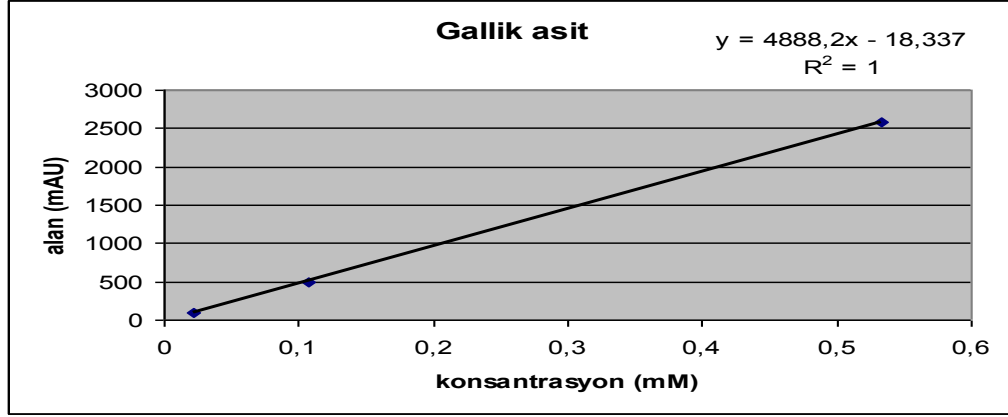


Ek Şekil 14. Ferulik asit kromatogramı ve maksimum dalga boyu (324 nm)

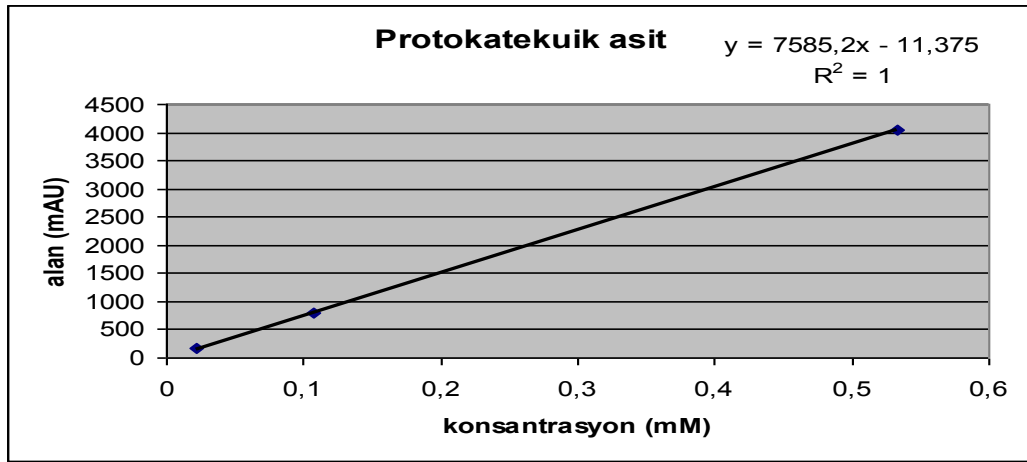


Ek Şekil 15. Sinapik asit kromatogramı ve maksimum dalga boyu (324 nm)

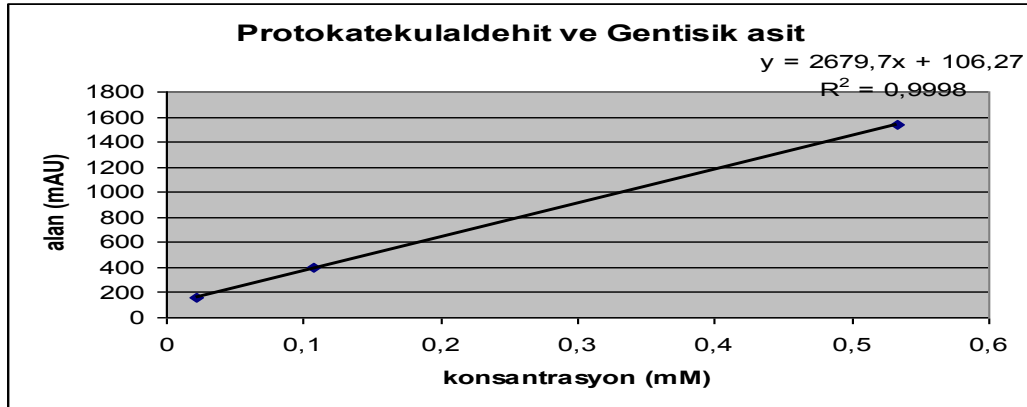
7.2. Standartların 3 farklı konsantrasyonunun, her bir standardın maksimum absorbands yaptığı dalga boyları kullanılarak elde edilen pik alanlarına karşı konsantrasyon grafikleri



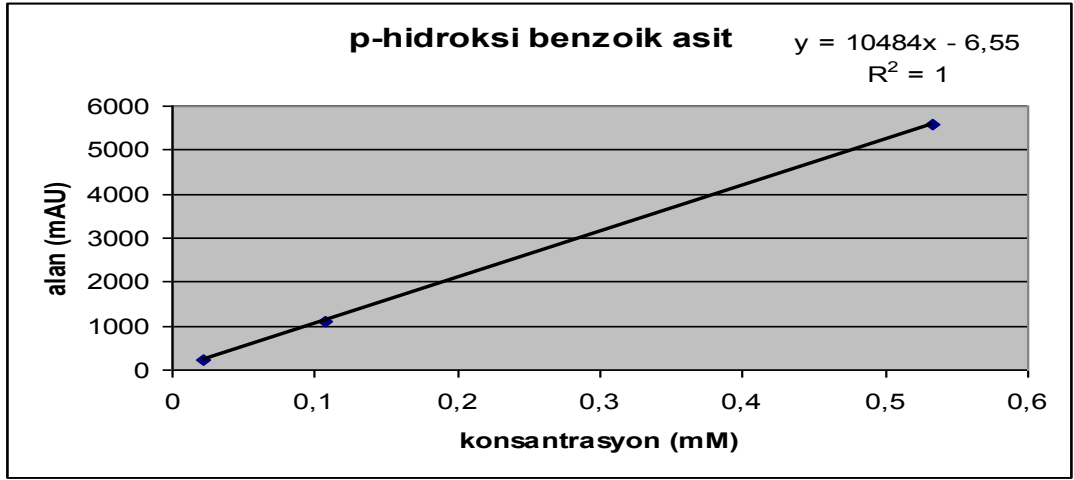
Ek şekil 16. Galik asit için konsantrasyona karşı alan grafiği



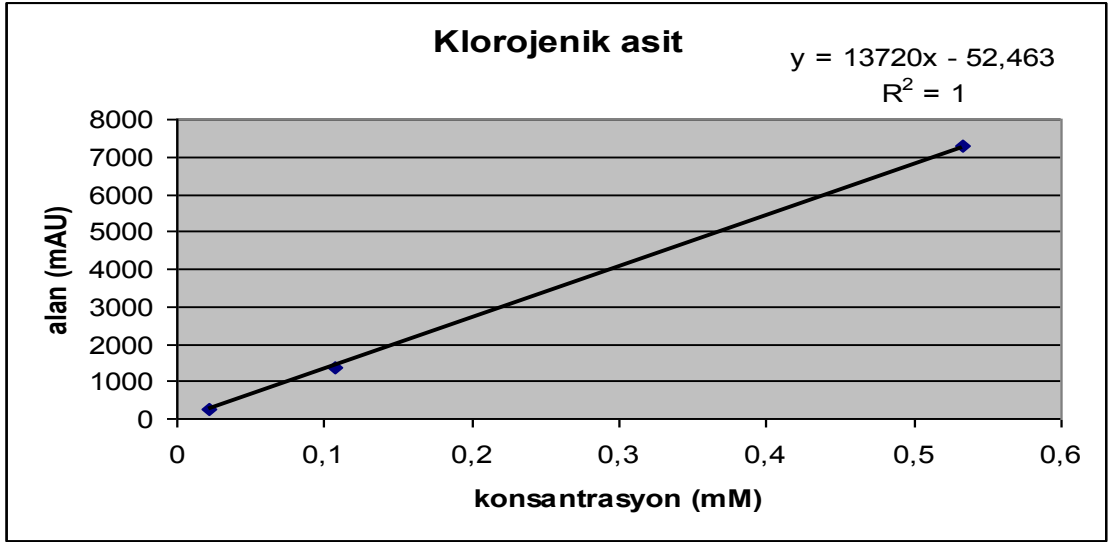
Ek şekil 17. Protokatekuik asit için konsantrasyona karşı alan grafiği



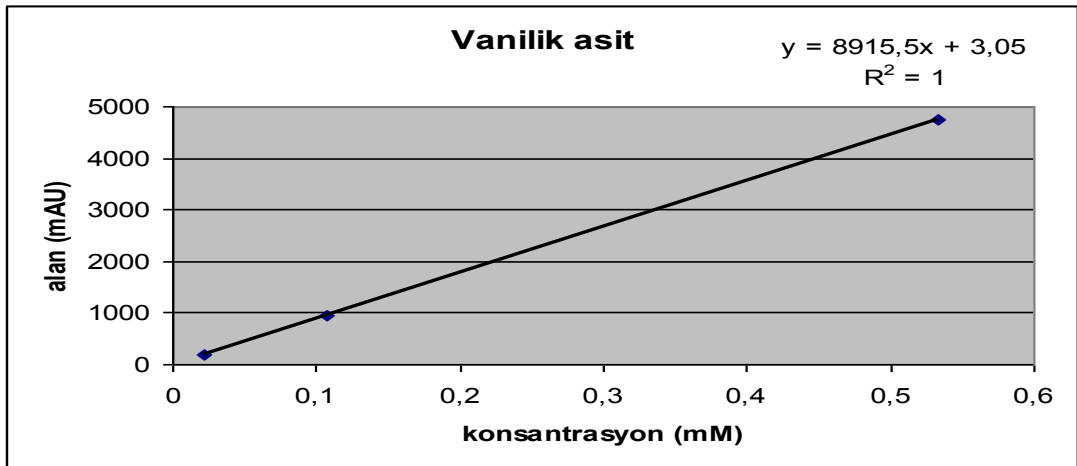
Ek şekil 18. Protokatekualdehit ve Gentisik asit için konsantrasyona karşı alan grafiği



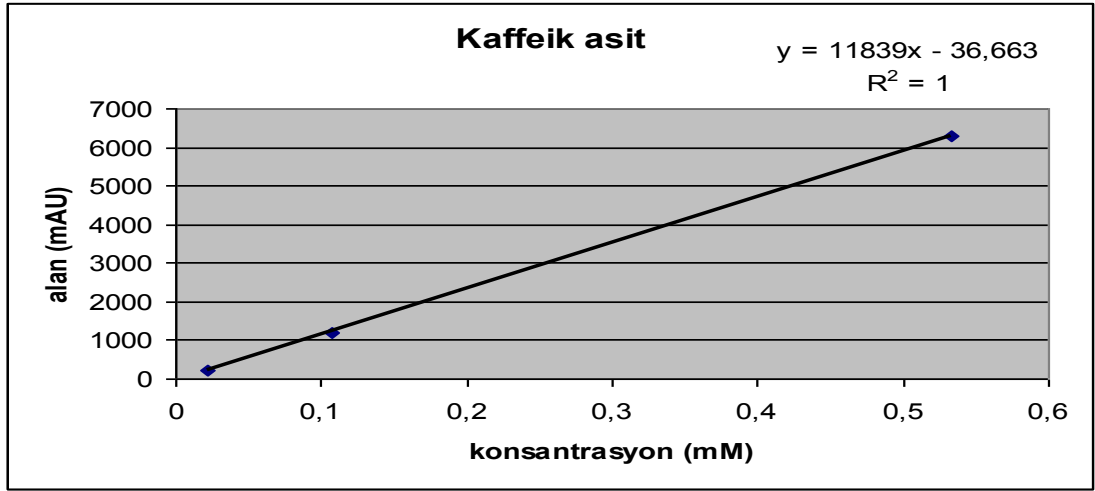
Ek şekil 19.P-Hidroksi benzoik asit için konsantrasyona karşı alan grafiği



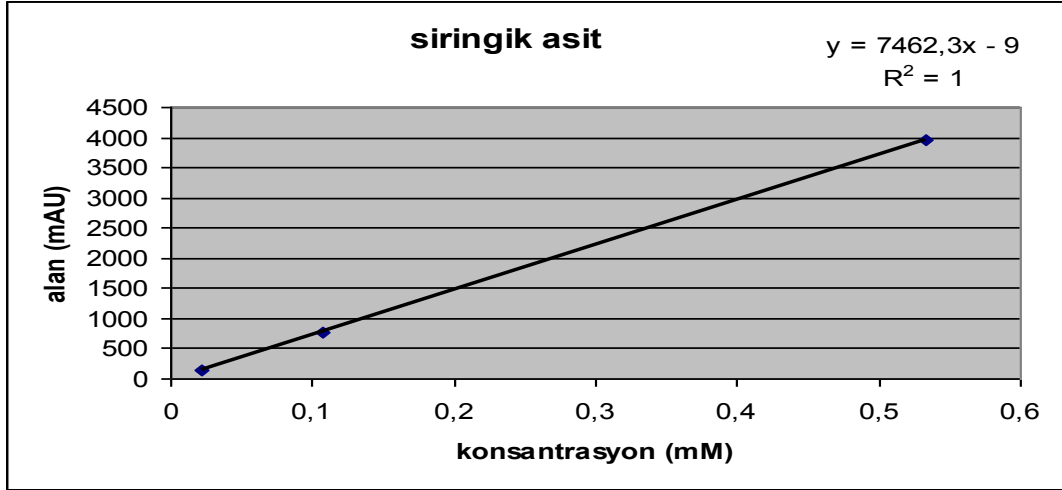
Ek şekil 20. Klorojenik asit için konsantrasyona karşı alan grafiği



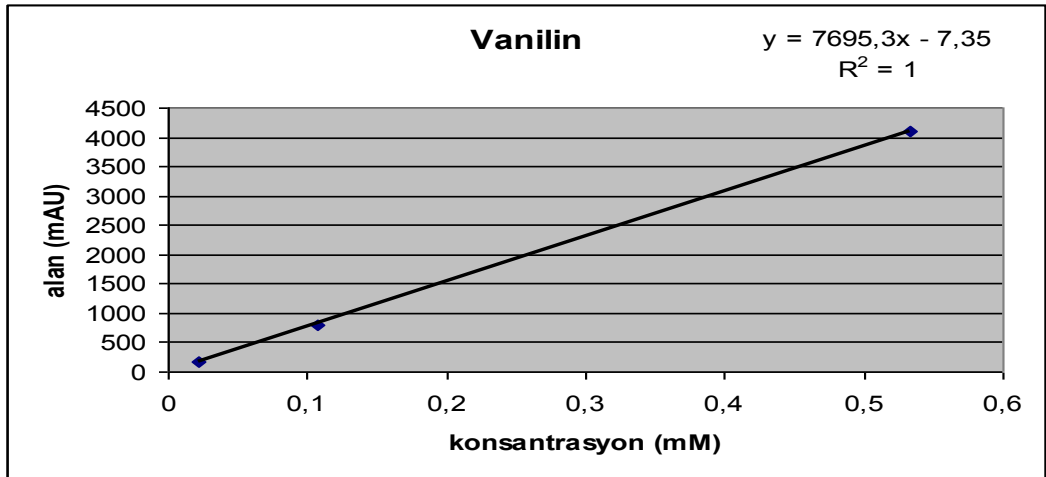
Ek şekil 21. Vanilik asit için konsantrasyona karşı alan grafiği



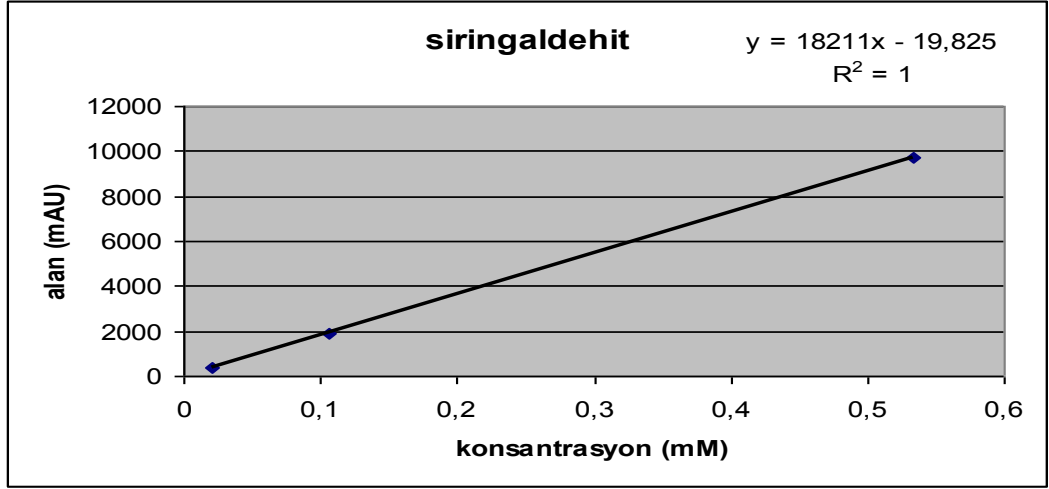
Ek şekil 22. kafeik asit için konsantrasyona karşı alan grafiği



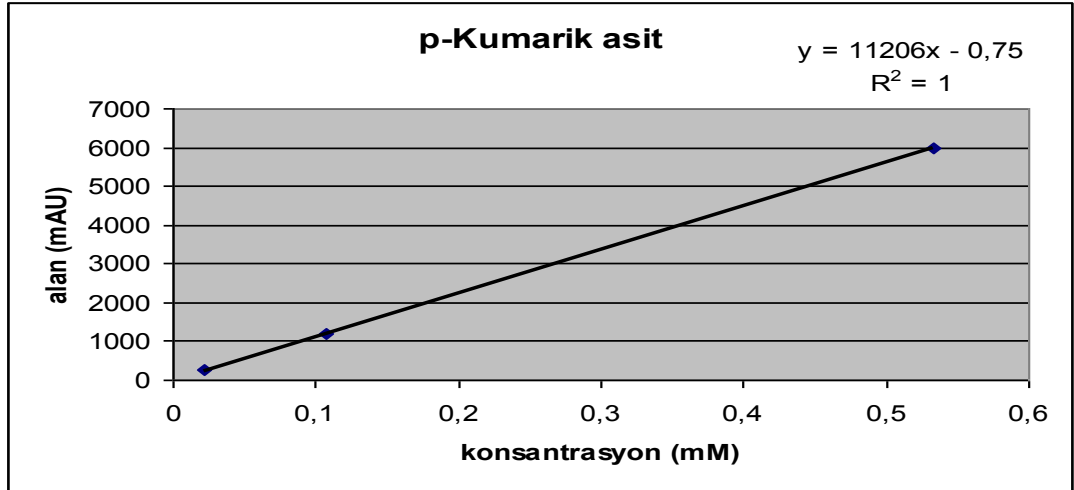
Ek şekil 23. Siringik asit için konsantrasyona karşı alan grafiği



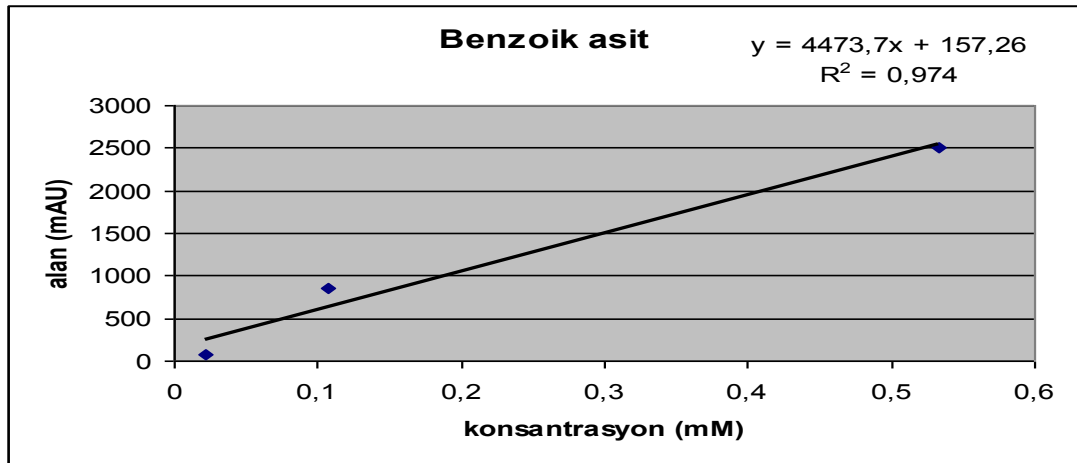
Ek şekil 24. Vanilin için konsantrasyona karşı alan grafiği



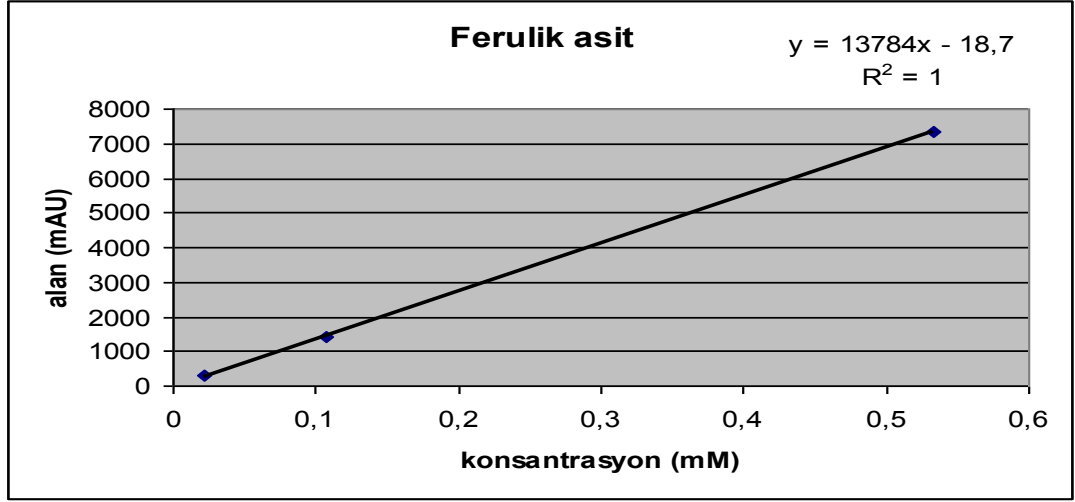
Ek şekil 25. Siringaldehit için konsantrasyona karşı alan grafiği



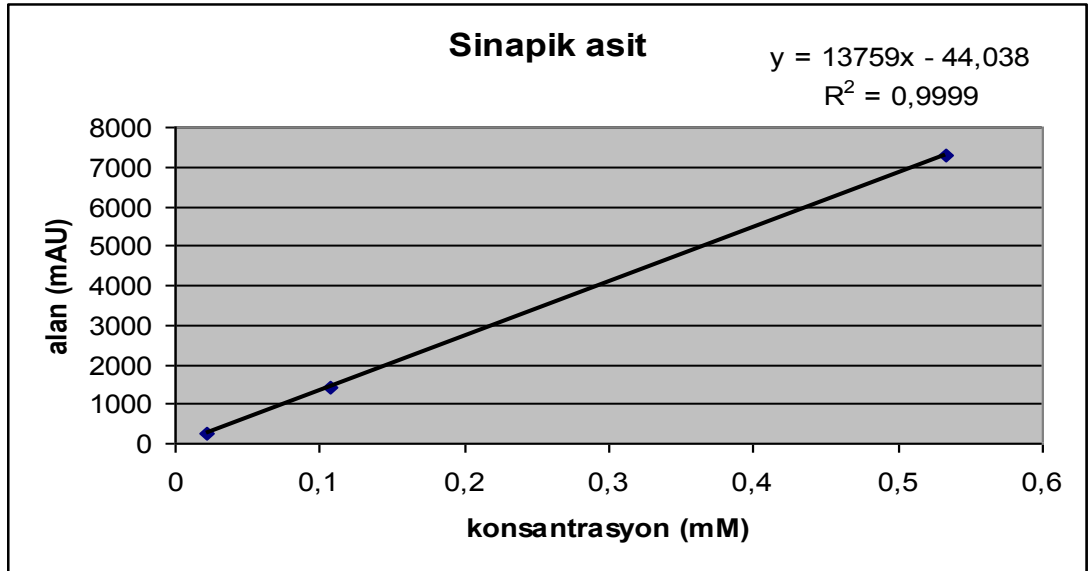
Ek şekil 26. p-Kumarik asit için konsantrasyona karşı alan grafiği



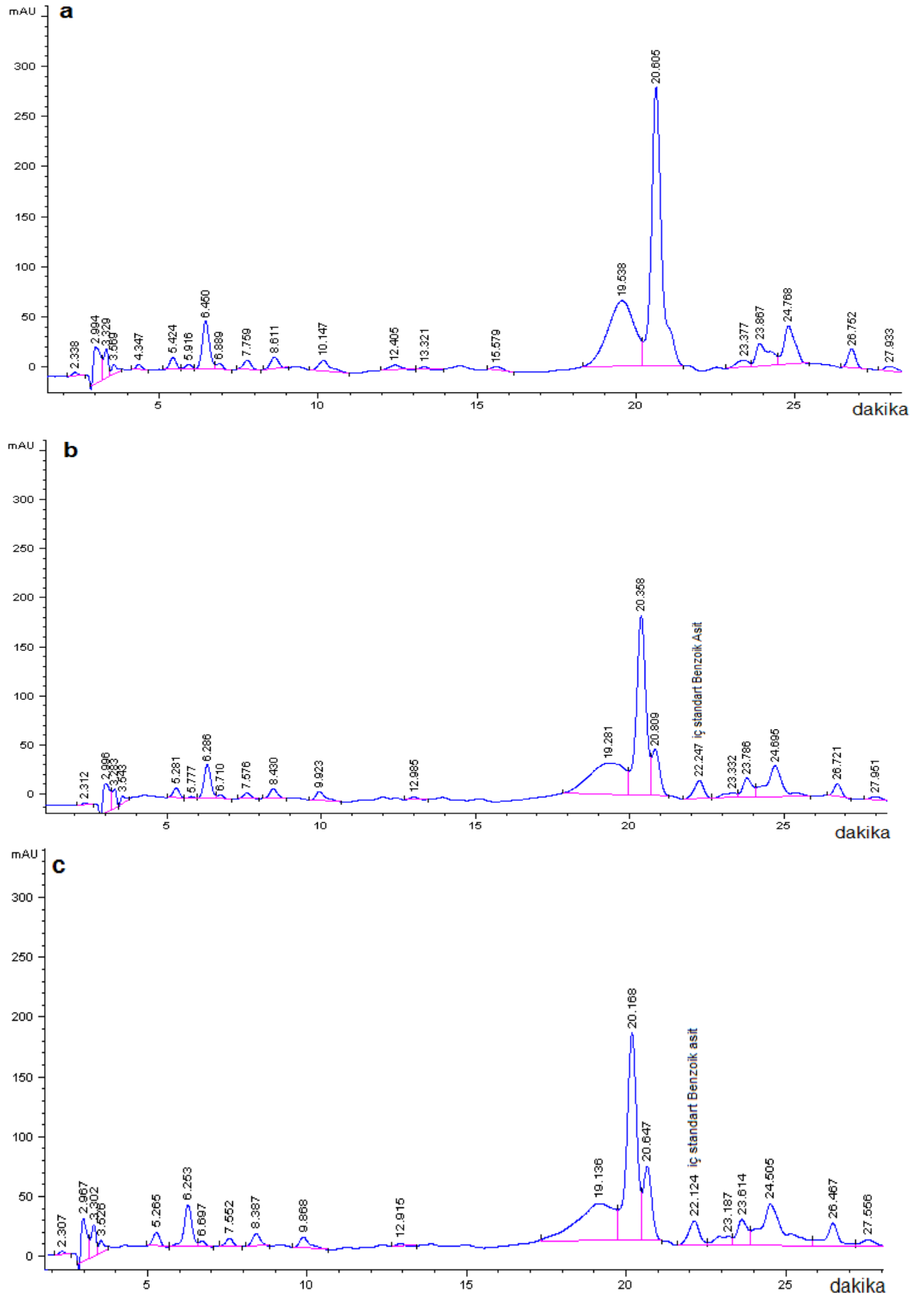
Ek şekil 27. Benzoik asit için konsantrasyona karşı alan grafiği



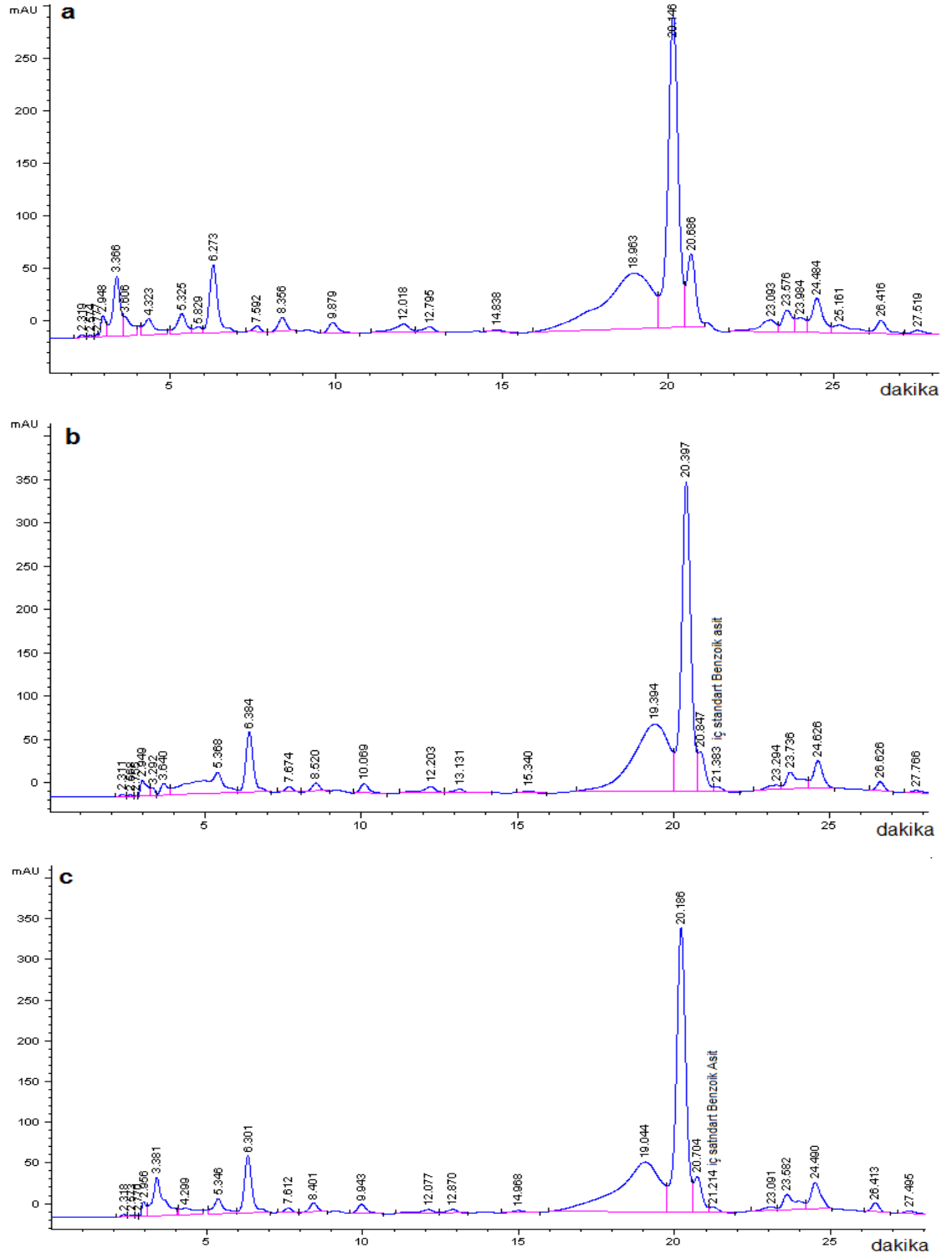
Ek şekil 28. Ferulik asit için konsantrasyona karşı alan grafiği



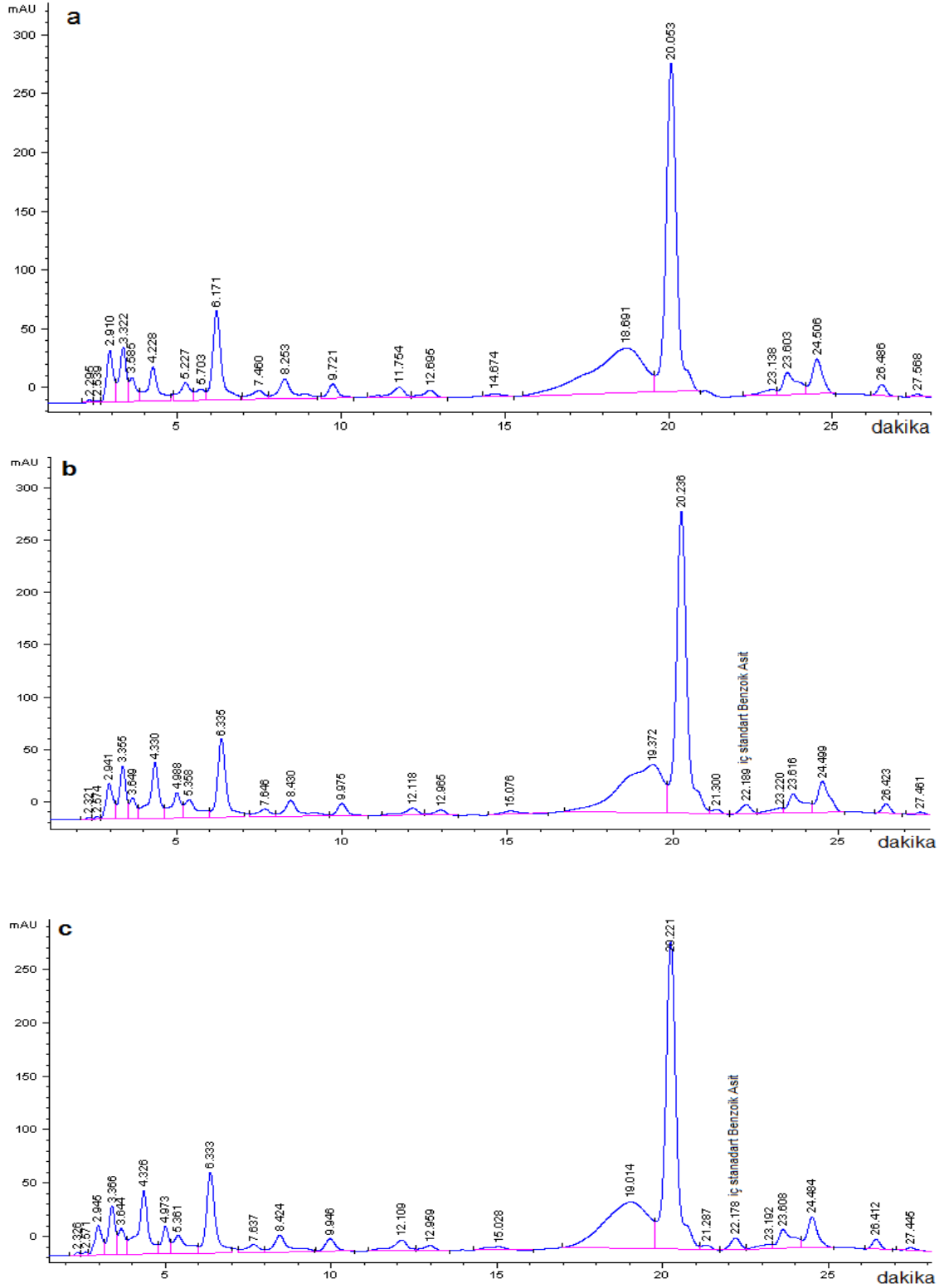
Ek şekil 29. Sinapik asit için konsantrasyona karşı alan grafiği



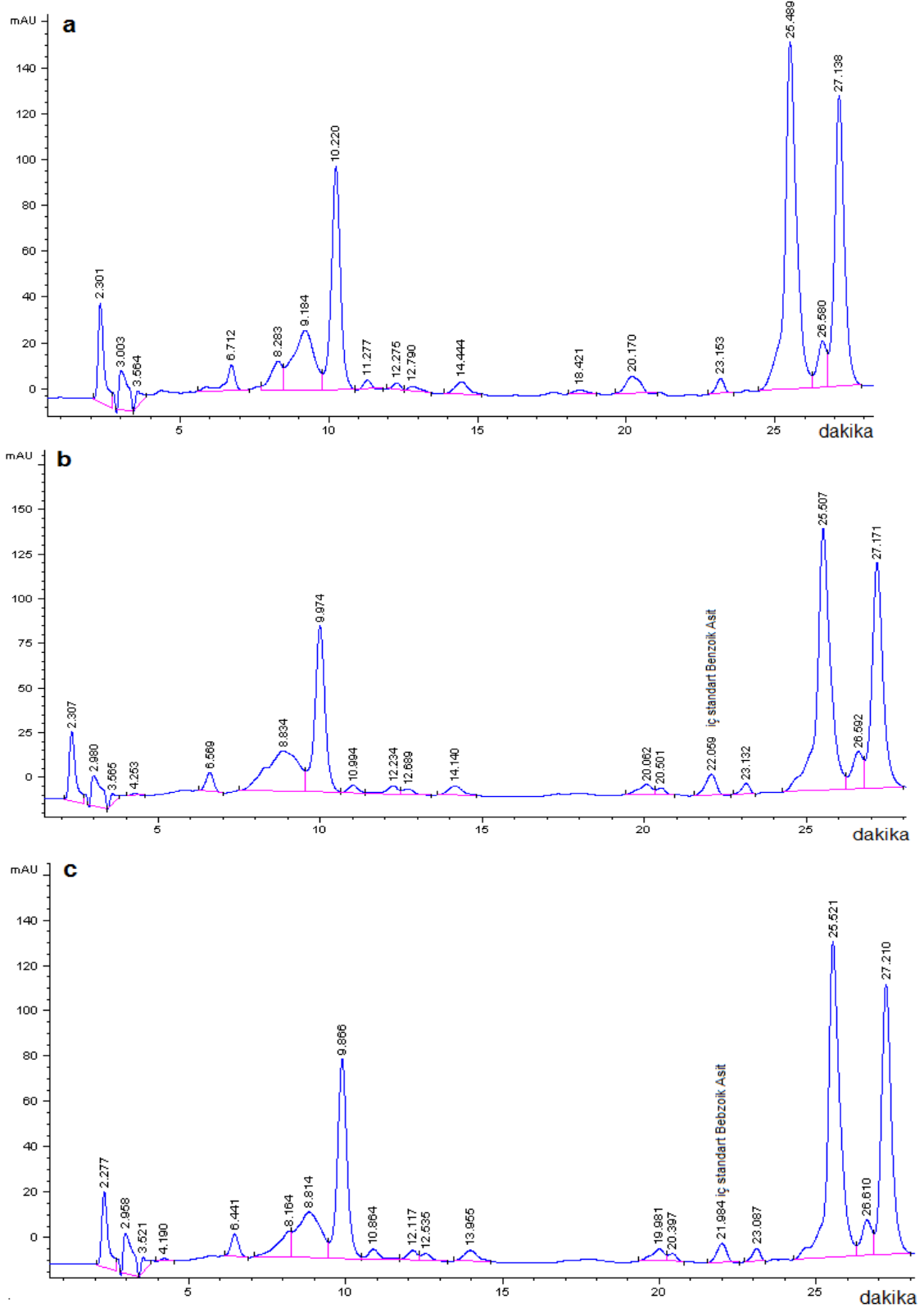
Ekşekil 30. BUM için HPLC-UV-DAD tekniği ile 280 nm'de (a) iç standartsız, (b) ve (c) iç standart eklenmiş ekstraktların seçimli ekstraksiyon sonrası elde edilen kromatogramları



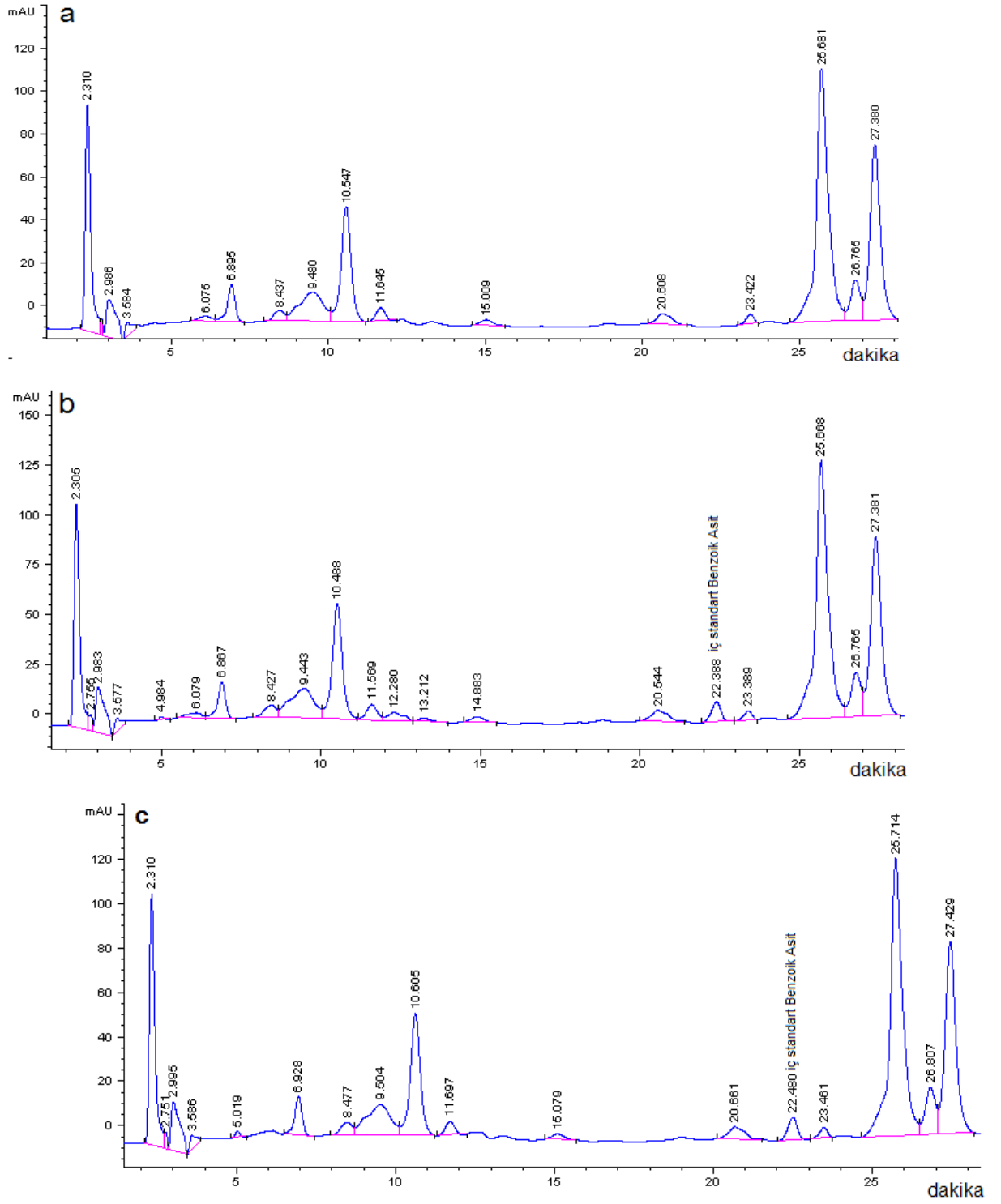
Ek şekil 31. BU%70M için HPLC-UV-DAD tekniği ile 280 nm’de (a) iç standartsız, (b) ve (c) iç standart eklenmiş ekstraktların seçimli ekstraksiyon sonrası kromatogramları



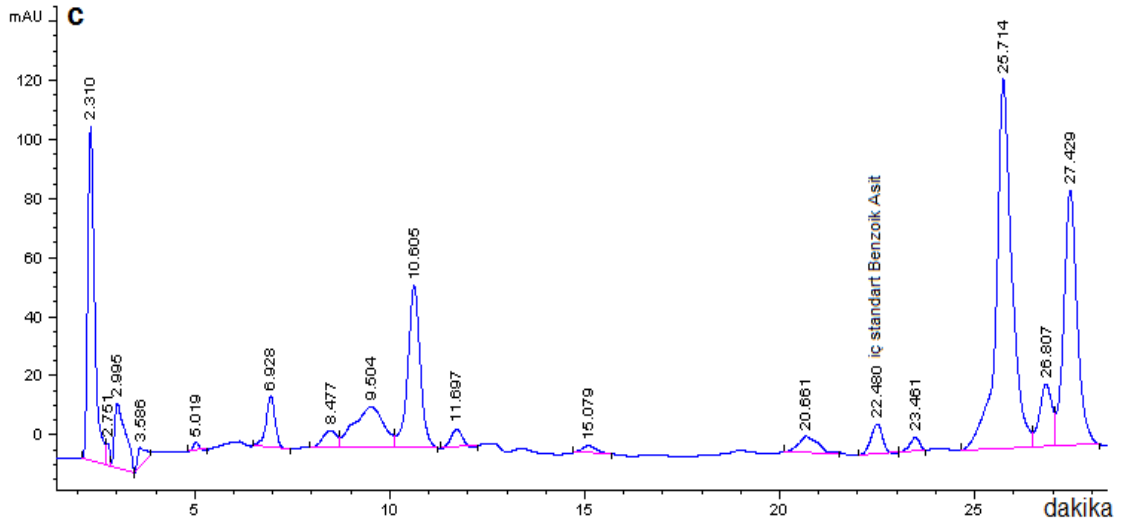
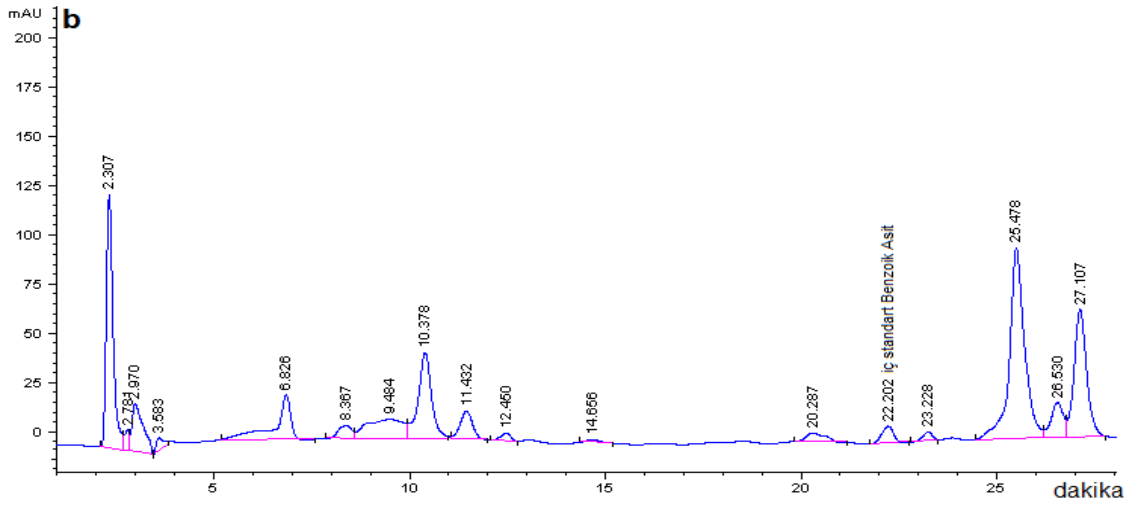
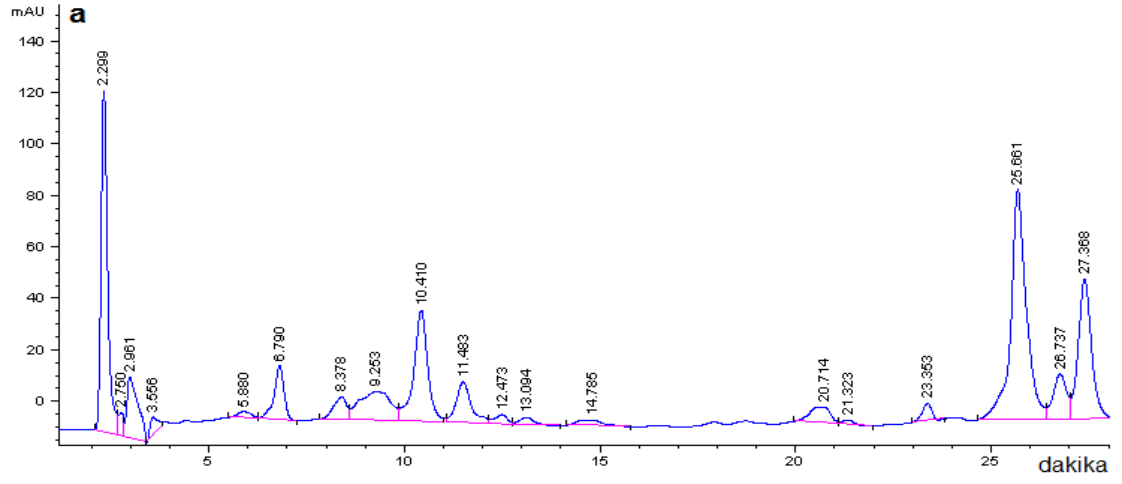
Ek şekil 32. BU%50M için HPLC-UV-DAD tekniği ile 280 nm’de (a) iç standartsız, (b) ve (c) iç standart eklenmiş ekstraktın seçimli ekstraksiyon sonrası elde edilen kromatogramları



Ek şekil 33. SEM için HPLC-UV-DAD tekniği ile 280 nm’de (a) iç standartsız, (b) ve (c) iç standart eklenmiş ekstraktların seçimli ekstraksiyon sonrası elde edilen kromatogramları

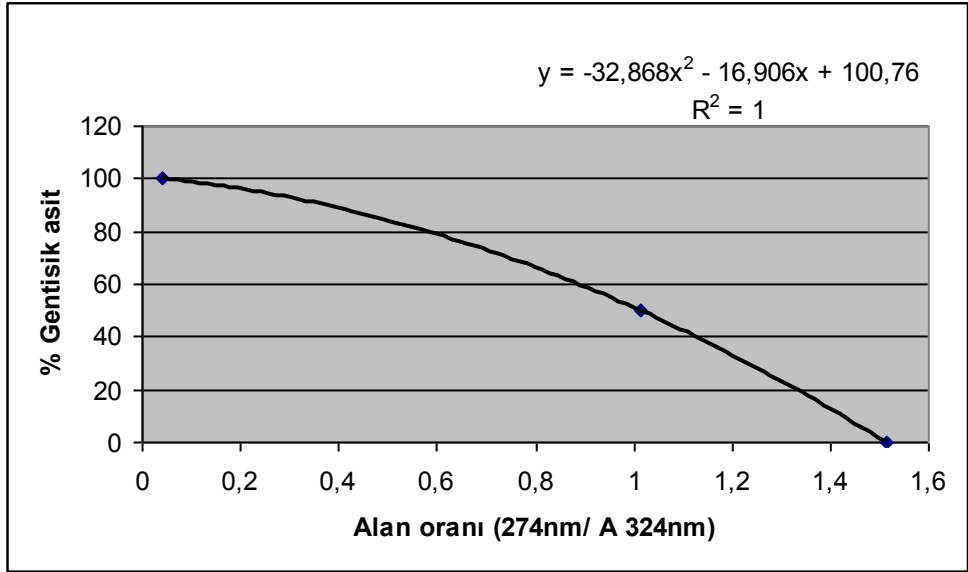


Ek Şekil 34. SE%70Miçin HPLC-UV-DAD tarafından 280 nm'de (a) iç standartsız, (b) ve (c) iç standart eklenmiş ektrakların Őeçimli ekstraksiyon sonrası elde edilen kromatogramları



Ek şekil 35. SE%50M için HPLC-UV-DAD tekniği ile 280 nm’de (a) iç standartsız, (b) ve (c) iç standart eklenmiş ekstraktların seçimli ekstraksiyon sonrası elde edilen kromatogramları

7.3



Ek şekil 36. Gentisik asit için 274 nm ve 324 nm dalga boylarındaki alanların oranına karşı % Gentisik asit grafiği

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : inan DURSUN
Dogum Yeri : Selim
Dogum Tarihi : 15.04.1984
Medeni Hali : : Bekar
Yabancı Dili : : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Kars Fen Lisesi (1999-2002)
Lisans : Çukurova Üniversitesi (2003-2007)
Yüksek Lisans : Kafkas üniversitesi (2008-)

Çalıştığı Kurum ve Yıl : Özel Ders Dersanesi İĞDIR (2008-2010), Kars Kavram
Dersanesi KARS (2010-)

Uluslararası Bildiriler

1. Akdeniz, F., Akyüz, E., Yucayurt, G., Dursun, İ., Burnaz, N.A., Güneş, F., Gökçe, G., Akgül S., Küçük, M., “Phenolic compositions of leaves, barks and stems of common rhododendron and cherry laurel”, 6th aegean analytical chemistry days, OP 28 Denizli, Turkey 9-12 october 2008
2. Akdeniz, F., Yucayurt, G., Gökçe, G., Dursun, İ., Küçük, M., Akyüz, E., Güneş, F., Akgül, S., “A kinetic study on the antioxidant activities of supercritical extracts from rhododendron and Lourocerasus species’ leaves”, 6th aegean analytical chemistry days, PPI018, Denizli, Turkey 9-12 october 2008

Ulusal Bildiriler

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).